



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL VEGETATIVA EN EL GÉNERO *SARCOGLOTTIS***  
**(ORCHIDACEAE, SPIRANTHINAE)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GABRIELA MICAELA CRUZ LUSTRE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**DRA. PATRICIA DOLORES DÁVILA ARANDA**  
**FES-IZTACALA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





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

**EVOLUCIÓN ESTRUCTURAL VEGETATIVA EN EL GÉNERO *SARCOGLOTTIS***  
**(ORCHIDACEAE, SPIRANTHINAE)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GABRIELA MICAELA CRUZ LUSTRE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**DRA. PATRICIA DOLORES DÁVILA ARANDA**  
**FES-IZTACALA**

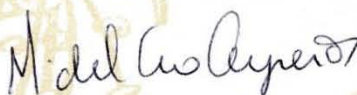
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de febrero de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CRUZ LUSTRE GABRIELA MICAELA** con número de cuenta **512026525** con la tesis titulada **"Evolución estructural vegetativa en el género *Sarcoglottis* (Orchidaceae, Spiranthinae)"**, realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA HILDA FLORES OLVERA  
Vocal: DRA. ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA  
Secretario: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO  
Suplente: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ  
Suplente: DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES

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

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de marzo de 2015.



Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por permitirme continuar con mi formación profesional.

Al CONACYT por los apoyos económicos recibidos bajo el número de CVU/becario: 440662/270076. Al Posgrado en Ciencias Biológicas por el apoyo PAEP para realizar actividades académicas.

Al Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez por dirigir esta tesis. A los miembros del comité tutorial, Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado y Dra. Patricia Dolores Dávila Aranda, por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme hacer el Posgrado en Ciencias Biológicas con los más altos estándares de calidad académica.

Al Instituto de Biología por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A los profesores: Dra. Adriana Muñoz Hernández, Dr. Alejandro Martínez Mena, Dr. Gerardo Vázquez Nin, M.C. Liliana Cervantes Martínez, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Olga Echeverría Martínez, Dra. Patricia Hernández Ledesma, Dra. Patricia Ramos Morales, Dra. Tatiana Fiordeliso Coll (Facultad de Ciencias, UNAM), Dr. Eduardo L. Borba (UFABC), Biól. Carmen Loyola Blanco, Dr. David S. Gernandt, Dr. Fernando Cervantes Reza, Dr. Fernando Chiang Cabrera, Dr. Guillermo Salgado Maldonado, Dr. Pedro Mercado Ruaro, Dra. Susana Magallón Puebla y Dra. Teresa Terrazas (Instituto de Biología, UNAM) por compartirme sus conocimientos y contribuir en mi formación.

Al Dr. Gerardo Salazar por sus sugerencias, por proporcionarme su material fijado previamente, por disponibilizar su colección personal de plantas vivas y por permitirme utilizar sus secuencias de ADN no sometidas.

A la Dra. Teresa Terrazas por permitirme trabajar en el Laboratorio de Botánica Estructural (Instituto de Biología, UNAM), por su paciencia y valiosas enseñanzas, por su disponibilidad para aportar sugerencias y por el tiempo e interés que dedicó para ayudarme a resolver mis dudas anatómicas.

A la Dra. Patricia Dávila por su confianza, apoyo, disposición y acertadas sugerencias.

A los miembros del jurado: Dra. María Hilda Flores Olvera, Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado (Instituto de Biología, UNAM), Dr. Ángel Salvador Arias Montes, Dra. Estela Sandoval Zapotitla (Jardín Botánico-IB, UNAM) y Dra. Silvia Aguilar Rodríguez (FES-Iztacala, UNAM) por la revisión de la tesis y útiles comentarios.

A la M.C. Berenit Mendoza Garfias del Laboratorio de Microscopía Electrónica (Instituto de Biología, UNAM) por su accesibilidad y asesoría durante el procesamiento del material para la microscopía electrónica de barrido y por su compañía agradable durante la toma de las micrografías.

Al Ing. Eric Hágsater por disponibilizar muestras de los ejemplares del Herbario AMO y de las plantas cultivadas en su invernadero. Agradezco también a los biólogos Rolando Jiménez, Luis Sánchez y Elizabeth Santiago por su amable atención durante mis visitas al Herbario AMO. El Biól. Rolando Jiménez además permitió reproducir una de sus ilustraciones.

Al Dr. Eduardo Pérez García (Facultad de Ciencias, UNAM) por proporcionar material para este trabajo.

Al Dr. Ricardo García Sandoval y al Dr. Wilfredo A. Matamoros por su disposición por compartir sus conocimientos sobre métodos filogenéticos.

Al Dr. Cristiano R. Buzatto, M.C. Marcelo Pedron (UFRGS) y al Prof. Jose A. Radins (MERNR) por las fotografías e información de las Spiranthinae sudamericanas incluidas en este trabajo.

A los guías que me acompañaron durante las colectas en campo. Al Biol. Álvaro Campos por su apoyo durante la colecta de material en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas. Al Dr. Thorsten Krömer (UV), quien proporcionó información de sus ejemplares cultivados en el orquideario de dicha estación.

A los compañeros del cubículo B-201 (Instituto de Biología, UNAM): Alejandra Martínez, Carolina Granados, Coyolxauhqui Figueroa, Efraín Fernández, Erika Bautista, Héctor Huerta, Itzi Fragoso, Karen Hernández, Liliana Cervantes, Lucía Ortega, Moisés Ávila, Sandra Albor, Ricardo de Santiago, Rubí Bustamante, Tania Hernández, Víctor Trejo y Viridiana Morales por la convivencia agradable. A Ana Martínez, Claudia Gutiérrez, Claudia Montealegre y Miguel Castañeda, por su amistad y ayuda, por las convivencias, por compartir conocimientos de los métodos e historia natural de los grupos que estudian y por los trabajos extras que fueron muy amenos al realizarlos juntos. Asimismo a los brasileños que hicieron su “*doutorado sanduiche*” en el B-201: a Aline do Vale (UFMG), Leonardo R.S. Guimarães (IBt) y Sérgio A. Adachi (UNESP), por su amistad y apoyo, por compartirme sus experiencias académicas, por las pláticas divertidas e inagotables, los paseos, las clases de portugués y por todas las cosas que aprendí con cada uno de ellos.

A los compañeros del Laboratorio de Botánica Estructural: Alicia Rojas, Cecelic Reséndiz, Gisela Salvatierra, Jorge Gutiérrez, Marisela Yáñez, Miguel Cruz Espíndola, Miguel Hernández Alba, Monserrat Ramírez, Monserrat Vázquez, Rocío Escamilla, Silvia Sumaya, Yolanda Morales y Yoscelina Centeno por su compañía agradable y su apoyo durante el trabajo anatómico. A la Biól. Dalia Grego por la asesoría en dicho laboratorio.

A Angélica Guerrero, Yoselin Cadena (Instituto de Biología, UNAM), Alexis Salazar, Blanca Mejía, Erika Olmedo, Marisol de la Mora, Sergio Ramos, Verónica Cepeda (Instituto de Ecología, UNAM), Elkin Noguera (Facultad de Ciencias, UNAM), Guadalupe Cerezo Lira y Miriam Martínez Ramírez (Facultad de Medicina, UNAM) por todo el apoyo brindado.

Al personal del Instituto de Biología, especialmente a la Biól. Rocío González por su valioso apoyo en los trámites referentes al posgrado, a Verónica Ramírez e Ing. Jorge López (Secretaría Técnica) por su ayuda en el servicio de videoconferencias, al M.C. Alberto Reyes, M.C. Ma. del Rosario García y Biól. Miriam Ramírez por su apoyo en la revisión del Herbario MEXU y a los encargados de la biblioteca por su amabilidad.

Al Lic. Daniel Villarreal (FES-Iztacala, UNAM) por su ayuda con el servicio de videoconferencias.

Al personal de la Unidad de Administración del Posgrado (Ciencias Biológicas) por su atención y eficiencia en los trámites, especialmente al Dr. Armando Rodríguez, a la Dra. Ma. del Coro Arizmendi, a Erica Flores y a Lilia Jiménez.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron tanto en la realización de esta tesis como en mi formación académica y personal.



## **DEDICATORIA**

A mi amada familia: a mis padres Silvano Cruz y Margarita Lustre, a mi abuela Micaela Juárez, a mis tíos Baldomero Cruz y Julia Cruz, a mis hermanas Carmen, Yola, Faby y Heidi y a mis sobrinos, por su gran amor, por creer en mí y darme en todo momento su apoyo incondicional.

A Miguel Ángel Soto Arenas (1963-2009), experto en orquídeas mexicanas quien me motivara a hacer el posgrado y a continuar con el estudio de estas plantas.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
II. ANTECEDENTES .....	5
2.1 Morfología de <i>Sarcoglottis</i> .....	5
2.1.1 Forma de crecimiento .....	5
2.1.2 Raíces .....	5
2.1.3 Hojas .....	5
2.1.4 Inflorescencia y flores .....	6
2.1.5 Cápsula y semillas .....	7
2.2 Antecedentes taxonómicos del género <i>Sarcoglottis</i> (Spiranthinae) .....	9
2.3 Estudios de las estructuras vegetativas en Spiranthinae .....	12
III. OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo general .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
4.1 Muestra taxonómica .....	19
4.2 Fuente del material para los estudios estructurales .....	19
4.3 Fuente de los datos moleculares .....	20
4.4 Procesamiento del material vegetativo .....	20
4.4.1 Microscopía óptica .....	20
4.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	24
4.5 Descripción morfológica y anatómica .....	24
4.6 Selección y codificación de los caracteres estructurales vegetativos .....	25
4.7 Selección de los caracteres moleculares .....	27
4.8 Análisis filogenéticos .....	29
4.9 Optimización de caracteres estructurales .....	31
V. RESULTADOS .....	32
5.1 Descripción morfológica y anatómica .....	32
5.1.1 Raíz .....	32
a) Morfología .....	32
b) Anatomía (corte transversal) .....	32
5.1.2 Hoja .....	34
a) Morfología .....	34
b) Micromorfología (superficie epidérmica) .....	36
c) Anatomía (corte transversal) .....	38
5.2 Análisis filogenéticos .....	57
5.2.1 Análisis de los datos estructurales .....	57
5.2.2 Análisis combinado de los datos estructurales y moleculares .....	58
5.3 Optimización de los caracteres estructurales .....	60

<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	68
6.1 Importancia de los caracteres estructurales en la reconstrucción filogenética .....	68
6.2 Evolución de caracteres estructurales y su importancia como marcadores taxonómicos .....	70
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b> .....	82

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Pág.
<p><b>Figura 1.</b> Morfología de <i>Sarcoglottis richardiana</i> (Schltr.) Salazar &amp; Soto Arenas (Spiranthinae). A, planta en floración. B, flor en vista lateral. C, flor vista de tres cuartos. D-F, disección floral. D, sépalo dorsal. E, sépalo lateral. F, pétalo. G, labelo. H, labelo en vista lateral rodeando la columna. I, columna en vista lateral. J, columna en vista frontal. K, polinario en vista ventral. L, polinario en vista dorsal. M, polinario en vista lateral</p>	8
<p><b>Figura 2.</b> Esquemas de la terminología utilizada en la descripción de la epidermis. A, contornos celulares. B, escultura de las paredes anticlinales en células vistas en corte transversal. C, curso de las paredes anticlinales. D, división de la superficie de una célula epidérmica. Ea, b, formas básicas de las células vistas en corte transversal.</p>	25
<p><b>Figura 3.</b> Morfología de algunas de las especies de <i>Sarcoglottis</i> (Spiranthinae) incluidas en este trabajo. A, <i>Sarcoglottis assurgens</i>. B, <i>Sarcoglottis lobata</i>. C, <i>Sarcoglottis sceptrodes</i>. D, <i>Sarcoglottis schaffneri</i>. E, <i>Sarcoglottis corymbosa</i>. F, <i>Sarcoglottis richardiana</i>. G, <i>Sarcoglottis scintillans</i>. H, <i>Sarcoglottis grandiflora</i>. I, <i>Sarcoglottis rosulata</i>. J, K, <i>Sarcoglottis uliginosa</i>.</p>	40
<p><b>Figura 4.</b> Anatomía de la raíz de algunos representantes de <i>Sarcoglottis</i> (Spiranthinae) incluidos en este trabajo. A, H, pelos radicales con pared continua y con dehiscencia en espiral de <i>S. scintillans</i>. B, pelo radical con dehiscencia en espiral de <i>S. sceptrodes</i>. C, velamen uniestratificado en <i>S. uliginosa</i> y engrosamientos en su pared celular. D, velamen triestratificado y engrosamientos escalariformes en la exodermis de <i>S. scintillans</i>. E, poros, engrosamientos en las paredes celulares del velamen e hifa en <i>S. lobata</i>. F, tilosoma lamelado en <i>S. schaffneri</i>. G, rafidios en una célula del córtex de <i>S. lobata</i>. H, pelo radical con pared continua y con dehiscencia en espiral en <i>S. scintillans</i>. I, velamen uniestratificado en <i>S. schaffneri</i> y engrosamientos en su pared celular. J, velamen triestratificado de <i>S. grandiflora</i>. K, vista general de la raíz de <i>S. uliginosa</i>. L, endodermis, periciclo y tejido vascular de <i>S. uliginosa</i>. M, células de parénquima en el córtex con spiranthosomas y banda de Caspary en la endodermis de <i>S. sceptrodes</i>.</p>	42
<p><b>Figura 5.</b> Morfología y anatomía de la raíz de algunos representantes de Spiranthinae utilizados en este trabajo como grupos de comparación. A, raíces lateralmente comprimidas en <i>Pelexia ekmanii</i>. B, pelos radicales de pared continua y con dehiscencia en espiral de <i>Pelexia</i> sp. C, espacios supraendodérmicos en <i>P. gutturosa</i>. D, tejido vascular en <i>Brachystele camporum</i>. E, tejido vascular en <i>Sauroglossum elatum</i>. F, velamen con seis estratos de <i>S. elatum</i>. G, tilosoma lamelado de <i>S. elatum</i>.</p>	44
<p><b>Figura 6.</b> Micromorfología de la superficie epidérmica de la hoja de algunos representantes de <i>Sarcoglottis</i> (Spiranthinae) incluidos en este trabajo. A, células epidérmicas (adax.) con ceras epicuticulares intactas de tipo costra en <i>S.</i></p>	46

*sceptrodes*. B, células epidérmicas poligonales isodiamétricas (adax.) con pared periclinal plana con giba convexa y paredes anticlinales rectas con estrías de *S. corymbosa*. C, células epidérmicas (adax.) con pared periclinal convexa de *S. uliginosa*. D, célula epidérmica (adax.) con estrías finas en los márgenes y microrelieve ausente en la parte central de *S. grandiflora*. E, célula epidérmica (adax.) con estrías finas en los márgenes y estrías en la parte central de *S. richardiana*. F, célula epidérmica (adax.) con estrías gruesas en los márgenes y estrías y verrugas en la parte central de *S. sceptrodes*. G, microrelieve de la parte central en la célula epidérmica (adax.) de *S. rosulata* con estrías y verrugas. H, estrías finas en las células subsidiarias del estoma de *S. grandiflora*. I, estrías gruesas en las células subsidiarias del estoma de *S. corymbosa*. J, estoma diacítico (abax.) en *S. assurgens*. K, estoma anisocítico (abax.) en *S. uliginosa*. L, estoma tetracítico (abax.) en *S. scintillans*.

**Figura 7.** Micromorfología de la superficie epidérmica de la hoja de algunos representantes de Spiranthinae utilizados en este trabajo como grupos de comparación. A, células epidérmicas poligonales isodiamétricas (adax.) en *Pelexia funckiana*. B, células epidérmicas poligonales alargadas (adax.) en *Sauroglossum elatum*. C, células epidérmicas poligonales alargadas (adax.) con paredes anticlinales onduladas en *S* y estomas anomocíticos de *Brachystele camporum*. D, célula epidérmica (adax.) con estrías finas en los márgenes y microrelieve ausente en la parte central de *S. elatum*. E, célula epidérmica (adax.) con estrías gruesas en los márgenes y estrías en la parte central en *Pelexia* sp. F, microrelieve de la pared periclinal (adax.) con concavidades en *Stenorrhynchos speciosum*. G, estrías finas en las células subsidiarias del estoma (adax.) de *Cyclopogon luteoalbus*. H, estrías gruesas en las células subsidiarias del estoma (adax.) de *P. gutturosa*. 48

**Figura 8.** Anatomía de la hoja de algunos representantes de *Sarcoglottis* (Spiranthinae) incluidos en este trabajo. A, células epidérmicas dorsiventralmente alargadas con pared periclinal plana con giba convexa (adax.) en *S. rosulata*. B, hoja hipostomática, células epidérmicas no alargadas dorsiventralmente con pared periclinal convexa (adax.) y mesofilo homogéneo en *S. scintillans*. C, borde foliar parenquimático de *S. sceptrodes*. D, borde foliar epidérmico de *S. uliginosa*. E, región media de la hoja de *S. grandiflora*. F, estoma y células braciiformes del mesofilo adyacentes a la superficie abaxial en *S. scintillans*. G, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma de V invertida en *S. scintillans*. H, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma horizontal en *S. schaffneri*. 50

**Figura 9.** Anatomía de la hoja de algunos representantes de Spiranthinae utilizados en este trabajo como grupos de comparación. A, hoja hipostomática con células epidérmicas dorsiventralmente alargadas (adax.) y mesofilo homogéneo en *Cyclopogon luteoalbus*. B, hoja hipostomática con células epidérmicas dorsiventralmente alargadas (adax.) y mesofilo heterogéneo en *Pelexia ekmanii*. C, hoja anfistomática con células epidérmicas dorsiventralmente no alargadas (adax.) y mesofilo heterogéneo en *Brachystele camporum*. D, borde parenquimático en *B. camporum*. E, borde epidérmico en *P. ekmanii*. F, borde epidérmico en *Sauroglossum elatum*. G, región media de la 52

hoja de *S. elatum*. H, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma de V invertida en *S. elatum*. I, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma horizontal en *P. ekmanii*.

**Figura 10.** Árbol de consenso estricto de los 23 AMP con las relaciones filogenéticas de los representantes de Spiranthinae incluidos en este trabajo inferidas con el análisis de los datos estructurales. 58

**Figura 11.** Relaciones filogenéticas en *Sarcoglottis* y otros representantes de Spiranthinae inferidas por parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS). 61

**Figura 12.** Relaciones filogenéticas en *Sarcoglottis* y otros representantes de Spiranthinae inferidas por parsimonia y máxima verosimilitud del análisis combinado de las secuencias de ADN y los datos estructurales. A, topología del árbol de consenso estricto de los tres AMPs. B, uno de los AMPs encontrado por MP. 62

**Figura 13.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en el AMP de la Figura 12B. A, presencia de rizoma. B, forma de las células del velamen. C, número de estratos celulares del velamen. D, presencia de hojas en la antesis. 63

**Figura 14.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en el AMP de la Figura 12B. A, tipo de contracción de la lámina foliar en la parte basal. B, tipo de contorno celular epidérmico foliar. C, presencia de estrías en la pared anticlinal de las células epidérmicas foliares. D, tipo de curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas foliares. 64

**Figura 15.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en el AMP de la Figura 12B. A, tipo de microrelieve de la pared periclinal en los márgenes de las células epidérmicas foliares. B, tipo de microrelieve de la pared periclinal en la parte central de las células epidérmicas foliares. C, grosor de las estrías en las células subsidiarias del estoma. D, forma de las células epidérmicas de la superficie adaxial de la hoja. 65

**Figura 16.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en el AMP de la Figura 12B. A, tipo de mesofilo. B, disposición de los elementos del xilema de los haces vasculares foliares. C, tipo de borde foliar. D, tipo de hoja de acuerdo con la ubicación de los estomas. 66

**Figura 17.** Distribución de los cambios de los estados de carácterestructurales en la versión simplificada del árbol de la Figura 12B. 67

**Cuadro 1.** Especies de Spiranthinae incluidas en el presente estudio. 21

**Cuadro 2.** Ejemplares de respaldo de las muestras analizadas anatómicamente en este trabajo. 22

<b>Cuadro 3.</b> Ejemplares de respaldo y números de acceso en GenBank de las secuencias de ADN utilizadas en este trabajo.	23
<b>Cuadro 4.</b> Caracteres morfológico-anatómicos de la raíz y la hoja de los miembros de Spiranthinae incluidos en este trabajo codificados para los análisis filogenéticos y la optimización de los caracteres estructurales vegetativos.	26
<b>Cuadro 5.</b> Matriz de caracteres morfológico-anatómicos de la raíz y la hoja de los miembros de Spiranthinae incluidos en este trabajo utilizados en los análisis filogenéticos y la optimización de los caracteres estructurales vegetativos.	27
<b>Cuadro 6.</b> Características morfológico-anatómicas de las raíces de las especies de Spiranthinae estudiadas en este trabajo.	53
<b>Cuadro 7.</b> Características morfológicas de las hojas de las especies de Spiranthinae incluidas en este trabajo.	54
<b>Cuadro 8.</b> Características micromorfológicas de la superficie epidérmica de las hojas de las especies de Spiranthinae incluidas en este trabajo.	55
<b>Cuadro 9.</b> Características anatómicas de las hojas de las especies de Spiranthinae estudiadas en este trabajo.	56
<b>Cuadro 10.</b> Características de las matrices de datos utilizadas en este trabajo.	57

## RESUMEN

El género *Sarcoglottis* (Spiranthinae, Cranichideae) incluye aproximadamente 45 especies de orquídeas neotropicales, terrestres, con raíces fasciculadas, hojas dispuestas en una roseta basal y flores con el labelo adnado a los sépalos laterales y el ovario, formando un nectario. En este trabajo se estudiaron 10 especies de *Sarcoglottis* y ocho representantes adicionales de otros géneros de Spiranthinae: *Brachystele*, *Cyclopogon*, *Pelexia* (4 spp.), *Sauroglossum* y *Stenorrhynchos* como grupos externos de acuerdo con estudios filogenéticos previos, con el fin de proporcionar una descripción morfológico-anatómica de las raíces y hojas, evaluar sus relaciones filogenéticas y explorar la evolución de los caracteres estructurales vegetativos. Para el estudio anatómico se estudiaron raíces y hojas mediante microscopía óptica y electrónica de barrido, encontrando que en *Sarcoglottis* pueden presentarse uno o tres estratos de células en el velamen y que el género es anatómicamente similar a los grupos externos. Se encontraron tilosomas lamelados en todas las especies aquí examinadas. Las relaciones filogenéticas se evaluaron mediante parsimonia y máxima verosimilitud (ML) utilizando 16 caracteres estructurales en combinación con secuencias de ADN de cloroplasto (*matK*, *trnL-trnF*) y nuclear (ITS), encontrando que, con excepción del análisis separado de los caracteres estructurales, *Sarcoglottis* es monofilético con soporte alto e incluye dos clados, uno con las especies México-centroamericanas y el otro a las sudamericanas. La posición filogenética de *Sarcoglottis sceptrodes* y *Brachystele camporum* no se resolvió inequívocamente. Los cambios en los caracteres estructurales se analizaron usando el criterio de optimización ACCTRAN sobre uno de los árboles más parsimoniosos derivado del análisis combinado, topológicamente idéntico al obtenido con ML, mostrando que dichos caracteres aparecen más de una vez en el árbol filogenético, sugiriendo homoplasia a nivel general, posiblemente como respuesta a presiones ambientales similares. Sin embargo, un tercio de los caracteres constituyen sinapomorfias en niveles menos inclusivos; por ejemplo, la ausencia de hojas en la anthesis, las células epidérmicas poligonales alargadas, las células planas con giba convexa, el mesofilo heterogéneo y las hojas anfistomáticas.

**Palabras clave:** Anatomía vegetativa, evolución estructural, filogenia, optimización, Orchidaceae, *Sarcoglottis*.



## ABSTRACT

The genus *Sarcoglottis* includes approximately 45 species of Neotropical terrestrial orchids with fasciculate roots, leaves arranged in a basal rosette and flowers with the labellum adnate to the lateral sepals at base to form a nectary. In this work, 10 species of *Sarcoglottis* were studied and eight additional representatives of other genera of Spiranthinae, namely *Brachystele*, *Cyclopogon*, *Pelexia* (4 spp.), *Sauroglossum* and *Stenorrhynchos* were used as outgroups based on previous phylogenetic studies, with the aim of providing a morphological and anatomical description, clarifying their phylogenetic relationships, and exploring the evolution of the vegetative structural characters. For the anatomical study, roots and leaves were examined through light microscopy and scanning electron microscopy, finding that *Sarcoglottis* has a one- or three-layered velamen and is anatomically similar to the outgroups. Lamellate tilosomes were observed in all the species examined herein. Phylogenetic relationships were assessed under maximum parsimony and maximum likelihood (ML) criteria analysing sixteen vegetative characters in combination with nucleotide sequences of plastid (*matK-trnK*, *trnL-trnF*) and nuclear DNA (ITS), showing that, except for the separate analysis of structural characters, *Sarcoglottis* is monophyletic with strong support and includes two clades, one including Mexican-Central American species and the other South American species. The phylogenetic positions of *Sarcoglottis sceptrodes* and *Brachystele camporum* are not unequivocally resolved. Changes in the structural characters were analysed using the ACCTRAN optimization on one of the most parsimonious trees derived from the combined analysis, which was topologically identical with the ML tree, showing that such characters appear more than once on the phylogenetic tree and suggesting homoplasy at a general level, possibly in response to similar environmental pressures. However, one third of them are synapomorphies at less-inclusive levels, for example, leaves absent at anthesis, elongated polygonal epidermal cells, flat epidermal cells with a convex hunch, heterogeneous mesophyll, and anfiomatic leaves.

**Key words:** Vegetative anatomy, structural evolution, phylogeny, optimization, Orchidaceae, *Sarcoglottis*.

## I. INTRODUCCIÓN

*Sarcoglottis* C.Presl pertenece a la subtribu Spiranthinae Lindl. (tribu Cranichideae Endl., subfamilia Orchidoideae *sensu* Chase *et al.*, 2003, un grupo de orquídeas extremadamente diverso (aproximadamente 40 géneros y 400 especies) y monofilético que se restringe casi exclusivamente al Neotrópico (Salazar, 2003). A la fecha se han descrito unas 45 especies de *Sarcoglottis*, lo cual lo convierte en uno de los géneros más diversos dentro de la subtribu, superado únicamente por *Cyclopogon* C.Presl y *Pelexia* Poit. ex Rich. (Govaerts *et al.*, 2015). Su distribución va desde el norte de México, pasando por Centroamérica, Trinidad y las Antillas menores hasta Sudamérica, excepto Chile (Salazar, 2003), alcanzando su mayor diversidad de especies en el sureste de Brasil (Govaerts *et al.*, 2015). Los ambientes en los que habita van desde aquellos con una estación de sequía marcada, como los bosques de encino y matorrales xerófilos de México, hasta los bosques húmedos del Neotrópico e incluso pastizales inundados naturalmente en Sudamérica (Hoehne, 1945).

La delimitación del género *Sarcoglottis*, como la mayoría de los géneros de Spiranthinae, se ha basado principalmente en caracteres florales, particularmente del nectario y el rostelo, es decir, la porción no receptiva del ápice del carpelo medio que da origen al viscidio (porción adhesiva que adhiere el polinario al polinizador; Dressler, 1993). Sin embargo, estudios filogenéticos moleculares recientes han mostrado que en algunos grupos de orquídeas los caracteres estructurales vegetativos también pueden ser útiles como marcadores taxonómicos e indicadores de las relaciones filogenéticas. Ejemplos de lo anterior han sido documentados para la tribu pantropical Malaxideae (Cameron, 2005), la subtribu neotropical Oncidiinae (Sandoval-Zapotitla *et al.*, 2010) y algunos grupos neotropicales de la subtribu Spiranthinae (Salazar *et al.*, 2003, 2011; Salazar y Ballesteros-Barrera, 2010; Salazar y Dressler, 2011). Por otra parte, a pesar de la riqueza de especies y la variedad de condiciones ambientales en las que prosperan los miembros del género *Sarcoglottis*, el conocimiento de la anatomía vegetativa de sus especies es muy limitado y probablemente podría proporcionar información sobre las modificaciones de las plantas con respecto a las condiciones ambientales que se encuentran a su disposición, como se ha mostrado en el trabajo de Figueroa *et al.* (2008).

Por lo anterior, en este trabajo se estudian aspectos anatómicos de raíces y hojas de algunos representantes del género *Sarcoglottis* con el fin de: 1) describir la morfología y anatomía de las hojas y raíces, 2) proponer hipótesis de la evolución de los caracteres estructurales vegetativos dentro del género; y 3) discutir la utilidad de estos caracteres como marcadores taxonómicos y para inferir las relaciones filogenéticas de *Sarcoglottis*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Morfología de *Sarcoglottis*

#### 2.1.1 Forma de crecimiento

*Sarcoglottis* comprende plantas herbáceas perennes con una estructura básica similar a la de otras monocotiledóneas. Están constituidas por una serie de vástagos que se generan de manera consecutiva a partir de meristemos o yemas de renuevo situadas en la base del vástago anterior, formando un eje compuesto, es decir, tienen crecimiento simpodial (Bell y Bryan, 1991). Estas plantas presentan una arquitectura vegetativa que corresponde al modelo de Tomlinson (Hallé *et al.*, 1978), por constar de unidades funcionales básicas completas, llamadas módulos, que se repiten y son ortotrópicos. Cada módulo consta de numerosas raíces agrupadas en un fascículo, la yema de renuevo de la siguiente estación de crecimiento y un tallo extremadamente reducido que porta las hojas y una inflorescencia apical. En algunas especies se puede presentar un rizoma que genera módulos a intervalos, permitiendo a las plantas explorar el hábitat (Hágsater *et al.* 2005).

#### 2.1.2 Raíces

Las raíces son numerosas, carnosas, fusiformes, presentan pelos radicales y se disponen en un fascículo, constituyendo órganos de perennación que sobreviven enterrados bajo el suelo durante la temporada más desfavorable del año y sustentan el desarrollo del nuevo brote durante la siguiente estación de crecimiento. Solamente en *Sarcoglottis uliginosa* Barb.Rodr., las raíces son relativamente delgadas y se pueden presentar varios fascículos a lo largo de un rizoma delgado y largo que crece bajo el suelo (Fig. 1A; Salazar, 2003).

#### 2.1.3 Hojas

Las hojas son generalmente delgadas y suaves, no articuladas y se disponen en una roseta basal debido a la reducción extrema del tallo (Salazar, 2003). Dependiendo de la especie, las hojas pueden estar presentes o no al momento de la floración, pero siempre son deciduas al final de la temporada más húmeda del año (Hágsater *et al.*, 2005). Las

hojas pueden ser casi sésiles, con la lámina foliar atenuada hacia la base o con la base distintamente contraída en un pecíolo corto. Esta última generalmente es plana, dispuesta de manera horizontal o ascendente, de forma ovada, elíptica o elíptica-oblanceolada. El color varía en tonos de verde, a menudo con blanco, ya sea de color homogéneo o a menudo con manchas o en rayas longitudinales blanquecinas, pudiendo variar estos patrones de coloración incluso entre los individuos de una misma población (Fig. 1A; Salazar, 2003).

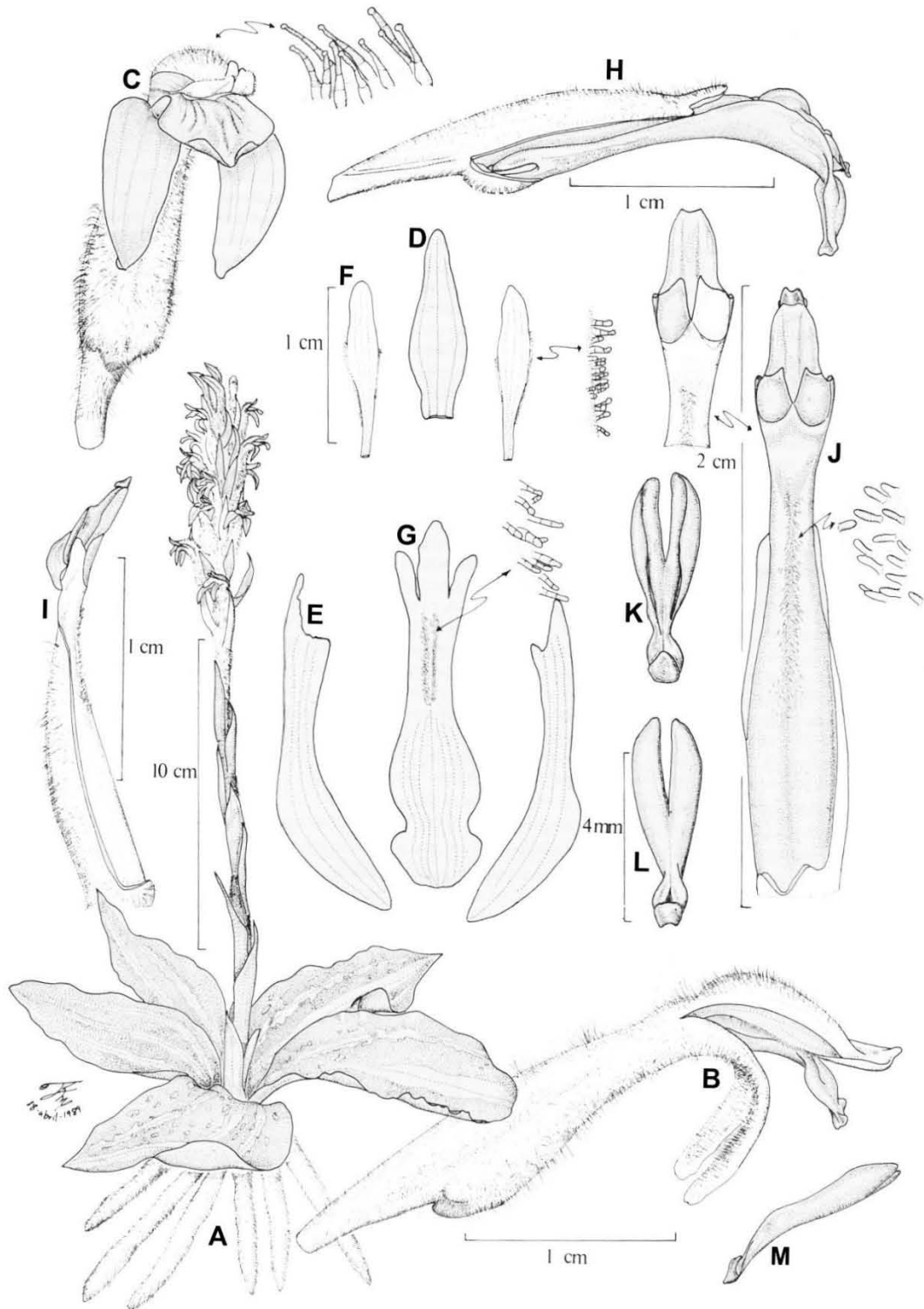
#### 2.1.4 Inflorescencia y flores

La inflorescencia es terminal y pedunculada (Fig. 1A). Presenta pubescencia al menos en la parte superior. En la mayoría de las especies el racimo es cilíndrico y porta de 7 a 30 flores dispuestas hacia todos los lados, pero en algunas especies puede presentarse un menor número de flores densamente arregladas (*e.g. Sarcoglottis uliginosa*). Las brácteas florales son glabras a pubescentes como en el escapo (Hoehne, 1945; Salazar, 2003). Las flores son grandes comparadas con las de otras Spiranthinae. Pueden estar dispuestas horizontalmente, ligeramente inclinadas o ser ascendentes (Fig. 1A). Tienen textura carnosa y su color puede ser verde, amarillo, blanco, rosado, bronce, café o pueden presentar una combinación de dichos colores; comúnmente presentan venas verde oscuro en el labelo y algunas veces en los pétalos. En algunas especies las flores son inodoras, mientras que en otras son muy fragantes, con aromas herbales, a especias, a almizcle o a levadura. Los sépalos son pubescentes en la superficie externa. El sépalo dorsal es libre y erecto (Fig. 1B, C, D), mientras que los laterales están parcialmente connados en aproximadamente una tercera parte de su longitud para formar un nectario largo, decurrente en el ovario y sin línea de adnación evidente o raramente espolonado; las porciones libres de los sépalos laterales son extendidas a fuertemente recurvadas (Fig. 1B, C, F). Los pétalos son erectos con su margen externo glabro a densamente papiloso-pubescente (Fig. 1B, C, E) y su margen interno adherido al sépalo dorsal. El labelo está parcialmente adherido a los lados de la columna (Fig. 1B, C, G, H) y connado a los sépalos laterales en la base formando un acceso estrecho al nectario. La columna es recta, de forma oblonga-elíptica a oblonga-ovada (Fig. 1I, J). El pie de la columna algunas veces es tan largo como la columna propiamente dicha, puede ser plano o acanalado ventralmente y con la superficie glabra o pubescente (Salazar, 2003). Los polinios junto con las estructuras accesorias útiles para adherirlos a los polinizadores constituyen una unidad

de dispersión, llamada polinario (Dressler, 1993; Hágsater *et al.* 2005), el cual está formado por dos polinios sulcados longitudinalmente (Fig. 1K-M), de color amarillo pálido, con ápices adelgazados y adheridos al viscidio (porción adhesiva del rostelo que adhiere el polinario al polinizador, Dressler, 1993). El viscidio es de color gris a azul violeta, tiene una superficie superior que se rompe y adhiere al polinizador, está situado en la superficie dorsal del rostelo y tiene la apariencia de una cuña. El rostelo es oblongo-triangular, rígido y truncado después de la remoción del viscidio. El estigma es bilobado. El ovario es sésil, pubescente a viloso, hinchado ventralmente a lo largo de su longitud completa debido al nectario (Salazar, 2003).

### **2.1.5 Cápsula y semillas**

La cápsula es elipsoide a cilíndrica-fusiforame y al igual que en la mayoría de las orquídeas se abre por varias líneas de dehiscencia longitudinal al madurar. Las semillas son diminutas, sin reservas nutritivas y estrechamente fusiformes (Hágsater *et al.* 2005; Salazar, 2003).



**Figura 1.** Morfología de *Sarcoglottis richardiana* (Schltr.) Salazar & Soto Arenas (Spiranthisae). **A**, planta en floración. **B**, flor en vista lateral. **C**, flor vista de tres cuartos. **D-F**, disección floral. **D**, sépalo dorsal. **E**, sépalo lateral. **F**, pétalo. **G**, labelo. **H**, labelo en vista lateral rodeando la columna (incluye la antera y el polinario). **I**, columna en vista lateral portando la antera y el polinario. **J**, columna en vista frontal. **K**, polinario en vista ventral. **L**, polinario en vista dorsal. **M**, polinario en vista lateral. Dibujo de Rolando Jiménez basado en *Soto 4225* (AMO).

## 2.2 Antecedentes taxonómicos del género *Sarcoglottis* (Spiranthinae)

El género *Sarcoglottis* fue establecido en 1827 por el botánico checo Karel (Carolus) Bořiwog Presl a partir de plantas de las montañas del departamento de Huánuco en Perú (Presl, 1927). El nombre genérico, formado por los términos griegos “*sarko*”, carnosos y “*glotta*”, lengua, hace alusión a la textura carnososa del labelo en el espécimen original de *S. speciosa* C.Presl., su especie tipo (Salazar, 2003).

Lindley (1840) reconoció cinco géneros para la subtribu Spiranthinae, *Cnemidia* Lindl. (removido de Spiranthinae por Bentham en 1881), *Spiranthes* Rich., *Stenorrhynchos* Rich. ex Spreng., *Pelexia* Poit. ex Rich. y *Sauroglossum* Lindl. Este autor mencionó que no encontraba una característica estructural clara para separar *Sarcoglottis* de *Spiranthes*, salvo ligeras variaciones en la forma, el tamaño y la dirección de los órganos florales, por lo que, con base en éstos caracteres lo redujo a *Spiranthes*, sección *Sarcoglottis*.

Schlechter (1920, 1926) realizó la primera revisión genérica moderna de la subtribu Spiranthinae, reconociendo 24 géneros en cuatro alianzas, con base en atributos de la columna y el nectario. Esta clasificación reconoció 17 géneros previamente propuestos (incluido *Sarcoglottis*) y estableció otros siete como monotípicos. Sin embargo, la propuesta de Schlechter fue severamente criticada por Ames (1922) por basarse en caracteres florales poco evidentes y no fue utilizada en las floras publicadas por varios botánicos americanos (Williams, 1951; Ames y Correll, 1952; Foldats, 1969; McVaugh, 1985), quienes trataron todas las especies de *Sarcoglottis* como *Spiranthes*. No obstante, fue aceptada por algunos autores como Hoehne (1945), Correa (1955) y Garay (1978), quienes reconocieron a *Sarcoglottis* como un género distinto.

Posteriormente, Balogh (1982; Burns-Balogh y Robinson, 1983) y Garay (1982) propusieron casi simultáneamente dos revisiones independientes de la subtribu Spiranthinae, las cuales diferirían en el número y la circunscripción de los géneros aceptados.



Balogh (1982), redefinió la subtribu *Spiranthinae* a nivel genérico e incluyó 16 géneros con base en características de la columna y el perianto. De estos géneros, 11 fueron colocados en cuatro alianzas (*Brachystele* Schltr., *Pelexia*, *Spiranthes* y *Stenorrhynchos*), con base en características del rostelo y el viscidio, mientras que el resto fue aislado por considerarlos como remanentes probables de otras líneas evolutivas. En este trabajo *Sarcoglottis* fue incluido en la alianza *Pelexia*, que incluye las plantas con rostelo elongado, amplio y laminar, viscidio adherido al ápice del rostelo y situado lateralmente en la base de los pies divergentes del polinario y la columna frecuentemente con un filamento libre y una extensión que cubre al viscidio inmaduro. Adicionalmente, Balogh (1982) segregó *Sarcoglottis* en tres secciones, *Potosia*, *Aphylla* y *Sarcoglottis*, con base en el desarrollo del espolón del nectario y la presencia o ausencia de hojas al momento de la floración; sin embargo, no mencionó las características que las diferencian.

Un año más tarde, Burns-Balogh y Robinson (1983) optimizaron manualmente 17 caracteres morfológicos, 15 florales y dos foliares con el fin de explorar las relaciones filogenéticas de los géneros agrupados en la alianza *Pelexia*. Se incluyó a *Cyclopogon*, *Pelexia* y *Sarcoglottis* y se utilizó a *Spiranthes* como grupo externo. Estos autores consideraron a *Pelexia* y *Sarcoglottis* como grupos más derivados que *Cyclopogon*. Para el caso particular de *Sarcoglottis* ellos indicaron las características distintivas de las secciones reconocidas en el género por Balogh (1982): la sección *Sarcoglottis* presenta hojas al momento de la floración, la sección *Aphylla* carece de hojas al momento de la floración, mientras que la sección *Potosia* usualmente carece de hojas al momento de la floración y presenta sépalos laterales enrollados.

Garay (1982), por su parte, reconoció 44 géneros, de los cuales 14 fueron nuevos y 13 monotípicos. Este autor se basó en las características del rostelo, el estigma, el nectario y el pie de columna para diferenciar los géneros, pero no para agruparlos en alianzas, ni reconoció grupos infragenéricos. Garay distinguió *Sarcoglottis* de los otros géneros por la longitud completa del pie de columna incrustada en el interior del tejido del ovario y con los sépalos laterales más o menos connados para formar un nectario prominente sin una línea de adnación observable externamente.

Szlachetko (1995) publicó *Systema Orchidarium*, una clasificación completa de la familia Orchidaceae, en la que, para las Spiranthinae siguió a Schlechter (1920, 1926) y se basó principalmente en características del rostelo y el viscidio. En este trabajo Szlachetko separó Spiranthinae en tres subtribus menos inclusivas, Spiranthinae s.s., Cyclopogoninae y Stenorrhynchidinae; sin embargo, no indicó los caracteres para distinguirlos. En trabajos posteriores este autor y colaboradores propusieron dos géneros nuevos para incluir especies que habían sido reconocidas previamente en *Sarcoglottis*. El primero fue *Veyretia* Szlach. (Szlachetko, 1995), donde se incluyeron plantas de Sudamérica, supuestamente sin hojas al momento de la floración y con la cavidad del nectario bipartido, sin tomar en cuenta que en *Veyretia* sí existen hojas, pero son de aspecto graminoide, contra las hojas planas y amplias de *Sarcoglottis*; Salazar, 2003). El segundo fue *Zhukowskia* Szlach., R.González & Rutk. (Szlachetko *et al.*, 2000), que incluyó a especies mesoamericanas incluidas previamente en *Sarcoglottis* por Schlechter (1920) y transferidas posteriormente a *Pelexia* por Garay (1982). Los argumentos para distinguir *Zhukowskia* fueron las características intermedias entre *Pelexia* y *Sarcoglottis*, tales como las flores similares a *Sarcoglottis* pero con la línea de adnación entre el ovario y los sépalos laterales visible externamente, común en *Pelexia*. En Mitnik (2003) se elevó a nivel de género a *Potosia* (Schltr.) R.González & Szlach. ex Mytnik, en el cual se incluyeron especies con distribución en Mesoamérica sin hojas al momento de la floración, el pie de columna y el nectario más cortos que la mitad de la longitud del ovario y diferencias mínimas en el labelo. En 2005, Szlachetko y colaboradores presentaron una revisión taxonómica para las subtribus, Cyclopogoninae, Spiranthinae y Stenorrhynchidinae (*sensu* Szlachetko, 1995), tratando a *Potosia* Mitnik, *Sarcoglottis* y *Zhukowskia* como tres géneros de Cyclopogoninae.

Salazar (2003) en su contribución en *Genera Orchidacearum* siguió principalmente a Dressler (1993), quien a su vez adoptó el sistema de Garay (1982) y presentó descripciones para los 40 géneros reconocidos para Spiranthinae. En este trabajo Salazar mencionó que, utilizando regiones de ADN nuclear y de cloroplasto *Sarcoglottis* es monofilético (si se excluye a *Veyretia*) e incluyó a *Potosia* y *Zhukowskia* como sinónimos de *Sarcoglottis*.

Salazar *et al.* (2003) evaluaron las relaciones filogenéticas en Cranichideae con secuencias de nucleótidos de ADN de cloroplasto (*rbcL*, *matK-trnK* y *trnL-trnF*) y nuclear (ITS), incluyendo 24 especies tradicionalmente incluidas en Spiranthinae. Los autores encontraron que Spiranthinae está fuertemente soportada como monofilética si se excluye *Galeottiella* Schltr.; asimismo, mencionaron que la adhesión del labelo a la columna (con excepción de *Discyphus* Schltr., transferido recientemente a Discyphinae por Salazar *et al.*, 2014) y la posesión de dos tipos de tétradas en el polinario constituyen sinapomorfias que distinguen esta subtribu. Salazar *et al.* (2003) identificaron cuatro clados principales en Spiranthinae que no se corresponden con las alianzas genéricas establecidas por Balogh (1982; Burns-Balogh, 1983) o la circunscripción de las subtribus de Szlachetko (1995): i) Clado *Stenorrhynchos*, que incluye a *Stenorrhynchos* s.s. y otros géneros considerados tradicionalmente cercanamente relacionados o combinados con este género, que son *Eltroplectris* Raf., *Mesadenella* Pabst & Garay y *Sacoila* Raf.; ii) Clado *Pelexia*, que incluye los géneros asignados previamente en la alianza *Pelexia* (Burns-Balogh y Robinson, 1983) y la subtribu Cyclopogoninae (Szlachetko, 1995), incluyendo *Cyclopogon*, *Pelexia* y *Sarcoglottis*, más otros géneros que no habían sido considerados por otros autores como cercanamente relacionados a ellos: *Odontorrhynchus* Correa y *Coccineorchis* Schltr.; iii) Clado *Eurystyles* que incluye a los géneros epífitos *Eurystyles* Wawra y *Lankesterella* Ames y iv) Clado *Spiranthes*, donde se incluye a *Spiranthes* s.s. y otros géneros diversificados principalmente en el límite norte del Neotrópico, tales como *Aulosepalum* Garay, *Beloglottis* Schltr., *Deiregyne* Schltr., *Dichromanthus* Garay, *Funkiella* Schltr., *Mesadenus* Schltr., *Microthelys* Garay, *Schiedeella* Schltr. y *Svenkoeltzia* Burns-Bal. En trabajos recientes donde se han estudiado las relaciones filogenéticas de Spiranthinae en un contexto filogenético explícito (*e.g.* Salazar *et al.*, 2011; Salazar y Ballesteros-Barrera, 2010; Batista *et al.*, 2011; Salazar y Dressler, 2011; Salazar y Jost, 2012, Borba *et al.* 2014) se han recuperado estos mismos clados principales.

### 2.3 Estudios de las estructuras vegetativas en Spiranthinae

La anatomía de las estructuras vegetativas de los representantes de la subtribu Spiranthinae generalmente ha sido analizada en estudios que involucran muestreos

taxonómicos de niveles más amplios. Como ejemplo de estos trabajos está el de Pridgeon *et al.* (1983), quienes estudiaron la estructura y distribución de los tilosomas en la familia Orchidaceae. De acuerdo con estos autores, los tilosomas son excrecencias lignificadas de la pared de las células del estrato más interno del velamen que está adyacente a las células de paso de la exodermis. En ese trabajo se incluyeron 350 especies, pertenecientes a 175 géneros y a 32 subtribus de orquídeas. Para la subtribu Spiranthinae solamente se incluyeron cuatro especies, *Beadlea* cf. *lindleyana* (Link & Otto) Garay & Dunsterv., *Spiranthes cernua* (L.) Rich. var. *odorata* (Nutt.) Correll, *Sarcoglottis acaulis* (Sm.) Schltr. (como *Spiranthes picta* Lindl.) y *Spiranthes* sp., todas ellas terrestres. Los autores encontraron en las Orchidaceae siete tipos morfológicos de tilosomas: esponjoso, lamelado, discoide, palmeado, entramado, baculado y trenzado. Asimismo, mencionaron que los tilosomas generalmente están presentes en taxa epífitos de distribución Neotropical, están ausentes en la subfamilia terrestre Orchidoideae (incluyendo Spiranthoideae) y es difícil hacer especulaciones sobre su función, debido a la heterogeneidad de su estructura fina.

Porembski y Barthlott (1988) examinaron raíces de 344 especies de 262 géneros representativos de la familia Orchidaceae, poniendo énfasis en la estratificación y micromorfología del velamen. Del total de las especies estudiadas, diecinueve pertenecen a la tribu Cranichideae y de éstas cinco corresponden a la subtribu Goodyeriinae, cuatro a Cranichidinae (incluidas *Ponthieva* R.Br. y *Prescottia* Lindl., transferidas a Prescottinae por Dressler, 1993) y ocho a Spiranthinae de los géneros *Cyclopogon*, *Mesadenella*, *Pelexia*, *Sauroglossum*, *Spiranthes* (2 spp.) y *Stenorrhynchos* (2 spp.). Los autores clasificaron el velamen en 12 tipos con base en el número de sus estratos celulares, estratificación en epi- y endovelamen (estratos más externo e interno, respectivamente, en un velamen pluriestratificado; Sanford y Adanlawo, 1973; Porembski y Barthlott, 1988), engrosamientos y poros en sus paredes celulares, tilosomas, engrosamientos en la exodermis e idioblastos en el córtex. Porembski y Barthlott (1988) observaron que todos los representantes de Spiranthinae presentaron un velamen de “tipo *Spiranthes*”, caracterizado por uno o dos estratos, con engrosamientos helicoidales y poros en las paredes celulares; únicamente *Sauroglossum elatum* Lindl. presentó seis estratos. El velamen “tipo *Spiranthes*” también se encontró en Cranichidinae, donde

además se presenta velamen “tipo *Calanthe*” (usualmente con tres a cuatro estratos y sin engrosamientos helicoidales).

Stern *et al.* (1993a) estudiaron la naturaleza y distribución de los spiranthosomas en miembros de la tribu Cranichideae de la entonces subfamilia Spiranthoideae (ahora en su mayor parte considerada como sinónimo de Orchidoideae, con excepción de las tribus Tropicidae y Diceratosteleeae, pertenecientes a la subfamilia Epidendroideae; Chase *et al.*, 2003). Los spiranthosomas son amiloplastos especializados de forma globular presentes en las células del parénquima cortical de la raíz. Ese trabajo incluyó 52 especies. La tribu Cranichideae fue la mejor representada con 48 especies, de las cuales 15 fueron de la subtribu Spiranthinae de los géneros *Cyclopogon* (4 spp.), *Eurystyles*, *Pelexia* (2 spp.), *Sarcoglottis*, *Spiranthes* (6 spp.) y *Stenorrhynchos*. Stern *et al.* (1993a) encontraron que los spiranthosomas están presentes en la mayoría de los miembros de la tribu Cranichideae.

Stern *et al.* (1993b) llevaron a cabo un estudio de la anatomía de la hoja, tallo y raíz de plantas de la subfamilia Spiranthoideae (ver arriba). En ese trabajo se examinaron 50 especies de la tribu Cranichideae (*sensu* Dressler, 1990), de las cuales 13 especies pertenecen a la subtribu Spiranthinae de los géneros *Cyclopogon* (4 spp.), *Eurystyles*, *Pelexia* (2 spp.), *Sarcoglottis*, *Spiranthes* (4 spp.) y *Stenorrhynchos*. Adicionalmente, realizaron un análisis cladístico utilizando 14 caracteres vegetativos obtenidos del estudio anatómico, incluyendo a *Diuris* Sm. (subfamilia Orchidoideae) y *Palmorchis* Barb.Rodr. (subfamilia Epidendroideae), así como a dos géneros de la subfamilia Apostasioideae (*Apostasia* Lindl. y *Neuwiedia* Bl.) designados como grupos externos. El estudio anatómico mostró que hay varias características anatómicas distintivas de Cranichideae, como la ausencia de esclerénquima en las partes estudiadas y la presencia de spiranthosomas en la raíz. Los resultados del análisis cladístico mostraron que los miembros de Cranichideae están más cercanamente relacionados con *Diuris*, que con otros “spiranthoides” (*e.g.* *Corymborkis* Thou, *Tropidia* Lindl. y *Diceratostelee* Summerh.), lo cual es consistente con el hecho ahora conocido de que estos últimos géneros pertenecen a Epidendroideae. Sin embargo, el énfasis de ese trabajo fue en las relaciones a niveles taxonómicos altos (tribales y subtribales) y no se presentaron a detalle los resultados a nivel de género o especie.

Figuerola *et al.* (2008) examinaron el número de estratos del velamen, los engrosamientos y poros en las paredes celulares del velamen, la presencia de tilosomas y los espacios supraendodérmicos (espacios intercelulares pequeños del tamaño de una a varias células de parénquima cortical circundante presentes cerca de la endodermis) de raíces de 26 especies pertenecientes a 19 géneros de las subtribus Cranichidinae, Goodyerinae, Manniellinae, Prescotttinae y Spiranthinae (*sensu* Dressler 1993), con el fin de evaluar su valor sistemático y posibles patrones en su evolución, analizándolos cladísticamente en conjunto con datos de secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto. En este trabajo se incluyeron 11 especies de Spiranthinae de los géneros *Aulosepalum*, *Cyclopogon*, *Dichromanthus* (2 spp.), *Mesadenus* (2 spp.), *Microthelys*, *Pelexia*, *Sacoila*, *Sarcoglottis* y *Schiedeella*. Dichos autores encontraron que los engrosamientos en las paredes celulares del velamen son sinapomórficos para el clado que agrupa a Prescotttinae con Spiranthinae, mientras que los espacios supraendodérmicos probablemente están relacionados con factores ambientales al encontrarse principalmente en especies de hábitats estacionalmente secos. Particularmente para *Sarcoglottis schaffneri* (Rchb.f.) Ames, *Pelexia* sp. y *Cyclopogon* aff. *comosus* (Rchb.f.) Burns-Bal. & E.W.Greenw., no se encontraron espacios supraendodérmicos y el velamen presentó un estrato celular. Dicho estudio documentó por primera vez la presencia de tilosomas en representantes de Cranichideae; dichas estructuras habían sido reportadas como ausentes en Cranichideae (Pridgeon *et al.*, 1983; Porembski y Barthlott, 1988), siendo los tilosomas de tipo lamelado una única sinapomorfia morfológica para Spiranthinae.

Andreota (2013) analizó anatómicamente la raíz, el tallo y las hojas de 10 representantes de la tribu Cranichideae: *Cranichis candida* (Barb.Rodr.) Cogn. y *Prescottia oligantha* (Sw.) Lindl. (Cranichidinae), *Microchilus arietinus* (Rchb.f. & Warm.) Ormerod y *Zeuxine strateumatica* (L.) Schltr. (Goodyerinae), *Cyclopogon apricus* (Lindl.) Schltr., *C. congestus* (Vell.) Hoehne, *C. variegatus* Barb.Rodr., *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay, *Pteroglossa roseoalba* (Rchb.f.) Salazar & M.W.Chase y *Sauroglossum nitidum* (Vell.) Schltr. (Spiranthinae), con el fin de encontrar caracteres útiles en la delimitación taxonómica del grupo. Los autores mencionaron como ejemplos de estos caracteres al velamen uniestratificado y la ausencia de engrosamientos escalariformes en la exodermis de Goodyerinae, la presencia de tilosomas en las

subtribus Cranichidinae y Spiranthinae, las hojas anfistomáticas en *C. apricus*, así como la ornamentación de la cutícula con estrías en *M. arietinus* y *Z. strateumatica* o con cera epicuticular en forma de granos en *C. congestus* y *S. nitidum*.

Bernal (2013) identificó y utilizó caracteres anatómicos de la raíz, hoja, escapo y superficie floral en representantes de Cranichideae para inferir relaciones filogenéticas en Spiranthinae. Esta autora dividió su trabajo en dos capítulos y siguió, en su mayor parte, la circunscripción de los clados propuestos por Salazar *et al.* (2003). En el primero estudió la evolución de los caracteres anatómicos en el clado epífito *Eurystyles/Lankesterella*, representado por dos especies de *Lankesterella* y cinco de *Eurystyles* e incluyó cuatro especies terrestres de los géneros *Cyclopogon*, *Mesadenella*, *Prescottia* y *Sacoila* como grupos externos. Bernal encontró que las características anatómicas resuelven al clado epífito *Eurystyles/Lankesterella* como monofilético y se reconoce por la altura de las células de la epidermis adaxial mayor que las del mesofilo. La segunda parte del estudio se enfocó al estudio de la evolución de caracteres anatómicos principalmente de los clados *Pelexia* y *Stenorrhynchos*, analizando 34 especies de 19 géneros. En el estudio anatómico se incluyeron los géneros *Brachystele* (2 spp.), *Cyclopogon* (8 spp.), *Eltroplectris* (2 spp.), *Hapalorchis* Schltr., (2 spp.), *Pelexia* (4 spp.), *Sarcoglottis* (2 spp.), *Veyretia* (3 spp.) y una especie de cada uno de los géneros *Stigmatosema* Garay, *Mesadenella*, *Sacoila*, *Skeptrostachys* Garay, *Thelyschista* Garay y *Sauroglossum*; como grupos externos se usaron especies individuales de los géneros *Aspidogyne*, *Baskervilla*, *Cranichis*, *Microchilus* C.Presl, *Platythelys* Garay y *Prescottia*. Bernal (2013) consideró erróneamente a *Sauroglossum* como miembro del clado *Stenorrhynchos* y a *Hapalorchis* del clado *Pelexia*, reconocidos en el trabajo de Borba *et al.* (2014) como miembros de los clados *Pelexia* y *Spiranthes*, respectivamente. El análisis cladístico de Bernal (2013) no incluyó todos los taxa analizados anatómicamente e incluyó adicionalmente a tres representantes del clado epífito, *Eurystyles* (2 spp.) y *Lankesterella*. Los resultados del análisis de los datos morfológicos mostraron que éstos por sí solos no son suficientes para proponer una hipótesis filogenética de Spiranthinae. El análisis combinado de la morfología y las secuencias de ADN nuclear (ITS) mostró que Spiranthinae es monofilético e incluyó los clados *Eurystyles/Lankesterella* y *Pelexia* recuperados como monofiléticos y el clado *Stenorrhynchos* como polifilético.

Recientemente Bernal *et al.* (2015) analizaron raíces de 22 especies pertenecientes a 12 géneros de Spiranthinae, *Brachystele*, *Cyclopogon*, *Eurystyles*, *Hapalorchis*, *Lankesterella*, *Mesadenella*, *Pelexia*, *Sacoila*, *Sauroglossum*, *Skeptrostachys*, *Stigmatosema* y *Veyretia*, así como de *Prescottia stachyodes* (Prescottinae), como grupo externo. Los autores reportaron dos tipos de pelos radicales: pelos simples y pelos con estructura en espiral (caracterizados por la ruptura de la pared celular y sin protoplasma en su interior). Estos autores mostraron que los pelos radicales con estructura en espiral están ampliamente distribuidos en las especies examinadas por ellos, con excepción de *Brachystele widgrenii*, *Lankesterella ceracifolia*, *L. cespitosa*, *Pelexia orthosepala* y *Sacoila lanceolata* y sugieren que la presencia de estos pelos radicales no parece estar influenciada por las condiciones ambientales, sino establecida genéticamente y relacionada con la fase final de diferenciación de algunos de los pelos.

Con los antecedentes mencionados se hace evidente la importancia de los estudios que involucran el estudio de la morfología, la micromorfología y la anatomía en otros representantes de Spiranthinae para revelar nuevos caracteres potencialmente útiles para la taxonomía, sistemática y evolución del grupo y las orquídeas en general.



### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Analizar la variación en caracteres estructurales radicales y foliares en 10 especies del género *Sarcoglottis* y explorar su evolución en un contexto filogenético explícito.

#### 3.2 Objetivos específicos

a) Describir la morfología y anatomía de las raíces y hojas de *Sarcoglottis* y comparalas con la de otras especies del clado *Pelexia* de la subtribu *Spiranthinae* de los géneros *Brachystele*, *Cyclopogon*, *Pelexia*, *Sauroglossum* y *Stenorrhynchos*.

b) Analizar los caracteres estructurales mediante análisis filogenéticos, separadamente y en combinación con secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto generadas previamente.

c) Explorar las posibles rutas evolutivas de los atributos estructurales analizados mediante su optimización en uno de los árboles generados en los análisis filogenéticos.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Muestra taxonómica

Se estudiaron 10 especies pertenecientes al género *Sarcoglottis sensu* Salazar (2003), que corresponden a ocho de las nueve especies que comprende el género en México y a dos de Sudamérica. Las especies seleccionadas representan gran parte de las preferencias ecológicas del género, tales como ambientes estacionalmente secos como matorrales, praderas, selvas bajas caducifolias y bosques de pino encino, así como hábitats permanentemente húmedos como bosques nublados, selvas lluviosas y pantanos. Con base en los estudios filogenéticos previos de Salazar (2003; Borba *et al.*, 2014) se usaron ocho especies como grupos de comparación, pertenecientes a los géneros *Pelexia* (4 spp.), *Brachystele*, *Cyclopogon*, *Sauroglossum* y *Stenorrhynchos*. Los cuatro primeros están cercanamente relacionados con *Sarcoglottis* en el clado *Pelexia* (Borba *et al.*, 2014), mientras que *Stenorrhynchos* pertenece a un clado distinto y fue usado como grupo externo principal en los análisis. La lista de las especies estudiadas y los ejemplares de respaldo se indican en los Cuadros 1 a 3.

### 4.2 Fuente del material para los estudios estructurales

Para las especies mexicanas se utilizó una raíz y una hoja provenientes de una a seis plantas diferentes por especie, dependiendo de la disponibilidad del material. Las especies sudamericanas se analizaron a partir de una sola planta por especie debido a que no fue posible muestrear otros individuos. Una parte del material analizado había sido fijado previamente, mientras que el resto se obtuvo específicamente para este trabajo a partir de colecciones de plantas vivas mantenidas en el Herbario AMO (Ciudad de México), el orquideario de la estación de Biología Tropical Los Tuxtlas (Veracruz) y la colección personal de Gerardo A. Salazar (Ciudad de México), así como de colectas en el campo en los estados de Oaxaca, Veracruz y Morelos durante el 2012 y 2013. Adicionalmente se utilizó material proveniente de ejemplares de herbario (AMO, MEXU) para *Sarcoglottis corymbosa* Garay y *S. lobata* (Lindl.) P.N.Don, que no fueron localizadas en campo ni en colecciones de plantas vivas.

### **4.3 Fuente de los datos moleculares**

Las secuencias de ADN de las regiones ITS, *matK* y *trnL-trnF* utilizadas fueron generadas en trabajos moleculares previos (Salazar *et al.*, 2003, 2009, 2011; Salazar y Ballesteros-Barrera, 2010; Batista *et al.*, 2011; Salazar y Dressler, 2011; Salazar *et al.*, datos no publicados).

### **4.4 Procesamiento del material vegetativo**

Se colectaron raíces y hojas sin evidencia de enfermedad; se lavaron con agua y se cortaron transversalmente para fijarse en FAA (10% de formaldehído, 5% de ácido acético glacial, 35% de agua destilada y 50% de etanol; Sass, 1958) durante 24 horas. En lo que respecta al material obtenido de ejemplares herborizados se tomó un fragmento de hoja y otro de raíz y se les rehidrató con agua caliente durante una hora. Adicionalmente, se tomó un fragmento de hoja sin fijar o rehidratar, para observar las ceras epicuticulares intactas. Tanto el material fijado como el rehidratado fue lavado con agua destilada; posteriormente se transfirió a etanol al 30 y 40% durante 24 horas por cambio y se le almacenó en etanol al 50% hasta su procesamiento.

#### **4.4.1 Microscopía óptica**

Se realizaron cortes transversales a mano alzada en la región media de la raíz, la lámina foliar y la parte basal de la hoja, así como cortes paradermales de la lámina foliar. Los cortes se almacenaron en etanol al 50%, posteriormente se pasaron a etanol al 50, 70 y 96% durante seis minutos por cambio y se tiñeron con safranina durante 30 minutos. Se lavaron con etanol al 96 y 100%, se les dejó una pequeña cantidad de éste último y se les agregó verde rápido. Se agitaron durante 15 segundos, se eliminó el exceso del colorante y se lavaron con etanol al 100%. Los cortes teñidos se colocaron en xilol, se seleccionaron con un pincel y se montaron con resina sintética. Las preparaciones se etiquetaron y se observaron en un microscopio Olympus BX51. Se tomaron fotomicrografías con una cámara digital Evolution™ LC Color adaptada al microscopio. El intervalo de alturas de las células epidérmicas foliares se obtuvo de la medición de seis

**Cuadro 1.** Especies de Spiranthinae incluidas en el presente estudio.

<b>Especie</b>	<b>Distribución</b>	<b>Tipo de vegetación</b>	<b>Floración</b>
<i>Brachystele camporum</i> (Lindl.) Schltr.	Brasil, Argentina, Paraguay, Uruguay	Campos abiertos, pastizal	Ago-Sep
<i>Cyclopogon luteoalbus</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	México	Bosque de encino, bosque mesófilo de montaña, bosque tropical perennifolio	Ene-Abr
<i>Pelexia ekmanii</i> (Kraenzl.) Schltr.	Brasil, Argentina, Paraguay	Campos abiertos, pastizal	Dic-Ene
<i>Pelexia funckiana</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	México, Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Colombia	Bosque mesófilo de montaña, bosque tropical perennifolio	Feb-May
<i>Pelexia gutturosa</i> (Rchb.f.) Garay	México, Guatemala	Bosque tropical subcaducifolio, pastizal	Dic-Feb
<i>Pelexia sp.</i>	México	Bosque mesófilo de montaña	May
<i>Sarcoglottis assurgens</i> (Rchb.f.) Schltr.	México, Guatemala	Bosque de pino-encino, bosque tropical caducifolio, bosque tropical perennifolio, pastizal	Mar-Abr
<i>Sarcoglottis corymbosa</i> Garay	México, El Salvador, Guatemala, Honduras	Bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque tropical subcaducifolio	Ene-Abr
<i>Sarcoglottis grandiflora</i> (Hook.) Klotzsch	Guyana, Suriname, Colombia, Ecuador, Brasil, Argentina, Paraguay	Bosque cerrado (“floresta”)	Dic-Ene
<i>Sarcoglottis lobata</i> (Lindl.) P.N.Don	México, Guatemala, El Salvador	Bosque mesófilo de montaña, bosque tropical perennifolio	Dic-Abr
<i>Sarcoglottis richardiana</i> (Schltr.) Salazar & Soto Arenas	México, Guatemala, Belize	Bosque mesófilo de montaña, bosque tropical perennifolio	Abr-Jun
<i>Sarcoglottis rosulata</i> (Lindl.) P.N.Don	México, Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras	Bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque tropical caducifolio, pastizal	Jun-Sep
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i> (Rchb.f.) Schltr.	México, Belice, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Panamá	Bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque mesófilo de montaña, bosque tropical perennifolio, pastizal	Dic-Feb
<i>Sarcoglottis schaffneri</i> (Rchb.f.) Ames	México, Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras	Bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, pastizal	Abr-Jul
<i>Sarcoglottis scintillans</i> (E.W.Greenw.) Salazar & Soto Arenas	México	Bosque de encino, bosque tropical perennifolio	Mar-May
<i>Sarcoglottis uliginosa</i> Barb.Rodr.	Brasil, Argentina, Paraguay,	Pantanal	Oct-Ene
<i>Sauroglossum elatum</i> Lindl.	Colombia, Ecuador, Brasil, Argentina	Campos abiertos, pastizal	Sep-Nov
<i>Stenorrhynchos speciosum</i> (Jacq.) Rich. ex Spreng.	México, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Panamá, Bahamas, República Dominicana, Jamaica, Islas Leeward, Puerto Rico, Islas Windward, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru	Bosque de pino-encino, bosque mesófilo de montaña	Dic-Feb

**Cuadro 2.** Ejemplares de respaldo de las muestras analizadas anatómicamente en este trabajo. Abreviaturas: H, hoja; I, intacta, sin fijar en FAA, ni sometida en disolvente de ceras; P, procesada, fijada en FAA y sometida en disolvente de ceras (xilol); R, raíz; \*, material de herbario.

Especie	Procedencia	Respaldo	Material disponible	Procesamiento de la hoja
<i>Brachystele camporum</i> (Lindl.) Schltr.	Misiones, Argentina	<i>Radins s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Cyclopogon luteoalbus</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	Querétaro, México	<i>García Cruz 970</i> , MEXU	R, H	P
<i>Pelexia ekmanii</i> (Kraenzl.) Schltr.	Candelaria, Argentina	<i>Radins s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Pelexia funkiana</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	Veracruz, México	<i>Salazar 8390 x2</i> , MEXU	R, H	P
<i>Pelexia gutturosa</i> (Rchb.f.) Garay	Veracruz, México	<i>Cruz Lustre s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Pelexia sp.</i>	Guerrero, México	<i>Salazar 6421</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Sarcoglottis assurgens</i> (Rchb.f.) Schltr.	Guerrero, México	<i>Figueroa 302</i> , MEXU	R, H	P
<i>Sarcoglottis corymbosa</i> Garay	Estado de México, México	<i>López Ferrari 1644</i> , AMO	R*	P
	Morelos, México	<i>Espejo 5960</i> , AMO	R*	P
	Jalisco, México	<i>González Tamayo s.n.</i> , AMO	R, H*	P, I
<i>Sarcoglottis grandiflora</i> (Hook.) Klotzsch	Misiones, Argentina	<i>Radins s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Sarcoglottis lobata</i> (Lindl.) P.N.Don	Chiapas, México	<i>Méndez 5892</i> , AMO	R*	P
	Veracruz, México	<i>Ventura 18249</i> , AMO	R, H*	P, I
<i>Sarcoglottis richardiana</i> (Schltr.) Salazar & Soto Arenas	Chiapas, México	<i>Salazar 8227</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P, I
	Chiapas, México	<i>Salazar 8237</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Chiapas, México	<i>Salazar 8238</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Chiapas, México	<i>Salazar s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Sarcoglottis rosulata</i> (Lindl.) P.N.Don	Guerrero, México	<i>Vásquez 1138</i> , MEXU (en líquido)	R	P
	Oaxaca, México	<i>Greenwood G-1201</i> , AMO	R, H*	P
	Oaxaca, México	<i>Cruz Lustre 129</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Oaxaca, México	<i>Cruz Lustre 142</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P, I
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i> (Rchb.f.) Schltr.	Quintana Roo, México	<i>Jiménez 2236</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Oaxaca, México	<i>Cruz Lustre 125</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Oaxaca, México	<i>Cruz Lustre 100</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P, I
	Veracruz, México	<i>Salazar 8374</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Veracruz, México	<i>Krömer 2712</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Veracruz, México	<i>Cruz Lustre s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Sarcoglottis schaffneri</i> (Rchb.f.) Ames	Oaxaca, México	<i>Salazar 6584</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Morelos, México	<i>Salazar s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Michoacán, México	<i>Salazar 6877</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
	Distrito Federal, México	<i>Rivera 3840</i> , MEXU	H*	I
<i>Sarcoglottis scintillans</i> (E.W.Greenw.) Salazar & Soto Arenas	Oaxaca, México	<i>Pichardo Ramírez 15</i> , MEXU	R, H	P
	Oaxaca, México	<i>Reyes 5769</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Sarcoglottis uliginosa</i> Barb.Rodr.	Misiones, Argentina	<i>Radins s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Sauroglossum elatum</i> Lindl.	Misiones, Argentina	<i>Cabassi s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P
<i>Stenorrhynchos speciosum</i> (Jacq.) Rich. ex Spreng.	México, Chiapas	<i>Pérez García s.n.</i> , MEXU (en líquido)	R, H	P

**Cuadro 3.** Ejemplares de respaldo y números de acceso en GenBank de las secuencias de ADN utilizadas en este trabajo. Abreviatura: ITS, espaciador interno transcrito

Especie	Procedencia	Respaldo	Acceso en GenBank		
			ITS	<i>matK</i>	<i>trnL-trnF</i>
<i>Brachystele camporum</i> (Lindl.) Schltr.	Misiones, Argentina	<i>Insaurralde s.n.</i> , MEXU (en líquido)	HG425362	HG425366	HG425369
<i>Cyclopogon luteoalbus</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	Oaxaca, México	<i>Salazar 5896</i> , MEXU	HE575512	HE575495	HE575522
<i>Pelexia ekmanii</i> (Kraenzl.) Schltr.	Misiones, Argentina	<i>Radins s.n.</i> , MEXU (en líquido)	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Pelexia funckiana</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	Chiapas, México	<i>Reyes 6725</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Pelexia gutturosa</i> (Rchb.f.) Garay	Chiapas, México	<i>Soto 10777</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Pelexia</i> sp.	Guerrero, México	<i>Salazar 6421</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis assurgens</i> (Rchb.f.) Schltr.	Oaxaca, México	<i>Salazar 6103</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis corymbosa</i> Garay	Jalisco, México	<i>Salazar 6155</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis grandiflora</i> (Hook.) Klotzsch	Misiones, Argentina	<i>Salazar s.n.</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis lobata</i> (Lindl.) P.N.Don	El Salvador	<i>Battle s.n.</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis richardiana</i> (Schltr.) Salazar & Soto Arenas	Chiapas, México	<i>Salazar 6174</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis rosulata</i> (Lindl.) P.N.Don	Guerrero, México	<i>Figuroa 169</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i> (Rchb.f.) Schltr.	México	<i>Salazar 8103</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis schaffneri</i> (Rchb.f.) Ames	Michoacán, México	<i>Salazar 6060</i> , MEXU;	No sometida	No sometida	_____
	México	<i>Jiménez s.n.</i> , MEXU	_____	_____	No sometida
<i>Sarcoglottis scintillans</i> (E.W.Greenw.) Salazar & Soto Arenas	Oaxaca, México	<i>Soto 7613</i> , MEXU	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sarcoglottis uliginosa</i> Barb.Rodr.	Misiones, Argentina	<i>Radins s.n.</i> , MEXU (en líquido)	No sometida	No sometida	No sometida
<i>Sauroglossum elatum</i> Lindl.	Misiones, Argentina	<i>Cabassi s.n.</i> , MEXU (en líquido)	HG425361	HG425365	HG425368
<i>Stenorrhynchos speciosum</i> (Jacq.) Rich. ex Spreng.	Islas Vírgenes	<i>Salazar 7661</i> , MEXU (en líquido)	FN996947	HG425364	FN996959

células en cada superficie en corte transversal usando el software Image Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, 2006).

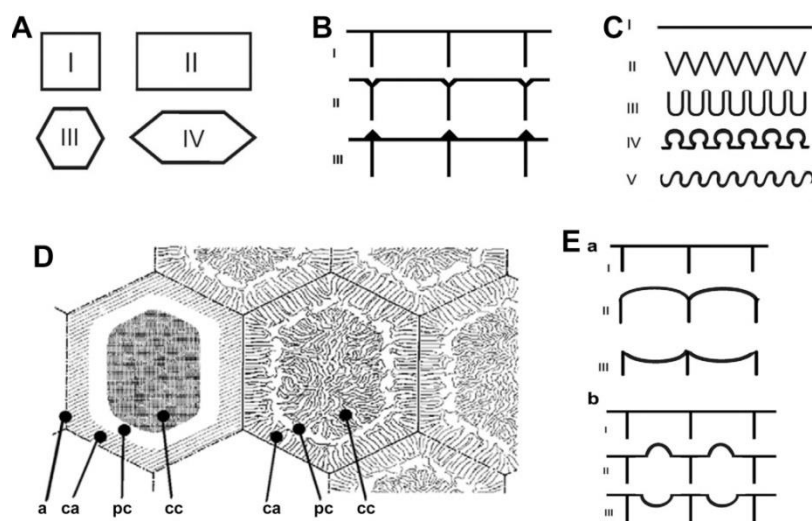
#### **4.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Se prepararon cortes transversales de la raíz y fragmentos de hoja de aproximadamente  $4 \times 4$  mm y se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30, 40, 50, 70, 80, 90, 100, 100 y 100%), por un lapso mínimo de 24 horas por cambio. Posteriormente se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub>, se montaron en portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de doble cara y se cubrieron con oro. Una vez procesadas se observaron en los microscopios electrónicos de barrido Hitachi F-2460N y Hitachi SU1510, operados a 10 o 15 Kv y se tomaron micrografías. Debido a que las hojas presentaban ceras epicuticulares que impedían observar los detalles de la superficie epidérmica se procedió a limpiarlas, pasando los fragmentos de la serie de etanol al 100% a xilol al 100% por un período de 24 horas y se colocaron durante ese lapso en un sonicador cada 12 horas durante 5 minutos. Posteriormente las muestras continuaron deshidratándose con la serie de etanol, se secaron a punto crítico, se montaron, se cubrieron con oro y se fotografiaron. Las muestras de hoja destinadas a observar las ceras epicuticulares intactas no se fijaron, no pasaron por la serie de alcoholes y no se cubrieron, solo se montaron en los portamuestras y se les tomaron micrografías.

#### **4.5 Descripción morfológica y anatómica**

Los términos utilizados en la descripción de la morfología y anatomía siguen principalmente a Simpson (2010) y Font Quer (1982). La descripción morfológica de las raíces y las hojas se realizó mediante la revisión de los ejemplares anotados en el Cuadro 2 y material adicional depositado en los herbarios AMO y MEXU. Para indicar la distribución de las especies incluidas, su hábitat, su periodo de floración, así como la forma y tamaño de las raíces y las hojas, se utilizaron adicionalmente las descripciones publicadas en la literatura (Hauman, 1920; Hoehne, 1945; Williams, 1951; Ames y Correll, 1952; McVaugh, 1985; Hágater y Soto-Arenas, 2003; Salazar, 2003; Isaurralde y Radins, 2007; Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007; Schinini, 2010). Para la descripción

anat6mica de la ra3z se utiliz6 adem6s la terminolog3a para la caracterizaci6n del velamen (Porembski y Barthlott, 1988), los tilosomas (Pridgeon *et al.*, 1983), la exodermis, el c6rtex, la endodermis y los haces vasculares (Stern *et al.*, 1993b), los spiranthosomas (Stern *et al.*, 1993a) y los espacios supraendod6rmicos (Figuer6a *et al.*, 2008). Las hojas se describieron anat6micamente siguiendo la terminolog3a para las ceras epicuticulares, el contorno de las c6lulas epid6rmicas y las paredes periclinales y anticlinales de Koch *et al.* (2009; Fig. 2), la cut3cula, la epidermis, el mesofilo y los haces vasculares seg6n Esau (1976) y Stern *et al.* (1993b) y los estomas de acuerdo con Metcalfe y Chalk (1979). Algunos t6rminos propuestos en este trabajo se describen al hacer la primera menc3n de ellos.



**Figura 2.** Esquemas de la terminolog3a utilizada en la descripci6n de la epidermis (modificado de Koch *et al.* 2009). **A**, contornos celulares: I, tetragonal; II, tetragonal alargada; III, poligonal isodiam6trica; IV, poligonal alargada. **B**, escultura de las paredes anticlinales en c6lulas vistas en corte transversal: I, recta; II, hundida; III, expuesta. **C**, curso de las paredes anticlinales: I, recto; II, ondulado en V; III, ondulado en U; IV, ondulado en  $\Omega$ ; V, ondulado en S. **D**, divisi6n de la superficie de una c6lula epid6rmica: a, paredes anticlinales; ca, campo de las anticlinales; pc, pared central; cc, campo central. **Ea**, formas b6sicas de las c6lulas vistas en corte transversal: I, plana o tabular; II, convexa; III, c6ncava. **Eb**, variaci6n de la forma plana: I, completamente plana; II, plana con giba convexa; III, plana con giba c6ncava.

#### 4.6 Selecci6n y codificaci6n de los caracteres estructurales vegetativos

Del estudio morfol6gico-anat6mico de la ra3z y la hoja se seleccionaron los caracteres estructurales utilizados en los an6lisis filogen6ticos y la optimizaci6n de



caracteres. La selección se limitó a aquellos que al menos uno de sus estados fuera compartido por dos o más especies. Algunos caracteres muy variables (*e. g.* el número de polos de xilema en la raíz) no fueron considerados, puesto que requieren una mayor número de individuos para conseguir una mejor codificación. Para las especies polimórficas, es decir, aquellas que presentaron más de un estado para un carácter, se codificó en los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud solo su estado predominante (marcado en el Cuadro 5 con el símbolo “\*”), debido a que no es posible incorporar polimorfismos en RaxML, el software en el que se realizó el análisis de máxima verosimilitud. Los estados de carácter que no pudieron ser determinados debido a la calidad del material examinado fueron codificados en la matriz de datos como dato faltante con el símbolo “?” (Cuadro 5). En total se codificaron 16 caracteres estructurales, de los cuales tres son morfológicos y 13 anatómicos. En los Cuadros 4 y 5 se indican los caracteres, sus estados y su codificación.

**Cuadro 4.** Caracteres morfológico-anatómicos de la raíz y la hoja de los miembros de *Spiranthinae* incluidos en este trabajo codificados para los análisis filogenéticos y la optimización de los caracteres estructurales vegetativos. Abreviaturas: ca, campo de las anticlinales; cc, campo central; ct, corte transversal; pc, pared central; vs, vista de la superficie.

Número	Caracteres y estados
1	Presencia de rizoma: no (0), sí (1)
2	Forma de las células del velamen (ct): no alargada radialmente (0), alargada radialmente (1)
3	Número de estratos celulares del velamen: uno (0), tres (1), seis (2)
4	Presencia de hojas en la antesis: no (0), sí (1)
5	Tipo de contracción de la lámina foliar en la parte basal: gradual (0), abrupta en un pecíolo más corto que la lámina (1), abrupta en un pecíolo tan largo como la lámina (2)
6	Tipo de contorno celular epidérmico foliar (vs): poligonal isodiamétrico (0), poligonal alargado (1)
7	Presencia de estrías en la pared anticlinal de las células epidérmicas foliares: no (0), sí (1)
8	Tipo de curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas foliares: convexa (0), plana con giba convexa (1)
9	Tipo de microrelieve de la pared periclinal en los márgenes de las células epidérmicas foliares (ca): estrías finas (0), estrías gruesas (1), concavidades (2)
10	Tipo de microrelieve de la pared periclinal en la parte central de las células epidérmicas foliares (pc, cc): liso (0), estriado (1), con concavidades (2), verrucoso (3)
11	Grosor de las estrías en las células subsidiarias del estoma: finas (0), gruesas (1)
12	Forma de las células epidérmicas de la superficie adaxial de la hoja (ct): no alargadas dorsiventralmente (0), alargadas dorsiventralmente (1)
13	Tipo de mesofilo: homogéneo (0), heterogéneo (1)
14	Disposición de los elementos del xilema de los haces vasculares foliares: horizontal (0), V invertida (1)
15	Tipo de borde foliar (ct): parenquimático (0), epidérmico (1)
16	Tipo de hoja de acuerdo con la ubicación de los estomas: hipostomática (0), anfistomática (1)

**Cuadro 5.** Matriz de caracteres morfológico-anatómicos de la raíz y la hoja de los miembros de Spiranthinae incluidos en este trabajo utilizados en los análisis filogenéticos y la optimización de los caracteres estructurales vegetativos. Abreviatura: \*, estado de carácter predominante.

Especie/Carácter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Brachystele camporum</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>Cyclopogon luteoalbus</i>	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1,3*	0	1	0	1	0	0
<i>Pelexia ekmanii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>Pelexia funckiana</i>	1	1	0	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Pelexia gutturosa</i>	0	0	0	0*,1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>Pelexia sp.</i>	0	0	0	1	2	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Sarcoglottis assurgens</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1,3*	0	0	0	0	0	0
<i>Sarcoglottis corymbosa</i>	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	?	0	0
<i>Sarcoglottis grandiflora</i>	0	0,1*	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Sarcoglottis lobata</i>	0	1	0	0*,1	0	0	1	1	0	1,3*	1	1	0	?	0	0
<i>Sarcoglottis richardiana</i>	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1*,3	0	1	0	0	0	0
<i>Sarcoglottis rosulata</i>	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1*,3	1	1	0	0	0	0
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i>	0	1	0	0,1*	0	0	1	0	1	1,3*	1	1	0	1	0	0
<i>Sarcoglottis schaffneri</i>	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1,3*	1	0	0	1	0	0
<i>Sarcoglottis scintillans</i>	1	0,1*	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Sarcoglottis uliginosa</i>	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Sauroglossum elatum</i>	0	0,1*	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Stenorrhynchos speciosum</i>	0	1	0	1	1	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0

#### 4.7 Selección de los caracteres moleculares

Se incluyeron secuencias moleculares de tres regiones del ADN: ITS del núcleo y *matK* y *trnL-trnF* del cloroplasto. Estas regiones han sido ampliamente usadas en trabajos previos sobre inferencia filogenética en varios niveles taxonómicos de angiospermas (Soltis and Soltis, 1998), incluyendo orquídeas (*e.g.* Salazar *et al.*, 2003, 2009, 2014; Salazar y Dressler, 2011; Batista *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2014). A continuación se presenta una breve descripción de cada una de ellas.

**a) Espaciadores internos transcritos (ITS).** La región de los ITS incluye el gen altamente conservado 5.8S y dos espaciadores internos transcritos, ITS1 e ITS2, que corresponden a sitios no codificantes del ADN ribosomal del núcleo (nrADN). La región ITS es parte de la unidad trascricional del nrADN, pero los productos de los transcritos

no se incorporan a los ribosomas maduros. Sin embargo, los espaciadores ITS1 e ITS2 parecen estar involucrados en la maduración del nrARN. Es probable que estos espaciadores estén bajo algún tipo de restricción evolutiva en cuanto a estructura y secuencia, sugerido por la alta proporción de guanina y citosina que contienen. Su uso en la filogenética de angiospermas ha sido principalmente a nivel de géneros cercanamente relacionados y especies debido a su evolución relativamente rápida, así como a las características de esta región: i) presentan miles de copias en el genoma nuclear, que se repiten en tándem en un locus cromosómico o en múltiples loci, facilitando su detección, amplificación, clonación y secuenciación; ii) posee alta información para niveles taxonómicos bajos, pero también exhibe patrones de secuencias conservados y altamente alineables entre muchas angiospermas; y iii) tiene una longitud moderada (ca. 700 pares de bases) y está flanqueado por secuencias altamente conservadas (genes ribosomales nucleares 18S y 26S), haciéndola relativamente fácil de amplificar (Baldwin *et al.*, 1995; Soltis y Soltis, 1998).

**b) *matK*.** Es una región codificante que se localiza dentro del intrón del gen del ARN de transferencia (tARN) para la lisina, *trnK*. El gen *matK* codifica para una madurasa, proteína involucrada en el empalme de los intrones tipo II de los transcritos de ARN. Tiene una longitud aproximada de 1,550 pares de bases y es fácilmente amplificado usando las regiones codificantes altamente conservadas que lo flanquean, entre ellos los exones de *trnK* y los genes *rps16* y *psbA*. Dado que *matK* tiene una de las tasas evolutivas más altas entre los genes del genoma del cloroplasto este gen es apropiado para resolver relaciones intergenéricas o interespecíficas en plantas con semillas (Soltis y Soltis, 1998). La cantidad de sitios informativos que proporciona es similar o un poco mayor con respecto a la región nuclear de los ITS, debido a su longitud mayor (Soltis y Soltis, 1998, Gravendeel *et al.*, 2001) y tiene hasta dos o tres veces más que el gen del cloroplasto *rbcL*.

**c) *trnL-trnF*.** La región *trnL-trnF* consta de dos fragmentos no codificantes que se encuentran en el ADN del cloroplasto (cpADN). El primero de ellos es el intrón *trnL* (grupo I), ubicado entre los exones 5' y 3' del gen que codifica para el tARN para leucina, *trnL* (UAA); el segundo es el espaciador intergénico localizado entre el exón 3' del gen *trnL* (UAA) y el gen que codifica para el tARN para fenilalanina, *trnF* (GAA) (Taberlet *et*

*al.*, 1991). Su tamaño es relativamente pequeño, el intrón va de 350-600 pb y el espaciador *trnL-trnF* de 120-350 pb en monocotiledóneas y dicotiledóneas muestreadas (Soltis y Soltis, 1998). Esta región evoluciona más rápido que las regiones codificantes (*e.g. rbcL*) y el propio intrón *trnL* lo hace con una tasa similar a la del espaciador intergénico, debido probablemente a su facilidad para formar estructuras secundarias. Se ha utilizado para resolver filogenias de plantas desde el nivel de especie a familia, siendo más apropiada en niveles taxonómicos bajos, por presentar un alto número de sitios informativos y variación de longitud a pesar de ser una región de tamaño relativamente pequeño (Soltis y Soltis, 1998).

#### 4.8 Análisis filogenéticos

Se elaboró en Mesquite (Maddison y Maddison, 2009) una matriz para cada uno de los conjuntos de datos: i) datos estructurales; ii) región ITS; iii) región *matK*; iv) región *trnL-trnF*; y v) combinación de datos estructurales y moleculares. Las secuencias de ADN de cada región fueron alineadas por separado con la versión en línea del programa MAFFT versión 7 usando los valores por defecto. Posteriormente los alineamientos resultantes se ajustaron visualmente en PAUP\* versión 4.0 (Swofford, 2002) con el fin de maximizar la similitud de las secuencias (Simmons, 2004) y se eliminaron los fragmentos de secuencias incompletas de los extremos 3' y 5', dejando la misma longitud para cada secuencia.

Los estudios filogenéticos previos para Spiranthinae y Cranichideae (Salazar *et al.*, 2003, 2011, Figueroa *et al.*, 2008; Bernal, 2013; Borba *et al.*, 2014) han mostrado que el análisis separado de las regiones ITS, *matK* y *trnL-trnF* ha recuperado patrones filogenéticos sin conflictos fuertemente soportados entre ellas, así como un incremento tanto en la resolución como el soporte de los clados cuando estas regiones se analizan combinadas entre ellas y/o con datos estructurales. En este trabajo se efectuaron análisis cladísticos, por una parte, de los caracteres estructurales (Cuadros 4 y 5) y los moleculares separadamente, además de ambos tipos de datos en combinación, incluyendo en todos los casos los mismos taxa estudiados anatómicamente. Dado que los resultados obtenidos del análisis combinado de las tres regiones de ADN fueron similares al de los

datos estructurales y moleculares combinados, en el apartado de Resultados se pone mayor énfasis en este último, puesto que reúne tanto la evidencia morfológica como la molecular con la que se dispone al momento.

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML). La decisión de utilizar dos métodos fue con el fin de comparar los resultados generados por ambos, debido a que en trabajos previos se han observado linajes dentro de *Spiranthinae* con ramas más largas que las de otros (Salazar y Dressler, 2011), lo que podría conducir a la parsimonia a errores analíticos como la “atracción de ramas largas”, es decir, a una agrupación de linajes con ramas largas que no están cercanamente relacionados entre ellos, debida a similitudes originadas por substituciones independientes en la misma base desde bases ancestrales diferentes (*e.g.* Sanderson *et al.*, 2000; Anderson y Swofford, 2004; Bergsten, 2005). La máxima verosimilitud, un método basado en modelos explícitos de evolución molecular, es menos susceptible a dicho error metodológico.

El análisis de parsimonia se realizó con el programa PAUP\* versión 4.0 (Swofford, 2002). Se realizaron búsquedas exactas de tipo “*branch and bound*” con adición de secuencias simple guardando todos los árboles más parsimoniosos (opción MULLTREES activada). Todos los caracteres se tomaron como no ordenados y de igual peso (Parsimonia de Fitch; Fitch, 1971). El apoyo interno de los clados se evaluó con un análisis “*bootstrap*” no paramétrico que consistió de 1,000 réplicas (Felsenstein, 1985), realizando una búsqueda de tipo “*branch and bound*” guardando todos los árboles. Los porcentajes bootstrap (BP) se consideraron arbitrariamente: 51 a 70 como soporte débil, 71 a 84 como soporte moderado y 85 a 100 como soporte fuerte. Los árboles resultantes se editaron en FigTree versión 1.3.1 (Rambaut, 2009).

El análisis filogenético de máxima verosimilitud se realizó en la interfaz gráfica de RaxML versión 1.3 (Silvestro y Michalak, 2011), utilizando la opción “*ML + rapid bootstrap*” para encontrar el árbol con la verosimilitud óptima y evaluar el soporte de los clados con 1,000 réplicas en un análisis “*bootstrap*” no paramétrico. Los datos estructurales se analizaron con la opción que considera datos de tipo multiestado, combinada con una distribución gamma para la tasa de variación de los sitios

(MULTIGAMMA) y el modelo MK. El modelo MK es una generalización del modelo Jukes-Cantor (JC) que considera igualmente probables las transiciones entre todos los estados de carácter y se ha sugerido para los análisis de caracteres morfológicos (Lewis, 2001). La matriz de datos combinada se analizó con la opción para datos multiestado, combinada con una distribución gamma para la tasa de variación de los sitios y la proporción de sitios invariantes (MULTIGAMMAI), asignando el modelo MK a la partición de los caracteres estructurales y el modelo GTR a los datos moleculares. El modelo GTR+G+I se obtuvo como el mejor modelo de ajuste para los datos moleculares con el programa JModeltest versión 2.1.4 (Posada, 2008), usando el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés; Akaike, 1974). El árbol obtenido para cada conjunto de datos se editó en FigTree versión 1.3.1 (Rambaut, 2009).

#### **4.9 Optimización de caracteres estructurales**

Para explorar las posibles rutas evolutivas de los 16 caracteres estructurales vegetativos de la raíz y la hoja y su valor taxonómico, éstos se optimizaron en uno de los árboles más parsimoniosos, resultante del análisis combinado de los datos estructurales y moleculares, el cual presentó la misma topología que el árbol de ML. La optimización se realizó con el programa Winclada versión 1.00.084.02 (Nixon, 2002) mediante la opción de transformación acelerada (ACCTRAN, por sus siglas en inglés), la cual favorece la interpretación de hipótesis de homología primaria postuladas como válidas en ausencia de evidencia que las contradiga (de Pinna, 1991).

## V. RESULTADOS

### 5.1 Descripción morfológica y anatómica

#### 5.1.1 Raíz

**a) Morfología.** Los ejemplares de las especies examinadas presentaron de diez a 30 raíces, de las cuales las centrales se introducen más profundamente en el sustrato, mientras que las laterales se disponen horizontalmente (Fig. 3G). Son gruesas y fusiformes (Fig. 3G), con excepción de *Sarcoglottis uliginosa* en la cual son cilíndricas y delgadas (Fig. 3K). En *S. scintillans* (E.W.Greenw.) Salazar & Soto Arenas las raíces se atenúan hacia el ápice (Fig. 3G). En *Brachystele camporum* (Lindl.) Schltr. las raíces son estipitadas (Cuadro 6), es decir, la porción proximal de éstas es delgada y se ensanchan hacia la porción más distal (Hoehne, 1945: Cuadro 166). En *Pelexia ekmanii* (Kraenzl.) Schltr., las raíces están comprimidas lateralmente (Fig. 5A). Las raíces se encuentran dispuestas en un fascículo (Fig. 3G), o bien, en varios fascículos a lo largo de un rizoma como sucede en *Pelexia funckiana* A.Rich. & Galeotti Schltr., *S. richardiana* (Schltr.) Salazar & Soto Arenas, *S. scintillans* y *S. uliginosa* (Cuadro 6) y producen raíces y brotes a intervalos. En *Sarcoglottis* este rizoma generalmente es subterráneo, horizontal y es particularmente evidente en la especie paludícola *S. uliginosa*, mientras que en *S. richardiana* y *S. scintillans* es muy corto y generalmente está oculto entre las raíces. En *P. funckiana* el rizoma es aéreo y vertical por lo que da a las raíces un aspecto de “zancos”, similar a lo reportado para *Manniella* (Manniellinae) y *Prescottia* (Cranichidinae) por Figueroa *et al.* (2008). El diámetro de las raíces varía de 0.3 cm en *S. uliginosa* hasta 1.4 cm en *S. scintillans* (Cuadro 6) y su longitud puede sobrepasar a los 15 cm de longitud en *S. schaffneri* (Rchb.f.) Ames y *S. scintillans*.

**b) Anatomía (corte transversal).** En todas las especies la superficie de las raíces presenta pelos radicales uniseriados (Figs. 4A, H, 5B). La base de cada pelo es infundibuliforme, el cuerpo es tubular y las puntas son redondeadas (Fig. 4H). La pared de los pelos radicales puede ser continua a lo largo de su longitud o presentar dehiscencia en espiral (Figs. 4A, H, 5B), quedando unida solamente por los restos de la pared celular

(Fig. 4B). La dehiscencia en espiral de la pared puede aparecer desde la base del pelo o en su porción más distal.

El velamen mostró variación en cuanto al número de estratos que lo forman (Cuadro 6), siendo generalmente uniestratificado (Fig. 4C, E, I), con células cuadradas (Fig. 4C) o rectangulares-cuneadas en sentido radial (Cuadro 6; Fig. 4E). En *Sarcoglottis scintillans* (Fig. 4D) y *S. grandiflora* (Hook.) Klotzsch (Fig. 4J) se presentaron tres estratos, mientras que en *Sauroglossum elatum* Lindl., se observaron seis (Fig. 5F). En estas especies con velamen pluriestratificado se observó diferenciación en epi y endovelamen, es decir, el estrato del velamen más externo e interno, respectivamente (Porembski y Barthlott, 1988). Las células del epivelamen son pequeñas y de forma cuadrada, mientras que las del endovelamen son rectangulares-cuneadas en dirección radial. En las paredes celulares del velamen se presentan engrosamientos helicoidales ya sea rectos u ondulados (Cuadro 6) y en las zonas que carecen de ellos se presentan poros (Fig. 4E). En el estrato más interno, adyacente a la célula de paso, se observaron tilosomas (excrecencias lignificadas de la pared de las células; Pridgeon *et al.*, 1983) de tipo lamelado, es decir, láminas que consisten de crestas y surcos dispuestos paralelamente (Pridgeon *et al.*, 1983; Figs. 4F, 5G). Las células del velamen pueden contener en su interior spiranthosomas e hifas (Fig. 4E).

El córtex está delimitado en su porción más externa por la exodermis y en la más interna por la endodermis (Fig. 4K). La exodermis es uniestratificada y está formada por dos tipos de células, todas de forma poligonal y menor tamaño en comparación con las del velamen. El primer tipo y más abundante corresponde a las células más anchas, con escasos contenidos celulares y engrosamientos escalariformes en sus paredes radiales (Fig. 4D). El segundo tipo consiste de células de paso, las cuales se localizan debajo de los tilosomas del velamen, son más escasas y estrechas, además de que poseen un gran núcleo, abundantes contenidos celulares y paredes celulares delgadas (Fig. 4F).

El córtex está formado por células parenquimáticas, cuyo número de estratos varía dependiendo de la especie, desde 9 a 11 en *Sarcoglottis uliginosa* hasta 23 a 25 en *S. assurgens* (Rchb.f.) Schltr. Las células del córtex presentan paredes delgadas, generalmente son isodiamétricas y son pequeñas en las capas más externas, globosas y



de mayor tamaño en los estratos intermedios y radialmente alargadas en los más internos (Fig. 4K). En el interior de dichas células se presentan abundantes spiranthosomas cuya cantidad se incrementa a medida que están más cerca del tejido vascular (Fig. 4M). Frecuentemente, el córtex contiene idioblastos con rafidios en su interior (Fig. 4G). Entre las células de parénquima de todas las especies estudiadas se observaron espacios intercelulares pequeños. Sin embargo, solamente en el estrato más interno del córtex de *Pelexia gutturosa* (Rchb.f.) Garay se observó lo que Figueroa *et al.* (2008) consideran como espacios supraendodérmicos, es decir, espacios intercelulares del tamaño de una célula de parénquima cortical circundante presentes en el exterior de la endodermis (Figueroa *et al.*, 2008; Cuadro 6; Fig. 5C). La endodermis es uniestratificada (Figs. 4L, M, 5C, D), formada por células isodiamétricas o alargadas en sentido tangencial con bandas de Caspary notables (Figs. 4M, 5D). El periciclo es uniestratificado y está formado por células isodiamétricas con algunos contenidos oscuros en su interior (Figs. 4L, 5C, D).

El tejido vascular es poliarco (Cuadro 6; Figs. 4M, 5D, E). Los polos de xilema se alternan con el floema y entre ambos se encuentran células de parénquima con contenidos oscuros. El parénquima de la región central está formado por células isodiamétricas en corte transversal, de menor tamaño que las del córtex y pueden presentar algunos spiranthosomas y rafidios.

### 5.1.2 Hoja

**a) Morfología.** Las especies estudiadas presentan generalmente de dos a 11 hojas dispuestas en espiral formando una roseta basal (Cuadro 7; Fig. 3). Las hojas son no articuladas, envainantes en la base, simples y de forma variable (Cuadro 7). La superficie de las hojas es glabra. El ápice es agudo a acuminado. El margen es entero o ligeramente ondulado como en *Sarcoglottis scintillans* y translúcido en *Pelexia ekmanii*, *Sarcoglottis uliginosa* y *Sauroglossum elatum*. La lámina foliar se reduce (Cuadro 7) y se va acanalando a medida que se acerca a la base. En *Pelexia ekmanii*, *P. gutturosa*, *Sarcoglottis grandiflora*, *S. lobata*, *S. sceptrodes* (Rchb.f.) Schltr., *S. scintillans* y *Sauroglossum elatum* la lámina foliar se reduce gradualmente. En *Brachystele*

*camporum*, *S. assurgens*, *S. corymbosa* Garay, *S. richardiana*, *S. rosulata* (Lindl.) P.N.Don, *S. schaffneri*, *S. uliginosa* y *Stenorrhynchos speciosum* (Jacq.) Rich. ex Spreng., forma un pecíolo notablemente más reducido en comparación con el ancho de la lámina, más corto que ésta (menos de 2 cm) y con características anatómicas similares a las de la lámina foliar. En *Cyclopogon luteoalbus* (A.Rich. & Galeotti) Schltr., *Pelexia funckiana* y *Pelexia* sp. la parte basal de la lámina foliar se contrae abruptamente para formar un pecíolo estrecho tan largo como ésta.

Las hojas son conduplicadas, presentan una nervadura media conspicua en la superficie abaxial que forma una quilla y nervaduras laterales menos evidentes conectadas por venas más pequeñas. Las hojas vistas de perfil son ligeramente arqueadas y crecen ya sea postradas sobre el sustrato como en *Sarcoglottis rosulata* (Fig. 3I), o bien, son ascendentes como en el resto de las especies (Cuadro 7). Las hojas son suaves y tienen una consistencia herbácea, sin embargo, las de *S. rosulata* tienen una consistencia ligeramente más carnosa y rígida.

Las hojas pueden estar presentes al momento de la floración o estar ausentes (Cuadro 7). *Cyclopogon luteoalbus*, *Pelexia funckiana*, *Pelexia* sp. *Sarcoglottis grandiflora*, *S. richardiana*, *S. rosulata*, *S. sceptrodes*, *S. uliginosa*, *Sauroglossum elatum* y *Stenorrhynchos speciosum* presentan hojas frescas en el módulo de crecimiento que porta la inflorescencia, aunque ocasionalmente *Sarcoglottis sceptrodes* carece de ellas o están marchitas en la floración. En *Brachystele camporum*, *Pelexia ekmanii*, *P. gutturosa*, *Sarcoglottis assurgens*, *S. corymbosa*, *S. lobata*, *S. schaffneri* y *S. scintillans* las plantas generalmente pierden las hojas antes de la floración. En algunas ocasiones *P. gutturosa*, *S. assurgens*, *S. corymbosa* y *S. lobata* pueden presentar hojas marchitas rodeando la inflorescencia. En *S. schaffneri* pueden presentarse hojas frescas en la antesis, no obstante, estas son producidas en un brote distinto a la inflorescencia, debido a que corresponden al módulo de la siguiente estación de crecimiento.

El color de la superficie adaxial de las hojas es variable y algunas especies pueden tener variación dentro de la misma población, pudiendo presentar un color verde uniforme o combinado con manchas, líneas o bandas longitudinales (Cuadro 7). En *Brachystele camporum*, *Cyclopogon luteoalbus*, *Pelexia ekmanii*, *Pelexia funckiana*, *P.*

*gutturosa*, *Pelexia* sp., *Sarcoglottis corymbosa*, *S. scintillans*, *S. uliginosa*, *Sauroglossum elatum* y *Stenorrhynchos speciosum* es verde uniforme, siendo más claro en *B. camporum* y *Sarcoglottis uliginosa*. Mientras que en *Sarcoglottis sceptrodes*, *S. richardiana*, *S. lobata* y *S. schaffneri*, puede ser únicamente verde oscuro, o bien, presentar bandas longitudinales o manchas de color blanco o plateado. En *S. assurgens* y *S. grandiflora* las hojas generalmente son solo de color verde oscuro, sin embargo, algunos individuos pueden presentar líneas y manchas, respectivamente. En *S. rosulata* las hojas son verde glauco con líneas longitudinales plateadas a lo largo de las nervaduras. En *S. richardiana* y *S. scintillans* se observó que la superficie adaxial tiene una apariencia iridiscente, mientras que en *S. lobata* es opaco. La superficie abaxial es de un color más claro, llegando a ser verde pálido grisáceo.

El tamaño de las hojas maduras es variable dependiendo de la especie (Cuadro 7); por ejemplo, *B. camporum* porta hojas pequeñas de 1.0 a 1.5 cm de ancho por 3.0 a 3.5 cm de largo, mientras que *S. sceptrodes* presenta hojas grandes de 5.0 a 7.0 cm de ancho por 21.0 a 37.0 cm de largo.

**b) Micromorfología (superficie epidérmica).** En la vista de la superficie en MEB de las epidermis de las hojas intactas (sin fijación, ni procesadas con xilol) se observó que las células epidérmicas presentan ceras epicuticulares de tipo costra (Fig. 6A) en ambas superficies. En la vista de la superficie de las hojas fijadas y procesadas se observaron restos de estas costras así como cera en forma de gránulos (Cuadro 8; Figs. 6C, D, G, H, 7D, E). Éstos últimos están ausentes o son escasos (menos de 15 gránulos por célula) en *Brachystele camporum*, *Pelexia gutturosa*, *Sarcoglottis assurgens*, *S. lobata*, *S. richardiana* y *Stenorrhynchos speciosum* y son abundantes en el resto de las especies.

En las células limpias se observó que el microrelieve de la pared periclinal de la superficie adaxial es estriado, excepto en *Stenorrhynchos speciosum*. Particularmente, en los márgenes celulares (campo de las anticlinales, ver Fig. 2D) las estrías son gruesas en *Pelexia* sp., *Sarcoglottis corymbosa* (Fig. 6B) y *S. sceptrodes* (Fig. 6F), mientras que en el resto de las especies son finas (Fig. 6D, E). En la pared periclinal (pared central y campo central, ver Fig. 2D) de la mayoría de las especies se presentan estrías, excepto en *Sarcoglottis grandiflora* (Fig. 6D), *S. uliginosa* y *Sauroglossum elatum* (Fig. 7D), quienes

presentaron un microrelieve liso en esta zona; en *Cyclopogon luteoalbus* (Fig. 7F), *Sarcoglottis assurgens*, *S. lobata*, *S. richardiana*, *S. rosulata* (Fig. 6G), *S. sceptrodes* (Fig. 6F) y *S. schaffneri* se presentaron además verrugas, ya sea agrupadas o distribuidas de manera aleatoria. En *Stenorrhynchos speciosum* solo se presentaron concavidades, tanto en los márgenes celulares como en el campo central (Fig. 7F). La superficie abaxial presenta un microrelieve similar al de la superficie adaxial, no obstante, las estrías son notorias en las células subsidiarias del complejo estomático, siendo gruesas en *Pelexia ekmanii*, *P. funckiana*, *P. gutturosa* (Fig. 7H), *Pelexia* sp., *Sarcoglottis corymbosa* (Fig. 6I), *S. lobata*, *S. rosulata*, *S. sceptrodes* y *S. schaffneri* o finas como en el resto de las especies (Cuadro 8; Figs. 6H, 7G).

Las células epidérmicas intercostales de ambas caras tienen un contorno poligonal isodiamétrico (Cuadro 8; Figs. 6A-F, 7A, E, F), excepto en *Brachystele camporum* (Fig. 7C), *Pelexia gutturosa* (Fig. 7H) y *Sauroglossum elatum* (Fig. 7B, D), en las que es poligonal alargado. En todas las especies las células costales son poligonales alargadas y se disponen en filas paralelas al eje longitudinal de la hoja. Las paredes anticlinales son hundidas y tienen un curso recto (Cuadro 8; Figs. 6A-F, 7A, B, D, E, F, H), excepto en *Brachystele camporum* (Fig. 7C) en el que son ligeramente onduladas en forma de “S”. En las células adyacentes a los aparatos estomáticos los contornos celulares pueden verse distorsionados para acoplarse a éstos. En *Pelexia gutturosa* (Fig. 7H), *Pelexia* sp., *Sarcoglottis corymbosa* (Fig. 6B), *S. lobata* y *S. schaffneri* las paredes anticlinales presentan estrías (Cuadro 8).

La pared periclinal en la superficie adaxial es convexa en *Brachystele camporum* (Figs. 7C, 9C), *Cyclopogon luteoalbus* (Fig. 9A), *Pelexia* (Figs. 7A, E, H, 9B), *Sarcoglottis grandiflora* (Figs. 6D, 8C), *S. sceptrodes* (Fig. 8C), *S. scintillans* (Fig. 8B), *S. uliginosa* (Fig. 6C) y *Sauroglossum elatum* (Fig. 7B), mientras que en el resto de las especies de *Sarcoglottis* (Cuadro 8; Figs. 6B, E, 8A) y en *Stenorrhynchos speciosum* es plana con una giba convexa. Dicha giba se hace más notoria por la acumulación de ceras epicuticulares. En todas las especies la curvatura de la pared periclinal en la superficie abaxial es convexa a más o menos plana.

**c) Anatomía (corte transversal).** En los cortes transversales se observó que la cutícula en ambas superficies es delgada (menor a 1  $\mu\text{m}$ ) y rodea tanto la superficie de las células epidérmicas como a la del complejo estomático (Figs. 7E, 8C).

La epidermis es uniestratificada en ambas superficies. La epidermis adaxial está formada por células de forma cuadrada en *Brachystele camporum*, *Pelexia funckiana*, *P. gutturosa*, *Pelexia* sp., *Sarcoglottis assurgens*, *S. schaffneri* y *S. scintillans* (Fig. 8B) y *Stenorrhynchos speciosum*, mientras que en el resto de las especies presenta células alargadas dorsiventralmente (Figs. 8A, 9A, B; Cuadro 9). Las células epidérmicas de la superficie abaxial son generalmente cuadradas a ligeramente alargadas. En cuanto al tamaño, las células de la superficie adaxial son más grandes que las células de la superficie abaxial: en la abaxial la altura varía de 112.0 a 478.0  $\mu\text{m}$  y en la adaxial varía de 87.0 a 148.0  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, las células de ambas superficies varían en tamaño, siendo las células localizadas al nivel del haz vascular principal más pequeñas que las del resto de la lámina (Figs. 8E, 9G).

Se observaron dos tipos de borde foliar (Cuadro 9). El primero y mejor representado está constituido por las células epidérmicas de ambas superficies separadas entre ellas por células parenquimáticas del mesofilo, por lo que es llamado en este trabajo “borde parenquimático” (Figs. 8C, 9D). El segundo tipo está presente en *Pelexia ekmanii* (Fig. 9E), *Sarcoglottis uliginosa* (Fig. 8D) y *Sauroglossum elatum* (Fig. 9F) y está formado solo por la unión de dos a cinco células de ambas superficies epidérmicas, por lo que es llamado aquí como “borde epidérmico”. En *Pelexia ekmanii* este borde está formado por la unión de dos células de cada superficie epidérmica y es redondeado en corte transversal, debido a que las células que lo forman son aproximadamente del mismo tamaño entre ellas y termina con un par de células. En *Sarcoglottis uliginosa* y *Sauroglossum elatum* dicho borde está formado por la unión de cuatro o cinco células de ambas epidermis, cuyo tamaño se va haciendo menor a medida que se acercan al margen de la lámina y termina con una sola célula, por lo cual el borde tiene forma triangular en corte transversal. Dado que las células epidérmicas poseen escasos contenidos en su lumen celular, el borde epidérmico es el responsable de que el margen se observe translúcido a simple vista en las hojas de plantas vivas (Fig. 3J), preservadas en líquido o en material de herbario.

Los estomas se restringen a la superficie abaxial de las hojas, es decir, éstas son hipostomáticas (Cuadro 9; Figs. 8B, 9A, B), excepto en *Brachystele camporum* (Fig. 9C) y *Pelexia gutturosa*, en las cuales se presentan en ambas superficies (hojas anfistomáticas). Los estomas se encuentran al mismo nivel que el resto de las células epidérmicas y presentan rebordes cuticulares (Fig. 8F). La cámara subestomática es irregular y de mayor tamaño que las células adyacentes del mesofilo (Figs. 8F, 9A, B). En la vista de la superficie en MEB y en los cortes paradermales se observó que los estomas anisocíticos (Fig. 6K) y tetracíticos (Fig. 6L) son los más comunes, mientras que los estomas diacíticos (Fig. 6J) se presentan en proporciones muy bajas. Solamente en *Brachystele camporum* se observaron estomas anomocíticos (Fig. 7C). Los estomas están distribuidos en la lámina foliar de manera aleatoria. Las células oclusivas son reniformes y el poro estomático tiene forma elíptica (Figs. 6J, K, L, 7G) y es paralelo al eje longitudinal de la hoja.

El mesofilo es homogéneo (Cuadro 9; Figs. 8B, E, 9A, G) excepto en *Brachystele camporum* (Fig. 9C) y *Pelexia ekmanii* (Fig. 9B), quienes presentaron mesofilo heterogéneo formado por un estrato de células de parénquima en empalizada corta y el resto de parénquima esponjoso. El mesofilo está formado por tres a ocho estratos de células de paredes delgadas (Cuadro 9). Particularmente, las células del mesofilo esponjoso son de forma isodiamétrica o ligeramente braciiforme, es decir, con proyecciones de la membrana celular (Font Quer, 1982; Fig. 8F). Los espacios intercelulares son pequeños. Los cloroplastos son más abundantes en las células cercanas a ambas superficies (Fig. 8B). Se presentaron idioblastos embebidos en el mesofilo con rafidios en su interior. No se observó hipodermis, haces de fibras o colénquima.

Los haces vasculares son de tipo colateral. Dichos haces se encuentran dispuestos en una hilera en la parte media del mesofilo (Figs. 8E, 9G), siendo de mayor tamaño el que se localiza en la parte media de la lámina y de menor tamaño a medida que se acercan al borde. En la mayoría de las especies los elementos del xilema están arreglados en forma de V invertida (Cuadro 9; Figs. 8G, 9H), excepto en *Cyclopogon luteoalbus*, *Pelexia ekmanii* (Fig. 9I), *Sarcoglottis sceptrodes* y *S. schaffneri* (Fig. 8H) en los que se disponen de manera horizontal.



Figura 3. Ver pie de figura en la siguiente página.

**Figura 3.** Morfología de algunas de las especies de *Sarcoglottis* (Spiranthinae) incluidas en este trabajo. **A**, *Sarcoglottis assurgens* (Figueroa 302). **B**, *Sarcoglottis lobata* (Chiapas, México; Salazar 9355, MEXU). **C**, *Sarcoglottis sceptrodes* (Chiapas, México; Dietz s.n., ejemplar cultivado). **D**, *Sarcoglottis schaffneri* (Salazar s.n.). **E**, ejemplar de herbario de *Sarcoglottis corymbosa* con hojas marchitas en la antesis (González Tamayo s.n.). **F**, *Sarcoglottis richardiana* (Salazar 8237). **G**, *Sarcoglottis scintillans* (Pichardo Ramírez 15). **H**, *Sarcoglottis grandiflora* (Radins s.n.). **I**, *Sarcoglottis rosulata* (Cruz Lustre 142). **J, K**, *Sarcoglottis uliginosa* (Radins s.n.); las flechas señalan el borde translúcido de la hoja en J y las raíces cilíndricas en K. Fotografías: Gabriela Cruz Lustre (A-G, I); Gerardo A. Salazar (H, J, K).



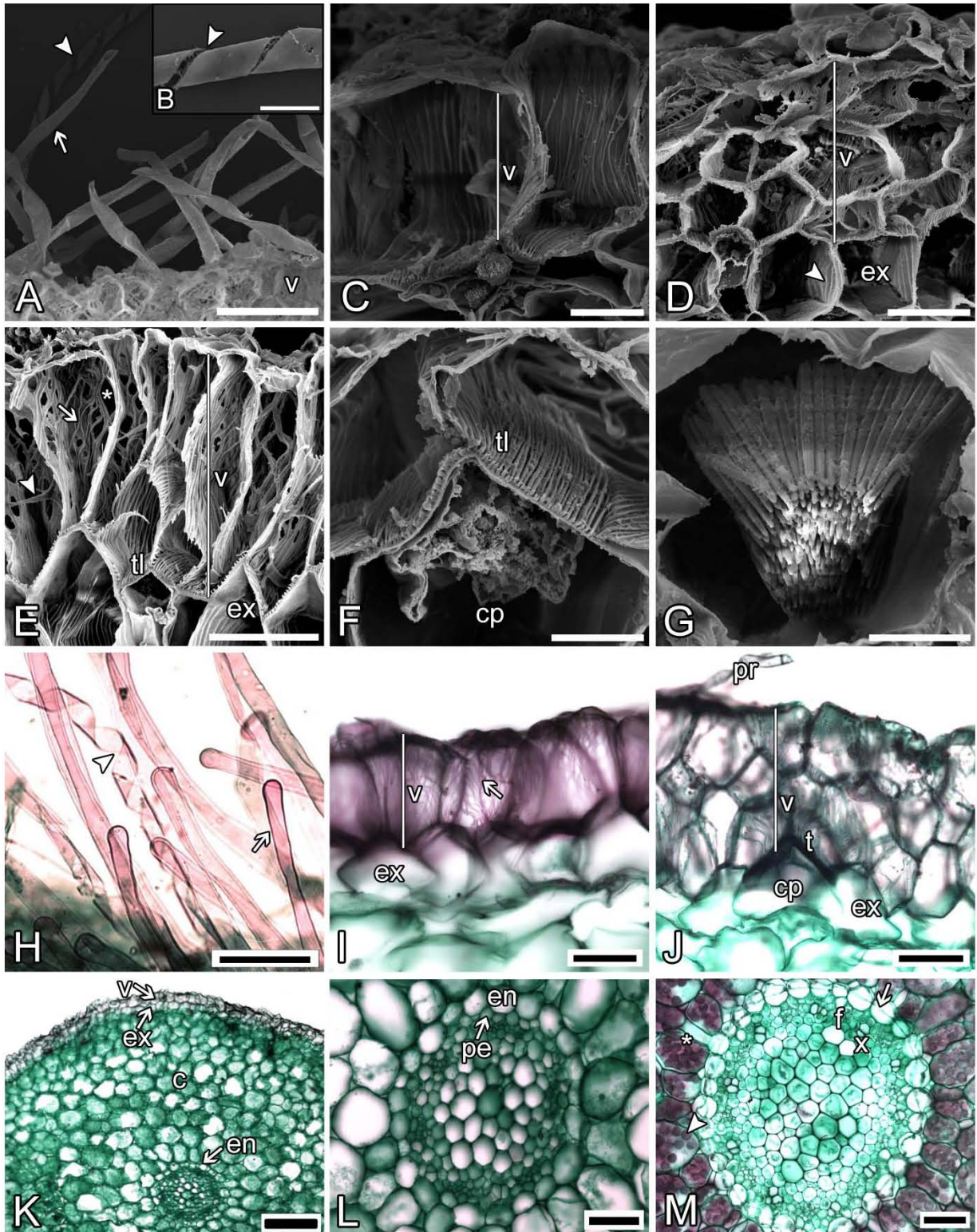


Figura 4. Ver pie de figura en la siguiente página.

**Figura 4.** Anatomía de la raíz de algunos representantes de *Sarcoglottis* (Spiranthinae) incluidos en este trabajo. Cortes transversales. **A-G:** Microscopía electrónica de barrido. **H-M:** Microscopía óptica. **A, H,** pelos radicales con pared continua (flecha) y con dehiscencia en espiral (punta de flecha) de *S. scintillans* (Reyes 5769). **B,** pelo radical con dehiscencia en espiral de *S. sceptrodes* (Salazar 8374). **C,** velamen uniestratificado en *S. uliginosa* y engrosamientos en su pared celular (Radins s.n.). **D,** velamen triestratificado y engrosamientos escalariformes (punta de flecha) en la exodermis de *S. scintillans* (Pichardo Ramírez 15). **E,** poros (asterisco), engrosamientos en las paredes celulares del velamen (flecha) e hifa (punta de flecha) en *S. lobata* (Ventura 18249). **F,** tilosoma lamelado en *S. schaffneri* (Salazar 6877). **G,** rafidios en una célula del córtex de *S. lobata* (Méndez 5892). **H,** pelo radical con pared continua y con dehiscencia en espiral en *S. scintillans* (Pichardo Ramírez 15). **I,** velamen uniestratificado en *S. schaffneri* y engrosamientos (flecha) en su pared celular (Salazar 6584). **J,** velamen triestratificado de *S. grandiflora* (Radins s.n.). **K,** vista general de la raíz de *S. uliginosa* (Radins s.n.). **L,** endodermis, periciclo y tejido vascular de *S. uliginosa* (Radins s.n.). **M,** células de parénquima en el córtex (asterisco) con spiranthosomas (punta de flecha) y banda de Caspary en la endodermis (flecha) de *S. sceptrodes* (Jiménez 2236). Abreviaturas: c, córtex; cp, célula de paso; en, endodermis; ex, exodermis; f, floema; pe, periciclo; t, tilosoma; tl, tilosoma lamelado; pr, pelo radical; v, velamen; x, xilema. Escalas, 150  $\mu\text{m}$  (A); 25  $\mu\text{m}$  (B, C, E); 50  $\mu\text{m}$  (D, I, J); 20  $\mu\text{m}$  (F, G); 100  $\mu\text{m}$  (G, L, M); 300  $\mu\text{m}$  (K). Fotografías: Berenit Mendoza y Gabriela Cruz Lustre (A-G); Gabriela Cruz Lustre (H-M).

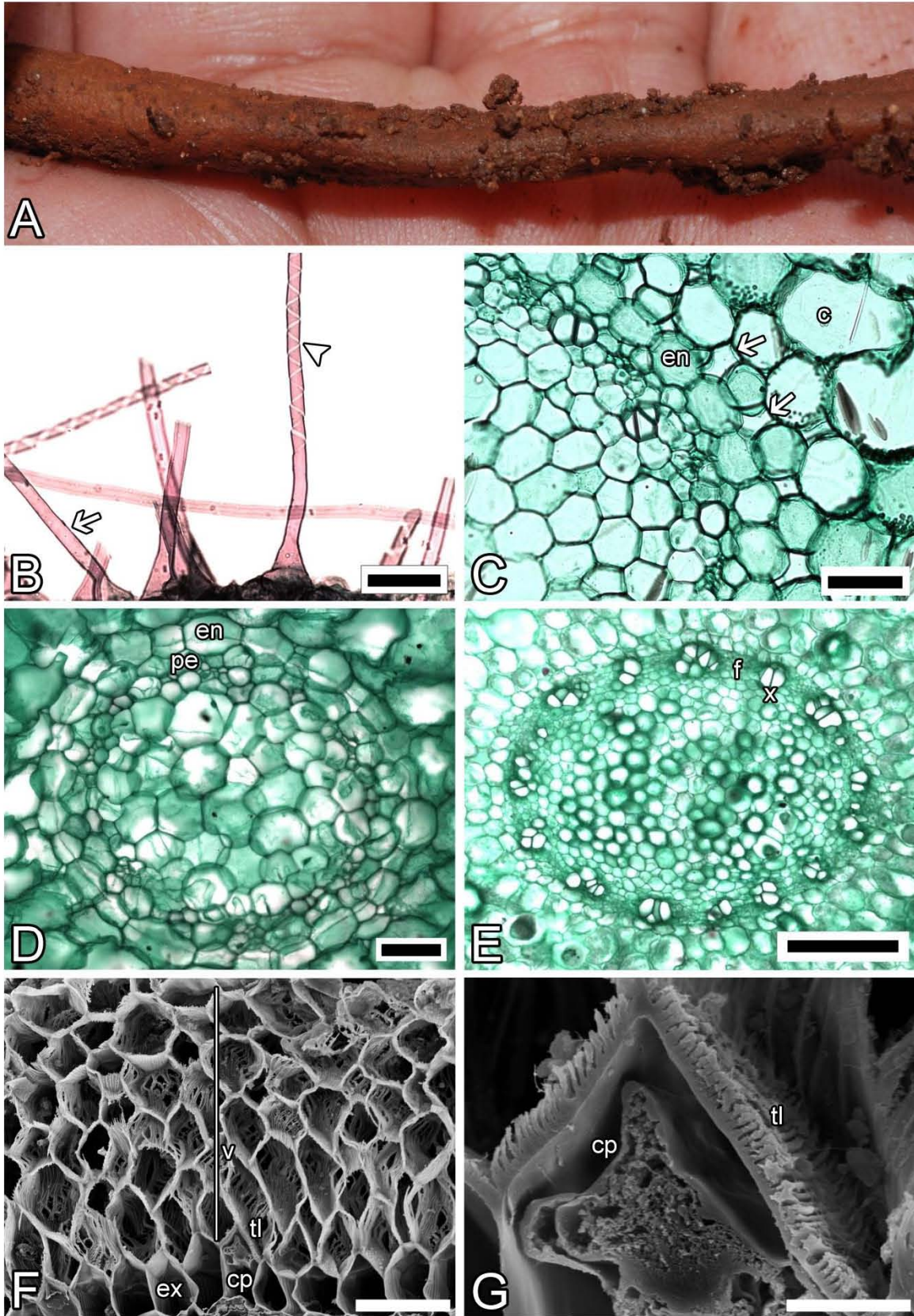


Figura 5. Ver pie de figura en la siguiente página.

**Figura 5.** Morfología y anatomía de la raíz de algunos representantes de Spiranthinae utilizados en este trabajo como grupos de comparación. **A:** Morfología. **B-G:** Anatomía (cortes transversales). **B-E:** Microscopía óptica. **F-G:** Microscopía electrónica de barrido. **A,** raíces lateralmente comprimidas en *Pelexia ekmanii* (*Radins s.n.*). **B,** pelos radicales de pared continua (flecha) y con dehiscencia en espiral (punta de flecha) de *Pelexia* sp. (*Salazar 6421*). **C,** espacios supraendodérmicos (flecha) en *P. gutturosa* (*Cruz Lustre s.n.*). **D,** tejido vascular en *Brachystele camporum* (*Radins s.n.*). **E,** tejido vascular en *Sauroglossum elatum* (*Radins s.n.*). **F,** velamen con seis estratos de *S. elatum* (*Radins s.n.*). **G,** tilosoma lamelado de *S. elatum* (*Radins s.n.*). Abreviaturas: c, córtex; cp, célula de paso; en, endodermis; ex, exodermis; f, floema; pe, periciclo; tl, tilosoma lamelado; x, xilema; v, velamen. Escalas, 100  $\mu\text{m}$  (B, C, D); 300  $\mu\text{m}$  (E); 100  $\mu\text{m}$  (F); 15  $\mu\text{m}$  (G). Fotografías: Gerardo A. Salazar (A); Gabriela Cruz Lustre (B-E); Berenit Mendoza y Gabriela Cruz Lustre (F, G).

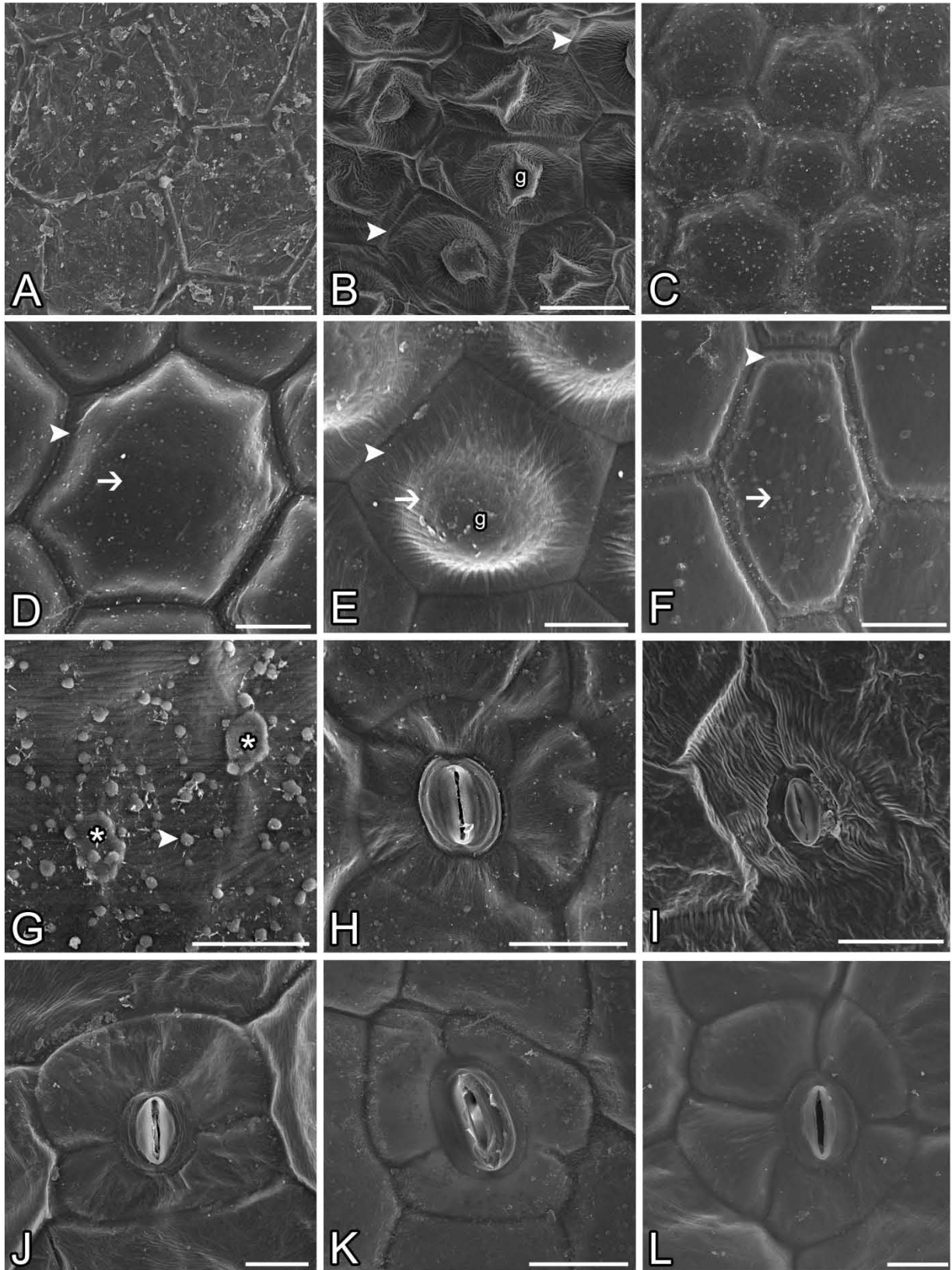


Figura 6. Ver pie de figura en la siguiente página.

**Figura 6.** Micromorfología de la superficie epidérmica de la hoja de algunos representantes de *Sarcoglottis* (Spiranthinae) incluidos en este trabajo. Vistas de la superficie en microscopía electrónica de barrido. **A:** Muestra intacta sin procesar (sin fijación en FAA, sin someter en xilol y alcoholes y sin cubrir). **B-L:** Muestras procesadas. **A,** células epidérmicas (adax.) con ceras epicuticulares intactas de tipo costra en *S. sceptrodes* (Cruz Lustre 100). **B,** células epidérmicas poligonales isodiamétricas (adax.) con pared periclinal plana con giba convexa y paredes anticlinales rectas con estrías (punta de flecha) de *S. corymbosa* (González Tamayo s.n.). **C,** células epidérmicas (adax.) con pared periclinal convexa de *S. uliginosa* (Radins s.n.). **D,** célula epidérmica (adax.) con estrías finas en los márgenes (punta de flecha) y microrelieve ausente en la parte central (flecha) de *S. grandiflora* (Radins s.n.). **E,** célula epidérmica (adax.) con estrías finas en los márgenes (punta de flecha) y estrías en la parte central (flecha) de *S. richardiana* (Salazar 8227). **F,** célula epidérmica (adax.) con estrías gruesas en los márgenes (punta de flecha) y estrías y verrugas en la parte central (flecha) de *S. sceptrodes* (Cruz Lustre s.n.). **G,** microrelieve de la parte central en la célula epidérmica (adax.) de *S. rosulata* con estrías y verrugas (Cruz Lustre 129); nótese la diferencia entre las verrugas (asterisco) y los gránulos de cera (punta de flecha). **H,** estrías finas en las células subsidiarias del estoma de *S. grandiflora* (Radins s.n.). **I,** estrías gruesas en las células subsidiarias del estoma de *S. corymbosa* (González Tamayo s.n.). **J,** estoma diacítico (abax.) en *S. assurgens* (Figuroa 302). **K,** estoma anisocítico (abax.) en *S. uliginosa* (Radins s.n.). **L,** estoma tetracítico (abax.) en *S. scintillans* (Reyes 5769). Abreviatura: g, giba convexa. Escalas, 50  $\mu\text{m}$  (A, D, F, H, I, K); 100  $\mu\text{m}$  (B, C); 25  $\mu\text{m}$  (E, J, L); 20  $\mu\text{m}$  (G). Fotografías: Berenit Mendoza y Gabriela Cruz Lustre.

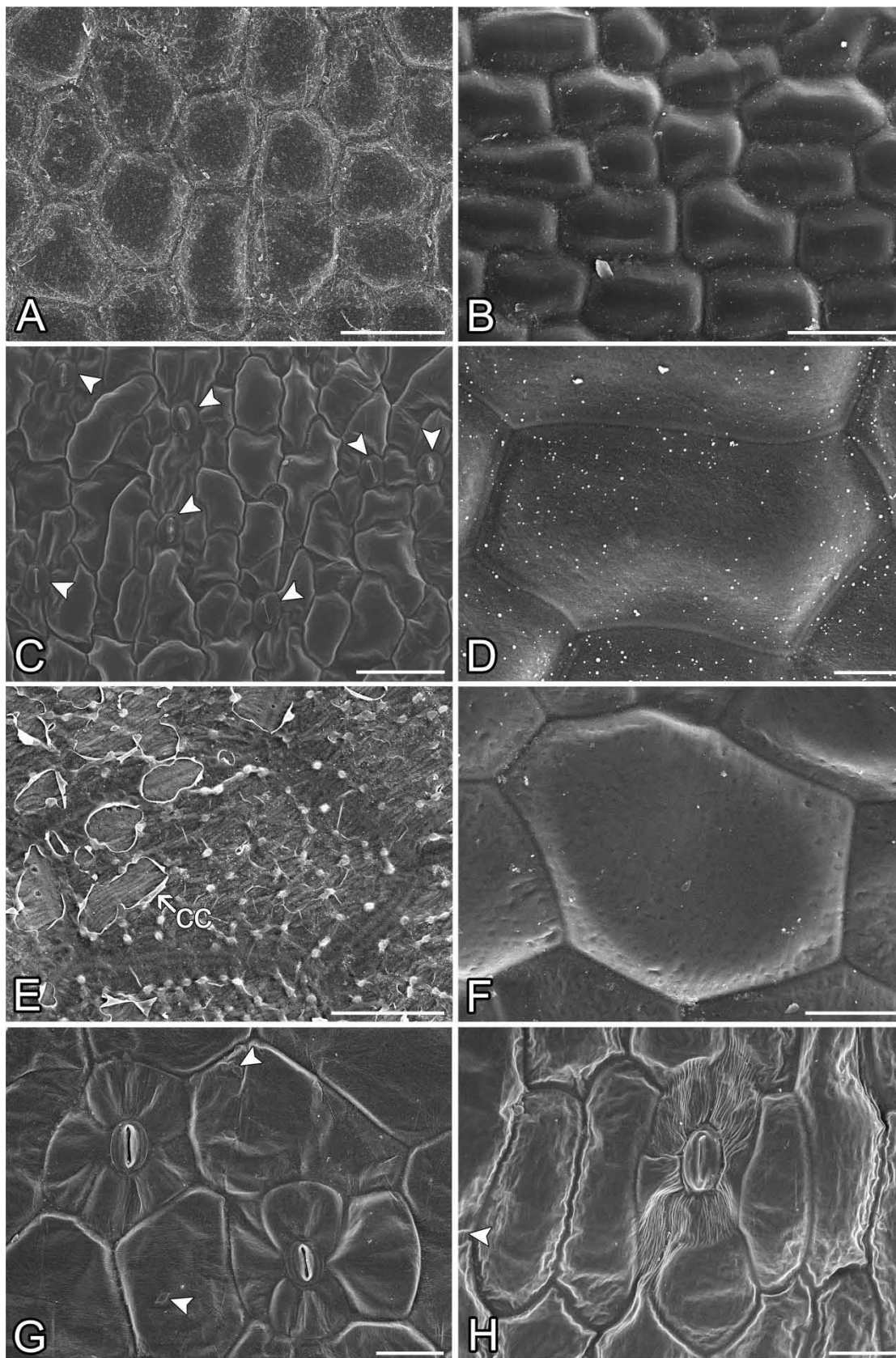


Figura 7. Ver pie de figura en la siguiente página.

**Figura 7.** Micromorfología de la superficie epidérmica de la hoja de algunos representantes de Spiranthinae utilizados en este trabajo como grupos de comparación. Vistas de la superficie en microscopía electrónica de barrido. **A**, células epidérmicas poligonales isodiamétricas (adax.) en *Pelexia funckiana* (Salazar 8390). **B**, células epidérmicas poligonales alargadas (adax.) en *Sauroglossum elatum* (Cabassi s.n.). **C**, células epidérmicas poligonales alargadas (adax.) con paredes anticlinales onduladas en S y estomas anomocíticos (punta de flecha) de *Brachystele camporum* (Radins s.n.). **D**, célula epidérmica (adax.) con estrías finas en los márgenes y microrelieve ausente en la parte central de *S. elatum* (Cabassi s.n.). **E**, célula epidérmica (adax.) con estrías gruesas en los márgenes y estrías en la parte central en *Pelexia* sp.; nótese el desprendimiento de la cutícula con gránulos de cera (Salazar 6421). **F**, microrelieve de la pared periclinal (adax.) con concavidades en *Stenorrhynchos speciosum* (Pérez García s.n.). **G**, estrías finas en las células subsidiarias del estoma (adax.) de *Cyclopogon luteoalbus*; nótese las verrugas (punta de flecha) en la pared periclinal (García Cruz 970). **H**, estrías gruesas en las células subsidiarias del estoma (adax.) de *P. gutturosa* (Cruz Lustre s.n.). Abreviatura: cc, cutícula + ceras epicuticulares (gránulos). Escalas, 100  $\mu\text{m}$  (A, C); 150  $\mu\text{m}$  (B); 50  $\mu\text{m}$  (D, E, F); 300  $\mu\text{m}$  (G, H). Fotografías: Berenit Mendoza y Gabriela Cruz Lustre.



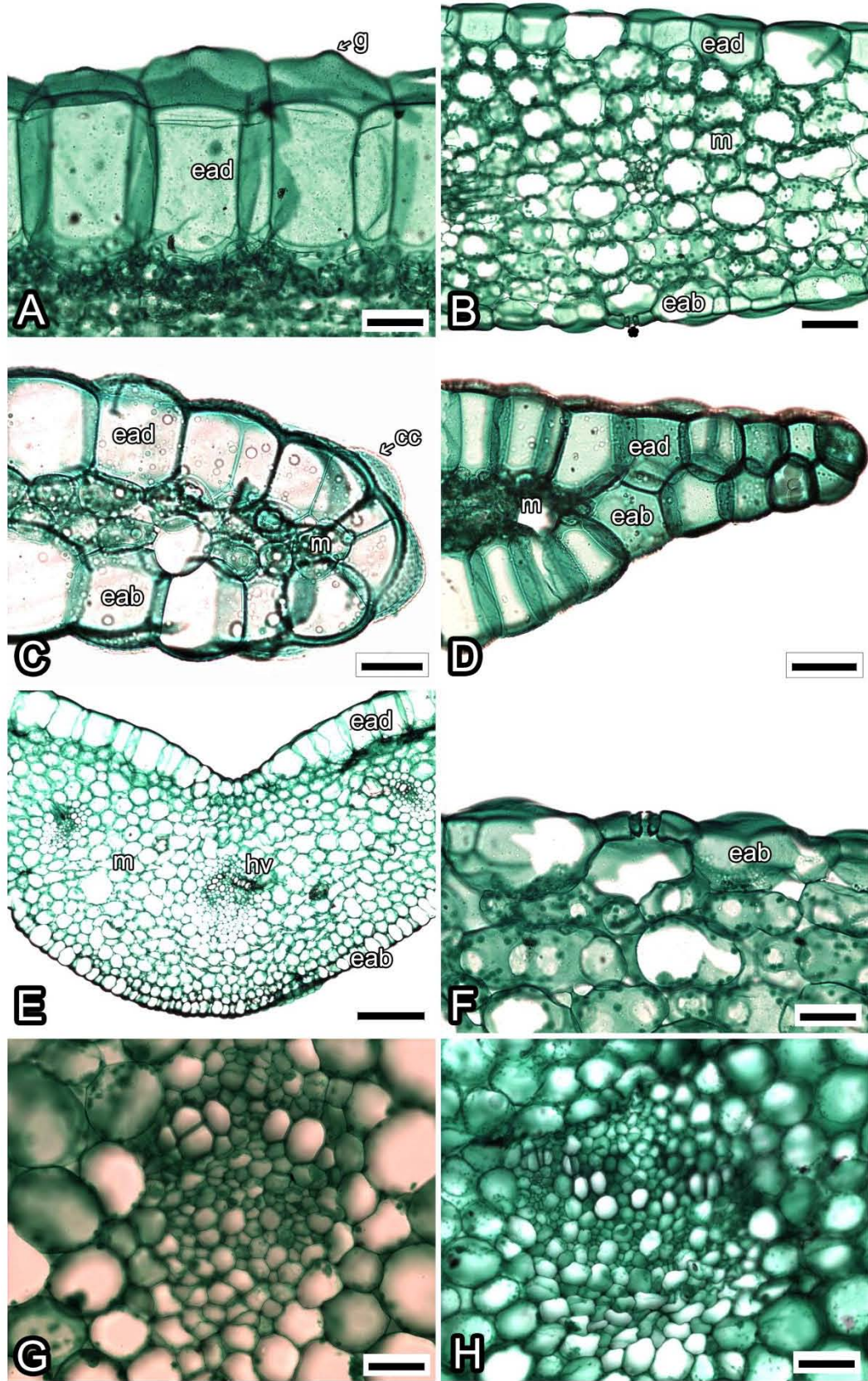
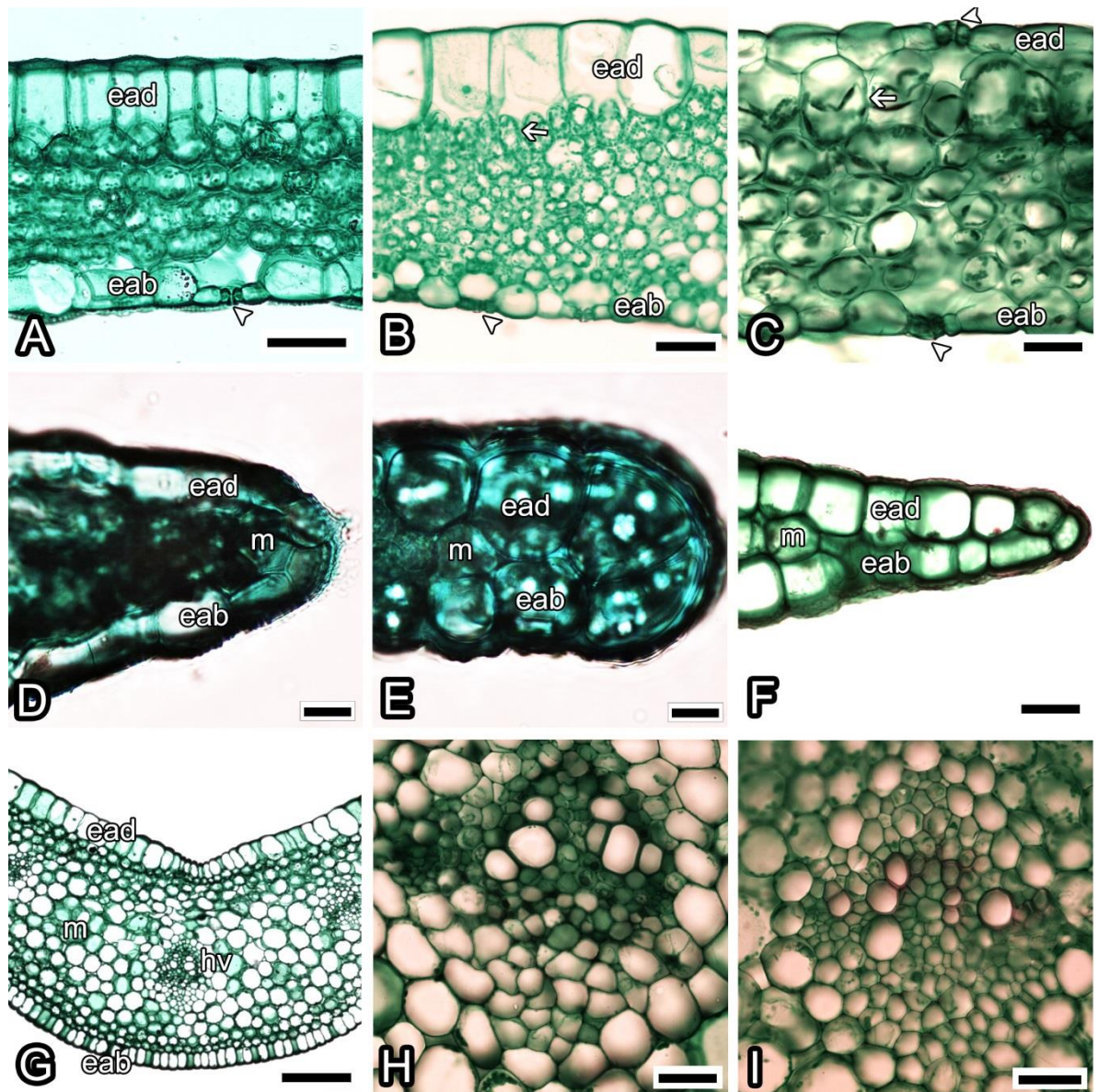


Figura 8. Ver pie de figura en la siguiente página.

**Figura 8.** Anatomía de la hoja de algunos representantes de *Sarcoglottis* (Spiranthinae) incluidos en este trabajo. Cortes transversales vistas en microscopía óptica. **A**, células epidérmicas dorsiventralmente alargadas con pared periclinal plana con giba convexa (adax.) en *S. rosulata* (Cruz Lustre 129). **B**, hoja hipostomática (estoma señalado con asterisco), células epidérmicas no alargadas dorsiventralmente con pared periclinal convexa (adax.) y mesofilo homogéneo en *S. scintillans* (Reyes 5769). **C**, borde foliar parenquimático de *S. sceptrodes* (Krömer 2712). **D**, borde foliar epidérmico de *S. uliginosa* (Radins s.n.). **E**, región media de la hoja de *S. grandiflora* (Radins s.n.). **F**, estoma y células braciiformes del mesofilo adyacentes a la superficie abaxial en *S. scintillans* (Reyes 5769). **G**, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma de V invertida en *S. scintillans* (Pichardo Ramírez 15). **H**, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma horizontal en *S. schaffneri* (Salazar 6584). Abreviaturas: cc, cutícula + ceras epicuticulares; ead, epidermis adaxial; eab, epidermis abaxial; g, giba convexa; hv, haz vascular; m, mesofilo. Escalas, 100 µm (A, B, D, H); 50 µm (C, F, G); 300 µm (E). Fotografías: Gabriela Cruz Lustre.



**Figura 9.** Anatomía de la hoja de algunos representantes de Spiranthinae utilizados en este trabajo como grupos de comparación. Cortes transversales vistas en microscopía óptica. **A**, hoja hipostomática (estoma señalado con punta de flecha) con células epidérmicas dorsiventralmente alargadas (adax.) y mesofilo homogéneo en *Cyclopogon luteoalbus* (García Cruz 970). **B**, hoja hipostomática (estoma señalado con punta de flecha) con células epidérmicas dorsiventralmente alargadas (adax.) y mesofilo heterogéneo (la flecha señala un estrato de células en empalizada corta) en *Pelexia ekmanii* (Radins s.n.). **C**, hoja anfistomática (estomas señalados con puntas de flecha) con células epidérmicas dorsiventralmente no alargadas (adax.) y mesofilo heterogéneo (la flecha señala un estrato de células en empalizada corta) en *Brachystele camporum* (Radins s.n.). **D**, borde parenquimático en *B. camporum* (Radins s.n.). **E**, borde epidérmico en *P. ekmanii* (Radins s.n.). **F**, borde epidérmico en *Sauroglossum elatum* (Radins s.n.). **G**, región media de la hoja de *S. elatum* (Radins s.n.). **H**, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma de V invertida en *S. elatum* (Radins s.n.). **I**, haz vascular principal con elementos del xilema dispuestos en forma horizontal en *P. ekmanii* (Radins s.n.). Abreviaturas: ead, epidermis adaxial; eab, epidermis abaxial; hv, haz vascular; m, mesofilo. Escalas, 100  $\mu\text{m}$  (A, B); 50  $\mu\text{m}$  (C, F, H, I); 20  $\mu\text{m}$  (D, E). Fotografías: Gabriela Cruz Lustre.

**Cuadro 6.** Características morfológico-anatómicas de las raíces de las especies de Spiranthinae estudiadas en este trabajo. Abreviaturas: Cu, cuadrada; On, ondulados; Re, rectos; Rt, rectangular; +, presente(s); -, ausente(s).

Especie/ Características	Morfología			Anatomía					
	Rizoma	Raíces estipitadas	Diámetro máximo (cm)	Estratos del velamen	Forma de los engrosamientos de las paredes del velamen	Forma de las células del velamen (radialm.)	No. estratos del córTEX	Espacios supraendo- dérmicos	Polos de xilema
<i>Brachystele camporum</i>	—	+	0.8	1	Re	Cu	12-14	—	6
<i>Cyclopogon luteoalbus</i>	—	—	0.7	1	On	Rt	20-22	—	10
<i>Pelexia ekmanii</i>	—	—	0.8	1	Re	Cu	19-21	—	7
<i>Pelexia funckiana</i>	+	—	0.5	1	Re	Rt	16-18	—	6
<i>Pelexia gutturosa</i>	—	—	0.8	1	Re	Cu	16-18	+	15
<i>Pelexia sp.</i>	—	—	0.8	1	On	Cu	16-18	—	9
<i>Sarcoglottis assurgens</i>	—	—	1.0	1	On	Rt	23-25	—	13
<i>Sarcoglottis corymbosa</i>	—	—	0.7	1	On	Rt	16-18	—	14
<i>Sarcoglottis grandiflora</i>	—	—	0.9	3	On	Cu, Rt	20-22	—	13
<i>Sarcoglottis lobata</i>	—	—	1.0	1	On	Rt	19-21	—	14
<i>Sarcoglottis richardiana</i>	+	—	1.0	1	On	Cu	16-18	—	11
<i>Sarcoglottis rosulata</i>	—	—	0.7	1	On	Cu	17-19	—	12
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i>	—	—	0.8	1	On	Rt	21-23	—	10
<i>Sarcoglottis schaffneri</i>	—	—	1.2	1	On	Rt	21-23	—	14
<i>Sarcoglottis scintillans</i>	+	—	1.4	3	On	Cu, Rt	17-19	—	11
<i>Sarcoglottis uliginosa</i>	+	—	0.3	1	Re	Cu	9-11	—	6
<i>Sauroglossum elatum</i>	—	—	0.7	6	On	Cu, Rt	21-23	—	14
<i>Stenorrhynchos speciosum</i>	—	—	0.9	1	On	Rt	22-24	—	12

**Cuadro 7.** Características morfológicas de las hojas de las especies de Spiranthinae incluidas en este trabajo. Abreviaturas: As, ascendente; Gr, reducida gradualmente; Pc, reducida en un pecíolo más corto que la lámina; Pl, reducida en un pecíolo tan largo como la lámina; Po, postrada; +, presentes; –, ausentes.

Especie/ características	No. de hojas	Forma	Color (adax.)				Parte basal de la lámina	Ancho (cm)	Largo (cm)	Posición de las hojas	Hojas en la antesis
			Uniforme	Líneas	Manchas	Bandas					
<i>Brachystele camporum</i>	4-5	Elíptica- Oblonga	+	–	–	–	Pc	1.0-1.5	3.0-3.5	As	–
<i>Cyclopogon luteoalbus</i>	3-7	Elíptica- Oblonga	+	–	–	–	Pl	4.0-4.5	11.0-21.0	As	+
<i>Pelexia ekmanii</i>	3-4	Lanceolada	+	–	–	–	Gr	2.2-2.5	8.0-12.0	As	–
<i>Pelexia funckiana</i>	4-11	Ovada- lanceolada	+	–	–	–	Pl	4.5-5.0	17.0-22.0	As	+
<i>Pelexia gutturosa</i>	3-4	Elíptica- oblanceolada	+	–	–	–	Gr	4.5-5.0	30.0-35.0	As	– +
<i>Pelexia sp.</i>	2-3	Ovada- lanceolada	+	–	–	–	Pl	2.5-3.5	11.0-13.0	As	+
<i>Sarcoglottis assurgens</i>	4-7	Elíptica- oblanceolada	+	+	–	–	Pc	3.5-5.0	15.5-20.0	As	–
<i>Sarcoglottis corymbosa</i>	4-5	Elíptica	+	–	–	–	Pc	2.5-3.0	7.5-8.0	As	–
<i>Sarcoglottis grandiflora</i>	4-8	Oblanceolada	+	–	+	–	Gr	4.5-6.0	15.0-20.0	As	+
<i>Sarcoglottis lobata</i>	4-6	Elíptica- oblonga	+	–	+	+	Gr	4.0-7.0	15.0-30.0	As	– +
<i>Sarcoglottis richardiana</i>	3-7	Elíptica	–	–	+	+	Pc	3.5-5.0	5.0-13.5	As	+
<i>Sarcoglottis rosulata</i>	3-4	Elíptica- obovada	–	+	–	–	Pc	3.0-5.5	5.0-9.0	Po	+
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i>	5-8	Oblanceolada	+	–	+	+	Gr	5.0-7.0	21.0-37.0	As	+ –
<i>Sarcoglottis schaffneri</i>	3-4	Elíptica- oblanceolada	+	–	+	+	Pc	3.5-5.5	14.0-21.0	As	–
<i>Sarcoglottis scintillans</i>	4-7	Oblanceolada	+	–	–	–	Gr	4.0-6.0	15-35.0	As	–
<i>Sarcoglottis uliginosa</i>	3-5	Lanceolada	+	–	–	–	Pc	2.5-3.0	4.0-8.0	As	+
<i>Sauroglossum elatum</i>	5-8	Lanceolada	+	–	–	–	Gr	5.0-6.0	15.0-25.0	As	+
<i>Stenorrhynchos speciosum</i>	3-9	Elíptica	+	–	–	–	Pc	2.5-5.0	8.0-15.0	As	+

**Cuadro 8.** Características micromorfológicas de la superficie epidérmica de las hojas de las especies de *Spiranthinae* incluidas en este trabajo. Abreviaturas: Ab, abundantes (>15 gránulos por célula); Ae, ausentes o escasos; Ai, anisocíticos; Ao, anomocíticos; ca, campo de las anticlinales; cc, campo central; Cn, con concavidades; Co, convexa; D, diacíticos; E, estriás; Ef, estriás finas; Eg, estriás gruesas; On, ondulada; Pa, poligonal alargada; pc, pared central; Pg, plana con giba convexa; Pi, poligonal isodiamétrica; Re, recta; T, tetracíticos; V, verrugas; +, presentes; -, ausentes; ?, información no disponible.

Especie/ características	Gránulos de cera	Contorno celular	Curso de la pared anticlinal	Estriás en la pared anticlinal	Curvatura de la pared periclinal	Microrelieve de la pared periclinal			Grosor de las estriás en las células subsidiarias del estoma	Estomas				
						Márgenes (ca)	Parte central (pc, cc)			Ao	D	Ai	T	
							E	V						Cn
<i>Brachystele camporum</i>	Ae	Pa	On	—	Co	Ef	+	—	—	Ef	+	?	?	?
<i>Cyclopogon luteoalbus</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Ef	+	+	—	Ef	—	+	+	+
<i>Pelexia ekmanii</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Ef	+	—	—	Eg	—	+	+	+
<i>Pelexia funckiana</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Ef	+	—	—	Eg	—	+	+	+
<i>Pelexia gutturosa</i>	Ae	Pa	Re	+	Co	Ef	+	—	—	Eg	—	?	+	+
<i>Pelexia sp.</i>	Ab	Pi	Re	+	Co	Eg	+	—	—	Eg	—	?	+	+
<i>Sarcoglottis assurgens</i>	Ae	Pi	Re	—	Pg	Ef	+	+	—	Ef	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis corymbosa</i>	Ab	Pi	Re	+	Pg	Eg	+	—	—	Eg	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis grandiflora</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Ef	—	—	—	Ef	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis lobata</i>	Ae	Pi	Re	+	Pg	Ef	+	+	—	Eg	—	?	+	+
<i>Sarcoglottis richardiana</i>	Ae	Pi	Re	—	Pg	Ef	+	+	—	Ef	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis rosulata</i>	Ab	Pi	Re	—	Pg	Ef	+	+	—	Eg	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Eg	+	+	—	Eg	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis schaffneri</i>	Ab	Pi	Re	+	Pg	Ef	+	+	—	Eg	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis scintillans</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Ef	+	—	—	Ef	—	+	+	+
<i>Sarcoglottis uliginosa</i>	Ab	Pi	Re	—	Co	Ef	—	—	—	Ef	—	+	+	+
<i>Sauroglossum elatum</i>	Ab	Pa	Re	—	Co	Ef	—	—	—	Ef	—	+	+	+
<i>Stenorrhynchos speciosum</i>	Ae	Pi	Re	—	Pg	Cn	—	—	+	Ef	—	+	+	+

**Cuadro 9.** Características anatómicas (corte transversal) de las hojas de las especies de Spiranthinae estudiadas en este trabajo. Abreviaturas: An, anfistomática; Cu, cuadrada; E, epidérmico; Hi, hipostomática; Ho, horizontal; Hm, homogéneo; Ht, heterogéneo; P, parenquimático; Rt, rectangular; V, V invertida, ?, información no disponible.

<b>Especie/ características</b>	<b>Forma celular epidérmica</b>	<b>Mesofilo</b>	<b>No. estratos del mesofilo</b>	<b>Disposición del xilema en los haces vasculares</b>	<b>Borde</b>	<b>Tipo de hoja de acuerdo con la localización de los estomas</b>
<i>Brachystele camporum</i>	Cu	Ht	5-6	V	P	An
<i>Cyclopogon luteoalbus</i>	Rt	Hm	4-5	Ho	P	Hi
<i>Pelexia ekmanii</i>	Rt	Ht	5-6	Ho	E	Hi
<i>Pelexia funkiana</i>	Cu	Hm	3-4	V	P	Hi
<i>Pelexia gutturosa</i>	Cu	Hm	5-6	V	P	An
<i>Pelexia sp.</i>	Cu	Hm	5-6	V	P	Hi
<i>Sarcoglottis assurgens</i>	Cu	Hm	4-5	V	P	Hi
<i>Sarcoglottis corymbosa</i>	Rt	Hm	?	?	P	Hi
<i>Sarcoglottis grandiflora</i>	Rt	Hm	4-5	V	P	Hi
<i>Sarcoglottis lobata</i>	Rt	Hm	?	?	P	Hi
<i>Sarcoglottis richardiana</i>	Rt	Hm	4-5	V	P	Hi
<i>Sarcoglottis rosulata</i>	Rt	Hm	7-8	V	P	Hi
<i>Sarcoglottis sceptrodes</i>	Rt	Hm	4-5	Ho	P	Hi
<i>Sarcoglottis schaffneri</i>	Cu	Hm	4-5	Ho	P	Hi
<i>Sarcoglottis scintillans</i>	Cu	Hm	5-6	V	P	Hi
<i>Sarcoglottis uliginosa</i>	Rt	Hm	4-5	V	E	Hi
<i>Sauroglossum elatum</i>	Rt	Hm	4-5	V	E	Hi
<i>Stenorrhynchos speciosum</i>	Cu	Hm	5-6	V	P	Hi

## 5.2 Análisis filogenéticos

### 5.2.1 Análisis de los datos estructurales

La matriz de los caracteres estructurales de la raíz y la hoja comprendió 16 caracteres, todos ellos variables y potencialmente informativos para la parsimonia (MP, Cuadro 10). El análisis de parsimonia encontró 23 árboles más parsimoniosos (AMPs) con una longitud de 46 pasos, índice de consistencia (IC) de 0.43 e índice de retención (IR) de 0.58. En la Figura 10 se presenta el árbol de consenso estricto que presentó clados similares a los del árbol del análisis de ML (lnL= -225.85).

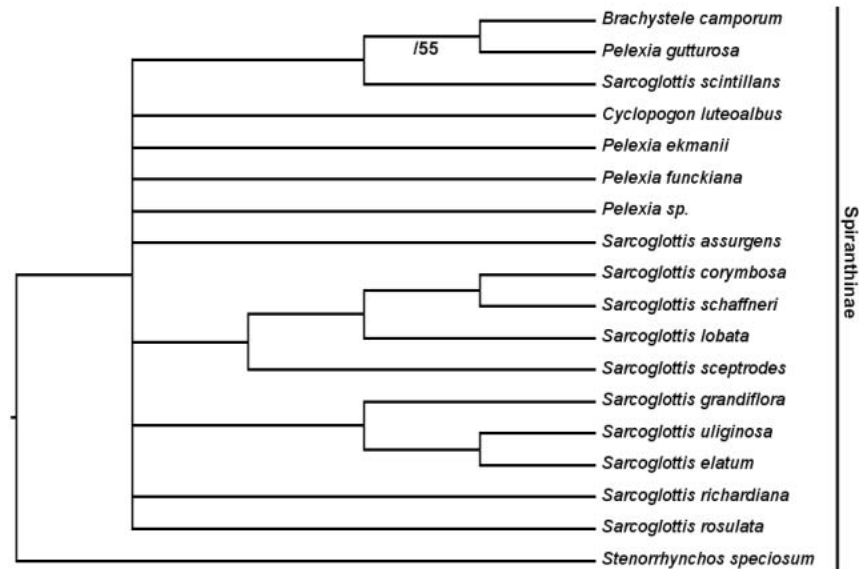
**Cuadro 10.** Características de las matrices de datos utilizadas en este trabajo.

	Fuente	Longitud de la matriz alineada	No. de caracteres constantes	No. caracteres autapomórficos	No. de caracteres parsimoniosamente informativos
<b>Datos estructurales</b>	Vegetativa (raíz, hoja)	16	0 (0%)	0 (0%)	16 (100%)
<b>ITS</b>	ADN (núcleo)	661	530 (80.18%)	79 (11.95%)	52 (7.87%)
<b>matK</b>	ADN (cloroplasto)	1,839	1,693 (92.06%)	95 (5.17%)	51 (2.77%)
<b>trnL-trnF</b>	ADN (cloroplasto)	1,298	1,188 (91.53%)	74 (5.70%)	36 (2.77%)
<b>Molecular</b>	ADN (núcleo y cloroplasto)	3798	3411 (89.81%)	248 (6.53%)	139 (3.66%)
<b>Combinada</b>	Vegetativa y ADN	3,814	3,409 (89.38%)	250 (6.55%)	155 (4.06%)

El análisis de los caracteres estructurales no proporciona evidencia de la monofilia de *Sarcoglottis* ni de *Pelexia*. El árbol de consenso estricto (Fig. 10) no presentó resolución en una buena parte y los clados tienen porcentajes bootstrap menores a 50. La topología muestra una politomía formada por siete especies (*Sarcoglottis rosulata*, *S. richardiana*, *S. assurgens*, *Pelexia* sp., *P. funckiana*, *Pelexia ekmanii* y *Cyclopogon luteoalbus*) y tres grupos principales. El primero de ellos está formado por *S. grandiflora* como hermana de *Sarcoglottis uliginosa*/*Sauroglossum elatum*. El segundo incluye a cuatro especies de



*Sarcoglottis* (*S. sceptrodes* y *S. lobata* como hermanas sucesivas de *S. schaffneri*/*S. corymbosa*). El tercero comprende a *Sarcoglottis scintillans* como hermano del par débilmente soportado de *Pelexia gutturosa*/*Brachystele camporum* (BP <50/55).



**Figura 10.** Árbol de consenso estricto de los 23 AMP (L= 23, IC= 0.43, IR= 0.58) con las relaciones filogenéticas de los representantes de Spiranthinae incluidos en este trabajo inferidas con el análisis de los datos estructurales. Los números bajo las ramas indican los porcentajes bootstrap >50% (MP/ML).

### 5.2.2 Análisis combinado de los datos estructurales y moleculares

La matriz alineada y combinada de las secuencias de los tres marcadores moleculares y los caracteres estructurales incluyó 3,814 caracteres, de los cuales 405 (10.61%) fueron variables y 155 (4.06%) fueron potencialmente informativos para la MP (Cuadro 10). El análisis de MP encontró tres AMPs con una longitud de 551 pasos, IC de 0.77 e IR de 0.74. Estos árboles difieren entre sí en la posición de *Sarcoglottis sceptrodes* y *Brachystele camporum*. Comparado con el análisis que incluyó solamente las tres regiones de ADN, se observó que estas especies también presentaron una posición variable entre los cuatro AMPs (L= 488, IC= 0.82 e IR= 0.80) encontrados en este último análisis; sin embargo, la monofilia de *Sarcoglottis* y las relaciones del resto de las especies incluidas son similares en ambos análisis y se discuten más adelante. En la

Figura 11 se presenta uno de los AMPs obtenido solamente de los datos moleculares con MP, cuya topología fue idéntica al obtenido para este mismo juego de datos con ML (lnL= -8332.27). En la Figura 12A se presenta el árbol de consenso estricto de los AMPs encontrados en el análisis combinado de los caracteres moleculares y estructurales, cuya topología fue idéntica al árbol de consenso estricto obtenido del análisis únicamente de los datos moleculares. En la Figura 12B se muestra uno de los AMP obtenido del análisis combinado de los caracteres moleculares y estructurales, topológicamente idéntico al árbol obtenido en el análisis en ML (lnL= -8740.71) para los mismos datos. En este trabajo el árbol de la Figura 12B se considera como el mejor estimado de las relaciones filogenéticas de las especies de *Spiranthinae* estudiadas, se describe a continuación y será utilizado para analizar la evolución de los caracteres estructurales.

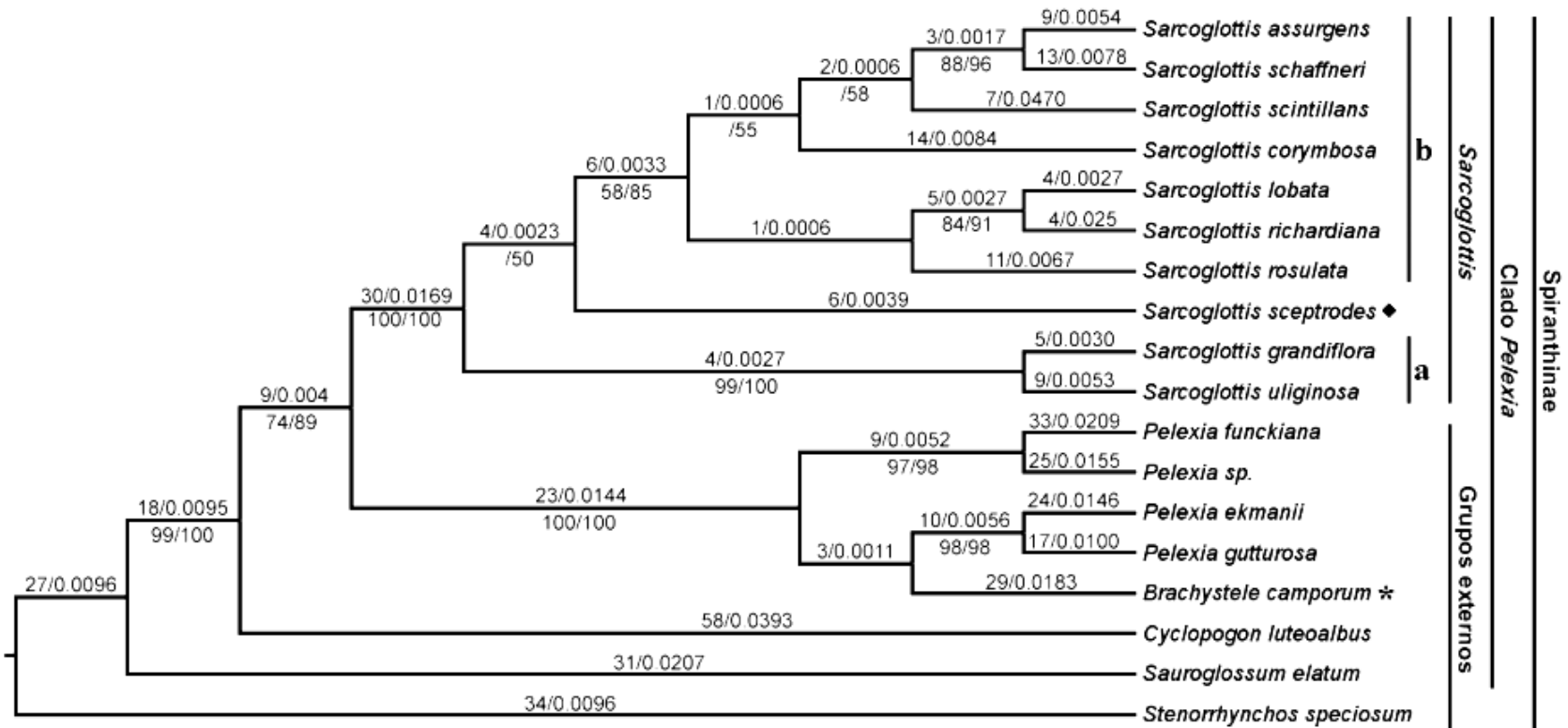
El análisis combinado de los datos moleculares y estructurales tanto con MP como con ML resolvió a *Sauroglossum elatum* como hermano del resto de los representantes del clado *Pelexia* con porcentaje bootstrap menor a 50 (Fig. 12B). Sin embargo, el grupo de *Cyclopogon luteoalbus* (*Pelexia-Brachystele/Sarcoglottis*) obtuvo un soporte fuerte (BP 100/100), recuperando la monofilia del clado *Pelexia sensu* Salazar (2003). El grupo *Pelexia-Brachystele* obtuvo un soporte de moderado a fuerte como hermano del clado formado por las especies de *Sarcoglottis* (BP 80/90).

El grupo *Pelexia-Brachystele* recibió un soporte fuerte (BP 100/100) e incluyó dos subgrupos fuertemente soportados: *Pelexia funkiana* como hermana de *Pelexia* sp. (BP 98/100) y *P. ekmanii* asociada con *P. gutturosa* (BP 97/99). Dentro de este grupo la posición de *Brachystele camporum* fue variable en los tres AMPs encontrados por MP, lo cual originó una tricotomía en el consenso estricto (Fig. 12A); en dos de los AMPs (uno de ellos mostrado en la Fig. 12B) se recuperó anidado en *Pelexia*, como hermano del grupo *Pelexia ekmanii/P. gutturosa* con porcentaje bootstrap menor a 50 y en conjunto siendo hermanas del grupo *Pelexia funkiana/Pelexia* sp., mientras que en el tercer árbol (no presentado) aparece como hermano del clado formado por las cuatro especies de *Pelexia* con porcentaje bootstrap menor a 50. El análisis de ML recuperó con un soporte débil a *Brachystele camporum* dentro de *Pelexia* (ML BP 51), como hermano del grupo *Pelexia ekmanii/P. gutturosa*, es decir, *Pelexia* es parafilético.

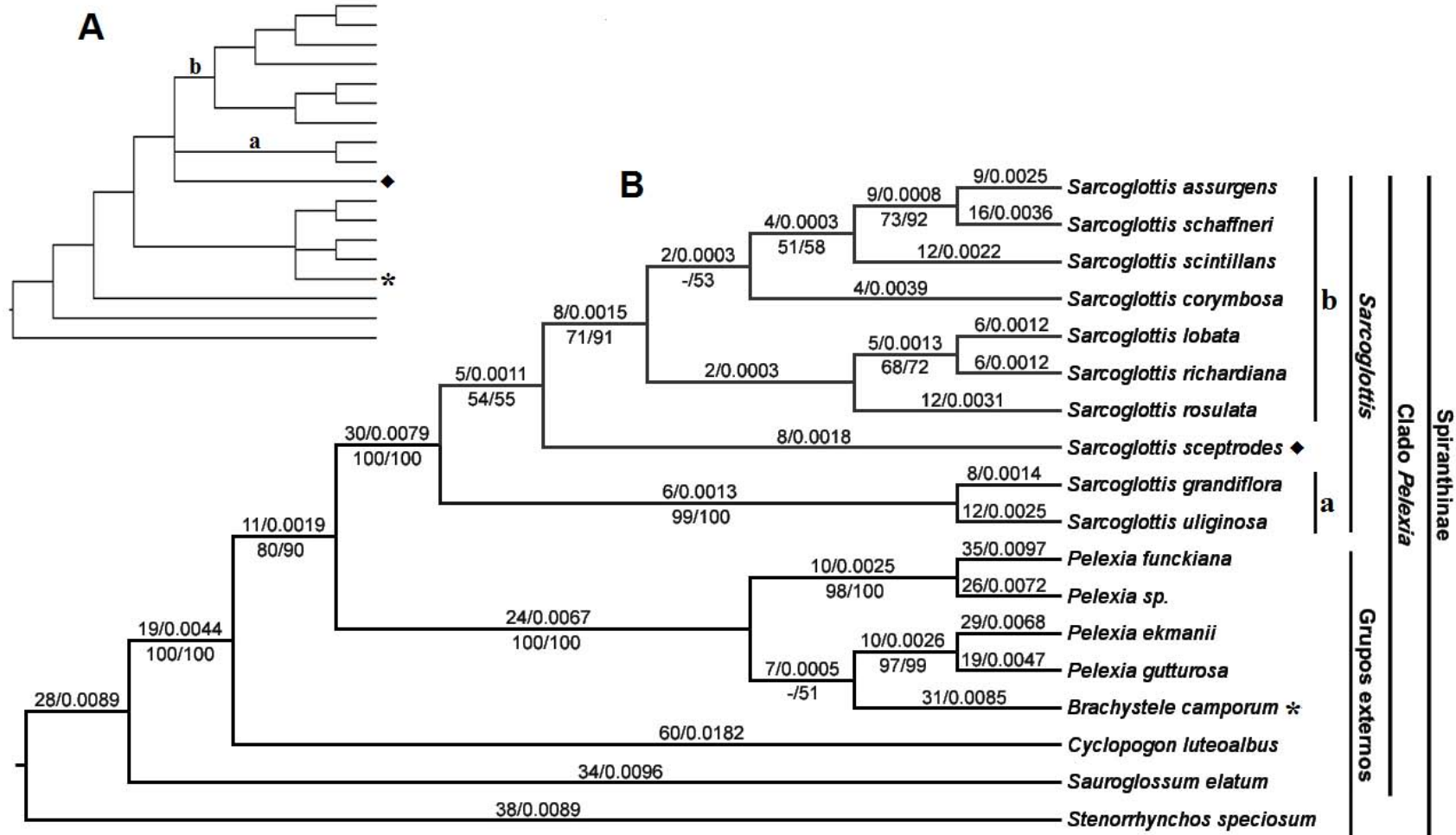
*Sarcoglottis sensu* Salazar (2003) se recuperó como monofilético con fuerte apoyo bootstrap (BP 100/100) e incluye dos clados principales, marcados como “Clado a” y “Clado b”, respectivamente (Fig. 12B). El “Clado a” está fuertemente soportado (BP 99/100) e incluye a *S. grandiflora* como hermana de *S. uliginosa*. El “Clado b” tiene un soporte de moderado a alto (BP 71/91) y se divide a su vez en dos subclados. El primer subclado está apoyado por valores menores a 50 y recupera a *S. rosulata* como hermana de *S. lobata/S. richardiana*, éstas últimas con un soporte débil a moderado (BP 68/72). El segundo subclado recupera con un soporte débil (BP <50/53) a *S. corymbosa* como hermana del clado también débilmente soportado (BP 51/58) en el cual *S. scintillans* es hermana de *S. schaffneri/S. assurgens*, esta última asociación con un soporte moderado a fuerte (BP 73/92). Con soporte débil, *S. sceptrodes* muestra una posición variable en las tres topologías obtenidas en el análisis de MP que origina una tricotomía en el consenso estricto (Fig. 12A); en uno de los AMPs (no presentado; MP BP <50) se asocia con el “Clado a”, mientras que en los otros dos (uno de ellos presentado en la Fig. 12B; MP BP 54) se recupera como hermano del “Clado b”, mostrando la misma posición que en el árbol obtenido con ML, no obstante, también está débilmente soportada (Fig. 12B; ML BP 55).

### 5.3 Optimización de los caracteres estructurales

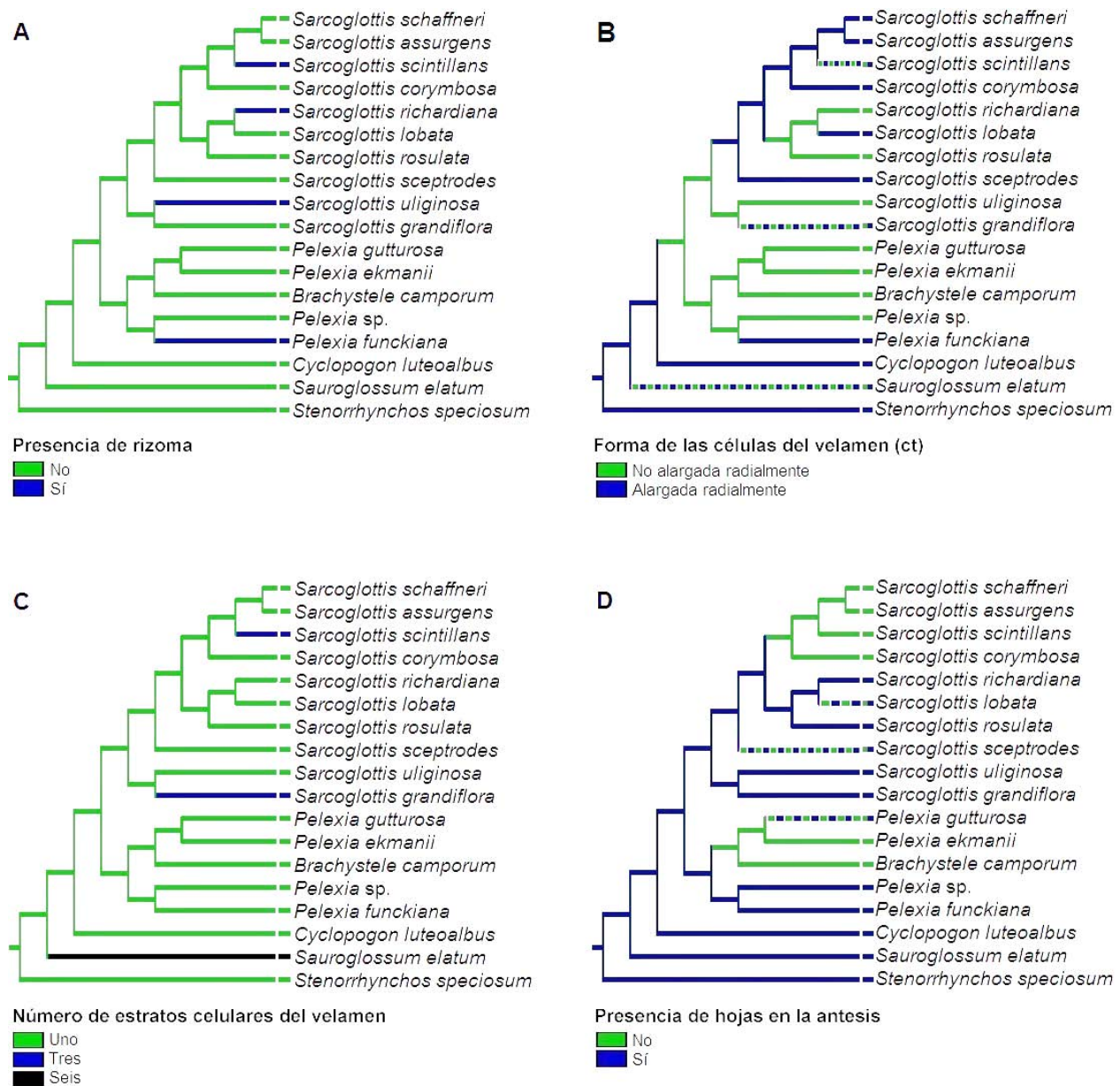
La reconstrucción de la evolución de los 16 caracteres estructurales de las especies analizadas de *Sarcoglottis* y otros miembros adicionales se presentan en las Figuras 13 a 16, sobre uno de los árboles más parsimoniosos resultantes del análisis combinado, topológicamente idéntico al obtenido con ML. En el apartado 6.2 se discute el posible patrón evolutivo para cada uno de estos caracteres. En la Figura 17 se muestra la distribución de los cambios de los estados de carácterestructurales.



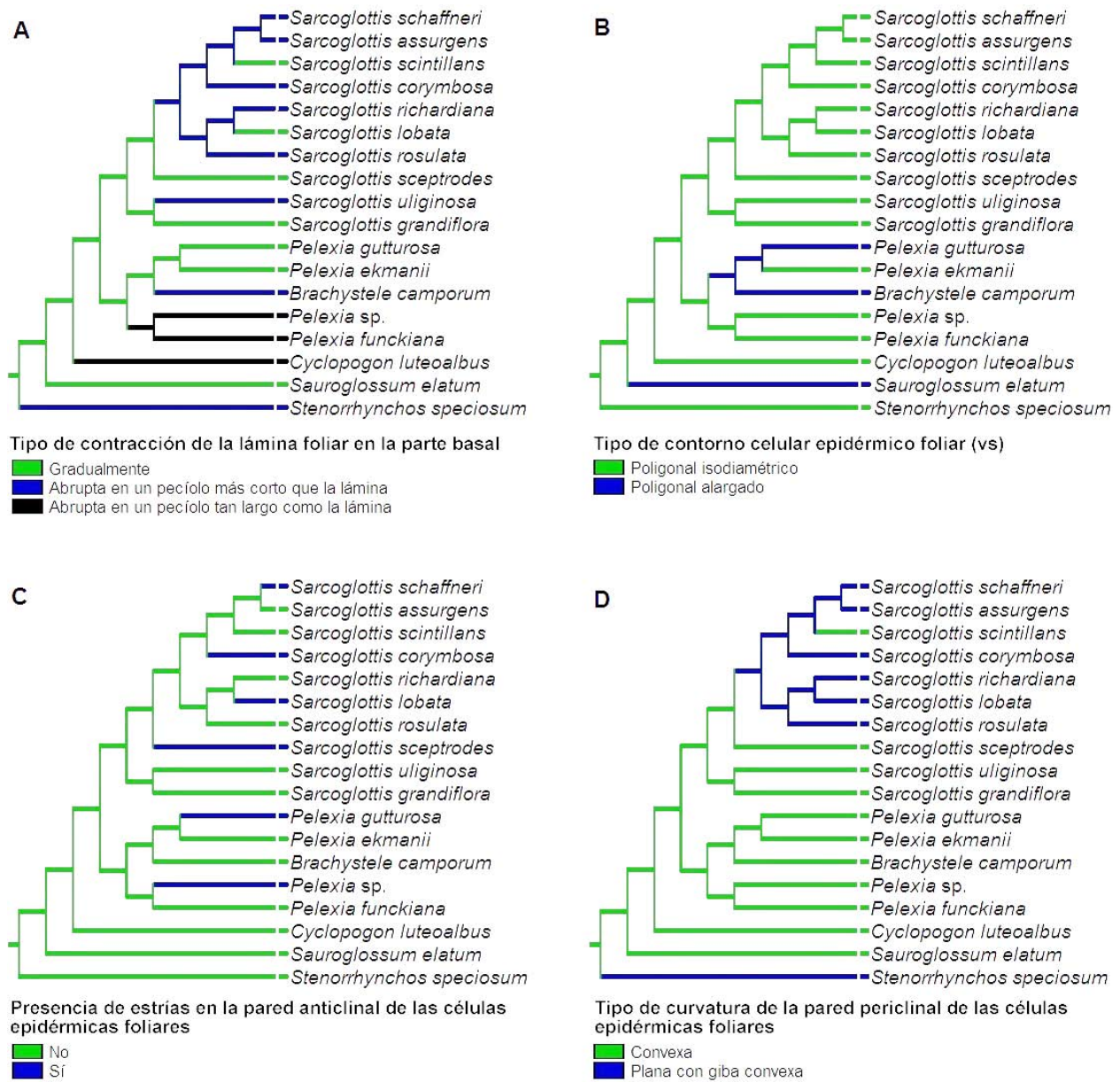
**Figura 11.** Relaciones filogenéticas en *Sarcoglottis* y otros representantes de Spiranthinae inferidas por parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS). Uno de los AMPs encontrado por MP ( $L= 488$ ,  $IC= 0.82$ ,  $IR= 0.80$ ), topológicamente idéntico al árbol de ML ( $\ln L= -8332.27$ ). Los números sobre las ramas indican la longitud de las ramas, los números debajo de las ramas indican los porcentajes bootstrap >50% (en ambos casos: MP/ML). Las barras indican clados mencionados en el texto. Se indica la posición de *Sarcoglottis sceptrodes* (♦) y *Brachystele camporum* (\*).



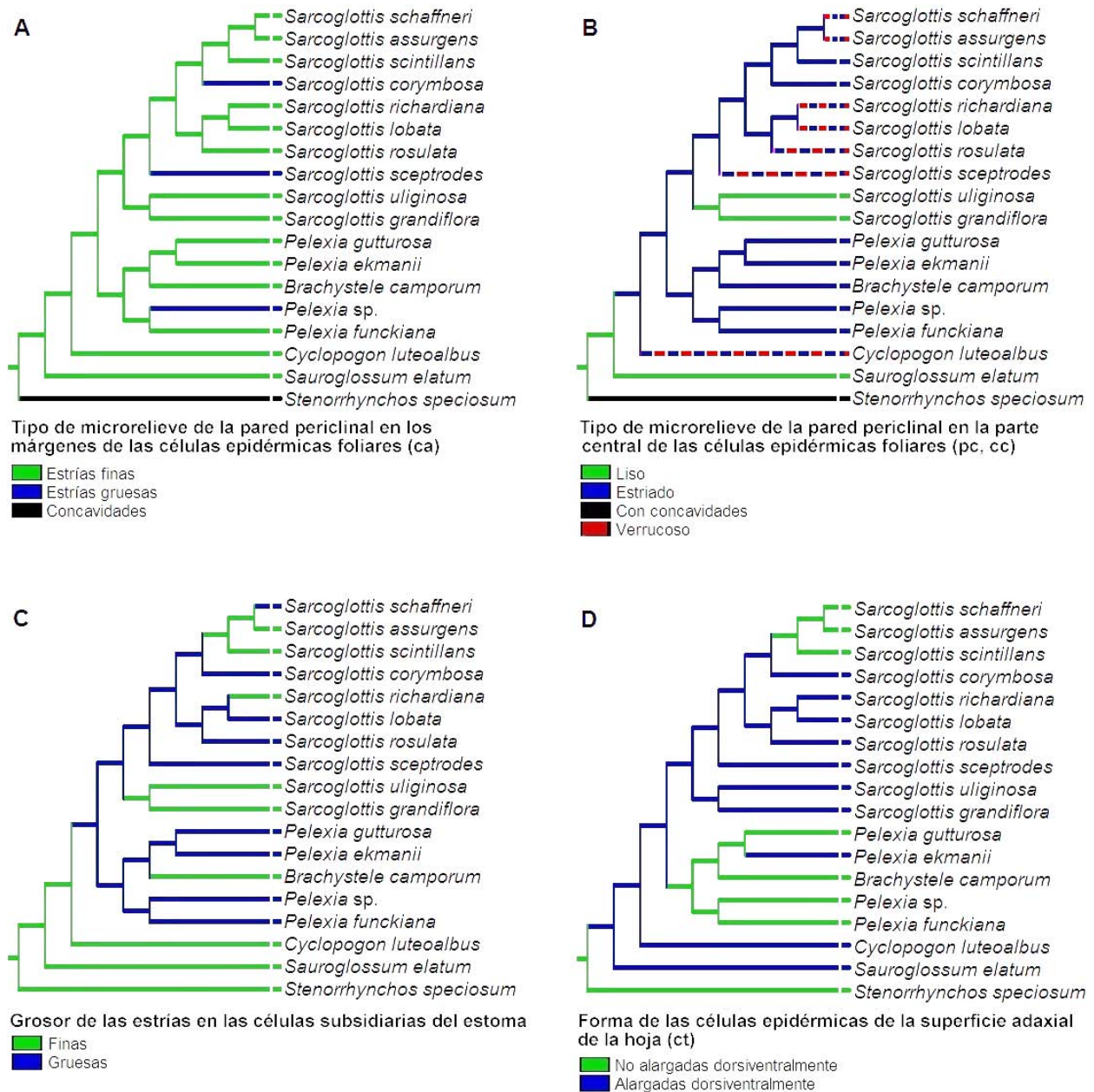
**Figura 12.** Relaciones filogenéticas en *Sarcoglottis* y otros representantes de Spiranthinae inferidas por parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS) y los datos estructurales. **A**, topología del árbol de consenso estricto de los tres AMPs (L= 551, IC= 0.77, IR= 0.74). Se indica la posición de *Sarcoglottis sceptrodes* (♦) y *Brachystele camporum* (\*). **B**, uno de los AMPs encontrado por MP (L= 551, IC= 0.77, IR= 0.74), topológicamente idéntico al árbol de ML (lnL= -8740.71). Los números sobre las ramas indican la longitud de las ramas, los números debajo de las ramas indican los porcentajes bootstrap >50% (en ambos casos: MP/ML). Las barras indican clados mencionados en el texto.



**Figura 13.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en uno de los AMP obtenido del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS) y los datos estructurales presentado en la Figura 12B. **A**, presencia de rizoma. **B**, forma de las células del velamen (corte transversal). **C**, número de estratos celulares del velamen. **D**, presencia de hojas en la antesis.

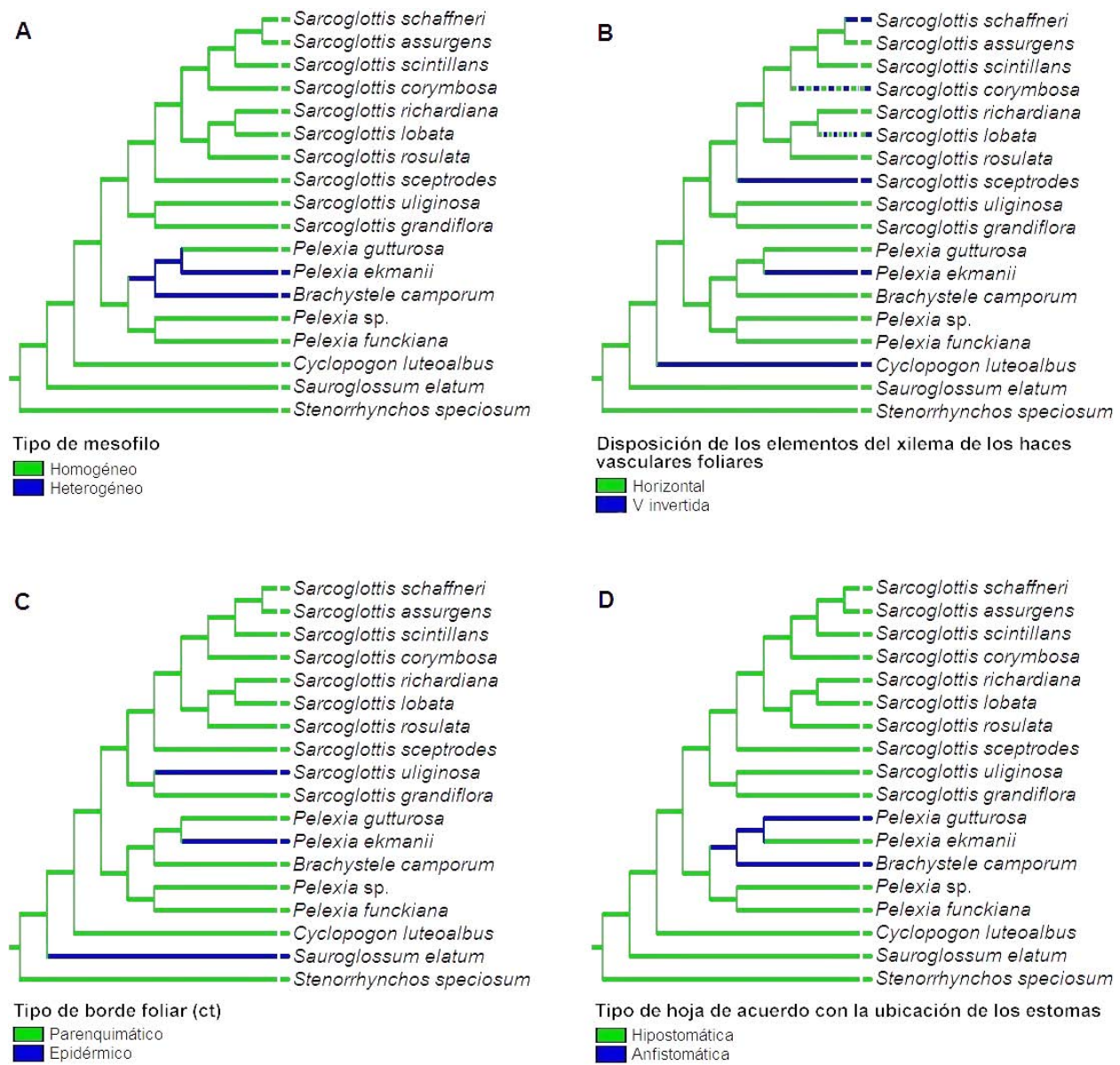


**Figura 14.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en uno de los AMP obtenido del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS) y los datos estructurales presentado en la Figura 12B. **A**, tipo de contracción de la lámina foliar en la parte basal. **B**, tipo de contorno celular epidérmico foliar (vista de la superficie). **C**, presencia de estrías en la pared anticlinal de las células epidérmicas foliares. **D**, tipo de curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas foliares.

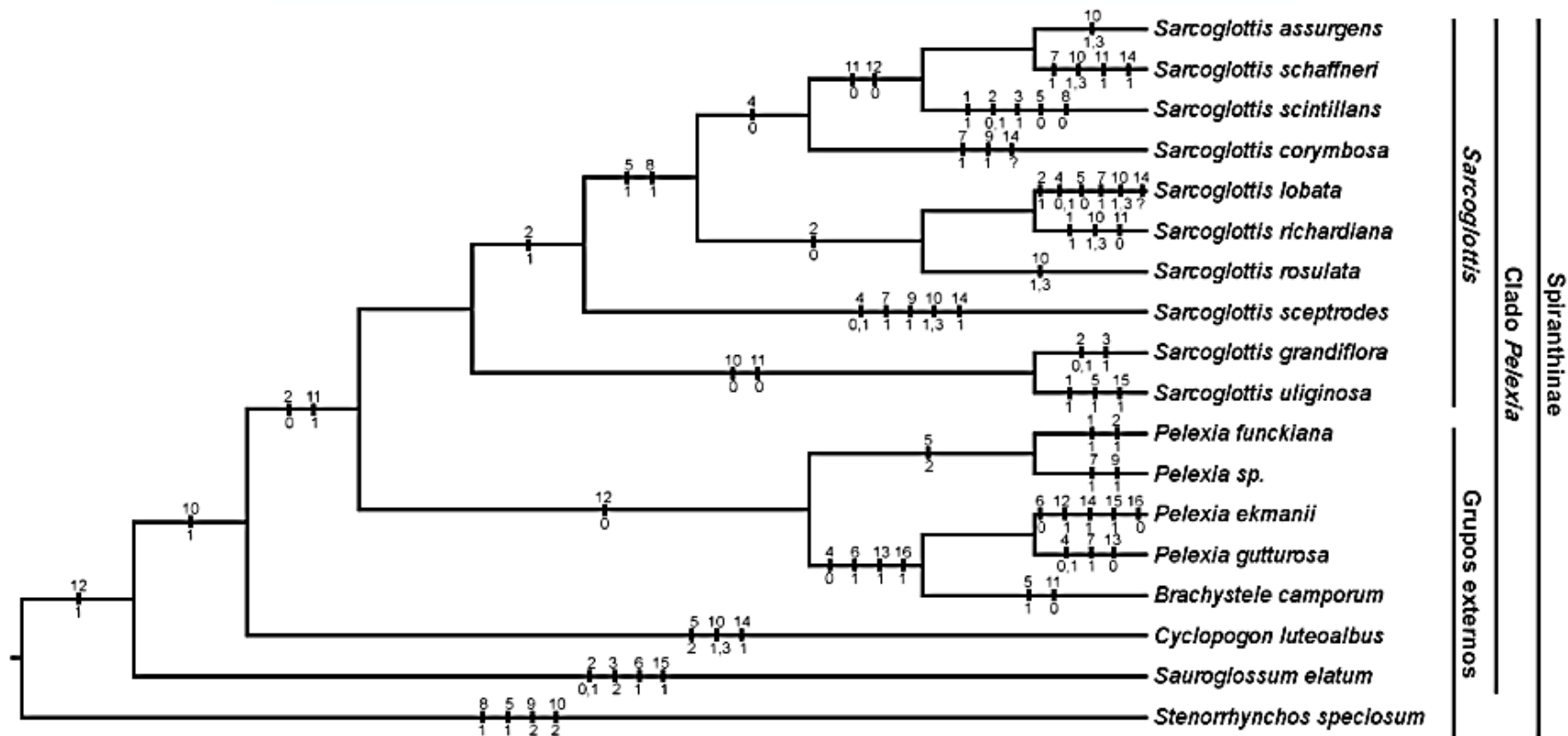


**Figura 15.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en uno de los AMP obtenido del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS) y los datos estructurales presentado en la Figura 12B. **A**, tipo de microrelieve de la pared periclinal en los márgenes de las células epidérmicas foliares (campo de las anticlinales). **B**, tipo de microrelieve de la pared periclinal en la parte central de las células epidérmicas foliares (pared central y campo central). **C**, grosor de las estrias en las células subsidiarias del estoma. **D**, forma de las células epidérmicas de la superficie adaxial de la hoja (corte transversal).





**Figura 16.** Optimización ACCTRAN de los caracteres estructurales en uno de los AMP obtenido del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS) y los datos estructurales presentado en la Figura 12B. **A**, tipo de mesofilo. **B**, disposición de los elementos del xilema de los haces vasculares foliares. **C**, tipo de borde foliar (corte transversal). **D**, tipo de hoja de acuerdo con la ubicación de los estomas.



**Figura 17.** Distribución de los cambios de los estados de carácterestructurales en la versión simplificada del árbol de la Figura 12B, generado del análisis combinado de las secuencias de ADN (*matK* + *trnL-trnF* + ITS) y los datos estructurales de los representantes de Spiranthinae incluidos en este trabajo. Los números sobre las ramas indican el carácter, los números bajo las ramas indican el estado de carácter.

## VI. DISCUSIÓN

### 6.1 Importancia de los caracteres estructurales en la reconstrucción filogenética

Al comparar la hipótesis filogenética obtenida con evidencia molecular con la que resulta del análisis solo de la información estructural se observó que esta última no resuelve concluyentemente las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas (Fig. 10), pues obtuvo poca resolución y apoyo para los clados, así como los índices de consistencia y retención más bajos en comparación con los análisis combinados (Figs. 11, 12). Esto apunta a altos niveles de homoplasia y una baja proporción de sinapomorfias en los caracteres estructurales. Sin embargo, al combinar los dos tipos de evidencia no se colapsa el árbol, lo cual quiere decir que la posible homoplasia de los caracteres estructurales permite soportar la topología encontrada. Además al combinar los datos moleculares con los estructurales se incrementa ligeramente el soporte de los clados y algunos de ellos quedan además soportados por sinapomorfias estructurales a cierto nivel (Fig. 17), como se ha encontrado en otros trabajos filogenéticos donde se han analizado caracteres vegetativos (Figueroa *et al.*, 2008; Sandoval-Zapotitla *et al.*, 2010; Bernal, 2013).

Las relaciones filogenéticas obtenidas en los árboles encontrados por parsimonia y máxima verosimilitud del análisis combinado de las tres regiones de ADN y los datos estructurales fueron similares entre sí. Los resultados de máxima verosimilitud presentaron valores de soporte más altos comparados con los de parsimonia. Las diferencias en las topologías se limitó a la posición de *Sarcoglottis sceptrodes* y *Brachystele camporum*; sin embargo, ninguno de los grupos discrepantes estuvieron fuertemente soportados (Figs. 11, 12). Por lo anterior, las diferencias entre las topologías, la falta de resolución y los bajos valores de soporte en algunos clados probablemente se deben a la escasez de información en los conjuntos de datos analizados más que a un conflicto entre ellos (Cuadro 10; Wiens, 1998).

Los resultados del análisis combinado apoyaron fuertemente la monofilia del clado *Pelexia sensu* Salazar (BP 100; Salazar, 2003; Salazar *et al.*, 2003). También con un

soporte fuerte (BP 100), se confirmó la monofilia de *Sarcoglottis sensu* Salazar (2003), es decir, no se ve la necesidad de reconocer a *Zhukowskia* (Szlachetko, González Tamayo y Rutkowski, 2000) ni a *Potosia* (Mitnik, 2003) como géneros distintos, sino como sinónimos de *Sarcoglottis*, debido a que quedan anidados. *Sarcoglottis* mostró dos clados principales, referidos como “Clado a” y “Clado b”, los cuales muestran una correspondencia geográfica. El “Clado a” incluyó a las dos especies con distribución en Sudamérica, *Sarcoglottis grandiflora* y *S. uliginosa*. La primera distribuida ampliamente en bosques húmedos (florestas), desde el norte de Sudamérica en Guyana y Surinam, hasta Brasil, Paraguay y el norte de Argentina, pasando por Colombia y Ecuador. La segunda se distribuye en pastizales inundados naturalmente en el sur de Brasil, Paraguay y el norte de Argentina. El “Clado b” está formado por especies que están distribuidas en México y Centroamérica. La parte basal de la lámina contraída en un pecíolo corto (Fig. 14A) y la presencia de pared periclinal recta con giba convexa (Fig. 14D) constituyen sinapomorfias para este clado, con cambios a lámina contraída gradualmente en *S. scintillans* y *S. lobata*, así como pared periclinal convexa en *S. scintillans*. Este clado incluyó dos subclados que se corresponden con el tipo de hábitat; uno que incluyó especies de bosques subhúmedos a húmedos (*S. rosulata*, *S. richardiana* y *S. lobata*), tales como el bosque de pino-encino, el bosque tropical perennifolio y el bosque mesófilo de montaña; y el otro para el cual la ausencia de hojas en la antesis (Fig. 13D) fue sinapomórfico e incluyó especies de bosques estacionalmente secos (*S. corymbosa*, *S. scintillans*, *S. schaffneri* y *S. assurgens*), comúnmente de bosque tropical caducifolio, pastizal y matorral xerófilo. La relación de *S. sceptrodes* con los clados anteriores no es clara y ha sido observado en análisis previos en los que se agrupa con *Sarcoglottis acaulis* (G. A. Salazar, com. pers.), una especie sudamericana con la que *S. sceptrodes* ha sido confundida.

Dentro de *Pelexia*, la parte basal de la hoja contraída en un pecíolo tan largo como la lámina (Fig. 14A) aparece como sinapomórfico para el grupo de *Pelexia funckiana* con *Pelexia* sp. Burns-Balogh y Robinson (1983) así como Christenson y Toscano (2000) consideraron que *Pelexia* está más relacionada con *Sarcoglottis*; sin embargo, en este trabajo, se encontró con un fuerte apoyo (BP 100), que *Pelexia* está más cercanamente relacionada con *Brachystele camporum* que con *Sarcoglottis* o *Cyclopogon*, concordando con lo propuesto por Salazar (2003; Salazar *et al.*, 2003; Borba *et al.*, 2014) de que *Pelexia* está relacionada con miembros de la “alianza *Brachystele*” (Balogh, 1982), tales como

*Brachystele camporum* y *Odontorrhynchus variabilis* Garay. Los estados de carácter estructurales ausencia de hojas en la antesis (Fig. 13D), contorno poligonal alargado en las células epidérmicas foliares (vista de la superficie; Fig. 14B), mesofilo en empalizada corta (Fig. 16A) y hojas anfistomáticas (Fig. 16D) fueron sinapomorfias que en este nivel apoyaron la posición de *Brachystele camporum* como hermano de las especies de *Pelexia* sección *Pachygenium* (Szlachetko *et al.*, 2001), si se consideran cambios posteriores en los tres últimos caracteres a contorno poligonal isodiamétrico, mesofilo homogéneo y hojas hipostomáticas para *Pelexia ekmanii*. Los resultados de este trabajo sugieren que *Pelexia* es parafilética, al incluir a *B. camporum*, no obstante se requiere incluir en los análisis un mayor número de especies y evidencias para decidir su circunscripción. En el trabajo reciente de Borba *et al.* (2014) *Sauroglossum elatum* aparece fuertemente soportado como miembro del clado *Pelexia*; sin embargo, en el presente trabajo, esta relación obtuvo un soporte bajo.

## **6.2 Evolución de caracteres estructurales y su importancia como marcadores taxonómicos**

En términos generales, las especies analizadas presentan una morfología y anatomía radical y foliar similar entre ellas. Resultados similares se han reportado para los órganos vegetativos de otros representantes terrestres de Spiranthinae (Stern *et al.*, 1993b; Figueroa *et al.*, 2008; Andreota, 2013; Bernal, 2013). Para todas las especies analizadas, con excepción de *Sarcoglottis uliginosa*, las raíces son fusiformes. En el caso de esta última especie, las raíces son muy delgadas y con menos pelos radicales en comparación con el resto de las especies del género analizadas, pudiendo estar relacionado con el hábitat en el que crece la especie. *Sarcoglottis uliginosa* crece en suelos anegados, que potencialmente le proporcionarían la disponibilidad de agua y nutrientes de manera permanente, en comparación con las especies de suelos bien drenados. Particularmente para las orquídeas terrestres se ha sugerido que la presencia de raíces engrosadas constituye una ventaja adaptativa, al servir de almacenamiento de agua y nutrientes que mantendrán a la planta durante la época desfavorable y le permitirán generar el nuevo brote (Salazar, 2003; Hágsater *et al.*, 2005), sobre todo para aquellas especies que crecen en ambientes con un período de sequía muy marcado, como ocurre con *S. schaffneri*, *S. assurgens*, *S. scintillans* y *S. corymbosa*. La presencia de rizoma

permitiría a las plantas de *S. uliginosa* explorar el sustrato y generar brotes a intervalos para asegurar el mantenimiento de la planta en caso de que cambien las condiciones de humedad, como sucede con otras especies de ambientes similares (Philbrick y Les, 1996). La optimización más parsimoniosa de la presencia de rizoma sugiere que su ausencia constituye la condición ancestral (simplesiomorfia) a partir de la cual se originó esta estructura (Fig. 13A). Dicha condición derivada o novedad evolutiva constituye una homoplasia que evolucionó de manera independiente en *Pelexia funckiana*, *Sarcoglottis uliginosa*, *S. richardiana* y *S. scintillans*.

En todas las especies estudiadas se observaron pelos radicales uniseriados no ramificados, siendo congruente con el estudio de Stern *et al.* (1993b) en el que encontraron este mismo tipo para la mayoría de las especies de Cranichideae estudiadas por ellos, excepto en *Sarcoglottis acaulis* en la que también pueden ser biseriados y en *Cyclopogon argyriifolius* (Barb.Rodr.) Barb.Rodr. que puede presentar pelos trifurcados. De manera similar a lo encontrado en este trabajo Figueroa *et al.* (2008) reportaron pelos radicales uniseriados para todas las especies de Cranichideae analizadas por ellos, incluyendo a *Sarcoglottis schaffneri*, mientras que Bernal (2013) reportó la ausencia de pelos radicales en *Veyretia sincorensis* (Schltr.) Szlach. En el presente trabajo se observó que los pelos radicales presentaron tanto pared continua como con dehiscencia en espiral. Esta última característica ha sido escasamente estudiada en las orquídeas. Uno de los trabajos que aborda el tema es el de Kumar y Krishnamurthy (1998) quienes estudiaron la asociación micorrízica de la orquídea terrestre *Spathoglottis plicata* Blume con el hongo *Rhizoctonia repens* Bernard, encontrando que dicho hongo entra en la raíz a través de los pelos radicales, se reproduce y al salir de ellos como clamidosporas les provoca una dehiscencia en espiral. Otro trabajo es el de Bernal (2013) quien también observó pelos con dehiscencia en espiral en la mayoría de las especies de Spiranthinae analizadas por ella de los clados *Pelexia* y *Stenorhynchos*, entre ellas dos especies de *Sarcoglottis* (*S. acaulis* y *S. ventricosa* (Vell.) Hoehne). En un trabajo reciente Bernal *et al.* (2015) sugirieron que la dehiscencia en espiral de los pelos radicales probablemente está relacionada con su fase final de diferenciación más que con las condiciones ambientales. Ante este panorama es necesario un estudio minucioso de la ontogenia y fisiología de los pelos radicales para determinar las causas que dan lugar a la dehiscencia en espiral y sus implicaciones. De cualquier manera, dado que la

función principal de los pelos radicales es incrementar la superficie de absorción de las raíces y optimizar la exploración del sustrato para la obtención de agua y nutrientes (Peterson y Farquhar, 1996), la presencia de pelos radicales con pared rota sugiere que éstos dejan de ser funcionales para estos fines.

La forma de las células del velamen puede ser alargada radialmente o no, la optimización de este carácter sugiere que la forma no alargada es el estado derivado y se originó a partir de la condición ancestral alargada (Fig. 13B). La condición derivada está presente en la mayoría de las especies del clado *Pelexia* (excepto *Cyclopogon luteoalbus*), con reversiones posteriores en *Pelexia funckiana*, *Sarcoglottis sceptrodes*, *S. lobata*, *S. corymbosa*, *S. assurgens* y *S. schaffneri*. Dado que en *Sauroglossum elatum*, *S. grandiflora* y *S. scintillans* presentan un velamen con más de un estrato en el velamen los dos estados están presentes en estas especies, debido a que las células del estrato más interno son alargadas, mientras que las de los más externos no lo son.

La mayoría de las especies presentaron un velamen uniestratificado, el cual ha sido el más común entre los miembros de Spiranthinae incluidas en los trabajos de Porembski y Barthlott (1988), Stern *et al.* (1993b), Figueroa *et al.* (2008) y Bernal (2013). Sin embargo, en este trabajo se observó también que *S. scintillans* y *S. grandiflora* presentaron velamen triestratificado, lo cual constituye el primer registro de un velamen pluriestratificado en el género *Sarcoglottis*. Se corroboró la presencia de seis estratos en el velamen de *Sauroglossum elatum* como había sido encontrado por Porembski y Barthlott (1988) y Bernal (2013). En este trabajo se observaron engrosamientos helicoidales y poros en las paredes de las células del velamen. Porembski y Barthlott (1988) indicaron que tanto los engrosamientos como los poros son característicos del velamen de tipo *Spiranthes*. Además, Figueroa *et al.* (2008) indicaron que los engrosamientos en las paredes celulares del velamen constituyen una sinapomorfia para el clado que incluye a Prescottinae y Spiranthinae. La optimización del número de estratos celulares del velamen sugiere que la posesión tanto de tres como de seis estratos en el velamen se derivó de la condición ancestral de un solo estrato (Fig. 13C). El velamen triestratificado aparece dos veces, en *Sarcoglottis grandiflora* y *S.*

*scintillans*, indicando homoplasia. El velamen formado por seis estratos constituye una condición derivada única (autapomorfia) para *Sauroglossum elatum*.

Pridgeon *et al.* (1983) y Pridgeon (1987) reportaron la ausencia de tilosomas (excrecencias lignificadas de la pared de las células del estrato más interno del velamen que está adyacente a las células de paso de la exodermis) en *Sarcoglottis acaulis* (= *Spiranthes acaulis*) y *Spiranthes odorata* (Nutt.) Lindl. (= *Spiranthes cernua* (L.) var. *odorata* (Nutt.) Correll). Sin embargo, en el presente trabajo se observaron tilosomas de tipo lamelado en todas las especies analizadas, corroborando los resultados de Figueroa *et al.* (2008), quienes proponen este carácter como una sinapomorfia para la subtribu Spiranthinae. Bernal (2013) reportó tilosomas baculados en *Sauroglossum nitidum* (Vell.) Schltr., mientras que el presente estudio mostró que en *S. elatum* los tilosomas son lamelados. Los tilosomas baculados, como los define Pridgeon *et al.* (1983) son masas irregulares de barras libres orientadas perpendicularmente a la pared tangencial de la célula de paso, mientras que los tilosomas lamelados son láminas que consisten de crestas y surcos paralelos. Figueroa *et al.* (2008) en su estudio con 26 especies analizadas de Cranichideae describieron a los tilosomas baculados (*sensu* Pridgeon *et al.*, 1983) como una autapomorfia de *Prescottia stachyodes* (Sw.) Lindl. Al observar la figura de Bernal (2013: fig. 2D) es evidente que hay un error de interpretación, probablemente debido al corte en un ángulo subóptimo, porque en la figura se ve claramente que carece de masas de barras libres y en cambio tiene crestas y surcos paralelos. La presencia de tilosomas se ha asociado con la absorción de agua y nutrientes, la reducción de la pérdida de agua por transpiración y la protección mecánica a las células exodermicas (Pridgeon *et al.*, 1983; Dugarte y Luque, 2012).

Todas las especies estudiadas poseen una exodermis uniestratificada con características similares a las reportadas por otros autores para orquídeas terrestres de la tribu Cranichideae (Stern *et al.*, 1993b; Figueroa *et al.*, 2008; Dugarte y Luque, 2012; Andreota, 2013; Bernal, 2013), tales como los engrosamientos escalariformes en las paredes del tipo de células más abundantes, los cuales se han relacionado con la prevención del colapso de las células exodérmicas, así como para reducir la pérdida de agua por evaporación (Pridgeon, 1987; Figueroa *et al.*, 2008).



En todas las especies analizadas el córtex es parenquimático y está formado por células de paredes delgadas que principalmente contienen en su interior gran cantidad de spiranthosomas, un tipo especializado de amiloplastos descritos por Stern *et al.* (1993a). Salazar *et al.* (2003) sugieren que los spiranthosomas podrían representar un sinapomorfia para la tribu Cranichideae. En el córtex también es común la presencia de idioblastos que contienen en su interior cristales de oxalato de calcio de tipo rafidio, es decir, cristales con forma de aguja dispuestos en paquetes (Font Quer, 1982). Estas estructuras probablemente estén relacionadas con el metabolismo del calcio en la planta, la protección contra herbívoros, resistencia mecánica y desintoxicación de metales pesados (Nakata, 2003). La presencia de spiranthosomas y rafidios parece ser muy común en los representantes de Cranichideae, lo cual se ha venido corroborando en los trabajos recientes (Figuroa *et al.*, 2008; Dugarte y Luque, 2012; Andreota, 2013; Bernal, 2013). Figuroa *et al.* (2008) reportaron espacios supraendodérmicos cortos, es decir, los espacios intercelulares del tamaño de una célula de parénquima cortical circundante presentes en el exterior de la endodermis, para la mayoría de Spiranthinae, excepto *Cyclopogon*, *Pelexia* y *Sarcoglottis*; así como espacios supraendodérmicos largos (longitud comparable a tres o cuatro células corticales adyacentes), que fueron autapomórficos para *Sacoila lanceolata*. En el presente trabajo se observaron espacios supraendodérmicos solo en *Pelexia guttuosa*, los cuales fueron cortos, es decir, del tamaño de una célula adyacente del córtex. Bernal (2013) encontró espacios supraendodérmicos largos en *Veyretia sincorensis* (Schltr.) Szlach., con un tamaño aproximado de dos células del córtex. Figuroa *et al.* (2008) sugirieron la posibilidad de que estos espacios representen canales secretores de mucílago, al ser más comunes en las especies de hábitats estacionalmente secos estudiadas por ellos. Esto último es congruente con la presencia de espacios supraendodérmicos en *Pelexia guttuosa*, la cual habita en selvas subdeciduas y pastizales.

La endodermis es uniestratificada con banda de Caspary desarrollada. Dugarte y Luque (2012) observaron una banda muy desarrollada en la endodermis de las especies de Cranichideae que crecen en páramos y consideran que las condiciones de cambios de temperatura diaria y exposiciones a sequías estacionales podrían estar influenciando su desarrollo.

De manera similar a lo reportado por Andreota (2013) el tejido vascular es poliarco y varía en número entre especies. Luque (2004) sugiere que un mayor número de polos hace más rápida y eficiente la llegada de agua y los nutrientes para su rápida conducción.

En cuanto a las hojas, las principales variaciones morfológicas entre las especies están asociadas con la forma, el tamaño, la succulencia, la disposición sobre el sustrato, la forma de la parte basal de la lámina y la presencia o no de hojas al momento de la floración. Sin embargo, estas características son relativamente constantes entre los individuos de cada especie. Por su parte, los patrones de coloración en las hojas, llegan a ser variables incluso entre los individuos de la misma población, como ocurre con *Sarcoglottis lobata*, *S. schaffneri*, *S. sceptrodes* y *S. richardiana*, quienes pueden presentar un color uniforme, o bien, ser variegadas o presentan manchas.

Independientemente del hábitat en el que se encuentren, todas las especies incluidas en este trabajo pierden las hojas anualmente, generalmente durante la temporada más seca del año. Algunas de ellas presentan las hojas durante la floración (*Cyclopogon luteoalbus*, *Pelexia funckiana*, *Pelexia* sp., *Sarcoglottis grandiflora*, *S. richardiana*, *S. rosulata*, *S. sceptrodes*, *S. uliginosa*, *Sauroglossum elatum* y *Stenorrhynchos speciosum*), mientras que otras portan solamente la inflorescencia y ocasionalmente el brote de la siguiente estación de crecimiento. Se infiere que la presencia de hojas al momento de la floración es el estado ancestral a partir de la cual se deriva la ausencia de ellas (Fig. 13D). La condición derivada a nivel general es homoplásica ya que aparece dos veces en el árbol, sin embargo, para cada uno de los clados en los que aparece es sinapomórfico. El primer clado está formado por cuatro especies de *Sarcoglottis* (*S. corymbosa*, *S. scintillans*, *S. assurgens* y *S. schaffneri*). El segundo clado incluye a *Brachystele camporum* y *Pelexia gutturosa* con *P. ekmanii*. *Pelexia gutturosa*, *Sarcoglottis sceptrodes* y *S. corymbosa* ocasionalmente presentan los dos estados de carácter.

Se observaron tres tipos de contracción de la parte basal de la lámina foliar: gradual, abrupta formando un pecíolo corto y abrupta en un pecíolo tan largo como la lámina. La optimización de este carácter sugiere que la contracción gradual es la condición ancestral (Fig. 14A); de esta condición se derivan dos estados homoplásicos a

nivel general, primero, la lámina contraída abruptamente en un peciolo corto que aparece de manera independiente en *Stenorrhynchos speciosum*, *Brachystele camporum*, *Sarcoglottis uliginosa* y la mayoría de las especies del “Clado b”, representando, en un nivel más interno, una sinapomorfia para dicho clado si se considera una reversión posterior en *S. lobata* y *S. scintillans*. Segundo, la lámina contraída abruptamente en un peciolo largo, el cual aparece dos veces, una en *Cyclopogon luteoalbus* y otra en el clado formado por *Pelexia* sp. y *P. funckiana*, para el cual se resuelve como una sinapomorfia en un nivel más interno.

La mayoría de las especies presentaron un contorno poligonal isodiamétrico en las células de la epidermis foliar (vista de la superficie) y este estado se interpreta como el estado ancestral, mientras que el contorno poligonal alargado se sugiere como el estado derivado (Fig. 14B). El contorno poligonal alargado es homoplásico a nivel general pues aparece dos veces de manera independiente, una en *Sauroglossum elatum* y otra en el clado formado por *Brachystele camporum* y *Pelexia gutturosa* con *P. ekmanii*, sin embargo, constituye una sinapomorfia para éste si se considera una reversión posterior en *P. ekmanii*.

En algunas especies se observó la presencia de estrías en la pared anticlinal de las células epidérmicas; la optimización de este carácter sugiere que la ausencia de ellas constituye la condición ancestral, mientras que su presencia es la condición derivada (Fig. 14C) y constituye una homoplasia que evolucionó de manera independiente en *Pelexia* sp., *P. gutturosa*, *Sarcoglottis sceptrodes*, *S. lobata*, *S. corymbosa* y *S. schaffneri*.

La pared periclinal puede ser convexa o plana con giba convexa, dependiendo de la especie. Se interpreta que la primera de ellas corresponde a la condición ancestral, mientras que la forma plana con giba es la condición derivada (Fig. 14D) y es homoplásica a nivel general, pues aparece dos veces de manera independiente, una en *Stenorrhynchos speciosum* y otra en el “Clado b” de *Sarcoglottis*; no obstante, si se considera una subsecuente reversión en *Sarcoglottis scintillans* esta condición representa una sinapomorfia para dicho clado. Andreota (2013) y Bernal (2013) reportan que la forma poligonal, las paredes anticlinales rectas y las paredes periclinales convexas son

las más comunes entre las especies de Spiranthinae estudiadas por ambas autoras, lo cual es congruente con los resultados encontrados en este trabajo.

Con respecto al microrelieve de la pared periclinal de las células epidérmicas, la optimización de este carácter para los márgenes celulares sugirió que las estrías finas constituyen la condición ancestral (Fig. 15A), a partir del cual se derivan dos estados, primero, microrelieve con estrías gruesas, que indica homoplasia al aparecer independientemente en *Pelexia* sp., *Sarcoglottis sceptrodes* y *S. corymbosa*. Segundo, microrelieve con concavidades, el cual constituye una condición derivada única para *Stenorrhynchos speciosum*. Por su parte, la optimización de este carácter para la parte central indicó que la condición ancestral es el microrelieve liso (Fig. 15B), a partir del cual se derivan tres estados; primero, microrelieve estriado, que se interpreta como una sinapomorfia en un nivel interno del árbol para las especies del clado *Pelexia* (con excepción de *Sauroglossum elatum*) si se considera una reversión ulterior en las especies de *Sarcoglottis* del “Clado a”. Segundo, microrelieve verrucoso que aparece independientemente en *Cyclopogon luteoalbus*, *Sarcoglottis sceptrodes*, *S. rosulata*, *S. lobata*, *S. richardiana*, *S. schaffneri* y *S. assurgens*. Tercero, microrelieve con concavidades que representa una condición derivada única para *Stenorrhynchos speciosum*. Las estrías finas en las células subsidiarias del estoma se reconstruyeron como la condición ancestral que derivó en estrías gruesas (Fig. 15C), compartidas por la mayoría de las especies del clado *Pelexia* (excepto *Sauroglossum elatum* y *Cyclopogon luteoalbus*), con reversiones posteriores en *Sarcoglottis assurgens*, *S. scintillans*, *S. richardiana*, el “Clado a” de *Sarcoglottis* y *Brachystele camporum*. Particularmente para Spiranthinae no se ha descrito a detalle la superficie epidérmica, incluso algunos caracteres han sido malinterpretados (e.g. gránulos citados como verrugas; *cfr.* Bernal, 2013). La ausencia de información sobre el microrelieve foliar hace difícil proponer hipótesis de su evolución o posible importancia que pudiera tener en estas plantas.

Todas las especies presentaron una epidermis uniestratificada, lo cual se ha observado en otras especies de Cranichideae (Stern *et al.*, 1993b; Figueroa *et al.*, 2008; Andreato, 2013; Bernal, 2013). La forma de las células epidérmicas puede ser alargada dorsiventralmente o no, la optimización de este carácter sugiere que las células no alargadas corresponden a la condición ancestral, a partir de la cual se derivaron las

células alargadas (Fig. 15D). Aunque la condición derivada es homoplásica, esta característica aparece como un carácter compartido en dos pequeños clados, el primero formado por *S. scintillans*, *S. assurgens* y *S. schaffneri* y también en el clado *Brachystele-Pelexia*, excepto *Pelexia ekmanii*.

En la mayoría de las especies se observó que el mesofilo es homogéneo, la optimización de este carácter sugiere que este estado es el ancestral, mientras que el mesofilo heterogéneo se interpreta como el estado derivado (Fig. 16A) y constituye una sinapomorfia del clado formado por *Brachystele camporum* y *Pelexia gutturosa* con *P. ekmanii*, con una pérdida secundaria en esta última especie.

Los haces vasculares son colaterales y de acuerdo con Dugarte y Luque (2012) éstos son característicos en las monocotiledóneas. Se infiere que la posición en V invertida de los elementos del xilema en los haces vasculares constituye el estado ancestral, mientras que su posición horizontal corresponde a la condición derivada (Fig. 16B) y es homoplásica, al aparecer independientemente en *Cyclopogon luteoalbus*, *Pelexia ekmanii*, *Sarcoglottis sceptrodes* y *S. schaffneri*.

En corte transversal se observaron dos tipos de borde, el parenquimático y más común entre las especies analizadas y el epidérmico, presente solamente en *S. uliginosa*, *P. ekmanii* y *S. elatum*, siendo estas observaciones congruentes con lo que observó Bernal (2013) quien reportó este último solo para *Brachystele widgrenii* y *Sauroglossum nitidum*. Andreota (2013) aunque no menciona esta característica, presenta un corte transversal de *S. nitidum* (fig. 90) en el cual se observa claramente que se presenta este tipo de borde. La presencia de esta característica es aparentemente constante en *Sauroglossum elatum*; sin embargo, ni Andreota (2013) ni Bernal (2013) discuten al respecto. En la descripción de *S. nitidum* de la Flora Brasílica (Hoehne, 1945) el margen de la hoja se describe como “*alvacenta*” (traducido como “blanquecino”), probablemente debido a la presencia de borde epidérmico. La optimización más parsimoniosa del tipo de borde sugiere que el borde parenquimático es el estado ancestral y que el borde epidérmico es el estado derivado, el cual es una homoplasia que evolucionó independientemente en *Sauroglossum elatum*, *Pelexia ekmanii* y *Sarcoglottis uliginosa* (Fig. 16C). Esta característica posiblemente esté relacionada también con el margen

translúcido que se ha observado en los márgenes foliares de algunas especies de orquídeas al momento observarlas en el microscopio estereoscópico o a contraluz (G. A. Salazar com. pers.), sugiriendo una distribución más amplia de esta característica en las Orchidaceae. Borba *et al.* (2014) observaron que en *Skeptrostachys* y otros representantes del clado *Stenorrhynchos sensu* Salazar (2003), tales como *Eltroplectris*, *Lyroglossa* Schltr., *Pteroglossa* Schltr. y *Sacoila* Raf., se presentan márgenes foliares translúcidos, lo cual sería interesante examinar anatómicamente para determinar si el borde epidérmico está presente en estos taxa. No existen muchos trabajos en los que se describa el borde epidérmico. Sin embargo, este tipo de borde se presenta en las hojas de *Eriocaulon elichrysoides* Bong. (Eriocaulaceae), una planta acuática del margen de los ríos en los campos rupestres de Brasil (Coan *et al.*, 2002, fig. 21). No obstante, los autores de este último trabajo tampoco discuten al respecto. Considerando que las especies que presentan este tipo de borde habitan principalmente en áreas de pastizal, campos rupestres y sabanas, probablemente esta característica esté relacionada con el hábitat de campos abiertos en el que crecen estas especies y ser un resultado de evolución convergente en linajes distantemente relacionados, como una adaptación independiente a dichos hábitats. Sin embargo, es necesario incrementar el muestreo taxonómico para analizar cómo se distribuye esta característica en Spiranthinae y generar hipótesis consistentes sobre su evolución y posible valor adaptativo.

Con excepción de *Brachystele camporum*, en el que se observaron solamente estomas anomocíticos, en el resto de las especies se observaron estomas anisocíticos, tetracíticos y diacíticos, lo cual confirma las aseveraciones de Stern y Judd (2002), Andreota (2013) y Bernal (2013) quienes consideran común la presencia de más de un tipo de estoma en las hojas de Orchidaceae. Bernal (2013) reporta además que en *B. widgrenii* (Rchbf.) Schltr. se presentan estomas diacíticos, los cuales no fueron identificados en *B. camporum* en el presente trabajo. Los estomas observados aquí se localizan al nivel de las demás células epidérmicas y presentan proyecciones cuticulares, lo cual es congruente con los resultados para otras especies de orquídeas (Dugarte y Luque, 2012; Andreota, 2013; Bernal, 2013). La reconstrucción del tipo de hoja de acuerdo con la ubicación de los estomas sugiere que las hojas hipostomáticas constituyen el estado ancestral a partir del cual se derivaron las hojas anfistomáticas (Fig. 16D). La presencia de estomas tanto en la superficie adaxial como abaxial puede interpretarse

como una sinapomorfia para el clado formado por *Brachystele camporum* y *Pelexia gutturosa* con *P. ekmanii*, que posteriormente revirtió en esta última especie.

Si bien la proporción de especies de *Sarcoglottis* incluidas en este trabajo constituye apenas un veinte por ciento del total del género, con los resultados aquí obtenidos y al compararlos con los reportes de la literatura se observa que la mayoría de los caracteres estructurales vegetativos son homogéneos en *Sarcoglottis*. No obstante, cabe hacer mención que el estudio de dichos caracteres fue importante porque reveló algunos caracteres diagnósticos para las especies estudiadas. Por otra parte, el análisis de la evolución de los caracteres estructurales (Figs. 12-16) mostró que aunque todos son homoplásicos a nivel general, un tercio de ellos fueron sinapomórficos en niveles menos inclusivos. La integración de otros tipos de evidencia (*e.g.* morfología, micromorfología y anatomía de las estructuras florales y semillas, citogenética, morfometría, entre otros) en los estudios filogenéticos permitirá dar mayor solidez a ciertos clados, al revelarse combinaciones únicas de caracteres homoplásicos, o bien, caracteres sinapomórficos a ciertos niveles.

## VII. CONCLUSIONES

Existe poca variación anatómica entre las especies del género *Sarcoglottis* y el resto de los representantes de Spiranthinae.

Se corroboró la presencia de tilosomas lamelados en todas las especies analizadas.

En este trabajo se registró por primera vez un velamen triestratificado para dos de las especies analizadas del género *Sarcoglottis*. Se observó además la presencia de verrugas en la pared periclinal de algunas de las especies examinadas.

Los caracteres estructurales por sí solos no resuelven las relaciones filogenéticas dentro de Spiranthinae, pero incrementan ligeramente el soporte de los clados cuando se analizan combinados con datos moleculares.

*Sarcoglottis* es monofilético y está formado por dos clados que muestran una correspondencia geográfica.

Las relaciones de *Sarcoglottis sceptrodes* y *Brachystele camporum* no se resuelven claramente con los datos utilizados.

Algunos de los caracteres estructurales constituyen sinapomorfias para ciertos clados en niveles menos inclusivos del árbol, entre ellos, la ausencia de hojas en la antesis, las células epidérmicas poligonales alargadas, las células planas con giba convexa, el mesofilo heterogéneo y las hojas anfistomáticas.



## VIII. LITERATURA CITADA

- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- Anderson, F. E. y D. L. Swofford. 2004. Should we be worried about long-branch attraction in real data sets? Investigations using metazoan 18S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 440–451.
- Ames, O. 1922. New or noteworthy orchids from different parts of the world. *Orchidaceae* 7: 88–140.
- Ames, O. y D. S. Correll. 1952. Orchids of Guatemala. *Fieldiana (Botany)* 26: 1–727.
- Andreota, R. C. 2013. Anatomia dos órgãos vegetativos de representantes da tribo Cranichideae (Orchidoideae: Orchidaceae). Tesis de maestría. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, Sao Paulo. Brasil.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell y M. J. Donohue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247–277.
- Balogh, P. 1982. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119–1132.
- Batista, J. A. N., T. E. C. Meneguzzo, G. A. Salazar, L. B. Bianchetti y A. J. Ramalho. 2011. Phylogenetic placement, taxonomic revision, and a new species of *Nothostele* (Orchidaceae), an enigmatic genus endemic to the cerrado of central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 348–363.
- Bell, A. D. y A. Bryan. 1991. Plant form – An illustrated guide to flowering plant morphology. Oxford University Press. Oxford.
- Benthham, G. 1881. Notes on Orchideae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 18: 281–360.
- Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163–193.
- Bernal, A. A. 2013. Evolução dos caracteres anatômicos em spiranthinae com ênfase nos clados: epífito, *Pelexia* e *Stenorrhynchos* (Orchidaceae). Tesis de maestría. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. Brasil.
- Bernal, A. A., E. C. Smidt y E. C. Bona. 2015. Spiral root hairs in Spiranthinae (Cranichideae: Orchidaceae). *Brazilian Journal of Botany* (Publicado online, DOI 10.1007/s40415-015-0141-2).

- Borba, E. L., G. A. Salazar, S. Mazzone-Viveiros y J. A. N. Batista. 2014. Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 29-46.
- Burns-Balogh, P. y H. Robinson. 1983. Evolution and phylogeny of the Pelexia alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). *Systematic Botany* 8: 263-268.
- Cameron, K. M. 2005. Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92(6): 1025–1032.
- Chase, M.W., K. M. Cameron, R. L. Barrett, J. V. Freudenstein. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. En: Dixon K.W, Kell S.P., Barrett R.L. y Cribb P.J. (eds.), *Orchid conservation. Borneo: Natural History Publications*, 69–89.
- Christenson, E. A. y A. L. V. Toscano de Brito. 2000. *Sarcoglottis depinatrix*. *Orchids* 69 (9): 875.
- Coan, A. I., V. L. Scatena y A. M. Giulietti. 2002. Anatomia de algumas espécies aquáticas de Eriocaulaceae brasileiras. *Acta Botânica Brasileira* 16(4): 371–384.
- Correa, M. N. 1955. Las orquídeas argentinas de la tribu Polychondreae Schlechter, subtribu Spiranthinae. *Darwiniana* 11: 24–88.
- de Pinna, M. C. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* 7 (4): 367–394.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press. Portland.
- Duarte, B. A. y R. Luque. 2012. Morfoanatomía en Cranichideae (Orchidaceae) de la Estación Loma Redonda del Parque Nacional “Sierra Nevada”, Mérida, Venezuela. *Lankesteriana* 12(1): 61–75.
- Esau, K. 1976. *Anatomía vegetal*. Ediciones Omega. Barcelona.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap. *Evolution* 39(4): 783–791.
- Figuroa, C., G. A. Salazar, A. Zavaleta y M. Engleman. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101: 509–520.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406–416.

- Foldats, E. 1969. Orchidaceae. En: T. Lasser (ed.), *Flora de Venezuela*, 15(1). Instituto Botánico. Caracas, Venezuela. 502 p.
- Font Quer, P. 1982. Diccionario de botánica. Editorial Labor. México.
- Garay, L. A. 1978. Studies in American orchids X. *Botanical Museum Leaflets (Harvard University)* 26: 1–38.
- Garay, L. A. 1982. A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets (Harvard University)* 28: 277–425.
- Govaerts, R., P. Bernet, K. Kratochvil, G. Gerlach, G. Carr, P. Alrich, A. M. Pridgeon, J. Pfahl, M. A. Campacci, D. Holland Baptista, H. Tigges, J. Shaw, P. Cribb, A. George, K. Kreuz y J. Wood. 2015. World checklist of Orchidaceae. London: Royal Botanic Gardens, Kew. Disponible en: <http://apps.kew.org/wcsp/> (acceso: 21 de enero de 2015).
- Gravendeel, B., M. W. Chase, E. F. de Vogel, M. C. Roos, T. H. M. Mes y K. Bachmann. 2001. Molecular phylogeny of *Coelogyne* (Epidendroideae; Orchidaceae) based on plastid RFLPs, *matK*, and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. *American Journal of Botany* 88: 1915–1927.
- Hágsater, E. y M. A. Soto-Arenas (eds). 2003. *Icones Orchidacearum: Orchids of Mexico* 2-3. Herbario AMO. 5-6 (2-3). México.
- Hágsater, E., M. A. Soto Arenas, G. A. Salazar, R. Jiménez Machorro, M. A. López Rosas y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México.
- Hallé, F., R. A. A. Oldeman y P. B. Tomlinson. 1978. Tropical trees and forests. An architectural analysis. Springer-Verlag. Berlín. Alemania.
- Hauman, L. 1920. Orchidées argentines. Anales de la Sociedad Botánica Argentina. Buenos Aires. Argentina.
- Hoehne, F. C. 1945. Orchidaceas. En: Hoehne F. C. (ed.). *Flora Brasílica*, fasc. 8, vol. 2, parte 2, pp. 1–389. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. São Paulo. Brasil.
- Isaurralde, I. E. y J. A. Radins. 2007. Misiones Orquídeas. 1a edición. Golden Company. Buenos Aires. Argentina.
- Koch, K., B. Bhushan y W. Barthlott. 2009. Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science* 54: 137–178.
- Kumar, S. S. y K. V. Krishnamurthy. 1998. The role of root hairs in the mycorrhizal association of the ground orchid, *Spathoglottis plicata* blume. *Mycorrhiza News* 10(2): 15-17.

- Lewis, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50: 913–925.
- Lindley, J. 1840. The genera and species of Orchidaceous plants (Tribe VI. Neotteeae), 41–524. J. Ridgway. London, Reino Unido.
- Luque, R. A. 2004. Estructura primaria del sistema radical de *Coespeletia Cuatrec.* *Interciencia* 29(1): 13–18.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.72. Disponible en: <http://mesquiteproject.org>
- McVaugh, R. 1985. Orchidaceae. En: Anderson, W. R. (ed.), *Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico*, vol. 16, 1–363. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan. USA.
- Media Cybernetics. 2006. Image Pro Plus. Versión 6.0.1 para Windows 2000/XP Profesional
- Metcalfe, C. y L. Chalk. 1979. *Anatomy of the dicotyledons*. 2a edición. Oxford University Press. Oxford.
- Mitnik, J. 2003. Rewizja taksonomiczna podplemienia Cyclopogoninae Szlach. (Spirantheae, Orchidaceae) z obszaru Ameryki Srodkowej. *Genus Inter Jour. Invert. Tax. (Supplement)*: 57-61.
- Nakata, P. A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxylate crystals formed in plants. *Plant Science* 164: 901–909.
- Nixon, K.C. 2002. WinClada. Versión 1.00.08. Ithaca, Nueva York. Disponible en: <http://www.cladistics.com>
- Philbrick, C. T. y D. H. Les. 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience* 46(11): 813–826.
- Porembski, S. y W. Barthlott. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* 8: 117–137.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7): 1253–1256.
- Presl, C. 1827. *Sarcoglottis. Reliquiae Haenkeanae* 1(2):95-96.
- Pridgeon, A. M. 1987. The velamen and exodermis of orchid roots. En: Arditti J. (ed.) *Orchid biology, reviews and perspectives*, IV, pp. 139–192. Ithaca, NY: Cornell University Press.

- Pridgeon, A. M., W. L. Stern y D. H. Benzing. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany* 70(9): 1365–1377.
- Rambaut, A. 2009. FigTree. Versión 1.3.1.  
Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Salazar, G. A. 2003. Spiranthinae. En: Pridgeon, A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F. N. Rasmussen (eds.) *Genera Orchidacearum*, vol. 3: Orchidoideae part 2, Vanilloideae, pp. 164–278. Oxford: Oxford University Press.
- Salazar, G. A., M. W. Chase, M. A. Soto y M. Ingrouille. 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90(5): 777–795.
- Salazar, G. A., L. I. Cabrera, S. Madriñán y M. W. Chase. 2009. Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 104: 403–416.
- Salazar, G. A. y C. Ballesteros-Barrera. 2010. *Sotoa*, a new genus of Spiranthinae (Orchidaceae) from Mexico and the southern United States. *Lankesteriana* 9(3): 491–504.
- Salazar, G. A., L. I. Cabrera y C. Figueroa. 2011. Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 1–18.
- Salazar, G. A. y R. L. Dressler. 2011. The leaves got it right again: DNA phylogenetics supports a sister-group relationship between *Eurystyles* and *Lankesterella* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Lankesteriana* 11(3): 337–347.
- Salazar, G. A. y L. Jost. 2012. *Quechua*, a new monotypic genus of Andean Spiranthinae (Orchidaceae). *Systematic Botany* 37: 78–86.
- Salazar, G.A., C. van den Berg y A. Popovkin. 2014. Phylogenetic relationships of *Discyphus scopulariae* (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences: evidence supporting recognition of a new subtribe, Discyphinae. *Phytotaxa* 173: 127–139.
- Sanderson, M. J., M. F. Wojciechowski, J. M. Hu, T. S. Khan y S.G. Brady. 2000. Error, bias, and long-branch attraction in data for two chloroplast photosystem genes in seed plants. *Molecular Biology and Evolution* 17, 782–797.
- Sandoval-Zapotitla, E., J. García-Cruz, T. Terrazas y J. L. Villaseñor. 2010. Relaciones filogenéticas de la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae) inferidas a partir de caracteres estructurales y secuencias de ADN (ITS y *matK*): un enfoque combinado. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 263–279.

- Sanford, W. W. e I. Adanlawo. 1973. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66: 307–321.
- Sass, J. E. 1958. Botanical microtechnique. 3a edición. Iowa State College Press. Ames, Iowa.
- Schinini, A. 2010. Orquídeas nativas del Paraguay. *Rojasiana* 9(1-2): 11-292.
- Schlechter, R. 1920. Versuch einer systematischen Neuordnung der Spiranthinae. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 37(2): 317–454.
- Schlechter, R. 1926. Das Sytem der Orchidaceen. *Notizblatt des Botanischen Garten und Museums zu Berlin-Dahlem* 88: 563–591.
- Silvestro, D. y I. Michalak. 2011. raxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity Evol.* Disponible: 10.1007/s13127-011-0056-0.
- Simmons, M. P. 2004. Independence of alignment and tree search. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31: 874–879.
- Simpson, M.G. 2010. Plant systematics. Academic Press. 2a edición.
- Soltis, D. E. y P. S. Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En: D. E. Soltis, P. S. Soltis y J. F. Doyle [eds.], *Molecular systematics of plants II. DNA sequencing*, 1–42. Kluwer Academic Publishers, London. UK.
- Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Sarcoglottis cerina*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Stern, W. L., H. C. Aldrich, L. M. McDowell, M. W. Morris y A. M. Pridgeon. 1993a. Amyloplasts from cortical root cells of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Protoplasma* 172: 49–55.
- Stern, W. L, M. W. Morris, W. S. Judd, A. M. Pridgeon y R. L. Dressler. 1993b. Comparative vegetative anatomy and systematic of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 113: 161–197.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Versión 4.0. Sunderland: Sinauer.
- Szlachetko, D. L. 1995. Systema Orchidaliium. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* (Supplement) 3: 1–152.

- Szlachetko, D. L., R. González Tamayo y P. Rutkowski. 2000. *Zhukowskia*, a new orchid genus from Mesoamerica. *Adansonia* 22(2): 235–238.
- Szlachetko, D. L., R. González y P. Rutkowski. 2001. *Pachygenium* Szlach., R. González & Rutk., a new genus of the subtribe Cyclopogoninae (Orchiidaceae). *Polish Botanical Journal* 46 (1): 3-6.
- Szlachetko, D. L., P. Rutkowski y J. Mytnik. 2005. Contributions to the taxonomic revision of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Orchidaceae) in Mesoamerica and the Antilles. *Polish Botanical Studies* 20: 3–387.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Wiens J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47: 568–581.
- Williams, L. O. 1951. The Orchidaceae of Mexico. *Ceiba* 2: 1–321.