



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Variabilidad genética y distribución  
espacial del lirio azteca  
(*Sprekelia formosissima*)**

**Tesis  
que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias en Biosistemática y  
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Alejandro Velasco Ramírez**

**Zapopan, Jalisco**

**Enero de 2017**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

## Variabilidad genética y distribución espacial del lirio azteca (*Sprekelia formosissima*)

Tesis  
que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biosistemática y  
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta  
Alejandro Velasco Ramírez

DIRECTOR  
Dra. Martha Isabel Torres Morán

Zapopan, Jalisco

Enero de 2017



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Variabilidad genética y distribución espacial de lirio Azteca  
(*Sprekelia formosissima* (L.) Herb.).

Por

Ing. Alejandro Velasco Ramírez

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos  
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dra. Martha Isabel Torres Morán  
Director de Tesis e integrante del jurado

05 Enero 2017

Fecha

Dr. Aarón Rodríguez Contreras  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

09 Enero 2017

Fecha

Dr. Miguel Ángel Macías Rodríguez  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

06/ENERO/2017

Fecha

Dra. Ana Paulina Velasco Ramírez  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

06/Enero/2017

Fecha

Dra. Araceli Rodríguez Sahagún  
Sinodal e integrante del jurado

05/12/16

Fecha

## **AGRADECIMIENTOS**

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice.....	I
Índice de figuras.....	III
Índice de cuadros.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>2</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>2</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<i>El uso y la importancia de los recursos Fitogenéticos.....</i>	<i>2</i>
<i>Generalidades y descripción del género Sprekelia.....</i>	<i>4</i>
<i>Descripción morfológica de Sprekelia formosissima.....</i>	<i>5</i>
<i>Uso y aprovechamiento del lirio azteca S. formosissima.....</i>	<i>5</i>
<i>Plasticidad fenotípica.....</i>	<i>7</i>
<i>Marcadores moleculares.....</i>	<i>9</i>
<i>ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).....</i>	<i>9</i>
<i>Análisis espacial de diversidad y distribución de plantas.....</i>	<i>10</i>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<i>Material vegetal.....</i>	<i>12</i>
<i>Extracción de ADN genómico.....</i>	<i>14</i>
<i>Amplificación por PCR para el marcador ISSR.....</i>	<i>15</i>

<i>Análisis de datos moleculares.....</i>	<b>16</b>
<i>Análisis espacial de diversidad y distribución de plantas.....</i>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>38</b>

## INDICE DE FIGURAS

N° DE FIGURA	TITULO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b>	Esquema de Jerarquía de expresión de los genes propuesto por Schlichting & Smith (2002) en la modificación fenotípica de los organismos vegetales.	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b>	Patrón de amplificación de muestras de <i>Sprekelia formosissima</i> y <i>Zephyranthes fosteri</i> con el iniciador 898 del marcador ISSR. M = Marcador de peso molecular de 200 pb.	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b>	Dendrograma producido con el marcador ISSR en colectas de <i>S. formosissima</i> y <i>Z. fosteri</i> .	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b>	Simulación $K=8$ generada por el programa STRUCTURE donde se observa la asignación de cada individuo (barras) a un grupo.	<b>23</b>
<b>Figura 5.</b>	Gráfica biplot de componentes principales para variables climáticas en colectas de <i>S. formosissima</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b>	Ubicación geográfica de las poblaciones de estudio de <i>S. formosissima</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 7.</b>	Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>S. formosissima</i> , agrupadas por el marcador ISSR en el cluster II, con referencia en el piso bioclimático correspondiente.	<b>32</b>
<b>Figura 8.</b>	Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>S. formosissima</i> , agrupadas por el marcador ISSR en el cluster III, con referencias del piso bioclimático correspondiente.	<b>33</b>
<b>Figura 9.</b>	Ubicación geográfica de las poblaciones de	<b>34</b>

*S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster IV, con referencias del piso bioclimático correspondiente

- Figura 10.** Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster V, con referencias del piso bioclimático correspondiente **35**
- Figura 11.** Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster Vi, con referencias del piso bioclimático correspondiente. **36**

## INDICE DE CUADROS

N° DE FIGURA	TITULO	PÁGINA
<b>Cuadro 1</b>	Colectas de <i>Sprekelia formosissima</i> utilizadas para el estudio de variabilidad y depositadas en el Instituto de Botánica UdeG.	<b>13</b>
<b>Cuadro 2</b>	Iniciadores y concentraciones utilizados en las pruebas de selección.	<b>15</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Variables bioclimáticas de WorldClim-Global Climate Data.	<b>18</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Estaciones climatológicas utilizadas para el estudio de las relaciones bioclimáticas y la distribución espacial de <i>S. formosissima</i> .	<b>18</b>
<b>Cuadro 5.</b>	Proporción de loci polimórficos por iniciador para el marcador ISSR en colectas de <i>S. formosissima</i> .	<b>20</b>
<b>Cuadro 6.</b>	Valores de diferenciación genética y heterocigocidad para la simulación de ocho grupo en colectas de <i>S. formosissima</i> .	<b>24</b>
<b>Cuadro 7.</b>	Valores propios de la matriz de correlación para componentes principales de datos climáticos de colectas de <i>S. formosissima</i> .	<b>25</b>
<b>Cuadro 8.</b>	Vectores característicos para componentes principales de datos climáticos de colectas de <i>S. formosissima</i> .	<b>26</b>

## RESUMEN

El lirio azteca *Sprekelia formosissima* (Amaryllidaceae) es una especie cuya distribución se encuentra en México y Guatemala. En México se extiende desde Chihuahua hasta Chiapas. Exhibe variación en el color, forma y tamaño de sus hojas y flores. Por esta razón, se han propuesto tres especies *S. formosissima*, *S. clintiae* y *S. howardii*. El trabajo documenta la variabilidad genética de 22 poblaciones de *Sprekelia formosissima* utilizando el marcador molecular ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Con la información generada, se calcularon los coeficientes de similitud entre las poblaciones, la diferenciación genética en términos de frecuencias alélicas ( $F_{st}$ ) y heterocigocidad promedio ( $H_e$ ). Los resultados mostraron niveles altos de variabilidad entre y dentro de las poblaciones. No se encontró evidencia de diferentes especies entre las mismas. El análisis de distribución espacial y bioclimas apoyó los resultados obtenidos en el análisis molecular y sugiere que la agrupación de los individuos en el dendrograma es resultado de diferencias en el ADN posiblemente ocasionados por los diferentes ambientes de crecimiento. La distribución geográfica y bioclimática de las poblaciones se muestra en mapas.

## ABSTRACT

The aztec lily (*Sprekelia formosissima*, Amaryllidaceae) is a species whose distribution is found in Mexico and Guatemala. In Mexico it extends from Chihuahua to Chiapas. It shows morphological and floral diversity and therefore three species have been formally described: *S. formosissima*, *S. clintiae* and *S. howardii*. The present work documents the genetic variability of 22 population of the aztec lily using the molecular marker ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). We estimated the coefficient of similarity among population, the allelic frequencies (Fst) and the average heterozygosity (He). The results showed high levels of genetic variation among and within the population. No evidence of different species was found among them. The analysis of the spatial distribution and bioclimate supported the results obtained in the molecular analysis, since it suggests that the association of the individuals in the dendrogram corresponds to the DNA changes caused by different environments. We used maps to show the geographical and bioclimate distribution of the populations.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas bulbosas, poseen una posición distintiva en los jardines del mundo. Sus tallos subterráneos les permiten sobrevivir a condiciones desfavorables de crecimiento. En el caso del lirio azteca [*Sprekelia formosissima* (L.) Herb., Amaryllidaceae], su flor elegante con tépalos rojos la han convertido en una planta con potencial ornamental.

*Sprekelia formosissima* es endémica de México. Su presencia se ha registrado desde Chihuahua hasta Chiapas (Martínez-Noguez, 2014). Crece principalmente en el bosque tropical caducifolio y el bosque mixto de pino y encino en un rango elevacional que va desde el nivel del mar hasta los 3,000 m. Exhibe variación morfológica en bulbos, hojas y flores. Los bulbos son ovoides y su tamaño varía de 3.5-7 cm de largo y 2.5-5 cm de diámetro. Las hojas son ensiformes y su tamaño varía de 10 a 50 cm de largo y de 7-12 mm de ancho. Su color es verde o glauco. La longitud de los tépalos puede ser de 5 a 15 cm. Este es el caso de un recurso fitogenético, potencialmente útil como ornamental, conocer y describir su variación es importante.

Martínez-Noguez (2014) analizó la variación fenológica y morfológica de *Sprekelia formosissima*. Según el autor, las plantas florecen de febrero a octubre. Las principales variaciones en estas estructuras, son apreciables en las longitudes y proporciones que se encuentran en el pedicelo, bráctea, pedúnculo, cuello, pétalos así como en la longitud de la hoja y la forma del ápice el cual es notoriamente variable. Estos resultados no permiten aseverar la existencia de otras especies para *Sprekelia*. La variabilidad genética es la variación del material genético de una población o especie. Proponemos determinar la variación genética en *Sprekelia formosissima* utilizando el marcador molecular ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).

## JUSTIFICACIÓN

La conservación de un recurso fitogenético implica su conocimiento. En el caso de especies silvestres con potencial ornamental, es necesario documentar sus

características para aumentar las probabilidades de éxito en programas de mejoramiento genético.

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la variabilidad genética y distribución espacial de *Sprekelia formosissima*

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar la existencia de una relación entre la distribución geográfica de *Sprekelia formosissima* y su variabilidad genética.

Determinar la estructura de la variabilidad genética.

Evaluar la validez de las diferentes especies propuestas dentro de *Sprekelia*.

### **HIPÓTESIS**

Es posible detectar variabilidad genética inter e intrapoblacional en colectas de *S. formosissima*, utilizando el marcador molecular ISSR. Se podría determinar si la variación morfológica de *S. formosissima* es producto de su extensa distribución geográfica y de las distintas características ambientales a las que se encuentra expuesta.

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### ***El uso y la importancia de los recursos fitogenéticos***

Según el Convenio de la Diversidad Biológica (CDB), los recursos genéticos son cualquier material de origen animal o vegetal, microorganismos u otros que contengan unidades funcionales de herencia. Incluye genes, secuencias de ADN, extractos biológicos, semillas y plasma (Hawtin *et al.*, 1996).

El uso de los recursos fitogenéticos se refiere al proceso de investigación de sus propiedades y a su utilización para incrementar el conocimiento científico o bien para el desarrollo de productos comerciales. El rápido desarrollo de la biotecnología ha permitido utilizar los recursos fitogenéticos en formas tales que no solamente han cambiado esencialmente nuestra comprensión del mundo

viviente, sino también ha llevado al desarrollo de nuevos productos y prácticas que contribuyen al bienestar del ser humano, desde importantes medicamentos hasta métodos que mejoran la seguridad en el suministro de alimentos. También ha mejorado los métodos de conservación que contribuyen a salvaguardar la biodiversidad global.

Los recursos fitogenéticos pueden tener un uso comercial o no comercial. En su uso no comercial, los recursos genéticos pueden utilizarse para mejorar el conocimiento o comprensión del mundo natural, con actividades que varían desde la investigación taxonómica al análisis de ecosistemas. Este trabajo normalmente es realizado por institutos de investigación académicos y públicos. En contraste, en su uso comercial, las empresas pueden utilizar los recursos genéticos para desarrollar enzimas especializadas, genes mejorados o moléculas. Los recursos pueden utilizarse en la protección de los cultivos, en el desarrollo de medicamentos, la producción de químicos especializados o en el procesamiento industrial. También es posible insertar los genes en los cultivos para obtener rasgos deseados que puedan mejorar la productividad o la resistencia a las enfermedades.

*Calochortus barbatus*, *Milla biflora*, *Sprekelia formosissima*, *Tigridia pavonia*, y *Zephyrantes fosteri*, son de origen mexicano y se cultivan en EUA e Inglaterra como flor de maceta o de jardín. Sin embargo, ninguna de ellas está cultivada comercialmente en México. Están adaptadas a las condiciones xerófitas y son plantas excelentes para utilizarlas en los parques, autopistas, jardines y en casa (Leszczynska-Borys & Borys, 2001).

En el caso del lirio azteca *S. formosissima* su color rojo escarlata y la forma de su flor le confieren un gran potencial para usarse como planta ornamental. Es posible su uso como flor de corte, flor en contenedor y paisajismo (Leszczynska-Borys & Borys *op cit*). Su cultivo podría demandar el desarrollo de nuevos cultivares. Pero es necesario conocer dónde se localiza la variación genética.

La pérdida de la diversidad vegetal se ha acentuado en los últimos años. Se estima que el cambio de uso de suelo a actividades agrícolas es responsable del 31% de la pérdida (RBG Kew, 2016). Otra amenaza es la sobre explotación con un 21.3%. La destrucción del hábitat a consecuencia de la expansión de las zonas urbanas es responsable por el 12.8%. La introducción y propagación de especies invasoras disminuyen la diversidad vegetal en un 7.54%. Por su parte, el cambio climático reduce al diversidad vegetal con un 3.96%. Otros factores incluyen el disturbio del hábitat, la actividad minera y la contaminación. Ante este escenario, es preciso conocer el recurso, *Sprekelia formosissima*, para su conservación.

### **Generalidades y descripción del género *Sprekelia***

En México crecen 83 especies nativas agrupadas en seis géneros de Amaryllidaceae. *Crinum*, *Hymenocallis*, *Zephyrantes*, *Habranthus* y *Sprekelia* tienen potencial como plantas decorativas debido a sus flores vistosas (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2003). *Sprekelia* posee una amplia distribución en México, (Van Dijk y Kupershoek, 2003; López-Ferrari y Espejo-Serna 2002). Crece en el bosque tropical caducifolio, el bosque de pino-encino, el matorral xerófilo, y vegetación secundaria derivada de ellos en Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Colima, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Veracruz. El rango altitudinal varía del nivel del mar hasta 3000 m. (Martínez-Noguez, 2014). Comúnmente se le conoce como lirio azteca, cintul, chintul, amacayo, capa de Santiago, flor de mayo, flor de Santiago, pata de gallo, tempranilla, venera de Santiago, zagalejo, espuelita, pata de gallo y lirio de San Pedro (Martínez, 1979).

*Sprekelia* es un género monotípico representado por *S. formosissima* (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2003). Sin embargo, por la variación morfológica que presenta, algunos autores consideran la existencia de tres especies (Traub 1965, Lehmiller 2000). *Sprekelia clintiae* (Traub 1965) es muy similar a *S. formosissima* pero con hojas glaucas. De forma similar, *Sprekelia howardii* (Lehmiller, 2000) es una especie de porte menor a 20 cm con hojas lineales semejantes a un

*Zephyranthes*. Estos caracteres morfológicos pueden ser altamente influenciados por variables ambientales (Borys *et al.*, 1999; Vidal-Barahona *et al.*, 2006).

### ***Descripción morfológica de Sprekelia formosissima***

Son hierbas perennes, con bulbos globosos y tunicados. Las raíces son fibrosas. Las capas más externas que cubren el bulbo (los catáfilos) son membranáceas, pardo oscuro o negro. Miden de 20-45 cm de alto (raramente 75). Desarrollan un escapo floral (raramente dos o tres), erecto y hueco, de 7-25 cm de largo, tubular en la base y con el ápice partido en dos. El pedúnculo es cilíndrico de 2.2-5.7 cm de largo. Tiene hojas basales, arrosetadas, lineares y el ápice es obtuso. Las flores son solitarias, muy raramente dos o tres en el mismo escapo, rojo escarlata, con simetría bilateral, hermafroditas. Desarrollan seis tépalos, libres, casi iguales y rojos. Los tépalos externos son lanceolados, reflexos, de 7.5-13 cm de largo. Los internos son lineares. Un tépalo externo y dos externos forman la parte superior de la flor. Por otro lado, un tépalo interno y dos externos forman la parte inferior de la misma donde se localizan seis estambres, insertos en la base de los tépalos. Los filamentos son casi tan largos o más largos que los tépalos. Las anteras son lineares y unidas a los filamentos por el dorso. El ovario es ínfero y trilobular. Los óvulos están dispuestos en dos series en cada lóculo. El estilo es cilíndrico, rojo, más largo que los estambres y el estigma es cortamente trifido. El fruto es una cápsula subglobosa trilobada, dehiscente de 1.5-2.7 cm de diámetro. Las semillas, son semicirculares, aplanadas, negras, con diminutas depresiones en forma de puntos en la superficie, miden de 9-11 mm de largo y de 6.5-8 mm de ancho (López-Ferrari & Espejo-Serna, 2002; Rzedowski, 2006).

### ***Uso y aprovechamiento del lirio azteca S. formosissima***

Desde tiempos prehispánicos, la floricultura se practicaba en México. Códices y escritos hacen referencia a jardines flotantes en chinampas y los jardines de Netzahualcoyotl. El lirio azteca es una flor, solitaria y majestuosa de extraordinaria belleza. Un elemento de comunicación simbólica ya que estuvo presente en los grandes centros ceremoniales de Mesoamérica, como en el Cerro de la Estrella, y

en los Jardines Botánicos Reales, de Moctezuma II (Leszczynska-Borys et al., 1995)

Fue conocida como Atzcalxóchitl o flor de esplendor rojo (Lozano, 1992). De acuerdo con (Leszczynska-Borys et al., 1995) la planta fue llevada a Inglaterra para su cultivo en 1658. Lozano (1992) mencionó que en 1764 J. H. Sprekelsen, Secretario municipal de Hamburgo, envió a Carlos Lineo bulbos de esta especie, quien describió el género como *Amaryllis*, pero en 1976, Tiscornia clasificó a esta planta como *Amaryllis formosissima*. Actualmente el nombre válido es *Sprekelia formosissima*.

A su llegada a España, Atzcalxochitl fue bautizada como flor de Santiago. El nombre deriva de su parecido con la cruz de los caballeros de la orden de Santiago. La flor de Santiago llegó a los Jardines más importantes de Europa, convirtiéndose en objeto de culto entre las élites europeas en señal de espiritualidad, de cultura, de gusto y de distinción. Se describiría la flor como “hermosísima de color fuego, que parece lirio y no es” (Leszczynska-Borys et al., 1995).

Desde su introducción a España e Inglaterra, dónde ha sido muy popular, se ha conservado el germoplasma hasta la actualidad. A finales de los setenta y principios de los ochenta del siglo veinte, resurgió el interés por el estudio sobre el cultivo y la anatomía de *Sprekelia*, (Sakanishi & Yanagawa, 1979; Torres, 2000). Por otro lado, se han realizado trabajos en la extracción, separación e identificación de alcaloides con posibles fines farmacológicos ya que se tienen registros del uso del bulbo de lirio azteca para tratamientos capilares por la cultura mexicana (Leszczyńska-Borys & Borys, 2000).

En México, hay muy pocos escritos sobre la horticultura ornamental. Los trabajos que existen sólo mencionan a *Sprekelia* como una planta de ornato, sin colocarla a nivel de la dalia, la nochebuena o el zempoalxóchitl. México tiene un gusto especial por las flores, pero se ha perdido la atracción por aquellas especies silvestres, que poseen un porte y belleza excepcional como es el caso de

*Sprekelia*. Sus tallos unifloros resaltan la arquitectura de su flor en rojo escarlata. Actualmente, se prefieren aquellas flores que han sido introducidas desde hace muchos años o recientemente para su cultivo como flor cortada, macetería o jardinería. Esto se refleja en lo siguiente, en el México actual es muy poco conocida *Sprekelia* como planta de ornato y en jardinería su uso es muy limitado y que prácticamente son desconocidos los trabajos relacionados con las bondades medicinales de *Sprekelia*, en cuanto a la obtención de alcaloides para uso farmacéutico, y aún más desconocidas son otras de sus aplicaciones (Lozano 1992).

### **Plasticidad fenotípica**

La adaptación de los organismos a diferentes ambientes es un mecanismo que puede realizarse de diferentes maneras (Anderson et al., 2012). Una de ellas es a través de la selección natural que hace prevalecer los caracteres que poseen mejor capacidad de sobrevivir. Las poblaciones pueden diferenciarse genéticamente, lo que las hace adaptarse a ambientes locales. Otra es la plasticidad fenotípica.

Schlichting & Smith (2002) definen a la plasticidad fenotípica como cualquier cambio en la característica de un organismo en respuesta a una señal ambiental. Los autores proponen esta definición a partir de varios conceptos. El más importante incluye fenómenos de plasticidad a diferentes niveles de organización los cuales son manifestación de muchos fenómenos subyacentes. El segundo concepto se basa en distinciones artificiales entre diferentes tipos de características a estudiar, en diferentes tipos de ambientes. No es necesario decidir un carácter específico, ya que tanto la fisiología como la morfología o el comportamiento, reciben el mismo tratamiento. Los cambios en el fenotipo de un individuo responden a una señal ambiental. El resultado puede ser el cambio en la producción de una proteína, la modificación de la actividad fisiológica, alteración del índice de crecimiento y el comportamiento. Todas las señales ambientales, internas o externas deben ser recibidas y procesadas a nivel celular. Lo anterior se ilustra en la Figura 1.

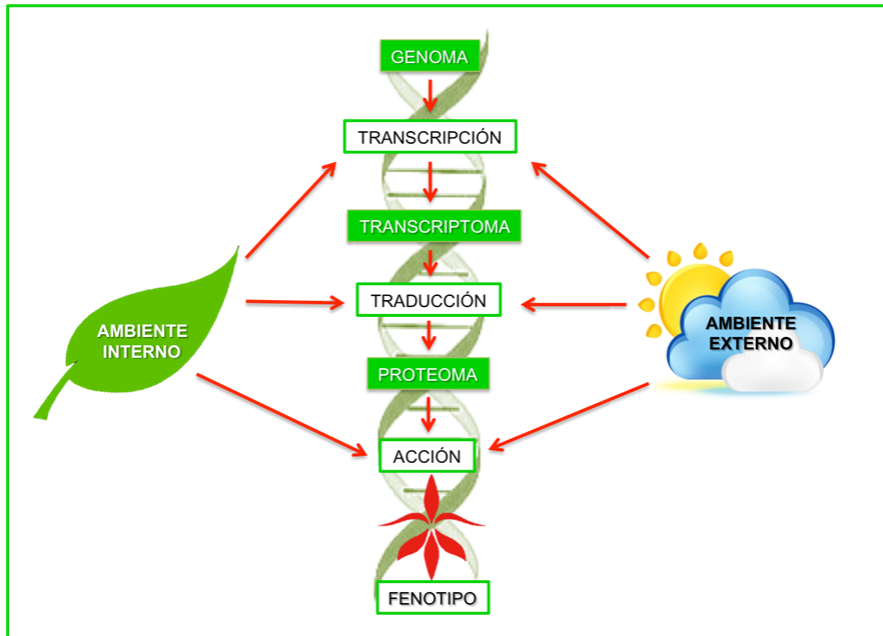


Figura 1. Esquema de Jerarquía de expresión de los genes propuesto por Schlichting & Smith (2002) en la modificación fenotípica de los organismos vegetales.

Según Palacio-López et al., (2015), existen cinco categorías para distinguir el fenómeno operante en los cambios fenotípicos de las plantas. La primera es la respuesta canalizada, donde no hay diferenciación, no hay plasticidad y los fenotipos medios de las poblaciones son iguales. En contraste, en la respuesta no canalizada existe diferenciación poblacional sin plasticidad y los fenotipos medios de las poblaciones son diferentes. La tercera categoría se refiere a la plasticidad adaptativa perfecta. Aquí, las respuestas plásticas son normas de reacción similares entre poblaciones. Por su parte, la plasticidad adaptativa incluye respuestas plásticas con normas de reacción paralelas, pero no congruentes entre poblaciones. Por último, la plasticidad no adaptativa resulta en respuestas plásticas con diferencias en la pendiente de las normas de reacción. La norma de reacción es el fenómeno que describe el patrón que sigue la expresión fenotípica de un genotipo en diferentes ambientes. En plantas, Kroon et al., (2004) separaron la plasticidad fenotípica y la norma de reacción. La plasticidad fenotípica se

expresa a nivel individual, mientras que la norma de reacción se expresa a nivel de subunidades modulares, o bien, grupos de plantas.

Debido a lo anterior, es muy difícil establecer una frontera entre un fenómeno y otro, cuándo se realiza un estudio de variabilidad en una especie en diversos ambientes. A nivel molecular, se han realizado diversos esfuerzos por detectar el mecanismo de plasticidad fenotípica en plantas. Ruan et al., (1998), utilizando microarreglos, en *Arabidopsis arenosa* mostraron evidencia de miles de genes participando en una respuesta compleja de las plantas a las manifestaciones del medio ambiente. Esta técnica involucra muchos genes, mientras que otras solo un grupo de ellos, como es el caso de la utilización de microsatélites (Noel et al., 2007). Las posibilidades de estudio permanecen abiertas en este campo y para un gran número de especies, entre ellas el lirio azteca.

### ***Marcadores moleculares***

Los marcadores moleculares son proteínas y ácidos nucleicos. Su análisis revela polimorfismos a nivel del ADN. Son útiles en la investigación básica y aplicada. Se emplean en filogenia, taxonomía, ecología y genética. Han mostrado ser importantes en el análisis de la diversidad genética y fitomejoramiento. Las características deseables para un marcador molecular son varias. Muestran moderado o alto nivel de polimórficos. Tienen herencia codominante que permite la discriminación entre homocigotos y heterocigotos. La asignación de alelos es inequívoca. Son frecuentes en el genoma. Su comportamiento es neutral. Son baratos y rápidos. Son altamente reproducibles. El intercambio de datos es muy fácil. El mejor marcador molecular es el que abarque una mayor parte del genoma (Solís & Andrade, 2006).

### ***ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)***

El marcador Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSRs) es una técnica basada en la PCR. Implica la amplificación de segmentos de ADN presentes a una distancia amplificable entre dos microsatélites idénticos y orientados en dirección opuesta. La técnica es casi idéntica a Random amplified polymorphic DNA

(RAPD) excepto que los iniciadores de los ISSR son diseñados a partir de los microsatélites y son más largos (16-25 pb vs 10 pb de los RAPD). Las repeticiones de microsatélites usados como iniciadores pueden ser di, tri, tetra o pentanucleótido (Bornet & Branchard, 2001).

Los ISSRs son dominantes e hipervariables. Durante la amplificación, el iniciador está compuesto de una secuencia microsatélite como (GACA) anclada al extremo 3' o 5' por dos a cuatro nucleótidos arbitrarios usualmente degenerados (Zietkiewicz et al., 1994). Los ISSRs se han utilizado mucho por su rápida implementación y bajo costo. Han sido útiles para establecer diversidad genética (Pradeep et al., 2002), para identificar cultivares estrechamente relacionados (Wolfe, 2000), para estudiar procesos evolutivos como la deriva génica y flujo genico biogeograficos y ecológicos (Lightbourn & Villeux, 2003). Se han utilizado para registrar la huella genética, para generar hipótesis filogenéticas, estudios de diversidad y variabilidad genética e identificación de cultivares (Zietkiewicz et al., 1994).

La interpretación de los ISSR se realiza con la lectura de geles. Las secuencias repetitivas idénticas proporcionan patrones diferentes (Pradeep et al., 2002). Se analizan como marcadores dominantes, lo que significa que son dialélicos con bandas presentes o ausentes, las cuales se registran como los dos alelos de un locus (Pradeep *op cit*). Los ISSRs están disponibles para todos los grupos vegetales con los cuales se ha experimentado hasta ahora.

### ***Análisis espacial de diversidad y distribución de plantas***

La diversidad de las plantas es vital para la supervivencia y el bienestar humano. De ellas obtenemos alimento, otras son importantes para la producción forestal, algunas son ornamentales y biocombustibles. Además de las especies cultivadas, muchas plantas silvestres satisfacen las necesidades locales de alimento, combustible, medicina y materiales de construcción.

El análisis espacial de diversidad y distribución de plantas mejora la comprensión y el monitoreo de la biodiversidad. Los resultados permiten formular estrategias de

conservación efectivas. La información espacial, combinada con datos de caracterización y evaluación resultan útiles para el manejo de bancos de germoplasma (Guarino, 2002).

Existe una necesidad enorme de información para el progreso científico. El GBIF Global Biodiversity Information Facility es una Plataforma Mundial de Información en Biodiversidad que ofrece acceso público. Los datos provienen de museos nacionales, herbarios y bancos de germoplasma en todo el mundo, (GBIF, 2016). Su objetivo es facilitar el acceso gratuito a los datos sobre biodiversidad, mundialmente a través de Internet; con el fin de apoyar la investigación científica, la conservación y el desarrollo sostenible. Utilizando programas informáticos diseñados para hacer análisis espaciales de diversidad y de modelación de distribución de especies es que las bases proporcionadas por GBIF resultan efectivas.

DIVA-GIS 7.5 y QGIS 2.18.0 son programas computacionales que nos ayudan a responder preguntas comunes relacionadas con el análisis espacial de datos de biodiversidad. Aunque todo se enfatiza en la importancia de hacer un muestreo adecuado, los softwares no elaboran sobre teorías de muestreo ni discute en detalle el análisis estadístico de datos de diversidad estos resultados solo remiten al lector a materiales de referencia alternativos para obtener mayor información.

DIVA-GIS puede emplearse para analizar la distribución de especies con el objeto de dilucidar patrones geográficos, ecológicos, y genéticos. Está orientado a científicos que no disponen de sistemas de información geográfica (GIS) comerciales, o no tienen tiempo para capacitarse en su uso, o para cualquier persona que necesita una herramienta GIS especializada en analizar las distribuciones de especies. DIVA-GIS puede ayudar a mejorar la calidad de los datos al encontrar las coordenadas de las localidades empleando diccionarios geográficos (gazeteers), y mediante la comprobación de coordenadas existentes utilizando superposiciones de áreas (consultas espaciales) de sitios de colecta con bases de datos de límites administrativos. Asimismo, pueden crearse mapas de distribución. Las funciones analíticas en DIVA-GIS incluyen el mapeo de riqueza y

diversidad; mapeo de la distribución de rasgos específicos; y la identificación de áreas con diversidad complementaria. DIVA-GIS también puede extraer datos climáticos para todas las localidades en la tierra; y mapear la diversidad basado en datos de marcadores moleculares (ADN). Puede también emplearse para el análisis de autocorrelación espacial, y en modelamiento de nichos ecológicos utilizando los algoritmos BIOCLIM y DOMAIN (con predicciones para climas presentes y futuros) (Guarino, 2002).

QGIS es un sistema de Información de código libre multiplataforma. Permite manejar formatos raster y vectoriales a través de las bibliotecas GDAL y OGR, biblioteca de software para la lectura y escritura de formatos de datos geoespaciales, publicada por la fundación geoespacial de código abierto (Open Source Geospatial Foundation). QGIS proporciona una creciente gama de capacidades a través de sus funciones básicas y complementos. Puede visualizar, gestionar, editar y analizar datos y diseñar mapas imprimibles. Obtenga una primera impresión con una lista más detallada de características, (Furze, 2012).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Material vegetal***

El estudio se realizó principalmente a partir de colectas realizadas por investigadores del Instituto de Botánica y mantenidas vivas en el Jardín Botánico Didáctico de la Universidad de Guadalajara. Los ejemplares de respaldo fueron depositados en el Herbario Luz María Villarreal de Puga del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG, Cuadro 1). Se colectó tejido vegetal de las plantas durante la producción vegetativa para realizar extracción de DNA. Posteriormente, se realizaron colectas en las localidades de El Arenal, Jalisco y Tecomán, Colima. La muestra de estudio está formada por 22 poblaciones y 200 individuos (Cuadro 1). Se utilizaron además, 10 individuos de *Zephyrantes fosteri* Traub. como referencia.

Cuadro 1. Poblaciones de *Sprekelia formosissima* utilizadas para el estudio de variabilidad genética. Ind refiere al número de individuos analizados en cada población. ID muestra el colector y su número de colecta. Los ejemplares de herbario están depositados en el Herbario *Luz María Villarreal de Puga* del Instituto de Botánica, de la Universidad de Guadalajara (IBUG).

N°	Ind.	ID	Localidad	Municipio	Estado	Coordenadas	Altitud (m)	Observaciones
1	8	6743	Carretera San Vicente-Volcanes, Fresno Hueco	Atenguillo	Jalisco	20°15'2.5"N, 104°29'10"W	1,931	Bulbosa frecuente
2	6	6700	Carretera Mazamitla-Tuxcueca	Mazamitla	Jalisco	20°01'29.2"N , 103°9'29.4" W	2,094	Bulbosa frecuente, estéril
3	12	6633	Barranca de Malinaltenango	Ixtapan de la Sal	Estado de México	18°46'33.5"N , 99°42'40.9" W	1,608	Bulbosa frecuente, fruto globoso trilobado
4	11	7004	Sierra El Filo	Cd. Victoria	Tamaulipas	23°37'1.3"N, 99°12'22.1" W	1,155	Bulbosa escasa en taludes del camino
5	15	7121	Chorros del Varal, orillas de la barranca	Los Reyes Peribán	Michoacán	19°31'1.7"N, 102°34'23.1 9"W	950	Hierba erecta de flor vistosa
6	11	6893	Puerto los Mazos	Casimiro Castillo	Jalisco	19°42'2.0"N, 104°23'53.1" W	1,273	Bulbosa escasa
7	5	6892	Barranca el Corcobado	Unión de Tula	Jalisco	19°53'8.9"N, 104°19'20.8" W	1,260	Bulbosa escasa, perianto rojo
8	15	7301	Carretera a Valle de Bravo, orillas del arroyo	Valle de Bravo	Estado de México	19°14'37.7N, 100°08'09.9" W	2,039	Bulbosa frecuente
9	10	7038	Xochicalco	Temixco	Morelos	18°47'59.9"N , 99°17'39.2" W	1,271	Bulbosa frecuente en talud del camino
10	10	7045	Camino a Ameyaltepec	Tepecoacuilco	Guerrero	17°57'36.2"N , 99°31'46.3" W	788	Bulbosa muy abundante sobre pendientes muy pronunciadas
11	5	7065	Lomas de Márquez,	Chilapa	Guerrero	17°32'34.7"N ,	1,430	Bulbosa escasa

12	5	7068	camino a Chilapa Carretera Chilpancingo-Chilapa	Chilpancingo	Guerrero	99°28'39.9" W 17°32'43.2"N , 99°27'04.1" W	1,665	Bulbosa frecuente a lo largo del arroyo; hojas muy angostas y largas
13	5	7080	El Ahuejote	Tixtla de Guerrero	Guerrero	17°34'46.3"N , 99°16'58.8" W	1,822	Bulbosa frecuente
14	10	7096	Carretera Chilpancingo	Leonardo Bravo	Guerrero	17°34'38.19" N, 17°38'38.19" W	1,534	Bulbosa frecuente
15	4	7113	Carretera México 51, Los Aguajes	Teloloapan	Guerrero	18°25'1.7"N, 99°57'55.33" W	1,740	Bulbosa frecuente
16	11	7116	Carretera Pachivia-Ixcateopan	Ixcateopan de Cuauhtémoc	Guerrero	18°27'17.8"N , 99°47'17.6" W	1,480	Bulbosa escasa en taludes del camino
17	7	7127	Km 2, carretera Ixcateopan-Taxco	Ixcateopan de Cuauhtémoc	Guerrero	18°30'25.8"N , 99°46'15.8" W	2,007	Bulbosa escasa en taludes del camino
18	10	7134	Km 18, carretera Taxco-Ixcateopan	Taxco	Guerrero	18°33'21.7"N , 99°41'51.9" W	2,017	Bulbosa escasa en paredón húmedo
19	10		Predio La Mesa	Arenal	Jalisco	20°42'0"N, 103°37'0"W	1,437	Bulbosa escasa
20	10	Herbario	Sierra de Manantlán	Tuxcacuesco	Jalisco	19°33'0"N, 103°52'0"W	848	
21	10	Herbario	Sierra de Manantlán	Comala	Colima	19°19'15"N, 103°45'37"W	400	
22	10	Colima	Km 19, carretera Colima-Manzanillo	Tecomán	Colima	19°03'58.7"N , 103°46'46.0" W	462	Bulbosa escasa, sobre paredón de roca caliza

### **Extracción de ADN genómico**

Cada muestra se trabajó de manera individual. Para la extracción de DNA de individuos con un tejido foliar superior a los 0.3 g se utilizó el método reportado por Keb-Llanes *et al.*, (2002) y para los individuos que presentaban una cantidad menor a .3 g se utilizó GE Healthcare Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kits. Las diferencias entre estos métodos de extracción fueron la

cantidad de tejido vegetal que se necesita y la pureza de DNA que se obtiene al finalizar la extracción. La evaluación de la calidad e integridad el DNA se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1% y por método espectrofotométrico utilizando el equipo Quawell Q3000, según protocolos reportados por Sambrook & Rusell (2001).

### ***Amplificación por PCR para el marcador ISSR***

La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µL, con las siguientes concentraciones de reactivos: buffer PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 0.8 µM de cada iniciador, dNTPs 0.25 Mm, 4 ng de muestra de ADN y 0.05 U de Taq Polimerasa Promega®. La amplificación del DNA se hizo utilizando el termociclador de marca TECHNE con capacidad para 96 muestras. Para la selección de los iniciadores utilizados se realizaron pruebas con diferentes iniciadores y diferentes concentraciones de DNA, 50 µL y 100 µL de 25 individuos al azar (Cuadro 2), el resultado de las pruebas permitió seleccionar los cinco iniciadores que presentaron mejor amplificación y patrón de bandeo.

Cuadro 2. Iniciadores y concentraciones utilizados en las pruebas de selección. Los cinco iniciadores seleccionados se indican en la quinta columna.

Iniciador	Secuencia	50µ	100µ	Seleccionado
898	5'-CAC ACA CAC ACA RY-3'	X	X	*
MAO	5'-CTC CTC CTC CTC RY-3'	X	X	*
OMAR	5'-GAG GAG GAG GAG RC-3'	X	X	*
AW3	5'- GTG TGT GTG TGT RG-3'	X	X	*
902	5'- GTG TGT GTG TGT AY-3'	X	X	*
843	5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRA-3'	X	X	
899	5'-CAC ACA CAC ACA RG-3'	X	X	
6	5'-GAC AGA CAG ACA GAC ARY-3'	X	X	

El programa utilizado para la PCR consistió en un ciclo de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos 45 s a 95°C (desnaturalización de ADN), 45 s a 52 °C (alineamiento del primer al ADN) y 1 min 30 s a 72°C. Finalmente las

muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa de alta resolución (BIO-RAD®) al 1.3%, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio para su visualización.

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

Se realizaron matrices binarias de acuerdo a la presencia/ausencia de las bandas amplificadas en los geles, con las cuales se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard de acuerdo a la ecuación  $S_j = \frac{n_{ab}}{(n_a + n_b - n_{ab})^{-1}}$ , donde  $n_a$  y  $n_b$  es igual a bandas presentes en los carriles a y b (individuos) y  $n_{ab}$  es igual a bandas en común para poder producir el análisis de agrupamiento con base al algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Average) mediante el software NTYSYpc® ver. 2.2, los resultados se presentan en un dendrograma, (Figura 3).

Se calculó el porcentaje de polimorfismo en los loci detectados con las cinco combinaciones de iniciadores utilizados. El criterio usado para la determinación de polimorfismo se basó en la presencia de bandas en un número  $\geq 95\%$  de los individuos o  $\leq 11\%$  de los individuos.

Se utilizó el programa STRUCTURE® ver. 2.3.4 para detectar la estructura genética entre las poblaciones de *Sprekelia* analizadas y determinar el nivel de diferenciación genética que hay entre las colectas, se calcularon los valores para grado de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) en término de frecuencias alélicas para cada grupo simulado, así como Heterocigocidad esperada ( $H_e$ ). Dicho análisis se realizó siguiendo la metodología reportada por Pritchard y col. (2000), el cual se basó en un algoritmo con 10000 repeticiones y 10000 iteraciones, en el cual se realizaron simulaciones de  $K=2$  a  $K=25$  grupos bajo el principio “admixture model”. Posteriormente se realizó la prueba de Evanno, (Evanno y col., 2005) para verificar la verosimilitud de cada simulación y determinar cuál es el número de grupos adecuado para este conjunto de datos. El programa en línea usado fue Structure Harvester, de acuerdo a la metodología reportada por Earl et al., (2012) y que se encuentra en la liga (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).

### ***Análisis espacial de diversidad y distribución de plantas***

Para la realización de este análisis se utilizaron los programas DIVA-GIS 7.5 y QGIS 2.18.0, que funcionan a partir de la base de datos de WorldClim-Global Climate Data, empleando las 19 variables bioclimáticas (Cuadro 3). En conjunto con los bioclimogramas de las estaciones climatológicas de las poblaciones en estudio (Cuadro 4). Los resultados del análisis junto con las referencias bioclimáticas se muestran en mapas generados por el programa. Con las variables climáticas de cada colecta, se realizó un análisis de componentes principales para encontrar asociación entre éstos y la agrupación de las colectas a nivel molecular. Este análisis se realizó con el programa NTYSYpc ® ver. 2.2.

Cuadro 3. Variables bioclimáticas de WorldClim-Global Climate Data.

<b>Variables bioclimáticas</b>	
BIO1	= Temperatura promedio anual
BIO2	= Rango medio diario (temp max – temp min; promedio mensual)
BIO3	= Isotermalidad (BIO1/BIO7) * 100
BIO4	= Estacionalidad en temperatura (coeficiente de variación)
BIO5	= Temperatura máxima del período más caliente
BIO6	= Temperatura mínima del período más frío
BIO7	= Rango anual de temperatura (BIO5-BIO6)
BIO8	= Temperatura media en el trimestre más lluvioso
BIO9	= Temperatura promedio en el trimestre más seco
BIO10	= Temperatura promedio en el trimestre más caluroso
BIO11	= Temperatura promedio en el trimestre más frío
BIO12	= Precipitación anual
BIO13	= Precipitación en el período más lluvioso
BIO14	= Precipitación en el período más seco
BIO15	= Estacionalidad de la precipitación (Coeficiente de variación)
BIO16	= Precipitación en el trimestre más lluvioso
BIO17	= Precipitación en el trimestre más seco
BIO18	= Precipitación en el trimestre más caluroso
BIO19	= Precipitación en el trimestre más frío

Cuadro 4. Estaciones climatológicas utilizadas para el estudio de las relaciones bioclimáticas y la distribución espacial de *S. formosissima*. Tem refiere a la temperatura promedio. PP muestra la precipitación promedio y T. es abreviación de Tropical, tomado de Macias, 2009.

Altitud (m)	Estación	Tem. (°C)	PP (mm)	Bioclima	Termotipo	Ombrotipo
680	Comala, Colima	23.4°	812.5	T. Xerico	Termotropical Inferior	Seco superior
32	Tecomán, Colima	26.4	839	T. Xerico	Infratropical superior	Seco inferior
1000	Colotlipa, Guerrero	24.6	1163.2	T. Pluviestacional	Termotropical inferior	Subhúmedo inferior
420	Placeres del Oro, Guerrero	27.6°	1061.1	T. Xerico	Infratropical superior	Seco superior
280	Tecomates, Jalisco	25.4°	1495.0	T. Pluviestacional	Termotropical inferior	Subhúmedo superior
688	Autlán de Navarro, Jalisco	22.8	718.6	T. Xerico	Termotropical Inferior	Seco inferior
810	Tuxcacuesco, Jal.	24.3°	752.3	T. Xerico	Termotropical Inferior	Seco inferior

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El DNA obtenido de cada muestra, fue suficiente para obtener amplificación en todas las muestras. Las bandas obtenidas permitieron seleccionar los loci con los que se construyó la matriz de presencia ausencia para el análisis. En la (Figura 2) se puede observar la amplificación para el iniciador 898 en muestras de *Sprekelia formossisima* y de *Zephyranthes fosteri*.

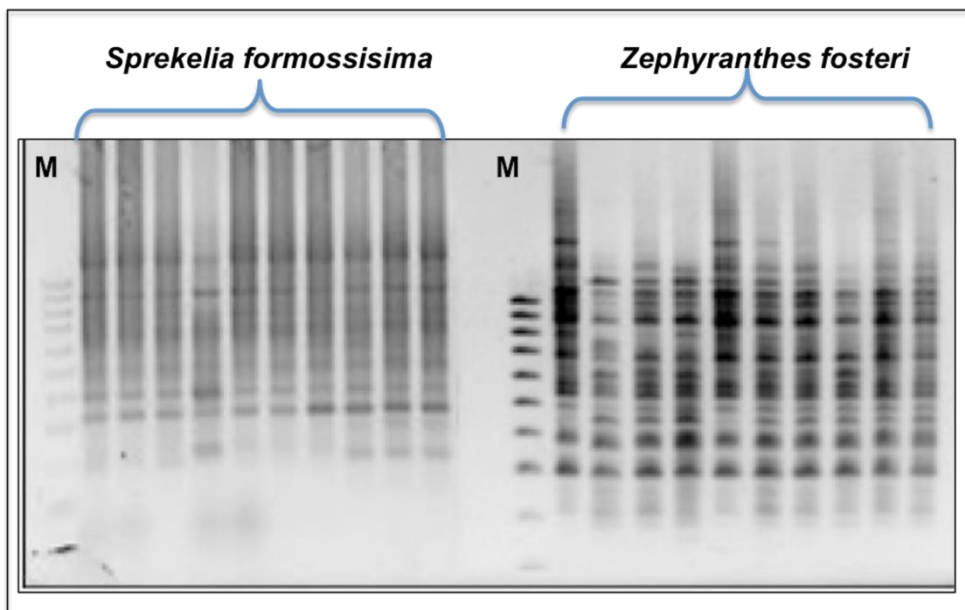


Figura 2. Patrón de amplificación de muestras de *Sprekelia formossisima* y *Zephyranthes fosteri* con el iniciador 898 del marcador ISSR. M = Marcador de peso molecular de 200 pb.

El marcador ISSR detectó un total de 128 loci de los cuales el 89% fueron polimórficos. El resultado total se muestra en el (Cuadro 5). Este marcador se ha utilizado en muchas especies para documentar su variabilidad genética y ha probado su capacidad para detectar diferencias inter e intraespecíficas. Tal es el caso del trabajo reportado por (Qia *et al*, 2010) que realizaron un estudio de variabilidad en la especie *Oryza granulata* y el marcador ISSR fue capaz de detectar diferencias dentro y entre poblaciones. Esos mismos autores reportaron un nivel de polimorfismo de 38.07% usando este marcador.

Cuadro 5. Proporción de loci polimórficos por iniciador para el marcador ISSR en poblaciones de *S. formosissima*.

Iniciador	No. Loci	Loci polimórficos	Proporción de loci polimórficos
898	25	2	0.920
AW3	32	2	0.937
MAO	15	1	0.933
OMAR	31	8	0.742
902	25	1	0.960
Total	128	14	0.890

De igual manera, pueden citarse trabajos con diferentes especies cuyos resultados han comprobado la efectividad de este marcador para estudios de variabilidad, diversidad y mapeo como mencionan (Pradeep et al., 2002).

El resultado del análisis de similitud y de agrupación para las muestras del presente trabajo, se presenta en la (Figura 3), en donde se puede observar que el marcador utilizado y las combinaciones de iniciadores seleccionadas, produjeron una clara separación entre las muestras de la especie *Zephyranthes fosteri* usadas como referencia de la misma familia. Este resultado apoya lo reportado anteriormente con respecto a que el marcador ISSR es capaz de diferenciar entre especies, como menciona (Zhou et al., 2001) quienes trabajaron con hongos, o bien (Luan et al., 2006) en la planta *Nouelia insignis* (Asteraceae). Por otra parte, las proporciones de loci polimórficos que se encontraron en el presente trabajo, son mayores a las reportadas por los autores mencionados. En la misma figura, se muestra la separación de las muestras en seis grupos (I -VI) en los que se asocian las diferentes poblaciones estudiadas. Esta asociación corresponde básicamente a los bioclimas presentes en los sitios de colecta y no a una correspondencia geográfica, como se verá más adelante.

Los niveles de similitud detectados con el marcador molecular reportan una separación de *Zephyranthes fosteri* a nivel 0.40 del coeficiente de Jaccard, en cambio el mayor nivel de similitud entre los individuos de las diferentes poblaciones, ascendió hasta 0.88 del coeficiente de Jaccard. Esto indica que a

pesar de que se trata de una especie de reproducción básicamente asexual, su variabilidad genética es alta.

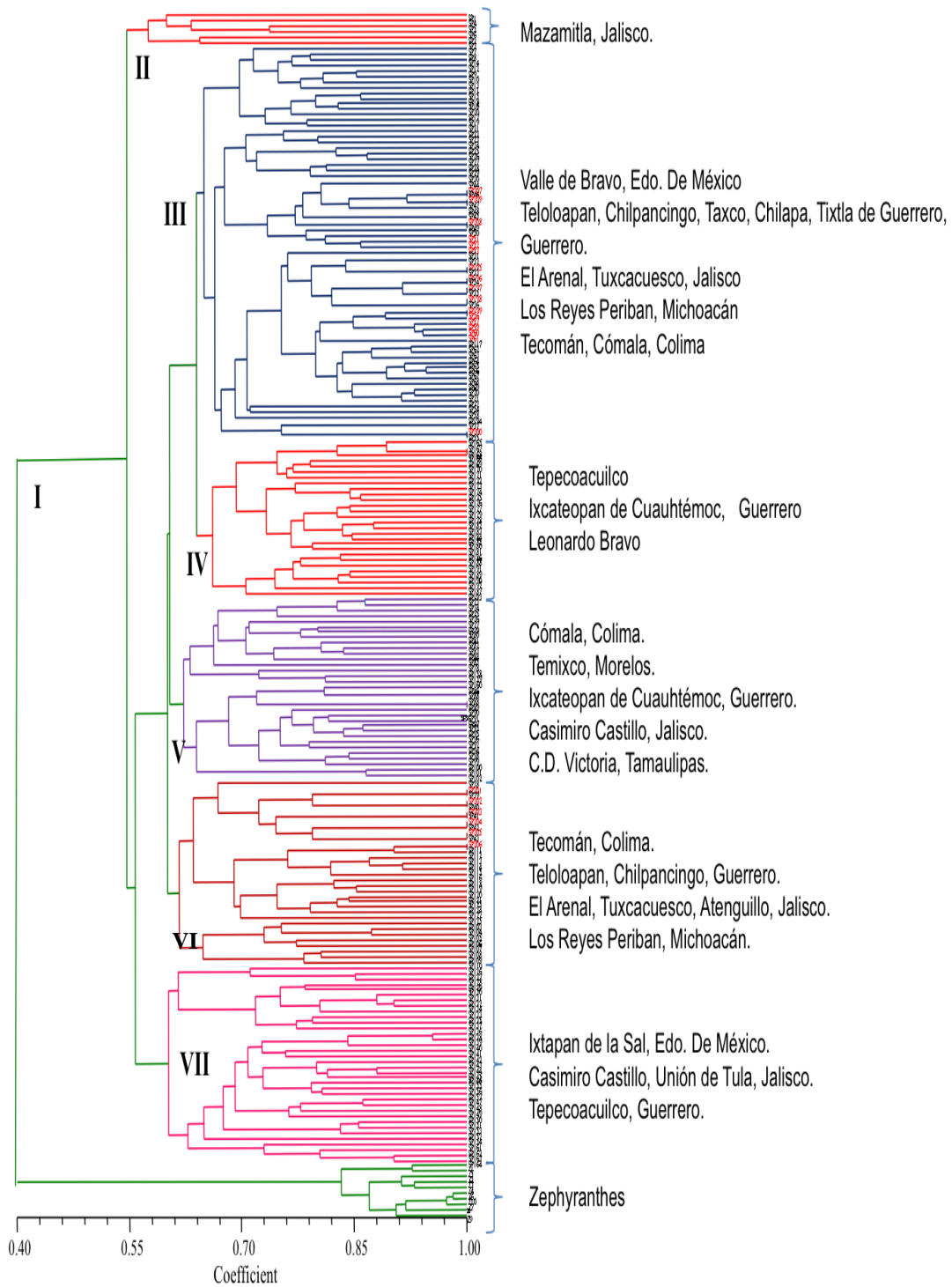


Figura 3. Dendrograma producido con el marcador ISSR en poblaciones de *S. formosissima* y *Z. fosteri*.

El marcador molecular ISSR se ha reportado también para detección de cambios no permanentes en la secuencia de DNA de los organismos, que son provocados por metilación o desmetilación. Esto es llamado mecanismos epigenéticos. Uno de los mecanismos epigenéticos es precisamente la metilación del DNA que es un proceso epigenético fundamental que ayuda al control de actividad de transcripción de genes en eucariotas. Los ISSR se han utilizado como precursores de la detección de metilación en combinación con el marcador MSAP (Methyl Sensitive Amplification Polymorphism) en diferentes organismos (Peraza-Echeverría et al., 2001; Park *et al.*, 2009). A su vez, se ha documentado la capacidad de estos marcadores moleculares para detectar cambios por estrés en las plantas (Chinnusamy & Zhu, 2009) debida a los cambios no permanentes en las secuencias de su DNA o por diferencias en el tipo de sustratos en los que crecen (Feng *et al.*, 2010).

El resultado del análisis de estructura genética, confirma la separación de las plantas de *Zephyrantes* de *Sprekelia*, sin embargo, el análisis hecho con el método de Evanno, produjo un ajuste para 11 grupos en los cuales se encuentra de nuevo la asociación de las mismas colectas agrupadas en el dendrograma. En la (Figura 4), se encuentra la gráfica producida por el programa STRUCTURE, en donde se asigna a nivel probabilístico a cada individuo a un grupo simulado. Los grupos se señalan con diferente color.

En la simulación K=8 a la que correspondería el número de grupos formados en el análisis UPGMA, se puede observar la coincidencia de cada colecta con la agrupación observada en el análisis anterior. En este caso se vuelve a señalar una clara separación de las muestras de *Zephyrantes fosteri*.

La estructura genética que muestra el programa, se basa en grupos bien diferenciados entre sí, como el grupo de color naranja, azul o rojo en la figura anterior, los cuales tienen en su mayoría individuos que no presentan mezcla de secuencias comunes con otras poblaciones. Tomando en cuenta el concepto de que la estructura genética en una población global, como en el caso de *S. formosissima* del presente trabajo, está dada por las barreras tanto físicas como

ambientales (Sethuraman, 2013) se puede inferir que aún cuando existen estas barreras en las colectas de diferente procedencia, la constitución genética de la población es la misma. Los valores de  $F_{st}$  y  $H_e$  para cada grupo, se muestran en el Cuadro 5.

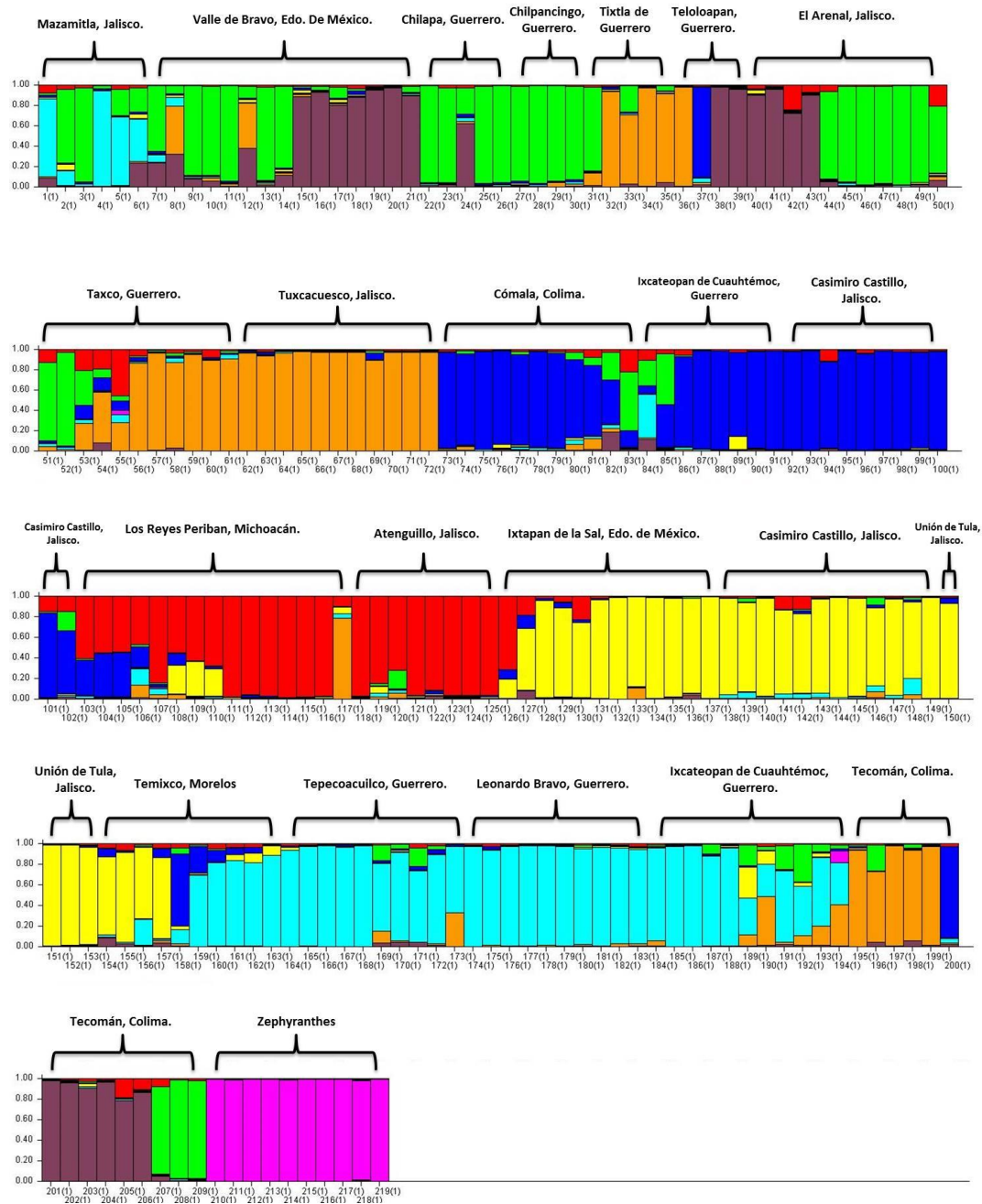










Figura 4. Simulación  $K=8$  generada por el programa STRUCTURE donde se observa la asignación de cada individuo (barras) a un grupo. Cada color significa un grupo. Al lado izquierdo se muestra el valor de probabilidad de pertenencia.

Como puede observarse en el (Cuadro 6), las colectas de Los Reyes, Peribán Michoacán y Atenguillo, Jalisco, son las colectas marcadas con un valor más alto de Fst, lo cual indica que son el grupo con mayor diferenciación genética (Fst = 0.7708), sin embargo los valores proporcionados por el programa para cada grupo, indican diferenciación muy grande (Fst >0.25).

Cuadro 6. Valores de diferenciación genética y heterocigocidad para la simulación de ocho grupo en poblaciones de *S. formosissima*. Valores de referencia: Fst = 0 no diversidad; entre 0 y 0.05, diferenciación pequeña; entre 0.05 y 0.15, diferenciación moderada; entre 0.15 y 0.25 diferenciación grande y >0.25 muy grande; valor de 1 = fijación de alelos alternativos.

Simulación <i>K=8</i>	Color	Valor de Fst	Valor de He	Especie
1		0.3313	0.1254	<i>S. formosissima</i>
2		0.2884	0.2234	<i>S. formosissima</i>
3		0.2711	0.2188	<i>S. formosissima</i>
4		0.3453	0.2054	<i>S. formosissima</i>
5		0.1768	0.2347	<i>S. formosissima</i>
6		0.7709	0.1997	<i>S. formosissima</i>
7		0.2925	0.2631	<i>S. formosissima</i>
8		0.2513	0.2042	<i>Zephyranthes fosteri</i>

Los valores de Fst encontrados para todos los casos, demuestra que el tamaño efectivo de las poblaciones es bastante pequeño y que sus genes se mueven poco, y esto quizá sea debido a su reproducción vegetativa y a la distribución geográfica de las mismas. Si bien es importante señalar, como lo indican algunos autores, que debe tenerse cuidado en la interpretación de este estadístico, ya que aunque es una medida que depende de los detalles de biología e historia de cada especie, en los estudios que involucran grandes áreas geográficas, como es el presente, podemos encontrar valores altos de diferenciación, mientras que lo contrario sucede cuando el área es pequeña o se cuenta con muestras no representativas del total de la población (Eguiarte et al., 2010; Sethuraman, 2013).

Los valores de heterocigocidad esperada, confirman que no existe mucha variabilidad en el género y puede tratarse de la misma especie en todas las colectas, además de su carácter de reproducción asexual.

El análisis de componentes principales realizado, mostró que los primeros dos componentes explican el 81.56% de la variación observada en las colectas (Cuadro 7), lo cual es concordante con los principios de análisis multivariado que confirman la utilidad de las variables elegidas (Lucena & Carrascosa, 2013). Las variables asociadas en el CP1 son de BIO1 a BIO12 (Cuadro 8) que incluyen las variables de temperatura máxima y mínima (descritas en el Cuadro 3), además de isothermalidad y la variable BIO12 de precipitación anual. En el CP2, se asociaron las variables BIO13, precipitación en el mes más lluvioso, BIO16, precipitación en el trimestre más lluvioso y BIO17 precipitación en el semestre más seco. La variable que no obtuvo participación en el CP1 y CP2 y aún en el CP3 fue precipitación en el trimestre más frío, que se encontró hasta el CP4.

Cuadro 7. Valores propios de la matriz de correlación para componentes principales de datos climáticos de poblaciones de *S. formosissima*.

<b>Componente</b>	<b>Valor del componente</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Acumulado</b>
1	12.60388160	66.3362	66.3362
2	2.89393988	15.2313	81.5675
3	2.13252300	11.2238	92.7913
4	0.66824706	3.5171	96.3084
5	0.39168433	2.0615	98.3699
6	0.15213863	0.8007	99.17.06
7	0.07507313	0.3951	99.5657
8	0.05042503	0.2654	99.8311
9	0.01402043	0.0738	99.9049
10	0.00800244	0.0421	99.9470
11	0.00731961	0.0385	99.9856
12	0.75900171	0.0090	99.9946
13	0.00076656	0.0040	99.9986
14	0.00016827	0.0009	99.9995
15	0.00006664	0.0004	99.9999
16	0.00002238	0.0001	100.0000
17	0.00000280	0.0000	100.0000
18	0.00000062	0.0000	>100%
19	0.00000000	0.0000	>100%

Cuadro 8. Vectores característicos para componentes principales de datos climáticos de poblaciones de *S. formosissima*.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4
BO1	0.994	0.008	0.031	0.045
BO2	0.963	0.003	-0.231	-0.099
BO3	0.704	0.124	0.651	0.126
BO4	-0.622	0.612	0.356	-0.030
BO5	0.961	0.107	0.223	0.041
BO6	0.982	-0.077	-0.132	0.030
BO7	0.949	0.161	-0.139	-0.144
BO8	0.987	0.071	0.059	0.055
BO9	0.994	-0.070	-0.004	0.028
BO10	0.986	0.080	0.086	0.042
BO11	0.993	-0.066	-0.019	0.043
BO12	0.882	0.303	0.055	-0.068
BO13	0.332	-0.715	-0.495	0.036
BO14	0.876	0.171	-0.416	-0.115
BO15	0.338	-0.359	0.811	0.148
BO16	0.554	-0.806	-0.126	0.096
BO17	0.376	0.841	-0.303	-0.189
BO18	-0.907	-0.275	-0.185	-0.060
BO19	-0.140	0.498	-0.458	0.721

Estos resultados sugieren tal como mencionan (Kroon et al., 2004), la respuesta de las plantas está inducida por una variación espacio- temporal en los factores ambientales y esto se observa en la asociación encontrada en las plantas, la cual se muestra en la gráfica biplot de la (Figura 5).

Existieron algunas coincidencias de asociación de las poblaciones, utilizando los datos climáticos de éstas y el DNA amplificado por ISSR. Las colectas que se asocian en los mismos clusters tanto en el análisis de distribución espacial como en el de marcadores moleculares son los siguientes grupos: Casimiro Castillo, Jalisco; Tecomán, Colima y Comala, Colima. Chilpancingo Guerrero y Los Reyes Peribán, Michoacán. Temixco Morelos; Ixcateopan de Cuauhtemoc, Guerrero y Teleoloapan Chilpancingo, Guerrero.

Las características climáticas en estos grupos, fueron encontradas coincidentes en el análisis con DIVA-Gis.

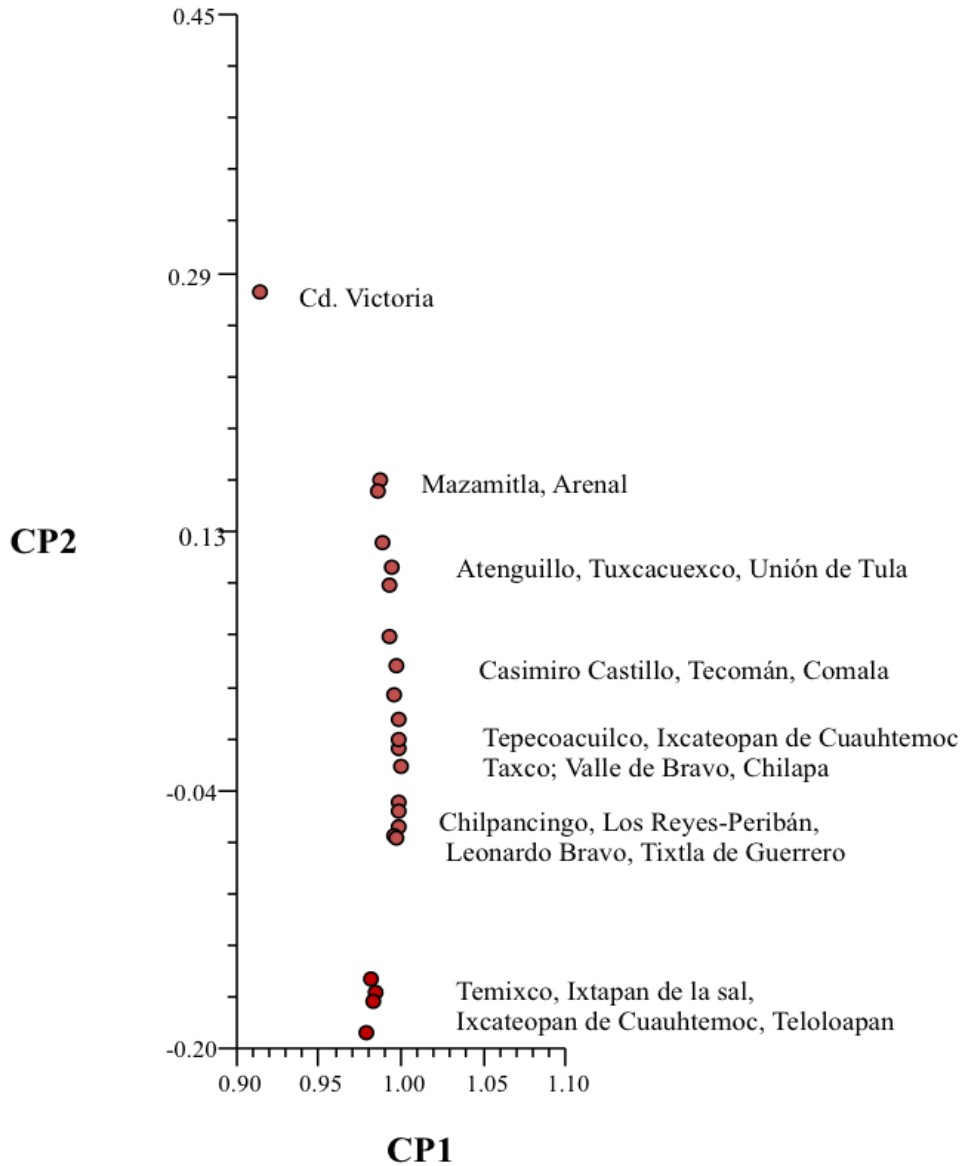


Figura 5. Gráfica biplot de componentes principales para variables climáticas en poblaciones de *S. formosissima*.

En el caso de *S. formosissima*, los resultados sugieren una respuesta de plasticidad fenotípica como una réplica adaptativa a las condiciones ambientales y que se expresa en la modificación de algún rasgo fenotípico cuando el ambiente es espacialmente heterogéneo. En anteriores trabajos reportados con el mismo género, (Bautista-Puga et al., 2011) han reportado variedades botánicas que pueden distinguirse con marcadores ISSR. Estos autores reportan que los

marcadores morfológicos son menos eficientes en el reconocimiento de las diferentes variedades botánicas que reportan.

De acuerdo con Cruz-Cárdenaz *et al.*, 2013, la información sobre la riqueza y variabilidad genética de una especie y su distribución geográfica, es fundamental para la toma de decisiones. En México existe información limitada sobre esta especie y la aportación de la información obtenida en el presente trabajo, puede ayudar a documentar el estado del recurso.

La temperatura promedio de los sitios de colecta, fue el factor que influyó para la distribución de los grupos en las colectas. De entre los factores ambientales, es ésta la que se considera tener un rol predominante en el crecimiento y la floración de las plantas bulbosas o geofitas, como mencionan Khodorova & Boitel-Conti (2013). Muchas de ellas requieren una secuencia de periodos cálidos y fríos para brotación y posterior floración. Esta es la razón de que se encuentren ubicadas de la forma que se reporta en la gráfica biplot de la (Figura 5).

También en esta Figura, puede observarse que la separación de los materiales se basó en las variables que se agrupan en el CP2. Esto es, en la separación mayor que se observa entre las poblaciones de Ixcateopan de Cuauhtemoc, Teloloapan y Cd. Victoria, las condiciones que las separan fueron la precipitación en el mes más lluvioso (Ixcateopan y Teloloapan) y la precipitación en el mes más seco (Cd. Victoria) en donde se cuenta con una altitud de 1591m y 901m respectivamente.

La altitud no fue una característica determinante o con influencia marcada en la asociación de las colectas en el dendrograma generado por marcador ISSR ni en el análisis de distribución espacial, ya que no coincide el dato de altitud con la agrupación.

En las Figuras 6 a la 11, se reportan la ubicación geográfica, las características de la altitud en los sitios de colecta que se agruparon en el dendrograma generada por ISSR, además de la clasificación bioclimática para cada grupo.

Macías, *et al.*, 2014; Macías, 2009), realizó la clasificación bioclimática de la vertiente del pacífico mexicano. Considerando las agrupaciones generadas en el dendrograma producido con el marcador ISSR los seis clusters se incluyen en, un Macrobioclima, Tropical. Dos Bioclimas, Tropical Pluviestacional y Tropical Xerico. Cuatro Termotipos, Mesotropical, Termotropical Superior, Infratropical y Termotropical Inferior. Dos Ombrotipos, Subhúmedo y Seco inferior.

Las combinaciones encontradas nos permiten sustentar los resultados obtenidos. El cluster II, agrupa únicamente los individuos de la población de Mazamitla, Jalisco, presenta un bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Mesotropical y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1041.8 mm y una temperatura promedio de 15.8 °C. Siendo este el que presenta un rango elevacional mayor y una humedad relativa constante.

El cluster III, agrupa las poblaciones de Valle de Bravo, Edo. De México. Teloloapan, Chilpancingo, Taxco, Chilapa, Tixtla de Guerrero, Guerrero. El Arenal, Tuxcacuesco, Jalisco. Los Reyes Periban, Michoacán. Tecomán, Cómala, Colima, presenta un Bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Termotropical superior y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 911 mm y una temperatura promedio de 16.6 °C. Características climáticas relacionadas con la vegetación de bosque mixto de pino y encino.

El cluster IV, agrupa las poblaciones de Tepecoacuilco, Ixcateopan de Cuauhtémoc, Leonardo Bravo, Guerrero, presenta un Bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Infratropical y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1,350 mm y una temperatura promedio de 31.5 °C. En este cluster se presenta el segundo mayor promedio de precipitación y un aumento considerable en la temperatura constante esto se debe a que en medida que la precipitación aumenta, en los bosques caducifolios comienzan hacerse cada vez más visibles las especies perenifolias generando así un aumento en el dosel arbóreo.

El cluster V, agrupa las poblaciones de Cómala, Colima. Temixco, Morelos. Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero. Casimiro Castillo, Jalisco. Cd. Victoria, Tamaulipas, presenta un Bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Infratropical y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1,637 mm y una temperatura promedio de 27.5 °C. En este cluster se presenta el mayor promedio de precipitación, pero una disminución en la temperatura promedio esto se debe a que este bioclima se distribuye de manera discontinua, permitiendo así un decremento en la humedad relativa producida.

El cluster VI, agrupa las poblaciones de Tecomán, Colima. Teloloapan, Chilpancingo, Guerrero. El Arenal, Tuxcacuesco, Atenguillo, Jalisco. Los Reyes Periban, Michoacán, presenta un Bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Termotropical Superior y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1,066 mm y una temperatura promedio de 19.6 °C. Este bioclima está vinculado a territorios que se ven favorecidos por flujos de viento más húmedos que se descargan sobre sierras, cañadas y piedemontes directamente orientados hacia ellos.

El cluster VII, agrupa las poblaciones de Ixtapan de la Sal, Edo. De México. Casimiro Castillo, Unión de Tula, Jalisco. Tepecoacuilco, Guerrero, presenta un Bioclima Tropical Xerico. Termotipo Termotropical Inferior y un Ombrotipo Seco, generando una precipitación promedio de 704 mm y una temperatura promedio de 20.5 °C. Este bioclima se corresponde con el dominio del bosque tropical caducifolio.

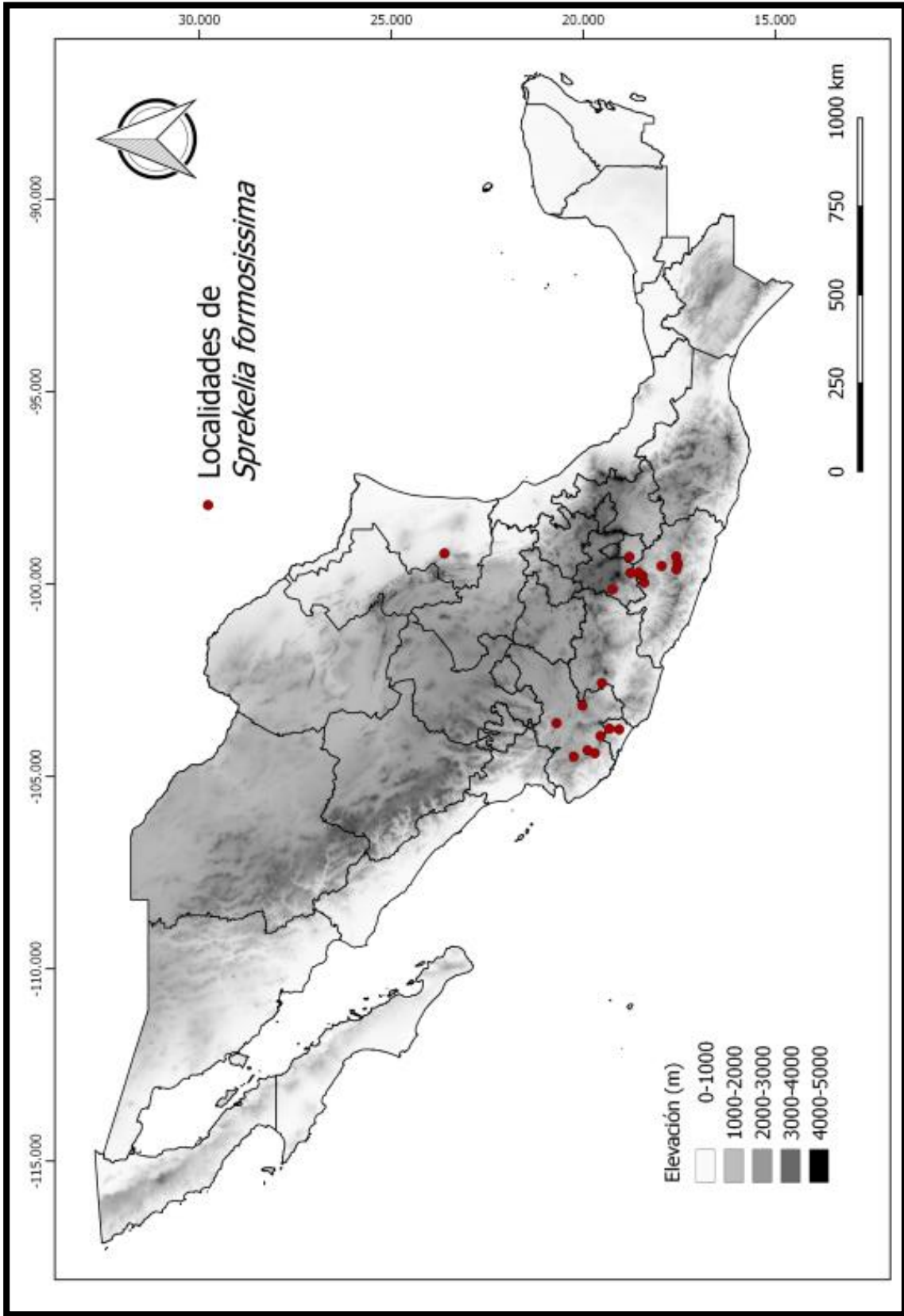


Figura 6. Ubicación geográfica de las poblaciones de estudio de *S. formosissima*.

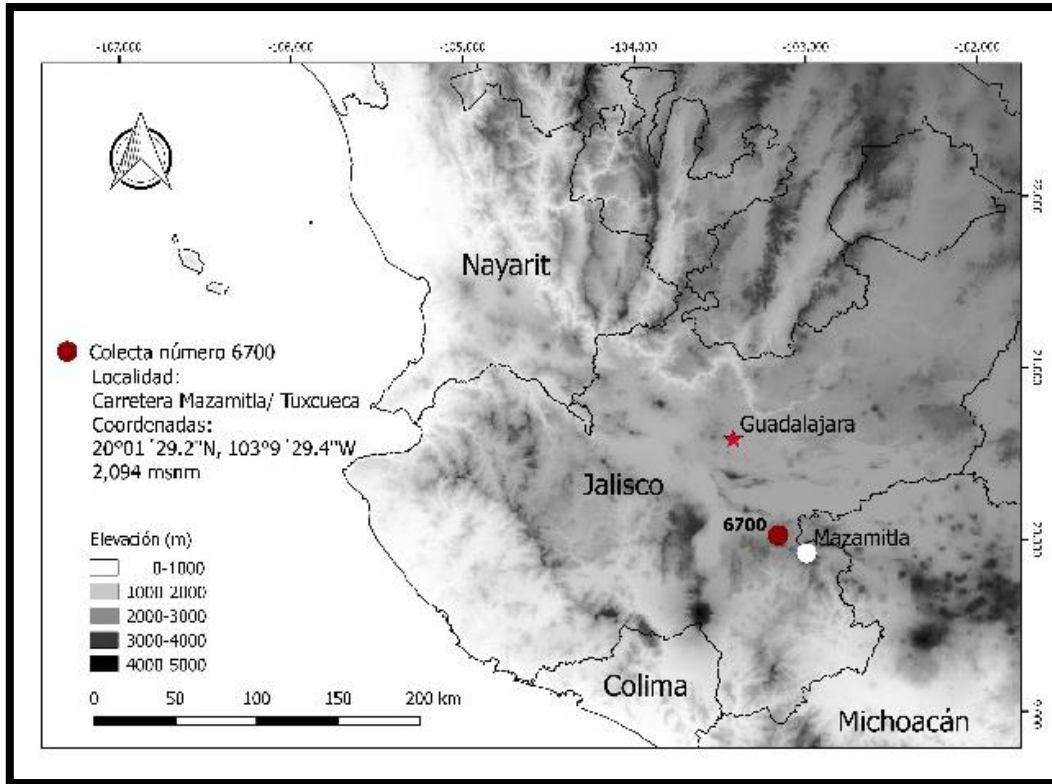


Figura 7. Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster II, con referencias del piso bioclimático correspondiente, bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Mesotropical y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1041.8 mm y una temperatura promedio de 15.8 °C.

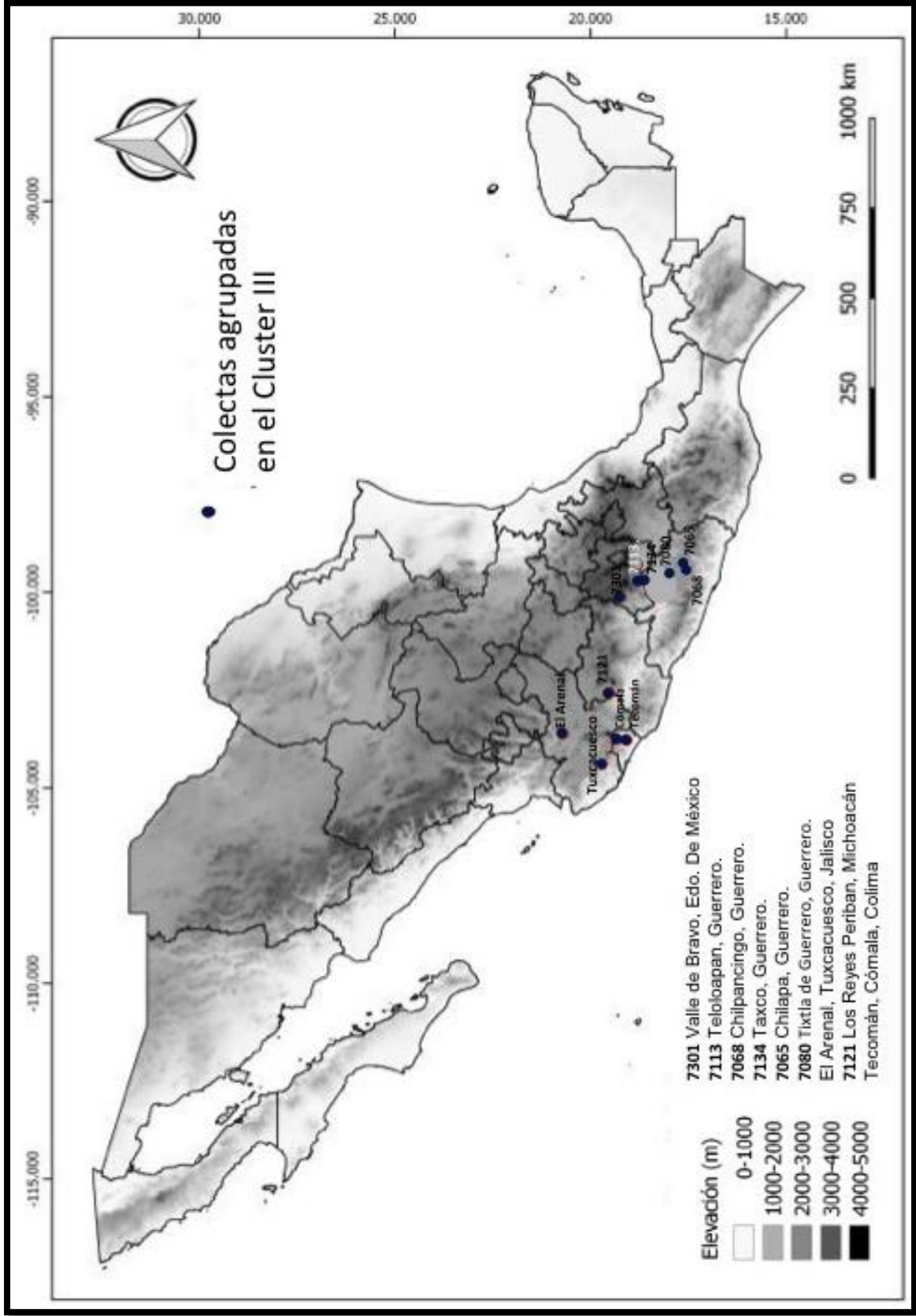


Figura 8. Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster III, con referencias del piso bioclimático correspondiente, Bioclíma Tropical Pluviestacional, Termostipo Termotropical superior y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 911 mm y una temperatura promedio de 16.6 °C.

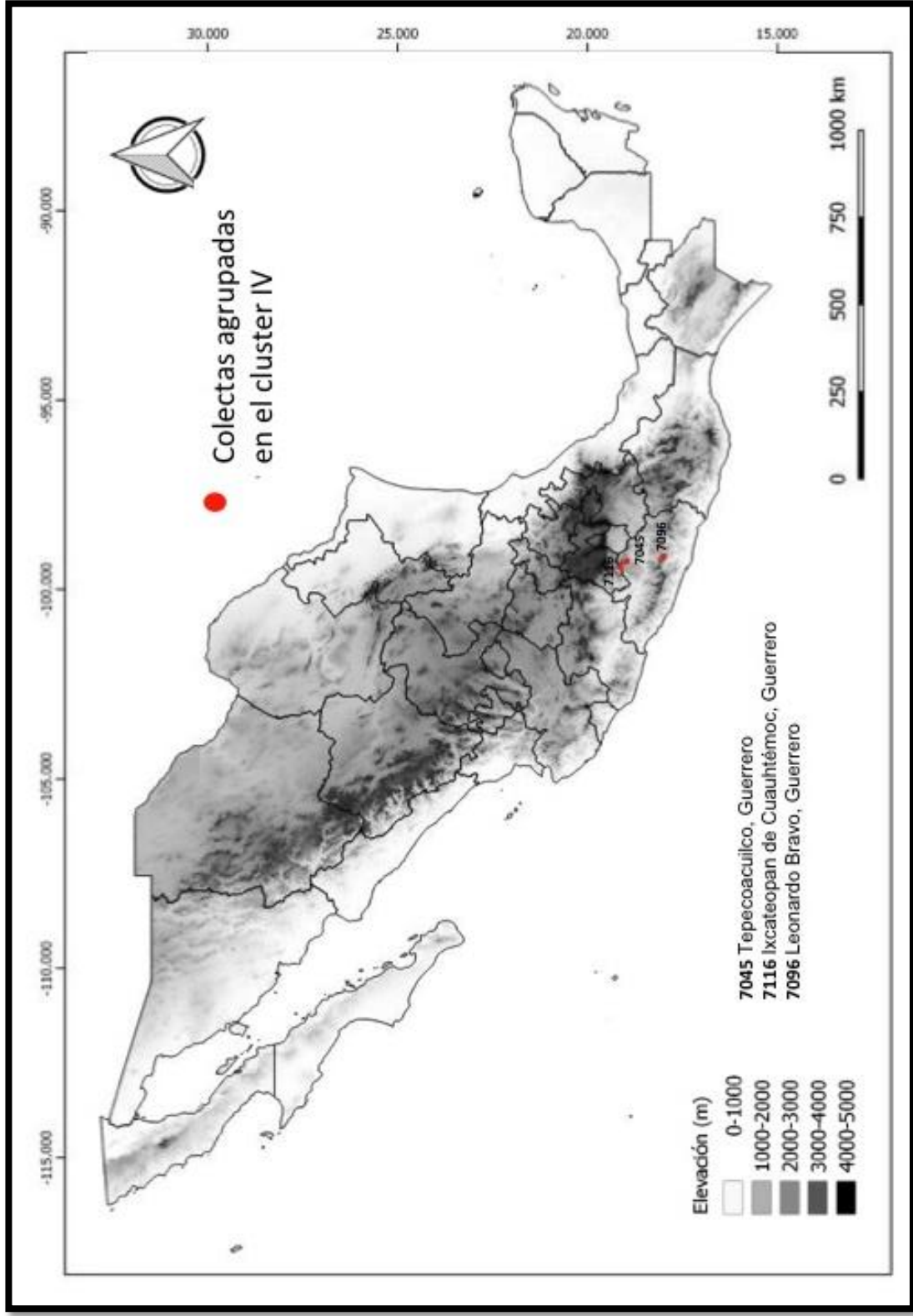


Figura 9. Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster IV, con referencias del piso bioclimático correspondiente, Bioclíma Tropical Pluviestacional, Termotipo Infratropical y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1,350 mm y una temperatura promedio de 31.5 °C.

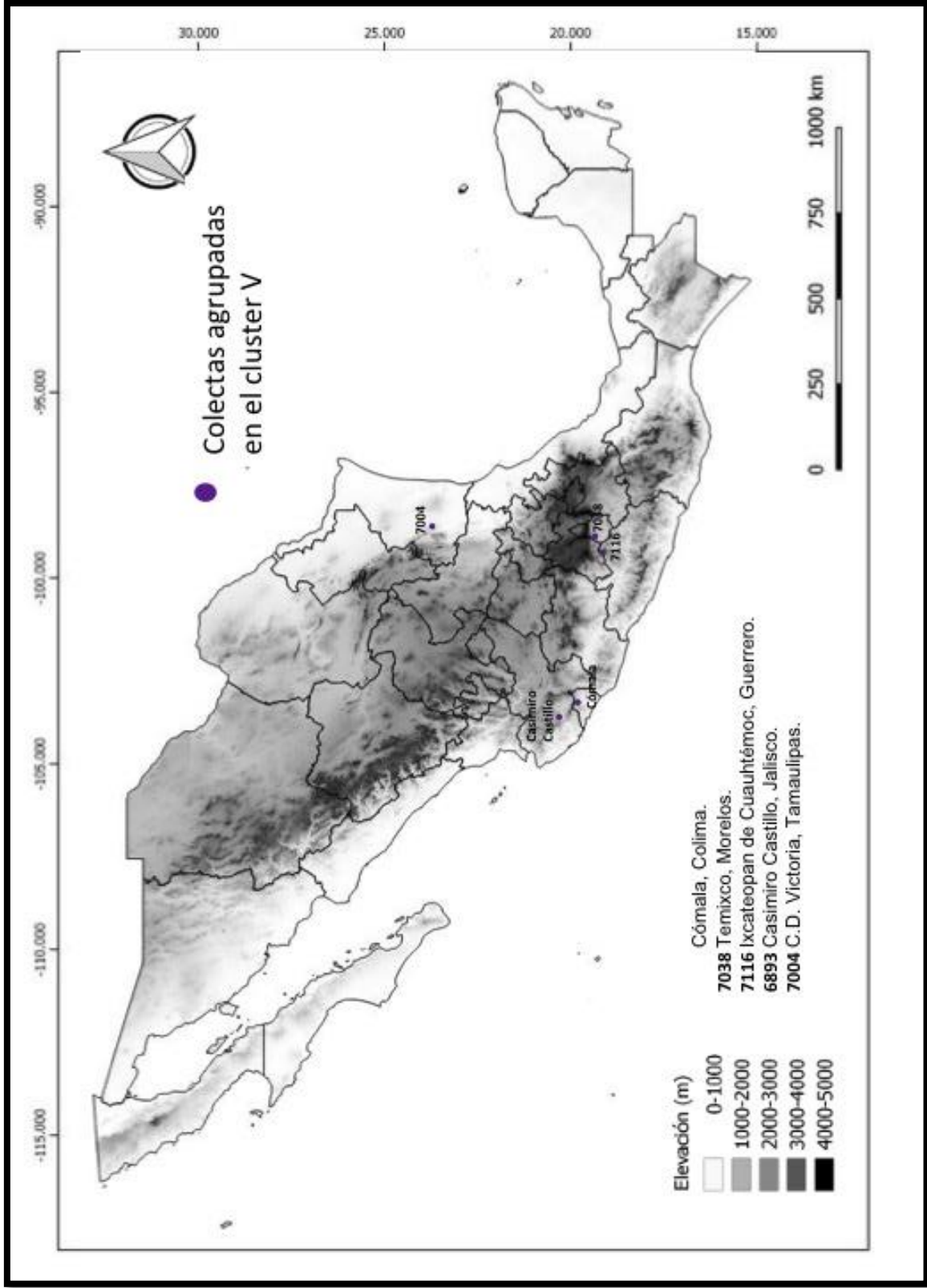


Figura 10. Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster V, con referencias del piso bioclimático correspondiente, Bioclima Tropical Pluviestacional, Termotipo Infratropical y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1,637 mm y una temperatura promedio de 27.5 °C. de 27.5 °C.

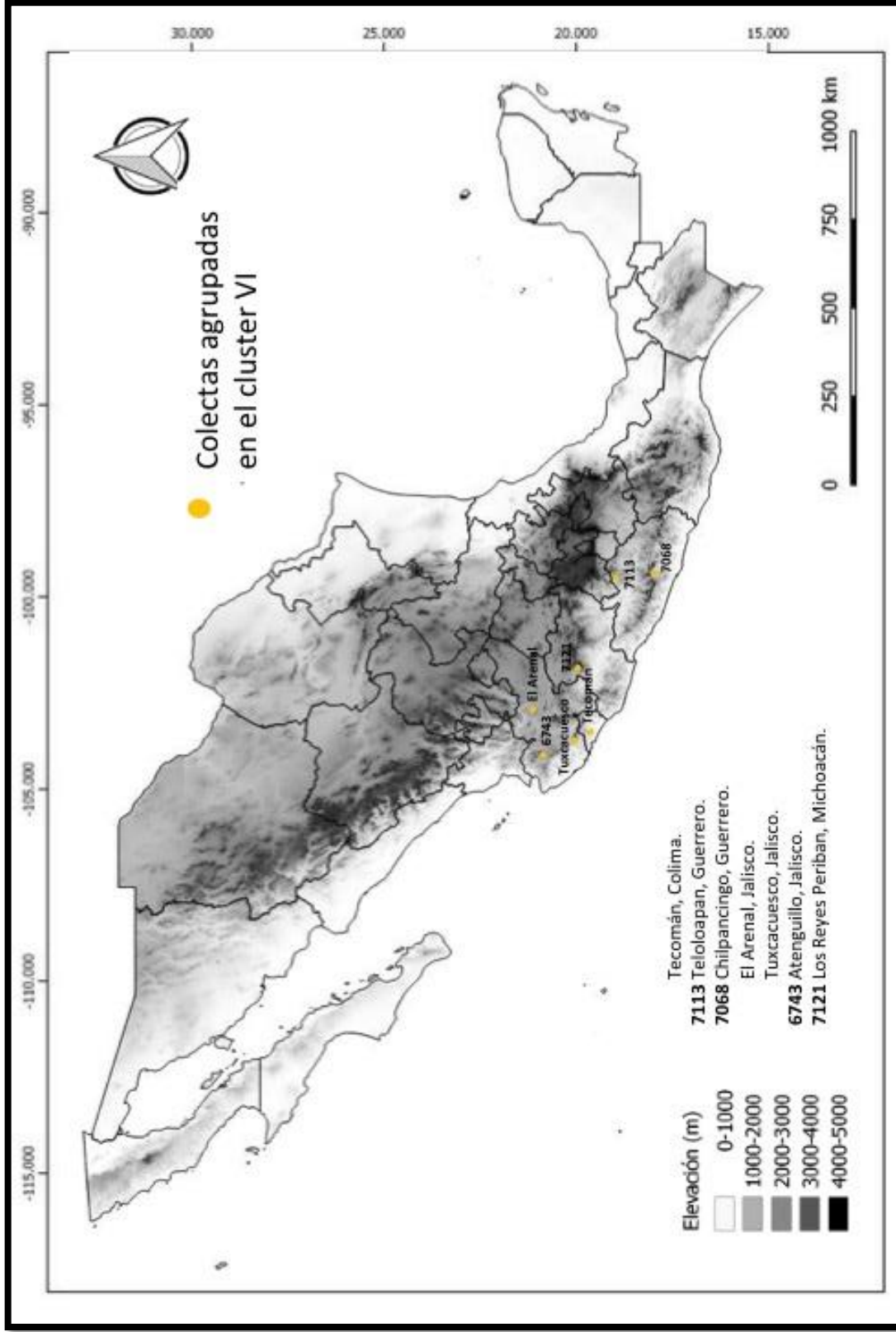


Figura 11. Ubicación geográfica de las poblaciones de *S. formosissima*, agrupadas por el marcador ISSR en el cluster Vi, con referencias del piso bioclimático correspondiente, Bioclíma Tropical Pluviestacional, Termotipo Termotropical Superior y un Ombrotipo Subhúmedo, generando una precipitación promedio de 1,066 mm y una temperatura promedio de 19.6 °C. C.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, reportan un nivel alto de variabilidad genética detectada con el marcador ISSR reportada en similitud con el coeficiente de Jaccard. Los niveles de heterocigocidad promedio y diferenciación genética encontrados, sugieren que la especie no se encuentra en peligro de deriva génica, aunque no existe flujo génico entre las colectas.

La información obtenida a nivel molecular sugiere la existencia de una sola especie entre las diferentes poblaciones de *S. formosissima*. Sin embargo, las diferencias morfológicas observadas pueden deberse a plasticidad fenotípica detectada por el marcador ISSR en secuencias de DNA metiladas o hemimetiladas.

Los cambios presentados en el fenotipo de individuos de *S. formosissima* se adjudican al clima, siendo este el principal factor medioambiental regulador de las modificaciones morfológicas.

Aunque los cambios en la precipitación y la temperatura que aparecen en el área de estudio están regidos por factores latitudinales, longitudinales, regionales y locales, los dos primeros se establecieron como los responsables de las modificaciones morfológicas presentadas en las poblaciones de *S. formosissima*.

Las diferencias morfológicas entre las poblaciones quedaron reflejadas a través del análisis bioclimático en donde cada uno de los grupos que agrupa el cluster pertenece a un Bioclima, Termotipo y Ombrotipo específico.

El análisis de distribución espacial es un punto de partida para la toma de decisiones sobre la creación de programas de mejoramiento genético y conservación de este recurso si la mancha urbana y la construcción de carreteras y complejos habitacionales lo pusieran en peligro.

## LITERATURA CITADA

- Anderson, J.T., Inouye, D.W., McKinney, A.M., Colautti, R.I. & Mitchell-Olds, T. 2012. Phenotypic plasticity and adaptive evolution contribute to advancing flowering phenology in response to climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 3843–3852.
- Bautista-Puga, M.D., Vázquez-García, I.M., Leszczynska-Borys, H., Borys W.M., Arzate-Fernández M.A. 2011. Caracterización de *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. Mediante marcadores morfológicos y moleculares. *Agrociencia*, 45: 413-422.
- Bornet, B. y Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and the specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reported*. 19:209-215.
- Borys, M.W., H. Leszczynska-Borys, & Galván, J.L. 2005. Variants in *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert. *Proceedings of the Royal Society of London. B Biological. Sciences*, 48: 31-37.
- Chinnusamy, V., & Zhu, J.K. 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 133-139.
- CONABIO. 2016, Ficha informativa *Sprekelia formosissima* (L.) Herb. Consultada: 20 de agosto de 2016.
- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/amaryllidaceae/sprekelia-formosissima/fichas/ficha.htm>.
- Domínguez, C.A., Eguiarte L.E., Núñez-Farfán, J., Dirzo, R. 1998. Flower morphometry of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae): geographical variation in mexican populations. *American Journal of Botany*, 85: 637-643.
- Earl, D.A. y vonHoldt, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2): 359-361.
- Espejo-Serna, A.; López-Ferrari, A. 2002. *Flora de Veracruz. Amaryllidaceae*. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. Fascículo 128. pp.32.
- Evanno, G.S., Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14(8): 2611 – 2620.
- Feng, S., Jacobsen, S.E y Reik, W. 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330: 622-627.
- Van Dijk, H. y Kurpershoek, M. 2003. *La Enciclopedia de las Plantas Bulbosas*. Ed. LIPSA. 233-240 pp.

- Hawtin, G., Iwanaga, M. y Hodgkin, T. 1996. Genetic resources in breeding for adaptati3n. *Euphytica*, 92: 255-260.
- Hodgins, K.A. y Barrett, S.C. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany*, 95:185-195.
- Keb-Llanes, M., Gonz1lez, G., Chi-Manzanero, B e Infante., D.2002. A rapid simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reported*. 20:6-18.
- Khodorova, N.V., y Boitel-Conti, M. 2013. The Role of Temperature in the Growth and Flowering of Geophytes. *Plants*, 2: 697-711.
- Kroon de, H., Huber, H., Stuefer, J.F. y van Groenendael, J.M. 2004. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, 166: 73–82.
- Laca-Men3ndez, L.R. 1999. Las plantas americanas en la obra de Charles de l'3cluse: primeras citas en las cartas de Juan de Casta3eda. *Anales del Jard3n Bot1nico de Madrid*, 57(1): 97- 107.
- Lehmiller, D.J. 2003-2004. A new nothogeneric taxon: x*Sprekeliantes* (Amarylidaceae). *Herbertia* 58: 123-126.
- Leszczyńska-Borys, H., y Borys, W.M. 2000. Seed production of *Sprekelia formisissima* (L.) Herbert. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, 42: 96-103.
- Leszczyńska-Borys, H. y Borys, W.M. 2002. *La flora en la cultura del estado de Puebla*. 68-72.
- Leszczyńska-Borys H., W.M. Borys. 1995. Relaciones Ra3z/Bulbo y otras caracter3sticas de *Sprekelia formosissima* *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 1.(3): 77-84.
- Lightbourn, G. y Veilleux, R. 2003. Retrotransposon based markes to characterize somatics hybrids and assess variation induced by protoplast fus3n of monoploidpotatoe. *Acta Horticulturae ISHS*. 619: 235-242.
- L3pez-Ferrari, A.R.,y Espejo-Serna, A. 2002. *Flora de Veracruz. Amaryllidaceae* Instituto de Ecolog3a, A.C. Xalapa, Ver. Fasc3culo 128. pp. 16-19.
- Lozano, P. G. 1992. *Relaci3n entre tama3o de bulbo y la floraci3n en Sprekelia formosissima* (L.) Hebert. Tesis (Ingeniero Agr3nomo Fitotecnista). Puebla, M3xico. 60 p.
- Luan, S., Chiang, T., y Gong, X. 2006. High Genetic Diversity vs. Low Genetic Differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a Narrowly Distributed and Endemic Species in China, Revealed by ISSR Fingerprinting. *Annals of Botany*, 98(3): 583-589.

- Lucena, A. y Carrascosa, F. 2013. Análisis Factorial: *Análisis de componentes principales*. Universitat Pompeu Fabra.
- <http://84.89.132.1/~satorra/M/ClaseComponentsPrincipalsFerranCarrascosa.pdf>
- Macías-Rodríguez, M.Á. 2009. Estudio de las relaciones entre zonobiomas, bioclimas y vegetación en la costa del pacífico Norteamericano. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá.
- Macías-Rodríguez, M.Á., Peinado, M., Giménez de A., J., Aguirre, J.L. y Delgadillo, J. 2014. Clasificación bioclimática de la vertiente del pacífico mexicano y su relación con la vegetación potencial. *Acta Botánica Mexicana*, 109: 133-165.
- Martínez, M. 1979. *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas mexicanas*. Fondo de cultura económica. México, D.F.
- Martinez-Noguez. J.J. 2014. Variación morfométrica y fenología de *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert., en México. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Meerow, A.W., Lehmiller, D.J. y Jason, R.C. 2003. Phylogeny and biogeography of *Crinum* L. (Amaryllidaceae) inferred from nuclear and limited plastid non-coding DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 349-363.
- Noel, F., Machon, N. y Porcher, E. 2007. Genetic Diversity at Molecular Markers and Strong Phenotypic Plasticity in Populations of *Ranunculus nodiflorus*, an Endangered Plant Species in France. *Annals of Botany*, 99: 1203–1212.
- Palacio-López, K., Beckage, B., Scheiner, S. y Molofsky, J. 2015. The ubiquity of phenotypic plasticity in plants: a synthesis. *Ecology and Evolution*, 5(16): 3389–3400.
- Park, S.Y., Murthy, H.N., Chakrabarty, D. y Paek, K.Y. 2009. Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45: 104-108.
- Pradeep, R., Sarla, M.N. y Siddiq, E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1): 9-17.
- Peraza-Echeverría, S., Herrera-Valencia, V.A., y Kay, A.J. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, 161: 359-367.
- Qian, W., Ge, S. y Hong, D. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2): 440-449.

- Reyes-Díaz, J., Arzate-Fernández, I., Piña-Escutia, J.L. y VázquezGarcía, L.M. 2015. Comparative study of the discriminating A. M.; capacity of DNA markers and their effectiveness in establishing genetic relationships in the genus *Tigridia*. *Agrociencia*, 49: 361-372.
- Ruan, Y., Gilmore, J. y Conner, T. 1998. Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 821–833.
- Rzedowski, J. 2006. *Vegetación de México*. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
- Royar Botanic Gardens, KEW. 2016. Consultada 14 de diciembre. <http://www.kew.org/visit-kew-gardens/explore/spring-kew-gardens>.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ra edición. New York. 794 pp.
- Sánchez, O. 1979. La Flora del Valle de México. Ed. Herrero. México, D.F. 103 pp.
- Sakanishi, Y. y Yanagawa, T. 1979. Bulblet formation on scale pieces of various bulbous ornamentals. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 9: 100–107.
- Sethuraman, A. 2013. On inferring and interpreting genetic population structure - applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness. Graduate theses and Dissertations. Paper 13332. <http://lib.dr.iastate.edu/etd>.
- Schlichting, C.D., y Smith, H.. 2002. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology*, 16:189–211.
- Solís, R.L., y Andrade, T.A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Consultada 20 de agosto 2016. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>.
- Torres, N.H. 2000. Colecta y caracterización de *Sprekelia formosissima* (L.) Herb.: una planta silvestre con potencial ornamental. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. 92 pp.
- Traub H. P. 1965. Addenda to Traub's "The Genera of the Amaryllidaceae: (1963)". *Plant Life* 21: 88-89.

- Vidal-Barahona, A., Lagunas, E.L., Valadez, M.E. y Ortiz, G. 2006. Variabilidad morfológica y molecular de cultivares criollos y mejorados de frijol común en Tabasco. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29: 273-281.
- Wolf, A. 2000. ISSR Resource Website. Consultada. 20 de agosto de 2016. <http://www.biosci.ohio-state.edu/ISSR.html>.
- Zhou, S. Smith, D.R. y Stanosz, G.R. 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research*, 105(8): 919–926.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176-183.