

Posgrado en Ciencias y Biotecnología en Plantas

**Filogenia del complejo *Heterotaxis* Lindley
(Orchidaceae): evolución de la arquitectura vegetativa y
de los síndromes de polinización**

Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Isidro Ojeda Alayón



Centro de investigación Científica de Yucatán

Mérida, Yucatán, México.

2003

Para dos personas maravillosas

**A mi esposa SANDRA,
por enseñarme nuevas formas de ver la vida,
por motivarme a superarme
y por tu amor**

**A mi hijo EMILIO,
tu presencia es alegría
y motivación para ser mejor**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Germán Carnevali, a quién agradezco todo el apoyo brindado durante la elaboración de esta tesis y sus acertados consejos durante la misma.

Agradezco todos los comentarios del comité de evaluación, a la Dra. Ivón Ramirez por sus consejos y comentarios en aspectos de la morfología y definición de caracteres, a la Dra. Victoria Sosa por todo su apoyo y consejos en la realización de la tesis, especialmente en el análisis filogenético, al Dr. Juan Javier Ortíz por sus comentarios sobre la morfología y de los caracteres morfológicos.

Agradezco a Silvia Hernández y a José Luis Tapia por todo su apoyo durante el trabajo en el herbario del CICY.

Agradezco las facilidades otorgadas y todo el apoyo del Museo de Historia Natural de la Universidad de Florida (FLAS), especialmente a los Drs. Norris Williams y Mark Whitten, quienes me apoyaron en la obtención de secuencias y en el trabajo de laboratorio, así como por el permiso de utilizar varias de sus secuencias sin publicar. También deseo agradecer al Dr. Mark Whitten por el permiso de utilizar varias de sus fotografías en esta tesis.

Agradezco las facilidades otorgadas por el Marie Selby Botanical Garden (SEL), por permitirme estudiar y coleccionar material vivo de su colección.

Agradezco la beca otorgada por la Red Latinoamericana de Botánica (RLB) para realizar un curso en sistemática filogenética.

Agradezco a la Secretaría de Relaciones Exteriores por el apoyo económico brindado para la realización del trabajo experimental en FLAS.

El autor agradece el apoyo recibido del Consejo de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca crédito otorgada con el No. 162949

Agradezco el apoyo brindado por la familia Ojeda y la familia Arango durante la realización de la tesis.

Agradecimiento especial

Infinitamente agradezco a mi esposa Sandra por todo su apoyo durante todo el tiempo que duro la tesis, por la paciencia de escucharme cuando solo hablaba de orquídeas, por las invaluable ideas que contribuyeron a mejorar la tesis y por saber que cuando te necesitaba estabas cerca para consolarme, alentarme o inspirarme.

CONTENIDO

		Pags.
	Resumen	i
	Abstract	ii
	Introducción	iii
	Bibliografía	v
Capítulo I	Antecedentes	
	Historia taxonómica en <i>Maxillaria</i> Ruiz & Pavón	1
	Historia taxonómica del complejo <i>Heterotaxis</i> Lindley	3
	Clado <i>Heterotaxis</i> – <i>Ornithidium</i>	9
	Hipótesis	10
	Objetivo general	10
	Objetivos específicos	11
	Bibliografía	11
Capítulo II	Análisis filogenético del complejo <i>Heterotaxis</i> Lindley con base en caracteres morfológicos y anatómicos	
	Introducción	13
	Materiales y métodos	13
	Taxa terminales	13
	<i>Grupo interno y especies excluidas</i>	13
	<i>Grupos externos</i>	14
	Material observado	15
	Técnicas anatómicas	16
	Análisis filogenéticos	18
	Resultados	19
	Caracteres	19
	<i>Caracteres morfológicos vegetativos</i>	19
	<i>Caracteres morfológicos florales</i>	25
	<i>Caracteres anatómicos</i>	34
	Análisis cladístico	41
	Sinapomorfias del clado <i>Heterotaxis</i> - <i>Ornithidium</i> .	43
	Sinapomorfias de <i>Maxillaria nasuta</i> y afines	45
	Sinapomorfias de <i>Heterotaxis</i> s.s. – <i>Ornithidium</i>	46
	Sinapomorfias en <i>Heterotaxis</i> s.s	46
	Discusión	48
	Bibliografía	50

Capítulo III	Análisis filogenético del complejo <i>Heterotaxis</i> Lindley con base en las secuencias de las regiones espaciadoras de los genes ribosomales (ITS 1 & 2)	
	Introducción	53
	Materiales y métodos	54
	Taxa terminales	54
	Métodos moleculares	55
	Grado de divergencia molecular de los ITS 1 & 2	56
	Resultados	57
	Grado de divergencia molecular de los ITS 1 & 2	57
	Discusión	58
	Bibliografía	61
Capítulo IV	Análisis filogenético del complejo <i>Heterotaxis</i> Lindl. basado en la evidencia total: evolución de la arquitectura vegetativa y síndromes de polinización	
	Introducción	64
	Materiales y métodos	65
	Taxa terminales	65
	Resultados	67
	Discusión	69
	Evolución de la arquitectura vegetativa	71
	Evolución de las estrategias de polinización en el clado <i>Heterotaxis</i> – <i>Ornithidium</i>	74
	Implicaciones taxonómicas	77
	Biogeografía	78
	Bibliografía	80
	Conclusiones generales	82
	Perspectivas	83
	Apéndice	83

RESUMEN

Maxillaria Ruiz & Pavón comprende uno de los géneros más conspicuos de las orquídeas Neotropicales. Su circunscripción y relaciones filogenéticas no están claras aún y existe evidencia de distintas fuentes que señalan el estado polí o parafilético del género, donde varios complejos de especies considerados en la actualidad dentro de la circunscripción de *Maxillaria*, podrían ser reconocidos a un nivel genérico. Con base en la morfología, anatomía y secuencias de los ITS 1 & 2 se presenta una filogenia de *Heterotaxis*, uno de los complejos de especies reconocidos actualmente dentro de *Maxillaria* que podría ser reconocido a un nivel de género; este complejo junto con *Ornithidium* forman un clado ubicado en la base del cladograma de *Maxillaria* s.l.

Tanto en el análisis de los datos por separado como en el de la evidencia total se encuentran tres clados con alto soporte, todas las especies incluidas de *Heterotaxis* forman un grupo monofilético (excepto *Maxillaria proboscidea*, *M. nasuta* y *M. cymbidioides*), las cuatro especies incluidas de *Ornithidium* forman un grupo monofilético el cual es el grupo hermano de *Heterotaxis*. *Maxillaria proboscidea*, *M. nasuta* y *M. cymbidioides* forman un clado monofilético en posición basal del cladograma.

Una reevaluación de la taxonomía de estos complejos consistiría reconocer al menos tres géneros dentro de este clado, *Heterotaxis*, *Ornithidium* y un nuevo género para *M. nasuta* y afines.

La evidencia total sugiere la presencia de dos clados dentro de *Heterotaxis* s.s., el clado "Crassifolia" incluye a la especie tipo del complejo, *M. crassifolia* y especies simpodiales de hábito y tamaño similar a esta, mas *M. equitans* y *M. valenzuelana* (*Marsupiarina* Hoehne). El otro clado ("Violaceopunctata") comprende solo especies simpodiales del tipo *M. violaceopunctata*, las cuales presentan una talla mayor en las estructuras vegetativas y florales. El clado *Heterotaxis* s.s. presentó poca variación morfológica y presentó una mayor variación en estructuras florales y anatómicas.

El árbol obtenido de la evidencia total de los datos apoya la hipótesis de que el hábito simpodial es plesiomórfico dentro del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*, que el hábito pseudomonopodial es derivado dentro de *Heterotaxis* s.s. y que la gran variedad de hábitos vegetativos dentro de *Ornithidium* es derivada y que evolucionó de manera diferente que en *Heterotaxis* s.s. Este análisis también apoya la hipótesis de que la estrategia de polinización por avispas recolectoras de pseudopolen es plesiomórfica en el clado y la ornitofilia es derivada.

ABSTRACT

Maxillaria Ruiz & Pavón is one of the most conspicuous genera of Neotropical orchids. Its phylogenetic relationships and circumscription are still unclear. There is evidence from several sources that pointed out its poly or paraphyletic status, where several complex of species, now recognized within *Maxillaria*, could be recognized at generic level. Based on morphology, gross foliar anatomy, and sequences of ITS 1 & 2 the present work presents a phylogeny of *Heterotaxis*, one of the species complex considered under the circumscription of *Maxillaria*. This complex plus *Ornithidium* are situated in a basal position in *Maxillaria* phylogeny, and both represent a group of species that could be recognized at generic level.

In both, separate analysis and total evidence, the different data support the existence of three clades well supported; all species included of *Heterotaxis* form a monophyletic group (except *Maxillaria proboscidea*, *M. nasuta* y *M. cymbidioides*), the four species included in *Ornithidium* form a monophyletic group which is the sister clade of *Heterotaxis*, and *Maxillaria nasuta*, *M. proboscidea*, and *M. cymbidioides* are situated in a basal position in the cladogram.

A taxonomic reevaluation of these complexes will result in the recognition of at least three genera, *Heterotaxis* s.s. (except *Maxillaria nasuta*, *M. proboscidea*, and *M. cymbidioides*), possibly *Ornithidium* and a new genus for *Maxillaria nasuta* and relatives.

Total evidence support the existence of two clades in *Heterotaxis* s.s. "Crassifolia" clade contains the type specie of the complex, *M. crassifolia*, and those species with similar growth habit and size plus *M. equitans* and *M. valenzuelana* (*Marsupiaria* Hoehne). The other clade, "Violaceopunctata", contains only species with sympodial growth habit and with larger plants. *Heterotaxis* s.s. clade shows little variation in gross morphology, and is more variable in floral and anatomical characters.

The topology obtained from total evidence supports the hypothesis that the sympodial growth habit is plesiomorphic in the clade *Heterotaxis* – *Ornithidium*. Pseudomonopodial growth habit is derivated in *Heterotaxis* s.s, the great diversity of growth habits observed in *Ornithidium* is also derivated, and this evolved in a different way than in *Heterotaxis* s.s. This analysis also support that the pollination by wasps which recollect pseudopollen is plesiomorphic, and the pollination by birds (hummingbirds) is derivated.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae comprende entre 25,000 - 35 000 spp. y es considerada como uno de los grupos con más especies dentro de las Angiospermas (Atwood, 1986; Dressler, 1993). El gran número de especies que incluye y sus numerosas ambigüedades taxonómicas sugieren una alta variabilidad genética, alto potencial evolutivo y una gran diversidad (Ackerman, 1998). Su importancia radica no solo en la cantidad de especies que comprende, sino también en la gran diversidad en historias de vida, estrategias de polinización, morfología vegetativa, diversidad ecológica, amplitud de distribución e interacciones (eg. hongos micorrízicos, polinizadores, hormigas, etc.), que presentan con otros organismos (Arditti, 1992; Dressler, 1993). Todo esto la convierte en un sistema idóneo para la realización de estudios evolutivos.

Actualmente existe un consenso en reconocer cinco subfamilias, donde Epidendroideae incluye la mayor parte (~70 %) de las especies que hay en Orchidaceae; esta subfamilia es considerada como la más derivada en Orchidaceae y se caracteriza por polinarios complejos, antera incumbente, tallos gruesos y donde el hábito epífita se presenta con mayor frecuencia (Dressler, 1993; Cameron *et al.*, 1999). Dressler (1993) reconoce dos grandes grupos naturales en la subfamilia, el grupo Epidendroide y el Cymbidiode. El primero agrupa básicamente a las especies con tallos en forma de cañas y el segundo a las especies con cormos (Dressler, 1993).

Maxillariaceae Pfitzer es una de las tribus en la que se encuentra subdividida el grupo Cymbidiode y abarca ~10 % de Orchidaceae; la tribu se caracteriza por polinarios complejos con viscidio y estipe, pseudobulbos usualmente con un entrenudo simple (heteroblásticos) y semilla tipo *Maxillaria* (Dressler, 1993; Whitten *et al.*, 2000).

Dressler (1993) dividió esta tribu en ocho subtribus, sin embargo, trabajos recientes de Whitten *et al.* (2000) basados en secuencias de ADN reconocen únicamente 6 subtribus e incluyen en Maxillariinae a las subtribus Lycastinae y Bifrenariinae.

Maxillariinae s.s. comprende unas 800 especies de distribución Neotropical, caracterizadas por inflorescencias unifloras basales, hojas conduplicadas, semilla tipo *Maxillaria* y cuatro polinios (Brieger, 1977; Dressler, 1993).

Contrario al patrón usual dentro de las Orchidaceae, Maxillariinae presenta una mayor variabilidad vegetativa que floral (Carnevali, 1991). La subtribu incluye plantas cespitosas con pseudobulbos (simpodial) como la condición primitiva (esta es la forma común dentro de otras subtribus relacionadas como Lycastinae s.s.) (Carnevali, 1991), mientras la condición monopodial (con pérdida de pseudobulbos y elongación de rizomas o el mantenimiento de la actividad del meristemo apical y elongación de módulo simpodial primario) es considerada avanzada en la subtribu (Brieger, 1977; Carnevali, 1991; Dressler, 1993).

El consenso es reconocer dentro de Maxillariinae s.s. los géneros *Cryptocentrum* Benth, *Maxillaria* Ruiz & Pav., *Mormolyca* Fenzl, *Chrysocynis* Lindl. & Rchb. f.,

Cyrtidiorchis Rauschert, *Anthosiphon* Schltr., *Pitiphyllum* Schltr., y *Trigonidium* Lindl. (Foldats, 1970; Dressler, 1981; Atwood, 1989; Carnevali & Ramírez, 2003). Con la nueva circunscripción de Maxillariinae propuesta Whitten *et al.* (2000), se añaden nuevos taxa bajo el concepto de esta subtribu, que debido a su variabilidad morfológica, ocasionan que la subtribu carezca de sinapomorfias evidentes que la diagnostiquen en conjunto.

Maxillaria Ruiz & Pav. es el género más numeroso dentro de la subtribu, estimaciones conservadoras reportan ca. 600 (Dressler, 1981; Carnevali, 1991; Senghas, 1993), sin embargo, es posible que esta cantidad se incremente, ya que nuevas especies son reportadas en este género. El género es generalmente reconocido por las hojas conduplicadas, inflorescencias unifloras, pie columnar más o menos bien desarrollado, cuatro polinios y un estipe muy distintivo en forma de herradura de caballo (Atwood & de Retana, 1999).

Es un grupo muy variable en tamaño y morfología vegetativa, ya que se pueden observar desde plantas de menos de 1 cm hasta de 2 m de altura, pueden estar creciendo formando grupos con rizomas cortos o en rizomas subrectos y ascendentes; con o sin pseudobulbos y con una o más hojas en el ápice (Hawkes, 1965; Dressler, 1993; McLeish *et al.*, 1995). Pueden presentar el labelo articulado y móvil o fusionado y formando un saco para la acumulación de néctar, variar en el tamaño, textura y coloración de la flor.

Su rango de distribución varía desde el sur de Florida hasta Argentina, alcanzado su más alta diversidad en los Andes (Hawkes, 1965). Las especies de este género son principalmente epífitas, aunque también se les puede encontrar como litofíticas o incluso como terrestres (Carnevali & Ramírez, 1989; McLeish *et al.*, 1995).

Las relaciones filogenéticas en *Maxillaria* no son claras aún y varias aproximaciones de distintos autores basados en caracteres morfológicos (Carnevali, 1991; Atwood & de Retana, 1999), anatómicos (Holtzmeier *et al.*, 1998) y moleculares (Whitten *et al.*, 2000; Whitten, *datos no publicados*) han hecho notar el estado para o polifilético del género, indicando que la circunscripción de éste debe ser re-evaluada y donde varios complejos de especies, tales como los complejos *Maxillaria rufescens* Lindl., *Ornithidium* Salisb. y *Heterotaxis* Lindl. podrían ser reconocidos a un nivel de género (Carnevali & Ramírez, 1989; Carnevali, 1991; Holtzmeier *et al.*, 1998; Carnevali *et al.*, 2001; Carnevali & Ramírez, 2003).

En el presente trabajo se aborda el estudio de las relaciones filogenéticas del grupo de especies que ha sido agrupado en el complejo *Heterotaxis*. Con base en evidencia morfológica, anatómica y molecular se presenta un análisis filogenético del complejo y su relación con otros complejos de especies cercanamente relacionados. Se presenta evidencia de cuales especies pertenecen a *Heterotaxis* y si estas forman un grupo monofilético; finalmente, con base en la filogenia obtenida se presentan posibles hipótesis de la evolución de la arquitectura vegetativa y de los síndromes de polinización de este complejo y los grupos cercanamente relacionados.

Bibliografía

- Ackerman JD** (1998) Evolutionary potential in orchids: patterns and strategies of conservation. *Selbyana* 19:8-14.
- Arditti J** (1992) *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons. USA.
- Atwood JT** (1986) The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Atwood JT** (1989) Orchids of Costa Rica 1. *Icones Plantarum Tropicarum* 14.
- Atwood JT and DM de Retana** (1999) Flora Costaricensis. Tribe Maxillarieae: Subtribes Maxillariinae and Oncidiinae. *Fieldiana* 40: 1-84.
- Brieger FG** (1977) On the Maxillarinae (Orchidaceae) with sepaline spur. *Bot. Jahrb. Syst.* 97: 548-574.
- Cameron KM, MW Chase, WM Whitten, PJ Kores, DC Jarrell, VA Albert, T Yukama, HG Hills and DH Goldman** (1999) A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcl* nucleotides sequences. *Am. J. Bot.* 86: 208-224.
- Carnevali G and I Ramírez** (1989) New and noteworthy orchids for the Venezuela flora. VII. Additions in *Maxillaria* from the Venezuelan Guayana. *Ann. Missouri Bot. Garden* 76: 374-380.
- Carnevali G** (1991) *Citology and the pollinaria in the Maxillariinae (Orchidaceae)*. Master of Science Thesis in Biology. University of Missouri-St. Louis, USA. 171 p.
- Carnevali G, JL Tapia and M Gómez-Juárez.** (2001) A synopsis of the *Maxillaria rufescens* complex in México, Central America, and the greater Antilles. *Brittonia* 53: 454-465.
- Carnevali G and I Ramírez** (2003) Orchidaceae, *Maxillaria*. En: *Flora of the Guyana*. V.7. Steyermark, J.A., Berry, P.E., Yatskievich K., and Holst, B.K. (eds). Missouri Botanical Garden. St. Louis. pp. 200-765.
- Dressler RL** (1981) *The orchids: Natural history and clasification*. Harvard University Press. 332 p
- Dressler RL** (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides, Press, Portland, Oregon, USA.
- Foldats E** (1970) Orchidaceae, *Cyrtidium*, *Pityohyllum*, *Trigomnidium*, *Scuticaria*, *Maxillaria*, and *Mormolyca*. In: *Flora de venezuela XV* (IV). T. Laser (ed) pp. 366-558.
- Hawkes AD** (1965) *Encyclopedia of cultivated orchids*. London. Faber and Faber limited.
- Holtzmeier MA, WL Stern and WS Judd** (1998) Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). *Bot. J. Linnean Soc.* 127: 43-82.
- McLeish I, Pearce, NR, Adams BR and JS Briggs** (1995) *Native orchids of Belize*. Rotterdam AA, Balkema.
- Senghas, K.** (1993) Subtribus: Maxillarinae, Band I/B Lieferung 28 In: *Die Orchidien*. R. Schlechter (ed) Berling and Hamburg. pp. 1727-1776.
- Whitten WM, NH Williams and MW Chase** (2000) Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopinae: combined molecular evidence. *Am. J. Bot.* 87: 1842-1856.

CAPITULO I

Antecedentes

Historia taxonómica de *Maxillaria* Ruiz & Pavón

Maxillaria es uno de los géneros más numerosos y distintivos de las orquídeas Neotropicales. Los autores de este género se basaron en 16 especies heterogéneas al describirlo y muchas de estas especies se encuentran actualmente bajo la circunscripción de otros géneros (eg. *Lycaste* Lindl., *Xylobium* Lindl., *Warrea* Lindl., *Oncidium* Sw., *Odontoglossum* H.B.K., *Scaphyglottis* Poepp. & Endlich, *Scaphyglottis* Poepp. & Endlich, etc.) (Ruiz & Pavón, 1798).

Los autores originales del género no seleccionaron, ni dejaron indicios de cual es la especie tipo en el protólogo y con esto ocasionaron que la circunscripción de *Maxillaria* fuera confusa (Garay, 1997). Varios intentos posteriores se realizaron para lectotipificar el género y de los 16 ejemplares designados por los autores en el protólogo, únicamente tres de estas especies (*Maxillaria ramosa*, *M. prolifera* y *M. platypetala*) caen en la circunscripción de lo que en la actualidad se reconoce como *Maxillaria*. De estas tres especies se ha designado recientemente a *M. platypetala* como la especie tipo del género (Garay, 1997).

Aunado a lo anterior, otros agregados de especies que fueron reconocidos al nivel genérico a principios de 1800's, tal como el caso de *Ornithidium* Salisb. (basado en *M. coccinea*), *Camaridium* Lindl., *Dicrypta* Lindl. (basado en *M. crassifolia*), *Heterotaxis* Lindl. (basado en *M. crassifolia*) y *Menadena* Rafinesque, entre otros, fueron posteriormente colocados en la sinonimia de *Maxillaria*. Todo esto aunado a la gran cantidad de especies descritas recientemente y a la gran variabilidad vegetativa del grupo ocasionó que en la actualidad la taxonomía y circunscripción de *Maxillaria* sea confusa y difícil (Carnevali, 1991; Dressler, 1993; Christenson, 1999).

Maxillaria es reconocido por las hojas conduplicadas, inflorescencias unifloras, pie columnar mas o menos bien desarrollado, cuatro polinios, un estipe muy distintivo en forma de herradura de caballo y el labelo articulado en forma de maxila en la mayor parte de las especies (característica que le da el nombre al género por la similitud de la articulación del labelo a la columna asemejando unas maxilas (Schultes & Pease, 1963; Mc Leish *et al.*, 1995; Atwood & de Retana, 1999).

Hasta la fecha, no existe un estudio cladístico comprensivo del género y algunos intentos de varios autores han sido enfocados al reconocimiento de grupos infragenéricos informales (alianzas, complejos, secciones, etc.) con el fin de formar grupos de especies y tratar de establecer relaciones entre estos basándose en algunos caracteres morfológicos.

Basado en las características del polinario y en el número cromosómico, Carnevali (1991) dividió el género *Maxillaria* en dos filas, 4 alianzas, 47 complejos y más de 10 series, uno de los fila abarca a las especies de *Cryptocentrum* y el otro fila

a las especies de *Maxillaria* junto con los géneros reconocidos actualmente de *Mormolyca*, *Chrysocycnis*, *Cyrtidiorchis* y *Trigonidium*.

Senghas (2000) en un intento de organizar *Maxillaria*, desarrolló una clasificación artificial basado en características de la flor y textura de la hoja, reconociendo 12 grupos dentro de *Maxillaria*, dándole un reconocimiento genérico a *Marsupiaria* Hoehne, *Ornithidium* y *Sepalosaccus* Schltr. Esta clasificación artificial únicamente es un intento de agrupar especies de acuerdo a caracteres aparentemente homoplásicos. Con base en características morfológicas y florales, Christenson (1999) subdividió *Maxillaria* en 19 secciones, reconociendo únicamente al nivel de género a *Sepalosaccus*.

Estos intentos de subdividir *Maxillaria* (Cuadro 1) son una muestra de la gran diversidad de arquitectura vegetativa y floral que presenta el grupo, y de lo complicado que resulta establecer una taxonomía que refleje la filogenia del género. Muchas de estas clasificaciones son artificiales y no contribuyen en el esclarecimiento de las relaciones de estos grupos, ya que únicamente se basan en pocos caracteres (muy homoplásicos) y como resultado forman grupos de especies que han presentado una evolución convergente y que por ello son fenéticamente similares.

Cuadro 1. Algunas de las clasificaciones infragenéricas realizadas en *Maxillaria* basados en distintas características morfológicas.

Caracteres usados	Grupos reconocidos	* Géneros reconocidos	Referencia
Forma vegetativa y posición del pseudobulbo	Cinco secciones		Pfitzer, 1889
Polinario y número cromosómico, caracteres vegetativos y florales	Fila <i>Cryptocentrum</i> -Complejo <i>Cryptocentrum</i>	<i>Scuticaria</i> <i>Anthosiphon</i> <i>Pityphyllum</i>	Carnevali, 1991
	Fila <i>Maxillaria</i>		
Variación vegetativa y morfología floral	11 grupos de especies		Senghas, 1993, 1994
Vegetativas y florales	19 secciones	<i>Sepalosaccus</i>	Christenson, 1999
Florales y succulencia de la hoja	12 grupos informales	<i>Marsupiaria</i> <i>Ornithidium</i> <i>Sepalosaccus</i>	Senghas, 2000
Vegetativos y florales	38 alianzas y 22 subalianzas	<i>Anthosiphon</i> <i>Chrysocycnis</i> <i>Cyrtidiorchis</i>	†Atwood, Carnevali and Dodson, datos no publicados

* Se refiere a los géneros reconocidos actualmente dentro de la circunscripción de *Maxillaria*.

† <http://www.filmnh.ufl.edu/natsci/herbarium/max/database/database.html>



Hasta la fecha no existe un análisis cladístico del género *Maxillaria* y únicamente se ha estudiado bajo esta perspectiva a determinados grupos incluidos en este género (Carnevali, 1996; Holtzmeier *et al.*, 1998).

Con el uso de la evidencia molecular de las secuencias de ITS 1 & 2 (*internal transcribed spacers*), en éste género se ha confirmado algunas de las hipótesis de relación que se especulaba existían entre ciertos grupos infragenéricos y también se ha podido ubicar la posición de algunos géneros y grupos de especies que por sus características morfológicas (muy modificadas) eran difícil de establecer, eg. *Pityphyllum*, *Mormolyca* y *Cryptocentrum*, entre otros (Whitten, *datos no publicados*).

De este análisis se obtiene también más evidencia de la situación para o polifilética de *Maxillaria* y de la ubicación del clado que se contempla en el presente estudio (Fig 1).

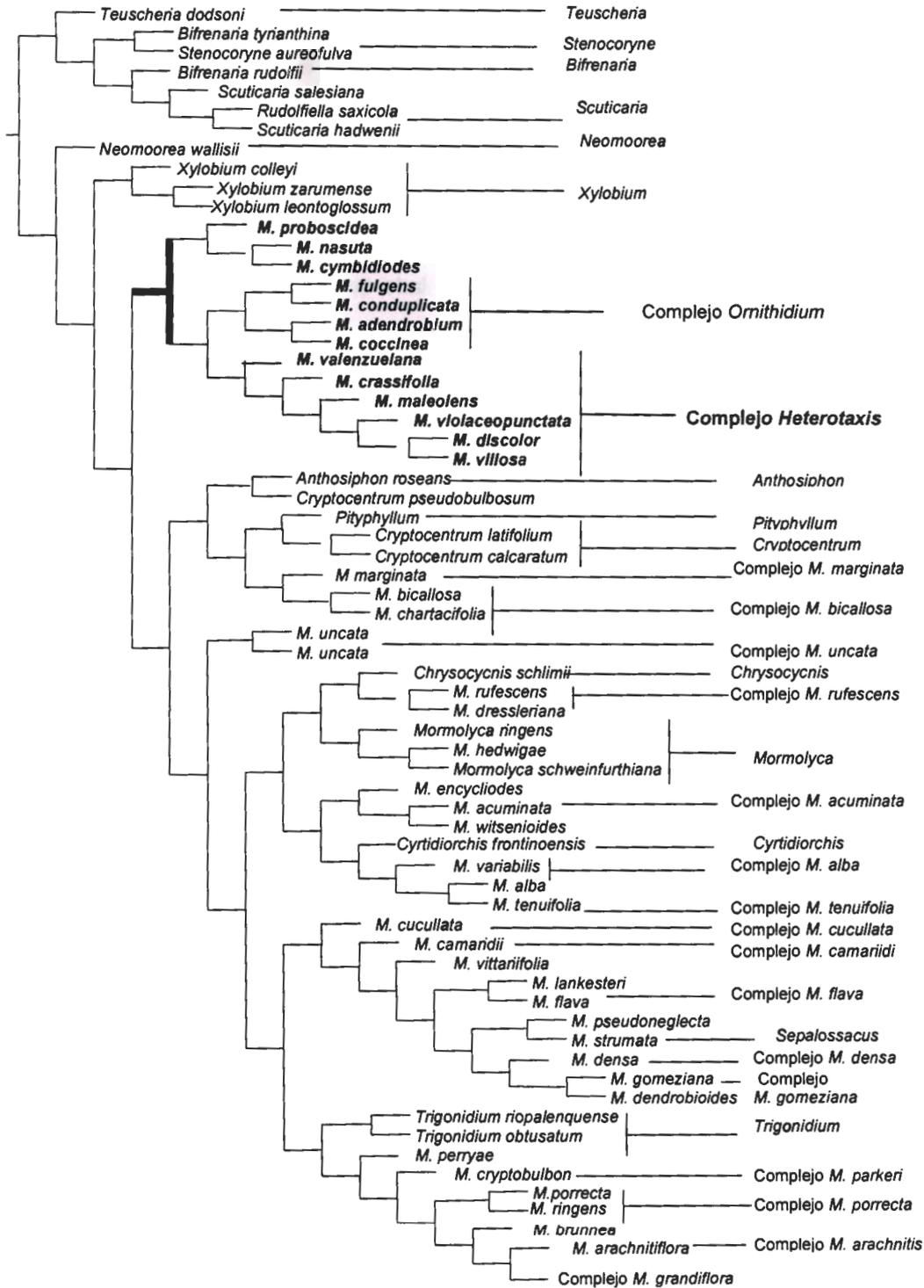
Varios estudios basados en caracteres morfológicos (Carnevali, 1991; Atwood & de Retana, 1999), anatómicos (Holtzmeier *et al.*, 1998) y recientemente secuencias moleculares de los ribosomas (ITS 1 & 2) (Whitten *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, *datos no publicados*) han hecho notar la condición de grupo poli o parafilético del concepto actual del género *Maxillaria*; sugiriendo que varios complejos de especies podrían ser reconocidos a un nivel de género una vez que se hallan establecido las relaciones filogenéticas de este grupo. Candidatos a ser reconocidos a nivel genérico se encuentran los complejos *Heterotaxis*, *Ornithidium* y el complejo *Maxillaria rufescens* Lindl., entre otros.

Historia taxonómica del complejo *Heterotaxis* Lindley

Lindley en 1830 describió el género *Dicrypta* [Gen. and Sp. Orch. Pl. (1830), 44] para una especie conocida en la actualidad como *Maxillaria crassifolia* Lindl. (Lindley, 1830), sin percatarse que previamente él mismo en 1826 había descrito el género *Heterotaxis* [Bot. Reg. 12 (1826), t. 1028] para la misma especie (Carnevali, 1991).

Bajo el argumento de que la descripción de *Heterotaxis* presentaba algunos caracteres erróneos, Lindley prefirió mantener el nombre *Dicrypta* (Lindley, 1830-1840) y este último se utilizó por varios autores quienes lo utilizaron en la descripción de especies nuevas y en la nomenclatura como un grupo informal dentro de *Maxillaria*. A pesar del argumento de Lindley, el protólogo de la descripción de *Heterotaxis* presenta los requerimientos necesarios y por razones de prioridad este nombre es válido para este grupo de especies (Principio III, Código Internacional de Nomenclatura Botánica). De aquí en adelante se referirá a este complejo de especies con el nombre de *Heterotaxis*.

Figura 1. Filogenia de algunas especies del género *Maxillaria* y géneros relacionados basadas en secuencias de los ITS 1 & 2 (Whitten *et al.*, *datos no publicados*), donde se observa la ubicación del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium* considerado en estudio en el presente trabajo (líneas gruesas) y su relación con otros complejos más relacionados en Maxillariinae reconocidos por Carnevali (1991) y Atwood *et al.* (*datos no publicados*). (Página siguiente).



La palabra *Heterotaxis* proviene del griego "heteros", otro y "taxis", orden, haciendo alusión probablemente a la posición intermedia del género, el cual sugería al autor una afinidad inmediata con *Arethuseae*, el cual puede ser considerado una conexión entre *Arethuseae* y *Epidendreae* (Schultes & Pease, 1963). Por otro lado, a pesar de que Lindley no proporcionó la etimología de *Dicrypta* explícitamente, esta se puede inferir con un alto nivel de certidumbre al leer el protólogo. Este dice específicamente, "*Habitus et patria ignoti*". Lindley sólo tenía un dibujo de la planta que estaba describiendo, por lo que la palabra "Dicrypta", basada en el griego "di", dos, y "cryp-, crypto-", escondido, se estaba refiriendo al desconocimiento del hábito y del origen del ejemplar tipo (Lindley, 1830), que refleja el verdadero significado de *Dicrypta* (G. Romero, *comunicación personal*).

Esta interpretación del nombre *Dicrypta* difiere de la de Schultes & Pease (1963), quienes mencionan que el nombre *Dicrypta* hace alusión tanto de la manera en la cual la antera esta inserta en la cavidad del clinandro o a lo corto del pedúnculo de la inflorescencia la cual esta completamente cubierta por la hoja basal (Schultes & Pease, 1963). Ambas etimologías de los nombres empleados para este género son vagas y no proporcionan mucha información sobre las características morfológicas del grupo.

A pesar de que la mayoría de los tratamientos taxonómicos y estudios florísticos actuales reconocen a las especies de *Heterotaxis* como un sinónimo del género *Maxillaria* (e.g. Dressler, 1981, Ames & Correl, 1985; Dressler, 1993; Ackerman, 1995; McLeslie *et al.*, 1995; Szlachetko, 1995; Mori *et al.*, 1997; Atwood & de Retana, 1999; Dodson, 2002; Carnevali & Ramirez, 2003), varios autores han propuesto clasificaciones informales dentro de *Maxillaria* y han reconocido a *Heterotaxis* (o algunos usando el nombre *Dicrypta*) como un grupo de especies distintivo dentro de este género, con características morfológicas que sugieren que podría ser reconocido a nivel de género.

El hecho de reconocer al complejo *Heterotaxis* a nivel genérico ha sido argumentado por Brieger & Illg (1972) y por Illg (1977) en sus trabajos taxonómicos con especies brasileñas, sin embargo, estos autores prefirieron mantenerlo como un subgénero dentro de *Maxillaria*, mientras algunos lo tratan como un género válido (Barros, 2002).

En un estudio basado en las características del polinario y del número cromosómico de especies dentro de *Maxillaria*, Carnevali (1991) reconoció la alianza *Heterotaxis*, dentro de la cual ubicaba el complejo *Maxillaria crassifolia*. Este complejo comprendía tres series: la serie *Maxillaria bicallosa*, *M. crassifolia* y *M. valenzuelana*.

Esta clasificación evidenciaba además aspectos de la arquitectura vegetativa, ya que la serie *M. bicallosa* agrupaba especies sin pseudobulbos y con hojas delgadas y flores pequeñas. En la serie *Maxillaria crassifolia* se encontraban las especies simpodiales con pseudobulbos comprimidos lateralmente y en la serie *M. valenzuelana* se encontraban las especies con un hábito pseudomonopodial y sin pseudobulbos. En estas dos últimas series se encuentran las especies que son consideradas en este trabajo dentro del complejo *Heterotaxis*, las cuales comparten características en la

estructura del polinario y similitudes en las características de la flor y el hábito vegetativo. En el cuadro 2 se esquematiza la clasificación establecida por este autor, los grupos que reconoció y las especies consideradas en cada grupo.

Cuadro 2. Clasificación del complejo *M. crassifolia* (alianza *Heterotaxis*) y las especies comprendidas en cada uno de los subgrupos establecidos según Carnevali (1991).

	Series	Especies
Complejo <i>M. crassifolia</i>	<i>Maxillaria bicallosa</i>	<i>M. bicallosa</i> <i>M. chartacifolia</i>
	<i>Maxillaria crassifolia</i>	<i>M. crassifolia</i> <i>M. maleolens</i> <i>M. villosa</i> <i>M. nasuta</i> <i>M. proboscidea</i> <i>M. discolor</i> <i>M. superflua</i> <i>M. santanae</i> <i>M. violaceopunctata</i> <i>M. brasiliensis</i>
	<i>Maxillaria valenzuelana</i>	<i>M. equitans</i> <i>M. valenzuelana</i> <i>M. witsinioides</i>

Agrupando a las especies del género *Maxillaria* a nivel de sección, Christenson (1999) reconoció la sección *Iridifoliae* Pfitz., [Natur. Pflanzenf. 2(6):187. 1889. Tipo. *M. iridifolia* Reich. f. = *M. valenzuelana* (A. Rich) Nash] y ubicó en ésta sección a las especies del complejo *Heterotaxis* y *Maxillaria nasuta*, es decir, en esta sección coloca a las especies de las series *M. crassifolia* y *M. valenzuelana* consideradas por Carnevali (1991) ambos en la alianza *Heterotaxis*. De acuerdo con Christenson (1999) esta sección se caracteriza por las inflorescencias solitarias, flores carnosas, campanuladas y con labelos de no lobulados a marcadamente trilobulados.

Bajo el esquema de clasificación de Senghas (1996, 2000) de la subtribu Maxillariinae, este autor reconoce dentro del género *Maxillaria* a once grupos (*Artengruppe*) de especies, bajo este esquema de clasificación la mayoría de las especies del complejo *Heterotaxis* se ubican en el grupo VII, la especie *Maxillaria nasuta* la ubica en el grupo XI, reconoce el género *Marsupiarina* como válido y en el agrupa a *M. valenzuelana*, *M. witsinioides* y *M. equitans*. El cuadro 3 se presenta un esquema de los grupos reconocidos por este autor y a las especies incluidas en cada uno.

Cuadro 3. Ubicación de las especies del complejo *Heterotaxis* de acuerdo a la clasificación de Senghas (1996, 2000) basada en algunas características morfológicas.

Subtribu	Grupo (Artengruppe)	Especies
Maxillariinae	Artengruppe VII (Lederblättrige) <i>Heterotaxis, Dicypta</i>	<i>M. discolor</i> <i>M. maleolens</i> <i>M. crassifolia</i> <i>M. chartacifolia</i> <i>M. violaceopunctata</i>
	Artengruppe XI (Polsterartige) subgrupo b.	<i>M. nasuta</i> <i>M. bolivarensis</i> C. Schweinf. <i>M. brachybulbon</i> Schltr. <i>M. confusa</i> Ames & C. Schweinf <i>M. melina</i> Lindl. <i>M. ringens</i> Rchb. f. <i>M. chlorantha</i> Lindl. <i>M. batemanii</i> Poepp & Endl.
	Género <i>Marsupiaria</i>	<i>M. valenzuelana</i> <i>M. witsinioides</i> <i>M. equitans</i>

Revisiones recientes de las alianzas de especies dentro de *Maxillaria* (Atwood *et al.*, datos no publicados) agrupan dentro de la alianza *Dicypta* (*Heterotaxis*) tres subalianzas: *Bicallosa*, *Crassifolia* y *Valenzuelana*. En éstas últimas dos subalianzas están las especies que se agrupan dentro del complejo *Heterotaxis* (Cuadro 4). Estos autores consideran que este complejo de especies es uno de los grupos dentro de *Maxillaria* que es posible reconocer al nivel de género.

Todas estas clasificaciones apuntan al hecho de que las especies del complejo *Heterotaxis* forman un grupo muy distintivo dentro de *Maxillaria*, cercanamente relacionado al complejo de *M. bicallosa* y afines. Estas clasificaciones reflejan básicamente las afinidades vegetativas morfológicas, reconociendo un grupo de plantas en forma de abanico sin pseudobulbos y con hojas delgadas (*M. bicallosa* y *M. chartacifolia*), un grupo de especies simpodiales con pseudobulbos comprimidos lateralmente, cubiertos de vainas con limbo foliar y flores solitarias (complejo *Heterotaxis* + *M. nasuta* y afines), y un grupo de especies pseudomonopodiales sin pseudobulbos y flores similares a los otros dos complejos (*M. valenzuelana*, *M. equitans* y *M. witsinioides*) agrupadas básicamente por el particular hábito vegetativo que presentan.

Hoehne (1947) en un intento de representar la gran variabilidad de hábitos vegetativos en *Maxillaria* describió el género *Marsupiaria* (basándose en *M. valenzuelana*) para ubicar en este a *M. valenzuelana* y *M. equitans* y en tratamientos posteriores de orquídeas brasileñas, este autor siguió reconociendo a *Marsupiaria* como un género válido (Hoehne, 1953). Algunos autores consideran este género

como válido en sus tratamientos (Senghas, 1993, 1994, 2000), mientras la mayoría lo consideran como un sinónimo de *Maxillaria*. A pesar de las diferencias vegetativas, las características florales muestran evidencia de afinidad de este grupo de hábito pseudomonopodial con el resto de las especies del complejo *Heterotaxis* y varios autores las mencionan como afines (Carnevali, 1991; Christenson, 1999).

Algunos autores no justifican el reconocimiento de *Marsupiaria* como válido, ya que mencionan que por ejemplo, *M. valenzuelana* esta más relacionada a *Heterotaxis*, mientras *M. equitans* esta mas relacionada con el complejo *Camaridium* Lindl. (Barros, 2002).

Cuadro 4. Ubicación de las especies del complejo *Heterotaxis* de acuerdo a la clasificación establecida por [†]Atwood *et al.* (datos no publicados) para el género *Maxillaria*.

	Subalianzas	Especies
Alianza <i>Dicrypta</i>	Bicallosa	<i>M. bicallosa</i> <i>M. chartacifolia</i>
	Crassifolia	<i>M. crassifolia</i> <i>M. maleolens</i> <i>M. villosa</i> <i>M. nasuta</i> <i>M. proboscidea</i> <i>M. discolor</i> <i>M. superflua</i> <i>M. santanae</i> <i>M. violaceopunctata</i> <i>M. brasiliensis</i> <i>M. verecunda</i> <i>M. cymbidioides</i>
	<i>Maxillaria valenzuelana</i>	<i>M. equitans</i> <i>M. valenzuelana</i> <i>M. witsinioides</i> <i>M. fritzii</i>

En un estudio reciente de las especies brasileñas de este complejo, Barros (2002) reconoce a *Heterotaxis* como un género válido y realiza las combinaciones nuevas para cinco especies de este complejo, *H. brasiliensis*, *H. sessilis* (= *M. crassifolia*), *H. proboscidea* (= *M. proboscidea*), *H. superflua* y *H. violaceopunctata* y considera a *M. discolor* como un sinónimo heterotípico de *M. crassifolia*.

[†] <http://www.flmnh.ufl.edu/natsci/herbarium/max/database/database.htm>



Clado *Heterotaxis* - *Ornithidium*

El presente trabajo aborda el estudio de la filogenia del complejo *Heterotaxis* y su relación con otros complejos cercanamente relacionados dentro de lo que aquí se denomina como el clado *Heterotaxis* - *Ornithidium*. La designación de este clado se baso en toda la información morfológica mencionada en párrafos anteriores y en estudios preliminares con secuencias de ADN (ITS 1 & 2) del género *Maxillaria* (Whitten *et al.*, datos no publicados) (Fig. 1).

Heterotaxis es reconocido en la actualidad por la mayoría de los autores a un nivel infragenerico; incluye principalmente plantas epifitas, cespitosas y con pseudobulbos comprimidos lateralmente, excepto *M. valenzuelana* y *M. equitans*, que presentan un crecimiento pseudomonopodial sin pseudobulbos. Las especies de este complejo presentan flores de color amarillo y en algunas especies se encuentran labelos de color púrpura con producción de aromas.

A pesar de que no existen estudios sobre la biología de la polinización de las especies del complejo *Heterotaxis*, estas presentan en sus labelos callos con diferentes texturas (granos, masas cerosas o carnosas) que asemejan polen, sin producción de néctar como recompensa y presencia de fragancia en *M. maleolens* y *M. nasuta*; se especula que este pseudopolen funciona como recompensa y es recolectado por abejas del grupo Hymenoptera. Esta producción de pseudopolen ha sido observada en al menos unas 50 especies del género *Maxillaria* (Pijl & Dodson, 1966).

Este síndrome de polinización ha sido confirmado en *Maxillaria grandiflora* y *Maxillaria sanderiana* (Dodson & Frymire, 1961; Dodson, 1962). En *Maxillaria pendens* (= *Maxillaria rigida* Barb. Rodr.) se ha reportado polinización por *Stelopolybia*, una avispa vespida que al parecer colecta cera del callo del labelo (Braga, 1978).

Ornithidium es un grupo muy característico dentro de *Maxillaria*, fue descrito por Salisbury en 1812 basándose en la especie *M. coccinea* (Jacquin) L.O. Williams ex Hodge y en la actualidad la mayoría de los autores lo consideran como un sinónimo de *Maxillaria*. Este complejo comprende al menos unas 30 especies distribuidas principalmente a altas elevaciones de la región de los Andes. Es un grupo muy diverso en arquitectura vegetativa y muy característica en su morfología floral. En este complejo no existen especies con arquitectura vegetativa simpodiales con entrenudos reducidos como la que se observa en la mayoría de las especies del complejo *Heterotaxis* (Atwood, comunicación personal).

Sus características vegetativas y florales han sido siempre mencionadas como derivadas dentro de *Maxillaria*; la presencia de flores tubulares, con producción de néctar y colores brillantes principalmente rojo y amarillo sugieren polinización por aves (colibríes). Todas estas características sugieren que este complejo presenta el síndrome de polinización denominado ornitofilia (Pijl & Dodson, 1966). En este trabajo únicamente se consideran cuatro especies como representativas de este complejo (cuadro 5).

Cuadro 5. Complejos reconocidos en el presente trabajo y las especies que actualmente se incluyen en cada uno de estos. Para este trabajo solo se incluyeron en *Ornithidium* cuatro especies representativas.

Complejo	Especies
<i>Heterotaxis</i>	<i>Maxillaria crassifolia</i> (Reichb.f.) Lindley <i>Maxillaria discolor</i> (Lodd.) C. Schweinf. <i>Maxillaria cymbidioides</i> Dodson, J.T. Atwood, & Carnevali <i>Maxillaria equitans</i> (Schltr.) Garay <i>Maxillaria fritzii</i> Carnevali & Ojeda <i>ined.</i> <i>Maxillaria maleolens</i> Schltr. <i>Maxillaria nasuta</i> Reichb.f. <i>Maxillaria proboscidea</i> Reichb.f. <i>Maxillaria schuitiesii</i> Ojeda & Romero <i>ined.</i> <i>Maxillaria santanae</i> Carnevali & Ramírez <i>Maxillaria superflua</i> Reichb.f. <i>Maxillaria valenzuelana</i> (Sw.) Nash <i>Maxillaria villosa</i> (Barb.Rodr.) Cogn. <i>Maxillaria violaceopunctata</i> Reichb.f.
<i>Ornithidium</i>	<i>Maxillaria dendrobium</i> (Reichb.f.) Dressler <i>Maxillaria coccinea</i> (Jacq.) L.O. Wms <i>Maxillaria conduplicata</i> (Ames & C. Schweinf.) L. O. Wms <i>Maxillaria fulgens</i> (Reichb.f.) L.O. Wms

Hipótesis

- Si el complejo *Heterotaxis* ha sido definido en base a *M. crassifolia*, entonces todas aquellas especies con hábito similar que han sido asociadas a este complejo se ubicarán en el mismo clado el análisis filogenético.
- Si *Maxillaria valenzuelana* y *M. equitans* pertenecen a *Heterotaxis*, estas deben de agruparse con el resto de las especies formando un clado monofilético, a pesar de las diferencias en el hábito vegetativo que presentan.
- Si en la subtribu Maxilariinae el hábito simpodial es plesiomórfico, entonces si las especies pseudomonopodiales de *M. valenzuelana* y *M. equitans* pertenecen al complejo *Heterotaxis*, estas deben ser derivadas dentro del clado.

Objetivo general

- Realizar un análisis filogenético del complejo *Heterotaxis* basados en caracteres morfológicos, anatómicos y moleculares, y estudiar la evolución de la arquitectura vegetativa y los síndromes de polinización con base en la reconstrucción cladística.

Objetivos específicos

- Reconstruir la filogenia de las especies del complejo *Heterotaxis* y establecer las relaciones filogenéticas de este complejo en relación con el complejo *Ornithidium* usando caracteres morfológicos, anatómicos y moleculares.
- Determinar si las especies asociadas a *Heterotaxis* forman un grupo monofilético y si este grupo podría ser reconocido a un nivel de género.
- Estudiar la evolución de la arquitectura vegetativa del clado *Heterotaxis* - *Ornithidium*.
- Estudiar la evolución de los síndromes de polinización (avispa colectoras de polen o cera vs. ornitofilia) en el clado *Heterotaxis* - *Ornithidium*.

Bibliografía

- Ackerman JD** (1995) *An orchid flora of Puerto Rico and the virgin Islands*. Memoirs of the New York Botanical Garden. V. 73. pp.- 112-115.
- Ames O and PS Correl** (1985) *Orchids of Guatemala and Belize*. Ed. Dover. USA. Pp. 560-590.
- Atwood JT and DM de Retana** (1999) Flora Costaricensis. Tribe Maxillarieae: Subtribes Maxillariinae and Oncidiinae. *Fieldiana* 40: 1-84.
- Barros F** (2002) Notas taxonómicas para espécies brasileiras dos generos *Epidendrum* e *Heterotaxis* (Orchidaceae). *Hoehnea* 29: 109-113.
- Braga PI** (1978) Aspectos biológicos das Orchidaceae duma campina da Amazonia Central. *Acta Amazónica* 7: 1-89.
- Brieger FG and RD Ilg** (1972) O grupo *Heterotaxis* do genero *Maxillaria* Ruiz et Pavon (Orchidaceae). In: *Anais da Sociedade Botanica do Brasil - XXIII Congresso Nacional de Botânica*, Recife, pp. 93-99.
- Carnevali G** (1991) *Citology and the pollinaria in the Maxillariinae (Orchidaceae)*. Master of Science Thesis in Biology. University of Missouri-St. Louis, USA. 171 p.
- Carnevali G** (1996) Systematics, phylogeny, and twig epiphytism in *Cryptocentrum* (Orchidaceae). Ph. D. Thesis. University of Missouri-St. Louis, USA. 334 p.
- Christenson EA** (1999) *Maxillaria*, an overview. Proceedings of the 16th world orchid conference. pp. 279-292
- Dressler RL** (1981) *The orchids: Natural history and clasification*. Harvard University Press. p 332.
- Dressler RL** (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides, Press, Portland, Oregon, USA.



- Dodson CH and GP Frymire** (1961) Preliminary studies in the genus *Stanhopea*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 48: 137-172.
- Dodson CH** (1962) The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *American Orch. Soc. Bull.* 31:
- Dodson CH** (2002) Native Ecuadorian orchids V. III: *Lepanthes - Oliveriana*. Ed. Dodson trust, Florida.
- Garay LA** (1997) The identity of the type drawings of *Maxillaria* Ruiz & Pavón. *Maxillarieae* 1:3-5.
- Hoehne FC** (1947) Reajustamento de algumas especies de Maxillarieas do Brasil, com criação de dois novos generos para elas. *Arqv. Bot. Estado Sao Paulo f.m.* 2: 65-74
- Hoehne FC** (1953) Orchidaeeas. In: *Flora Brasílica*. Hoehne, F.C. (ed). Instituto de Botanica. De Sao Paulo. V. 12. pt 7. 397 p.
- Holtzmeier MA, WL Stern and WS Judd** (1998) Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). *Bot. J. Linnean Soc.* 127: 43-82.
- Illeg RD** (1977) *Maxillaria brasiliensis* Brieg. and Illeg, uma espécie nova de orquídeas da seecao Heterotaxis. In: *Trabalhos do XXI Congresso nacional de Botanica*, Rio de Janeiro, pp. 239-245.
- Lindley** (1830-1840) *Genera and Species of Orchidaceous Plants*, Ridgways, London, 44 p.
- McLeish I, NR Pearce, BR Adams and JS Briggs** (1995) *Native orchids of Belize*. Rotterdam AA, Balkema. Pp.- 89-104
- Mori SA, G Cremers, J Granvil, M Hoff and JD Mitchel** (1997) *Guide to the vascular plants of Central French Guiana. Part 1. Pterodophytes, Gymnosperms, and Monocotyledons*. Ed. New York Botanical Garden Press. USA, pp.- 314-319.
- Pfitzer F** (1889) Monandrae-Maxillariinae. In. *Orchidaceae*, 2 Teil, 6 Abteilung, *Die naturlichen Pflanzen-familien*, A. Engler and K. Prantl (eds). Leipzig, 186-188.
- Pijl L and CH Dodson** (1966) *Orchid flowers :their pollination and evolution*. Ed. University of Miami Press. p 244.
- Ruiz H and J Pavón** (1798) *Maxillaria*. In *Sistema Vegetabilium Florae Peruvianaee et Chilensis* 1. pp. 219.226
- Senghas K** (1993) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 28. In: R. Schlechter, *Die Orchidien*. Berlin: Blackwell, 1727-1776
- Senghas K** (1994) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 29. In: R. Schlechter, *Die Orchiden*. Berlin: Blackwell, 1777-1792.
- Senghas K** (2000) *Maxillaria*, un genre chaotique. *Richardiana* II (1): 29-38.
- Szlachetko DL** (1995) Systema Orchidalium. *Fragmenta Floristica et Geobotanica*. Suppl. 3:1-152.
- Schultes RE and AS. Pease** (1963) *Generic names of Orchids. Their origin and meaning*. Academic Press. USA. Pp. 116, 155-156, 195.
- Whitten WM, NH Williams and MW Chase** (2000) Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany* 87: 1842-1856.



CAPITULO II

Análisis filogenético del complejo *Heterotaxis* Lindley con base en caracteres morfológicos y anatómicos

Introducción

La reconstrucción de la historia evolutiva de un grupo de organismos en particular se basa en el método cladístico, originalmente desarrollado por Henning (Henning, 1950, 1966), este método es usado para reconstruir genealogías de los organismos y para construir una clasificación (Forey *et al.*, 1992). El objetivo del análisis cladístico es inferir la filogenia mediante la manipulación de los datos (caracteres) para la producción de un cladograma, proveer una clasificación con base en los principios filogenéticos y usar esta filogenia para entender la evolución (Stevens, 1991).

El análisis parte desde la selección del grupo interno (grupo de interés), la búsqueda de caracteres tanto en el grupo interno como en el grupo externo (teniendo cuidado de comparar estructuras homólogas) (Roth, 1988), dividir estos caracteres en estados, construir la matriz de datos y analizarla usando alguno de los algoritmos desarrollados en programas como Hennig 86, Winclada, Phylip, PAUP, etc. , basándose en los principios de parsimonia.

Finalmente, de las filogenias obtenidas se establece un sistema de clasificación y estos cladogramas son usados para estudiar los procesos evolutivos.

En el presente capítulo se presenta un análisis filogenético de las especies del complejo *Heterotaxis* basada en caracteres morfológicos y anatómicos.

Materiales y métodos

Taxa terminales

Grupo interno y especies excluidas

En el complejo *Heterotaxis* se han asociado unas 17 especies y de estas únicamente se incluyeron 14 especies (cuadro 6); a pesar de que algunos autores relacionan a *Maxillaria witsinioides* con el complejo *Heterotaxis*, la evidencia molecular reciente la ubica más relacionada con las especies del complejo *Maxillaria acuminata* (Whitten *et al.*, *datos no publicados*). Una revisión detallada de la morfología también sugiere una mayor afinidad de *M. witsinioides* con la alianza de *M. acuminata* - *M. notylioglossa* dentro de *Maxillaria*, razones por las cuales no se incluye a *M. witsinioides* en este estudio. Tampoco se incluyeron en el grupo interno a *M. bicallosa* ni a *M. chartacifolia*. Del complejo *Ornithidium* se incluyeron 4 especies representativas (cuadro 6).

Cuadro 6. Especies consideradas en el análisis filogenético de los complejos *Heterotaxis* y *Ornithidium*.

Taxón	Complejo
<i>Maxillaria crassifolia</i> (Reichb.f.) Lindley	<i>Heterotaxis</i>
<i>Maxillaria cymbidiodes</i> Dodson, J.T. Atwood, & Carnevali	
<i>Maxillaria discolor</i> (Lodd.) C. Schweinf.	
<i>Maxillaria equitans</i> (Schltr.) Garay	
<i>Maxillaria fritzii</i> Ojeda & Carnevali ined	
<i>Maxillaria maleolens</i> Schltr.	
<i>Maxillaria nasuta</i> Reichb.f.	
<i>Maxillaria proboscidea</i> Reichb.f.	
<i>Maxillaria schultesii</i> Ojeda & Romero ined	
<i>Maxillaria santanae</i> Carnevali & Ramírez	
<i>Maxillaria superflua</i> Reichb.f.	
<i>Maxillaria valenzuelana</i> (Sw.) Nash	
<i>Maxillaria villosa</i> (Barb.Rodr.) Cogn.	
<i>Maxillaria violaceopunctata</i> Reichb.f.	
<i>Maxillaria adendrobium</i> (Reichb.f.) Dressler	<i>Ornithidium</i>
<i>Maxillaria coccinea</i> (Jacq.) L.O. Wms	
<i>Maxillaria conduplicata</i> (Ames & C. Schweinf.) L. O. Wms	
<i>Maxillaria fulgens</i> (Reichb.f.) L.O. Wms	

Grupos externos

Para determinar la polaridad de los caracteres se utilizó la estrategia de comparación con varios grupos externos (Nixon and Carpenter, 1993; Barriel and Tassy, 1998). En este análisis se consideraron cuatro taxa como grupos externos.

La selección de los grupos externos se basó en las hipótesis filogenéticas de análisis previos basados en secuencias de ADN (ITS 1 y 2, *matK*, el intron *trnL* y el espacio intergene *trnL-F*) de la tribu Maxillariae Pfitzer (Whitten *et al.*, 2000), la subtribu Maxillariinae *sensu* Whitten *et al.*, (Whitten *et al.*, datos no publicados) y del género *Lycaste* L. (Ryan *et al.*, 2000).

De estos análisis se seleccionaron cinco especies como grupos externos de los géneros *Lycaste* Lindl., *Xylobium* Lindl., *Maxillaria* Ruiz & Pav. y *Cryptocentrum* Benth.; los taxa terminales seleccionados fueron *Lycaste cruenta*, *Xylobium zarumense*, *M. bicallosa* y *Cryptocentrum latifolium*.

El género *Lycaste* ha sido clasificado, junto con otros siete géneros, dentro de la subtribu Lycastinae (Dressler, 1993), sin embargo, análisis recientes sitúan a este género como parte de la subtribu Maxillariinae (Whitten *et al.*, 2000). La especie seleccionada como representativa de este género pertenece a la sección *Deciduoseae* Fowlie (Ryan *et al.*, 2000).

El género *Xylobium* se encontraba ubicado en la subtribu Lycastinae (Dressler, 1993), pero estudios recientes basados en secuencias de ADN (ITS) transfirieron las Lycastiinae dentro de Maxillarinae (Whitten *et al.*, 2000).

De acuerdo con Whitten *et al.* (*datos no publicados*) estos dos géneros son de los más relacionados con la subtribu Maxillarinae s.s y *Lycaste* es el grupo más externo en el presente estudio. Estos dos géneros se encuentran en los clados más cercanos de las especies de *Maxillaria* s. l. y de los géneros *Cryptocentrum*, *Anthosiphon*, *Mormolyca*, *Trigonidium*, *Pithiphyllum*, *Cyrtidiorchis* y *Chrysosyncnis*.

Maxillaria bicallosa junto con *M. chartacifolia* han sido agrupadas por algunos autores en el pasado junto con las especies del complejo *Heterotaxis* (Carnevali, 1991); sin embargo, análisis recientes basados en secuencias de ADN sitúan a estas dos especies en un clado aparte de las especies de *Heterotaxis*, pero cercanamente relacionadas (Whitten *et al.*, *datos no publicados*). De estas dos especies se escogió a *M. bicallosa* para representar este clado y para someter a prueba su posición con respecto al complejo *Heterotaxis*.

Cryptocentrum es un género muy distintivo dentro de Maxillarinae, evidencias recientes sitúan a este género inserto dentro de *Maxillaria* s. l. y cercanamente relacionado al clado *Heterotaxis* – *Ornithidium* (Whitten *et al.*, *datos no publicados*). De este género se escogió a *Cryptocentrum latifolium* Schltr. como especie representativa. Las características usadas de esta especie representan al subgénero *Cryptocentrum*, caracterizado por plantas monopodiales, sin pseudobulbos, hojas disticas y donde la bráctea floral cubre todo el espolón sepalino (Carnevali, 1996; Carnevali, 2001).

Obtención de caracteres morfológicos vegetativos y florales

El estudio se centró en la búsqueda de caracteres cualitativos (discretos) y a pesar de que en muchos caracteres se menciona longitud, tamaño, etc., estos se codificaron en relación a sus proporciones con otros caracteres y no se les codificó como caracteres cuantitativos, teniendo cuidado de no establecer caracteres si existía un solapamiento entre los estados determinados (Stevens, 1991). Para el caso del grupo externo se utilizaron caracteres que estuvieran presentes en la especie representativa del género o grupo de especies.

Material observado

Se estudió material de herbario, incluyendo algunos ejemplares tipo, plantas vivas y colecciones en líquido. Los caracteres florales utilizados se obtuvieron de material conservado en líquido y para algunos taxa se obtuvieron de muestras de herbario re-hidratadas (cuadro 7); esta información se complementó con bibliografía (Brieger, 1977; Williams *et al.*, 1980; Atwood, 1989; Carnevali & Ramírez, 1989; Dodson & Bennett, 1989; Dodson & Mármol, 1989; Dodson & Vásquez, 1989; Hágsater & Salazar, 1990; Carnevali, 1991; McLesih *et al.*, 1995; Carnevali, 1996;

Atwood & de Retana, 1999; Romero & Carnevali, 2000; Carnevali, 2001) y algunas descripciones e iconografía de material tipo. Para el caso de *Maxillaria conduplicata* (una especie poco colectada) la información fue obtenida básicamente de descripciones y de dibujos de la literatura.

Técnicas anatómicas

Las muestras para la anatomía foliar se obtuvieron de muestras colectadas en fresco, muestras conservadas en etanol al 70 % y de material re-hidratado de muestras de herbario (cuadro 7). Previo a realizar los cortes, las muestras que fueron re-hidratadas y conservadas en alcohol al 70 %, luego se sometieron a una campana de vacío durante unas 24 hrs. con la finalidad de eliminar las burbujas en el tejido.

Se realizaron cortes transversales de hojas que se encontraban en la parte basal de las plantas y se utilizó el segundo tercio de estas. Los cortes se hicieron a mano alzada con una navaja, se colocaron en cloro comercial durante unos minutos hasta que destiñeron (la concentración de cloro varió del 5-20 % dependiendo del grosor y la textura de las hojas), se enjuagaron con agua destilada, se tiñeron con azul de toluidina al 1 % y safranina al 1 % por unos tres minutos y se enjuagaron de nuevo con agua destilada.

Finalmente, se preservaron temporalmente sobre portaobjetos con cloruro de calcio al 2 %. Los cortes se observaron en un microscopio Nikon SM2800 a distintos aumentos (1X a 6.3 X) y se fotografiaron utilizando una cámara digital Nikon coolPix 950. Estos análisis se realizaron en una o dos hojas de cada especie y revisando varios cortes de la misma hoja. Las estructuras observadas se definieron con base en trabajos previos (Esau, 1967, 1977; Arditi, 1992 y Holtzmeier *et al.*, 1998).



Cuadro 7. Ejemplares representativos de herbario y muestras en líquido estudiados para la obtención de caracteres florales y anatómicos en el análisis cladístico del complejo *Heterotaxis* y especies representativas de *Ornithidium*.

Taxón	Morfología Ejemplar de herbario Sitio de origen (Herbario)	Anatomía Ejemplar de herbario Sitio de origen (Herbario)
Grupo interno		
<i>Maxillaria adendrobium</i> (Reichb.f.) Dressler	Proctor 26543, Jamaica (NY)	Proctor 26543, Jamaica (NY)
<i>Maxillaria coccinea</i> (Jacq.) L.O. Wms	Pimentel-García 794 Rep. Dominicana (NY)	Smith 10305, Rep. Dominicana (NY)
<i>Maxillaria conduplicata</i> (Ames & C. Schweinf.) L. O. Wms	-	-
<i>Maxillaria crassifolia</i> (Reichb.f.) Lindley	Camevali 2860 Verapaz, Guatemala (CICY)	CICY 98-025, Planta en cultivo (CICY)
<i>Maxillaria cymbidioides</i> Dodson, J.T. Atwood, & Carnevali	SEL 1995-0447A	SEL 1995-0447A
<i>Maxillaria discolor</i> (Lodd.) C. Schweinf.	Crémers & Granville 13620 Valle, Colombia (CAY)	Mori et al 21314, Amazonas, Brasil (NY)
<i>Maxillaria equitans</i> (Schltr.) Garay	Camevali 2988 (CICY)	Ex García es, Planta en cultivo. Sin voucher
<i>Maxillaria fritzii</i> Carnevali & Ojeda ined	Camevall 3443 Imbabura, Ecuador (CICY)	Camevali 3443 Imbabura, Ecuador (CICY)
<i>Maxillaria fulgens</i> (Reichb.f.) L.O. Wms.	Camevali 3405 Esmeraldas, Ecuador (CICY)	Holst 5778, Belize (MO)
<i>Maxillaria maleolens</i> Schltr.	Camevali 2845 Tegucigalpa, Honduras (CICY)	Martinez 17042, Ococingo, Chiapas, Mexico (MEXU)
<i>Maxillaria nasuta</i> Reichb.f.	Steyermark 105906 Frontera Brasil-Venezuela Amazonas (VEN)	Whitten 1869 (FLAS)
<i>Maxillaria proboscidea</i> Reichb.f.	Camevali 2893 Aragua, Venezuela (CICY)	Tate 308, Brasil (NY)
<i>Maxillaria schultesii</i> Ojeda & Romero ined	Schultes-Cabrera 12788 Amazonas-Vaupés (NY)	Barriga 15892, Vaupes, Colombia (AMES)
<i>Maxillaria santanae</i> Carnevali & Ramírez	Camevali 3125 Amazonas, Venezuela (CICY)	Camevali 3125, Amazonas, Venezuela (CICY)
<i>Maxillaria superflua</i> Reichb.f.	Camevali 3213 Amazonas, Venezuela (CICY)	M. Steyermark & Dunsterville 112940, Venezuela (NY)
<i>Maxillaria valenzuelana</i> (Sw.) Nash	Killip et al. 16408 Colombia (NY)	SEL 1985-0356A
<i>Maxillaria villosa</i> (Barb.Rodr.) Cogn.	Camevali 2890, Brasil (CICY)	Atwood 5609 (SEL)
<i>Maxillaria violaceopunctata</i> Reichb.f.	Camevali 2857, Surinam CICY	SEL 1981-2139, Planta en cultivo (SEL)
Grupos externos		
<i>Maxillaria bicallosa</i> (Reichb.f.) Garay	Camevali 2898, Ecuador CICY	sin voucher
<i>Cryptocentrum latifolium</i> Schltr.	Camevali 3378 Ecuador CICY	sin voucher
<i>Xylobium zarumense</i> Dodson	Camevali 2902 Ecuador CICY	Whitten 89096, Planta en cultivo (FLAS)
<i>Lycaste cruenta</i>	Planta en cultivo, Xico, Veracruz	Sin voucher

Análisis filogenéticos

La matriz se elaboró con Winclada (Nixon, 2001). Los taxa que presentaron más de un estado fueron codificados como polimórficos (Cornet & Turner, 1999). Todos los caracteres se consideraron con el mismo peso, se utilizó parsimonia de Fitch y todos fueron considerados como no ordenados. El análisis de parsimonia se corrió usando el programa NONA (Golobof, 1993).

Se realizó una búsqueda heurística con la estrategia múltiple TBR+TBR (*mult*max**), con un total de 1000 réplicas (*mult.*1000*). Se inició cada réplica con 10 árboles en la memoria (*h/10*) y se conservaron un máximo de 1000 árboles (*hold 1000*). A cada árbol obtenido se le calculó la longitud (L) y la homoplasia se evaluó con el índice de consistencia (CI) (Kluge & Farris, 1969) y el índice de retención (RI) (Farris, 1989). A pesar de que el análisis de *bootstrap* es uno de los parámetros más comúnmente usados para el soporte de los cladogramas, se han mencionado algunos problemas asociados con este, tales como su sensibilidad al orden con el que se adicionan los terminales en el análisis, el hecho de no suprimir las ramas de longitud cero y reemplazar los caracteres en una nueva terminal (Sanderson, 1995; Farris *et al.*, 1996). Por este motivo, en este estudio se decidió utilizar un análisis de *jackknife* (Farris *et al.*, 1996). Este análisis se realizó con 1000 réplicas (*h 1000*), realizando 10 réplicas de la búsqueda (*mult* 10*) y reteniendo 10 árboles en la memoria (*h/10*).

El soporte de las ramas se evaluó mediante el índice de Bremer (Bremer, 1988, 1994) ó también conocido como el índice de soporte de Bremer (SI) (Kluge & Wolf, 1993; Davis, 1993) o índice de decaimiento (*decay index*) (Olmstead *et al.*, 1993).

Este valor se obtuvo sometiendo la matriz de caracteres y el árbol obtenido al programa NONA desde Winclada; sometiendo la matriz a una búsqueda TBR y reteniendo los árboles de longitud mayor a la del árbol en la memoria. Para el análisis se usó una memoria de 10000 árboles (*h 10 000*), tomando un número de pasos extra de 10 con el comando *bs 10* en NONA.

La optimización en cladística es un proceso realizado en dos pasos (descendente y ascendente) para la asignación óptima de los estados de carácter en cada nodo (Farris, 1969; Fitch, 1971). Durante el paso descendente se obtiene la longitud del árbol y en el paso ascendente se asignan los estados de carácter definitivos para cada nodo. Una vez que se han asignado los estados óptimos para todos los nodos (incluyendo los terminales), se puede interpretar la evolución del carácter y entonces es posible inferir también la dirección de cambio. Para la interpretación de la evolución de la arquitectura vegetativa y de los síndromes de polinización se utilizó la optimización ACCTRAN (*fast*).



Resultados

Caracteres

Un total de 58 caracteres morfológicos y anatómicos fueron usados para la construcción de la matriz de datos (ver apéndice). De estos 17 fueron caracteres morfológicos vegetativos, 30 fueron caracteres morfológicos de estructuras vegetativas y 11 caracteres anatómicos foliares. A continuación se describen cada uno de los caracteres utilizados y los criterios usados para el establecimiento de cada uno de los estados considerados.

Caracteres morfológicos vegetativos

- 1. Seudobulbos.**- El términoseudobulbo se aplica a las secciones engrosadas de los tallos. En Maxillarinae losseudobulbos son heteroblásticos, es decir, presentan un solo entrenudo (Dressler, 1981). Su presencia se encuentra asociada a plantas con un hábito de crecimiento simpodial, estando ausentes en los hábitosseudomonopodial y monopodial. Sin embargo, en el presente estudio se observaron varios tipos de crecimiento simpodial asociado conseudobulbos y con patrones de formación de estos. Codificación:seudobulbos presentes (0), ausentes (1).
- 2. Superficie delseudobulbo.**- Se observó variación en la superficie de losseudobulbos en los ejemplares herborizados. En este estudio se consideraron 4 estados para este caracter; se observaronseudobulbos surcados con cicatrices densas ubicadas en posición longitudinal, estas se encontraban desde la base delseudobulbo hasta el extremo apical donde se articula la hoja, la superficie de estos era generalmente opaca, aunque en algunas especies, eg. *Maxillaria violaceopunctata*, la superficie presentaba cierto brillo (Fig. 2A). Otrosseudobulbos presentaban una superficie con escasos surcos (incluso lisos) y con un brillo muy característico, como si la superficie hubiese sido barnizada (Fig. 2B). Las especies estudiadas en *Ornithidium* presentaban cicatrices menos densas, estas no se encontraban en posición longitudinal, sino que se encontraban en forma irregular, similar a grietas sobre la superficie, sin brillo y generalmente opacas. (Fig. 2C). En *Lycaste* y *Xylobium* losseudobulbos presentaban unas cicatrices poco densas, generalmente en forma reticulada e irregular, los espacios entre los surcos podían ser grandes o los surcos podían estar muy apretados (Fig. 2D). Codificación: con costillas densas longitudinales (0), con brillo y costillas escasas (1), con costillas irregulares (2), costillas reticuladas (3).
- 3. Forma delseudobulbo.**- La forma delseudobulbo se encuentra asociado a la relación de las dimensiones del ancho y largo, lo que da lugar a la forma de esta estructura. En este estudio se establecieron cuatro estados para la forma delseudobulbo. En *Lycaste cruenta* losseudobulbos son ovoides y comprimidos lateralmente y presentan unas espinas en el ápice cuando las hojas se caen. *Xylobium* presenta una variación en la forma delseudobulbo, pero la mayoría de

las especies estudiadas de éste género junto con la especie tomada como representativa presentan pseudobulbos fusiformes (Fig. 2E). La forma del pseudobulbo en este género es variable y podría ser un carácter informativo dentro de este. Pseudobulbos oblongos y comprimidos lateralmente se observaron en el complejo *Heterotaxis* (Fig. 2A y B); en las plantas vivas estos son más comprimidos lateralmente en el ápice y presentan un ensanchamiento en la base. Los pseudobulbos estudiados en *Ornithidium* son ovoides, no se encuentran comprimidos lateralmente y tienen casi el mismo largo que ancho (Fig. 2.C). Codificación: fusiforme (0), oblongo comprimido lateralmente (1), ovoide no comprimido lateralmente (2), ovoide comprimido lateralmente con espinas en el ápice (3)

4. Arquitectura vegetativa.- Se encontró una gran variación en la arquitectura vegetativa de las especies estudiadas. Cada uno de las arquitecturas vegetativas establecidas se debió a características encontradas en cada una que las caracterizaban. En este estudio se consideraron las siguientes arquitecturas vegetativas:

Simpodial, en este tipo de arquitectura vegetativa se producen simpodios a intervalos constantes, este simpodio consta de una sección del rizoma cubierto de vainas o pre-yema de renuevo y de otra sección en donde generalmente se produce el pseudobulbo (post-yema de renuevo). Los simpodios pueden ramificarse y formar plantas con apariencia cespitosa (Fig. 2F).

Monopodial, en este tipo de arquitectura vegetativa no hay pseudobulbos y existe un crecimiento apical continuo y es posible observar ramificaciones de estos tallos, aunque no hay un patrón constante y predecible (Fig. 2G).

Seudomonopodial, este tipo de arquitectura carece de pseudobulbos y únicamente se observa un rizoma en el sustrato (pre-yema de renuevo). De este rizoma surgen los seudomonopodios sin ramificaciones y con crecimiento limitado. Una vez que el seudomonopodio ha alcanzado determinado tamaño, otro seudomonopodio se origina del rizoma; esta arquitectura tiene el mismo patrón de producción de vainas que la arquitectura simpodial; primero se producen vainas sin limbo y luego las vainas con limbo foliar donde únicamente se producen las flores. Este tipo de crecimiento se observó en *M. equitans* y en *M. valenzuelana* (Fig. 2H).

Sigmoides, en este tipo de crecimiento hay hojas sigmoides, sin pseudobulbos y las plantas tienen forma de abanico (Fig. 2I).

Codificación: simpodial (0), monopodial (1), seudomonopodial (2), sigmoide (3).

5. Entrenudos de la pre-yema de renuevo. El término pre-yema de renuevo se le aplica a la sección que está formada por los entrenudos que separan dos tallos adyacentes (Solano, 2002); cuando este segmento crece postrado se le denomina rizoma (Dressler, 1993) (Fig. 2J [PR]). En esta sección se encuentran las raíces y las vainas que no presentan limbo foliar; en algunas especies las vainas pueden estar más envoltorios que en otras. Algunos autores denominan a esta región como la parte basal o subterránea (Rasmussen, 1986), sin embargo, cuando esta

se encuentra en forma ortotrópica o plagiotrópica crea confusión con el tallo aéreo y hace difícil la identificación entre ambos. Se encontró variación en el tamaño de los entrenudos de este segmento en aquellas plantas que presentaban un crecimiento por simpodios (simpodiales y pseudomonopodiales). En algunas especies los entrenudos eran reducidos, lo que ocasionada que los pseudobulbos se encontraran muy agrupados. En otras los entrenudos no se encontraban reducidos y se encontraban alargados, ocasionando que los pseudobulbos se formaran a intervalos mas o menos constantes (7-10 entrenudos), pero separados (Fig. 2J).

Codificación: reducidos (0), alargados (1).

6. **Forma de crecimiento del segmento pre-yema de renuevo.** Usualmente esta región se encuentra postrada al suelo y es a lo que comúnmente se le denomina rizoma en las plantas simpodiales (Dressler, 1993). Sin embargo, en algunas especies este segmento puede estar creciendo en forma erecta (ortotrópico). Este tipo de crecimiento fue observado en algunas especies del complejo *Ornithidium*. En *M. fulgens*, por ejemplo, se forma un pseudobulbo en la parte basal de la planta (que correspondería a la post-yema de renuevo) y a partir de este pseudobulbo la siguiente pre-yema de renuevo es ortotrópica, al final de esta se forma de nuevo otra post-yema de renuevo que resulta en otro pseudobulbo (Fig. 2K). Este tipo de crecimiento presenta el mismo patrón de crecimiento que por ejemplo *M. coccinea*, la cual tiene la pre-yema de renuevo en posición postrada (Fig. 2J). Codificación: crecimiento postrado (0), crecimiento ortotrópico (1).
7. **Entrenudos de la post-yema de renuevo.** Esta sección comprende de la región de la yema de renuevo al ápice de la planta (Fig. 2J [PTR]); a diferencia de la post-yema de renuevo establecida por Solano (2002), esta región no termina con la yema de la inflorescencia, ya que ésta se forma en las axilas de las hojas. En la post-yema de renuevo se encuentran en la base las vainas imbricadas que carecen de limbo foliar (~4-10 vainas), seguida de las vainas que tienen en el ápice una hoja articulada (~4-6 vainas) y el pseudobulbo en el ápice (cuando esta presente). La producción de las inflorescencias ocurre únicamente en las axilas de las vainas con limbo foliar. En algunas especies, como en *M. crassifolia*, la post-yema de renuevo presenta entrenudos reducidos, y todas las vainas producidas (con limbo y sin limbo) se encuentran fuertemente agrupadas en torno al pseudobulbo (Fig. L). En otras especies como *M. equitans*, los entrenudos de este segmento se encuentran alargados y han suprimido la producción de pseudobulbos (Fig. 2H). Codificación: reducidos (0), alargados (1).
8. **Superficie radicular.-** Para este caracter se establecieron 3 estados de acuerdo a las diferencias observadas: las especies de *Xylobium* y *Lycaste* se caracterizaron por una superficie radicular densamente pilosa. En otras especies la superficie de las raíces estaba lisa sin ninguna excrescencia, con algunas escamas y de una consistencia esponjosa al contacto. En otras la superficie radicular es glabra, con algunas escamas, estas alargadas y de una consistencia esclerótica, dándole a la superficie una textura y consistencia con mayor dureza al tacto. En otras esat era glabra pero de una consistencia distinta a las anteriores. Codificación: pilosa (0), esponjosa (1), esclerótica (2), glabra (3).

- 9. Ápice de la hoja.-** Para la forma del ápice de la hoja se establecieron dos estados de caracter, este podía estar en forma aguda o acuminada, es decir, ambos lóbulos estaban simétricos, como en las especies de *Xylobium* y *Lycaste* (Fig. 2M); o estar en forma asimétrica y presentar dos lóbulos apicales de distinta longitud (Fig. 2L). Codificación: simétrico (0), asimétrico (1).
- 10. Pecíolo de la hoja.-** Para este caracter se establecieron dos estados; esta estructura podía estar presente como en *Xylobium* y *Lycaste* (Fig.2M). Las plantas que carecían de pecíolo presentaban un pseudopeciolo, en esta estructura los pliegues de las hojas podían o no fusionarse y daban consistencias distintas a esta estructura (Fig. 2L). Codificación: presente (0), ausente (1).
- 11. Nervio medio de la vaina quillado.-** Este término se aplico a la presencia de una estructura en la base de las vainas que presentaban limbo foliar. Esta estructura estaba presente cuando los pliegues de las vainas se fusionaban en la base y al desarticularse la hoja de la vaina, la cicatriz que se formaba en esta tenía forma de Y. Esto ocasionaba que los dos bordes no pudiesen ser desplegados en un solo plano (Fig. 2N). Esta estructura podía estar ausente y la cicatriz que quedaba al desarticular la hoja tenía una forma de V, cuando esta quilla estaba ausente los pliegues de las vainas podían extenderse en un solo plano (Fig. 2O). Codificación: presente (0), ausente (1).
- 12. Tipo de hoja.-** Dos tipos de hojas se consideraron en el estudio, las especies de *Xylobium*, *Lycaste* y otras tribus relacionadas poseen hojas plegadas (Fig. 2M), mientras los géneros agrupados en Maxillariinae s.s. se caracterizan por hojas conduplicadas (Fig. 2L). Codificación: plegada (0), conduplicada (1).
- 13. Foliación del pseudobulbo.-** Se observó una variación en el número de hojas por pseudobulbo en los grupos estudiados. En el género *Lycaste* se observan principalmente dos o tres hojas por pseudobulbo y no hay especies unifoliadas. En *Xylobium* principalmente se observan plantas con dos hojas en el ápice del pseudobulbo, siendo menos comunes las de tres hojas y las unifoliadas. Dentro del género *Maxillaria* también hay una variación en el número de hojas por pseudobulbo en los complejos de especies y al parecer esta característica ha evolucionado varias veces dentro del género. Para este caracter se establecieron dos estados, el pseudobulbo podía presentar solo una hoja en el ápice (unifoliado) ó tener más de una hoja en el pseudobulbo (multifoliado). Para *Lycaste cruenta* se considero que tenían más de una hoja en el ápice del pseudobulbo, en *Xylobium* este caracter se codificó como polimórfico, ya que en este género existen especies unifoliadas. Codificación: unifoliado (0), multifoliado (1).

- 14. Pliegues de la hoja del pseudobulbo.-** En *Maxillaria* las hojas no tienen un peciolo como en las especies de *Xylobium* o *Lycaste*, en lugar de esto se forma una estructura denominada pseudopeciolo. Estos pliegues pueden estar completamente libres, sin fusionarse en la base y pueden extenderse completamente en un solo plano (Fig. 2O). En otras especies estos pliegues se fusionan parcialmente en la base y esto evita que puedan ser extendidas en un solo plano (Fig. 2P). Codificación: sin fusionar (0), fusionadas parcialmente en la base (1).
- 15. Pliegues de la hoja.-** Se encontró variación en el grado de fusión de los pliegues de las hojas articuladas a las vainas. Para este carácter se consideró el tamaño que abarcaba la hoja desde su articulación con la vaina hasta el ápice. Los pliegues de la hoja podían estar completamente libres desde la zona de articulación de la hoja hasta el ápice de la hoja y esta podía extenderse en un solo plano (Fig. 2R). En otro estado, los pliegues se encontraban parcialmente fusionados en el primer tercio de la hoja en la zona cercana a la articulación con la vaina. En este tipo de fusión los pliegues solo se fusionaban como máximo hasta un 50 % en este sitio (Fig. 2S). En el último estado los pliegues de la hoja se encuentran fusionados. El sitio donde presentan menor fusión es en el sitio cercano a la articulación con la vaina, pero el grado de fusión es mayor al 50 %. En este estado los pliegues en el segundo y tercer tercio de las hojas se encuentran totalmente fusionados o parcialmente fusionados, pero de nuevo la proporción de los pliegues fusionada es mayor al 50 %. El grado de fusión se observó también en los cortes anatómicos. Especies como *M. equitans* presentan los dos pliegues de las hojas completamente fusionadas en casi toda su longitud (Fig. 2T). Codificación: libres (0), parcialmente fusionados (1), fusionados (2).
- 16. Haces vasculares en el envés de la hoja.-** Los haces vasculares en el envés de la hoja podían estar muy prominentes como en *Xylobium* y *Lycaste*, o ser prácticamente ausentes o poco visibles. Codificación: prominentes (0), poco visibles (1).
- 17. Vainas del pseudobulbo con limbo foliar.-** El pseudobulbo de las especies estudiadas estaba rodeado por dos tipos de vainas, unas que presentaban limbo foliar y otras que carecían de limbo. El patrón observado es que las vainas basales son las que carecen de limbo y que las que inmediatamente rodean el pseudobulbo (entre 2-6) poseen limbo foliar. Estos dos tipos de vainas se observaron en el grupo interno y no se observaron vainas con limbo foliar en las especies estudiadas de *Xylobium* y *Lycaste*. Codificación: ausentes (0), presentes (1).



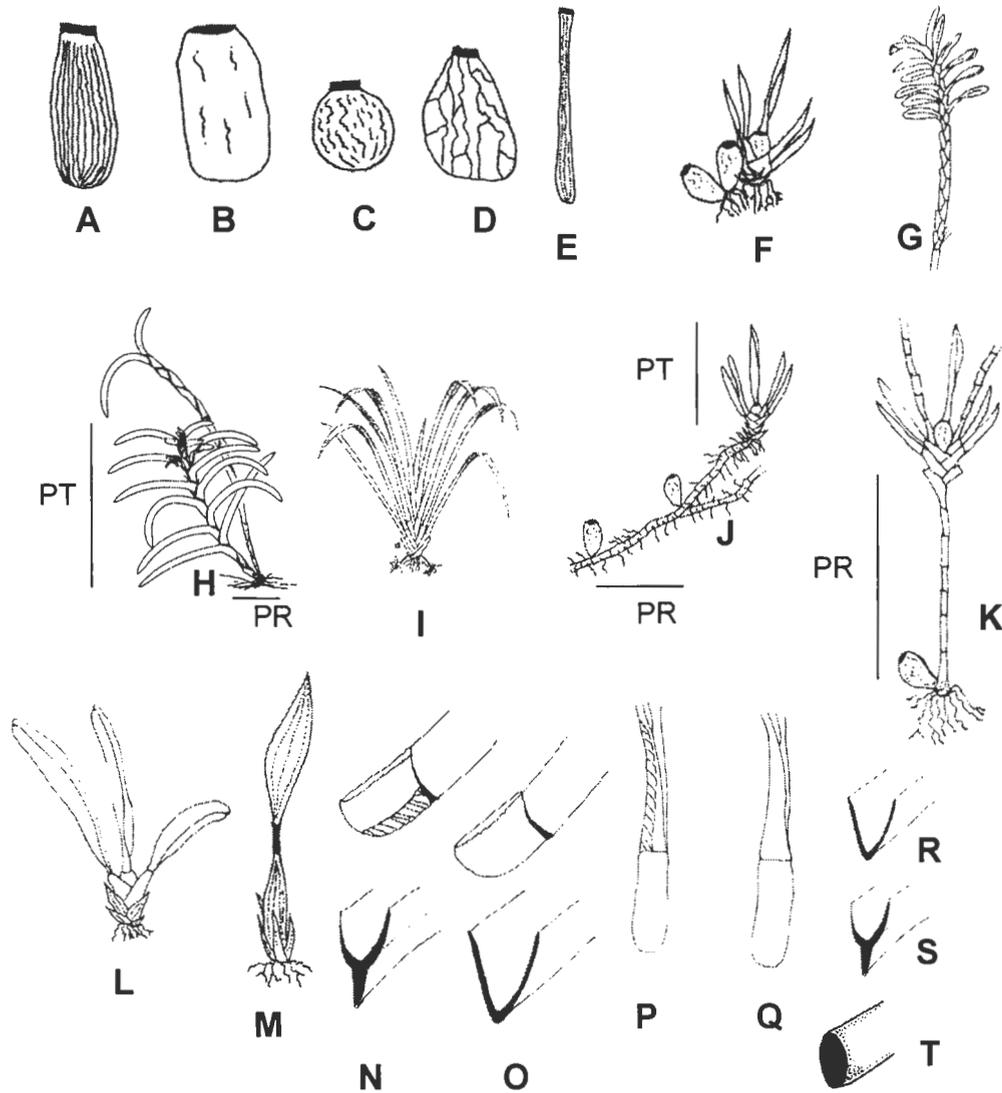


Figura 2. Variación en la superficie y forma de los pseudobulbos observados en A) las especies del complejo *Heterotaxis*, B) *Maxillaria nasuta*, C) *Ornithidium* y D-E) en *Xylobium*; F) hábito simpodial, G) monopodial H) pseudomonopodial en *M. equitans*, con la post-yema de renuevo alargada, I) sigmoide; J) con la pre-yema de renuevo [PR] y la post-yema de renuevo [PTR], K) *M. fulgens* con la pre-yema de renuevo ortotrópica; L) *M. crassifolia*, M) *Xylobium zarumense*; nervio medio guillado N) presente y O) ausente; pseudopeciolo de la hoja del pseudobulbo P) parcialmente fusionado y Q) libre; primer tercio de las hojas articuladas a las vainas mostrando los pliegues R) libres, S) parcialmente fusionados y T) fusionados.

- 18. Inflorescencias.-** Las inflorescencias de los grupos estudiados son racimos, las flores se ubican en posición axilar al raquis de la inflorescencia y usualmente florecen desde la base hasta el ápice (Dressler, 1981). La variación observada en este carácter se encuentra en el número de flores producidas por inflorescencia. En las especies de *Xylobium* se produce desde pocas a muchas flores por racimo (racimo multifloro); la inflorescencia de *Lycaste* se considera como una panícula con las ramas muy condensadas que continua creciendo y produce flores simples por mucho tiempo. En el resto de las especies del grupo interno se ha reducido el número de flores por inflorescencia y únicamente se produce una flor por inflorescencia (uniflora). Codificación: racimo multifloro (0), racimo unifloro (1), panícula (2).
- 19. Ubicación de las inflorescencias.-** Las inflorescencias podían producirse en dos partes de las plantas estudiadas, estas podían originarse en la base del pseudobulbo, como en *Xylobium* y *Lycaste* ó se originaban en las axilas de las vainas del pseudobulbo. Las inflorescencias axilares únicamente se producían en vainas que presentaban limbo foliar y aunque este estado fue constante en el grupo interno, la ubicación del tipo de vaina con la inflorescencia es una información valiosa cuando se trata de explicar la evolución de la arquitectura vegetativa de las especies en los complejos *M. nasuta*, *Heterotaxis* y *Ornithidium*. Codificación: basal (0), axilar (1).
- 20. Entrenudos del pedúnculo de la inflorescencia.-** El pedúnculo de la inflorescencia tiene una bráctea en cada entrenudo, es posible saber el número de entrenudos cuando se cuentan estas brácteas; sin embargo, hay que tener cuidado de no incluir la bráctea floral y la bráctea que envuelve toda la inflorescencia uniflora, ya que a menudo son muy similares y es difícil distinguirlas una vez separadas. La manera más segura es contar los nudos del pedúnculo una vez que se han localizado la bráctea floral y la vaina que envuelve a toda la inflorescencia. Para este carácter solo se consideraron las inflorescencias unifloras que se originaban en las axilas de las vainas con limbo foliar, ya que era fácil establecer homologías. El número de entrenudos es constante dentro de los individuos de las especies estudiadas, pero es variable dentro de las especies de un mismo género, por ejemplo en *Cryptocentrum* el número de entrenudos varia entre 3-15 (Carnevali, 1996). Para este carácter se fijaron tres estados; pedúnculos con más de cinco entrenudos en la inflorescencia como en algunas especies de *Cryptocentrum*, donde *C. latifolium* tiene 15 entrenudos. Inflorescencias con cinco entrenudos se observaron en el grupo de *M. nasuta* y afines. Pedúnculos con cuatro entrenudos se encontraron en los complejos *Heterotaxis* y *Ornithidium*. Codificación: > de cinco (0), cinco (1), cuatro (2).
- 21. Posición de las brácteas de la inflorescencia.** El pedúnculo de la inflorescencia uniflora tiene una bráctea en cada nudo, la posición de esta sobre el pedúnculo presento variación entre los grupos estudiados. Las brácteas podían envolver completamente el pedúnculo, sobrepasando el siguiente nudo del cual se

originaron, dando una apariencia articulada al pedúnculo y sin dejar partes descubiertas del pedúnculo (Fig. 3A). En el otro estado las brácteas pueden sobrepasar el siguiente nudo, pero no envuelven por completo en pedúnculo y este se encuentra descubierto en ciertas zonas, no dando esta apariencia articulada (Fig. 3B). Codificación: sin envolver el pedúnculo (0), envolviendo el pedúnculo (1).

22. Longitud del pedúnculo de la inflorescencia.- La longitud del pedúnculo de la inflorescencia depende tanto del número de entrenudos, como de la longitud de cada uno de los entrenudos. Para este caracter se consideraron tres estados. El pedúnculo podía ser corto, estos es, el tamaño de este no excedía más de dos veces el tamaño del pseudobulbo; en las plantas sin pseudobulbos el pedúnculo no era mas de dos veces del tamaño de las vainas con limbo foliar, de hecho la articulación de la hoja con la vaina era del mismo tamaño o un poco menor al tamaño del pedúnculo (Fig. 3C). En otras especies la longitud del pedúnculo se consideró como mediana, éste rebasaba el tamaño del pseudobulbo, siendo hasta más de dos veces la longitud del pseudobulbo, sin embargo, nunca era de igual o mayor tamaño que las hojas (Fig. 3D). El pedúnculo podía ser tan largo como las hojas, resultando en una estructura muy evidente en las plantas con este tamaño de pedúnculo. Codificación: corto (0), mediano (1), largo (2).

23. Tamaño del 3° y 4° entrenudo del pedúnculo de la inflorescencia. Los entrenudos del pedúnculo de la inflorescencia se designaron en forma descendente comenzando con el entrenudo más cercano a la flor. De esta manera, el primer entrenudo es aquel que se encuentra inmediatamente debajo de la flor y en forma descendente se asignan los siguientes números para el resto de los entrenudos. Se encontró variación en el tamaño de los entrenudos 3° y 4° en comparación al resto de los entrenudos de la inflorescencia. En unas especies el tamaño de estos era menor con respecto a los otros entrenudos, lo que ocasionaba que estos aparecieran como reducidos (Fig. 3E). En otras especies estos dos entrenudos tenían más o menos el mismo tamaño al resto de los entrenudos y no se veían reducidos (Fig. 3F). Codificación: reducido con respecto al resto (0), de igual tamaño que el resto (1).

24. Número de flores por axila.- La inflorescencia de *Maxillaria* es considerada uniflora, pero en algunas especies pueden producirse varias por axila; ocasionando que en una misma axila de la vaina se puedan ver varias flores producidas al mismo tiempo. El número de flores podía llegar hasta 8 o más en una misma axila, como en algunas especies del complejo *Ornithidium*. También se observó que en algunas generalmente se producen pocas; se consideraron como pocas cuando estas no excedían de tres flores simultáneas por axila. Por lo general se encontraban en las consideradas pocas casi siempre una o dos flores al mismo tiempo en la axila. Codificación: no más de tres (0), > de tres (1).

25. Longitud de la bráctea floral.- Como bráctea floral se denominó a la vaina que se encuentra inmediatamente en la articulación del pedicelo de la flor con el pedúnculo de la inflorescencia. Para este caracter se establecieron cuatro estados. Esta podía



ser corta y no llegar a cubrir completamente el ovario pero cubría el pedicelo (Fig. 3G), en otras especies estaba sin cubrir el ovario ni el pedicelo completamente (Fig. 3H) y en otras cubría el pedicelo y el ovario (Fig. 3I). Codificación: cubre el pedicelo pero no el ovario (0), sin cubrir el pedicelo ni el ovario (1), cubre el pedicelo y el ovario (2).

- 26. Longitud de la 1ª vaina del pedúnculo de la inflorescencia.** Las vainas del pedúnculo se denominaron a partir de la bráctea floral en orden descendente desde la flor hasta la base de la inflorescencia. La primera vaina es aquella que se encuentra por debajo de la bráctea floral. El tamaño de esta vaina podía variar y se establecieron tres estados para este carácter. La vaina podía alcanzar la articulación de la bráctea floral pero no era tan larga como para cubrir el ovario de la flor (Fig. 3J). En el otro estado la longitud de la vaina alcanzaba a cubrir el ovario de la flor y cubría la bráctea floral (Fig. 3K). En otras especies la vaina es corta y no alcanza a cubrir la articulación de la bráctea floral (Fig. 3L). Codificación: sin cubrir el ovario (0), cubre el ovario (1), sin cubrir la siguiente articulación (2).
- 27. Longitud de la 4ª vaina del pedúnculo de la inflorescencia.** Siguiendo la denominación para las vainas del pedúnculo, la cuarta vaina es la que cubre el cuarto entrenudo del pedúnculo. Esta vaina presentó variación en su tamaño, podía ser corta y cubrir únicamente el siguiente nudo (Fig. 3F [4]) ó larga y alcanzar los dos siguientes nudos (Fig. 3E [4]). Esto podía ser reflejo de que los entrenudos estuvieran más cortos y la longitud de las brácteas sea dependiente de esto, pero podía haber entrenudos más o menos de igual tamaño con brácteas variables en longitud. Codificación: cubre el siguiente nudo (0), cubre los dos siguientes nudos (1).
- 28. Longitud de la 3ª vaina del pedúnculo de la inflorescencia.** La longitud de esta vaina fue de igual manera variable dentro de las especies estudiadas. La vaina podía ser de una longitud corta y cubrir solo el siguiente entrenudo (Fig. 3F [3]) ó cubrir los dos siguientes entrenudos (Fig. 3E [3]). Codificación: cubre el siguiente nudo (0), cubre los dos siguientes nudos (1).
- 29. Grosor del pedicelo del ovario.** Se observó variación en el grosor del pedicelo del ovario. Para este estado se establecieron dos estados. En un estado el grosor del pedicelo era el mismo en comparación con el resto del pedúnculo de la inflorescencia (Fig. 3 M). En las especies del complejo *Heterotaxis* el pedicelo es más grueso y costillado en comparación al resto del pedúnculo de la inflorescencia (Fig. 3N). Es muy evidente en material fresco y es poco perceptible cuando se estudia las muestras de herbario. Codificación: igual grosor al pedúnculo (0), mas grueso que el pedúnculo (1).
- 30. Largo relativo del pedicelo del ovario con respecto al fruto.-** El pedicelo de la flor abarca desde el sitio de la articulación con el pedúnculo de la inflorescencia hasta el ovario de la flor. En Orchidaceae no es fácil distinguir el pedicelo de ovario cuando se observa una flor, ya que no es posible distinguir el ovario del pedicelo a

simple vista y únicamente es posible diferenciarlo con estudios anatómicos; sin embargo, cuando se forma el fruto es posible distinguir ambas estructuras y visualizar su tamaño. Los pedicelos podían ser largos, es decir, eran más de dos veces el tamaño del fruto o la flor y ocasionaban que estas estructuras estuvieran péndulas (Fig. 3O). En el otro estado, el pedicelo se consideró corto, ya que en comparación con el fruto o la flor eran de igual o de menor tamaño (Fig. 3P). Codificación: mayor que el fruto (0), menor que el fruto (1).

31. Ápice del fruto.- Esta porción apical fue considerada como la región inmediata después del sitio donde se articula la columna. Esta parte del fruto podía presentar un adelgazamiento (constricción), como si esta zona fuese estéril y no tuviera una producción de semillas; esta región era mucho más delgada que la parte media del fruto (Fig. 3O). En el otro estado, el fruto no presentaba esta constricción súbita en la parte apical y esta zona tenía más o menos el mismo grosor de la parte media del fruto (Fig. 3P). Codificación: atenuada (0), sin atenuación (1).

32. Posición de la columna con respecto al ovario.- La posición en la que la columna se une al ovario mostró una variación en aquellas especies que tenían un pie columnar reducido. La columna podía unirse al ovario con una cierta inclinación, lo que ocasionaba que en esta parte se formara un ángulo (de aproximadamente 45°), este era evidente en la flor y también cuando el fruto ya se encontraba formado (Fig. 3Q); este era constante, ya que si en la flor se observaba esta inclinación, este persistía también en el fruto. Por otro lado, la columna se podía unir sin ninguna inclinación, quedar en forma perpendicular y tener la misma orientación que el ovario (Fig. 3R). Codificación: en ángulo de 45° (0), perpendicular (1), en ángulo recto (2).

33. Pie columnar.- El pie columnar es una extensión ventral de la base de la columna en el sitio donde se une el labelo (Dressler, 1981). Se encontró variación en la proporción del tamaño de esta estructura con respecto al resto de la columna. En unas especies esta estructura se consideró prominente, ya que podía llegar a ser de mayor tamaño con respecto a la columna; sin embargo, se consideró que esta estructura era prominente cuando llegaba a ser al menos de la mitad del tamaño del resto de la columna (Fig. 3S). Se consideró que esta estructura estaba reducida cuando era de menor tamaño de la mitad del tamaño de la columna; en general en aquellas especies en la que se consideró reducida esta estructura era poco evidente y en la mayoría de las especies era el 10 % del tamaño de la columna (Fig. 3T). Para el género *Cryptocentrum* se consideró que esta estructura podía alcanzar la articulación del pedicelo de la flor, por lo tanto era mucho más larga que en los otros estados (Fig. 3U). Codificación: prominente (0), reducido (1), alcanza la articulación del pedicelo (2).

34. Forma de la columna.- Se encontró variación en la forma de la columna para las especies estudiadas. En algunas la columna tenía una forma arqueada, donde el sitio de unión de la columna al ovario se encontraba a la misma altura que el estigma y el resto de la columna tenía esta forma de arco (Fig. 4A). En otras especies la columna presentaba una forma sigmoide, el estigma estaba por arriba



de la articulación de la columna al ovario y el espacio de la columna entre estas dos zonas presentaba esta forma de S (Fig. 4B). En el último estado, la columna no presentaba una forma en particular y estaba alineada con la columna, a esta forma de la columna se le denominó recta (Fig. 4C). Codificación: arqueada (0), sigmoide (1), recta (2).

35. Unión del labelo a la columna.- El labelo podía estar unido a la columna de dos formas, podía estar articulado a la columna, ocasionando que tuviese movilidad (Fig. 4D), ó podía estar fusionado a la columna y por lo tanto carecer de una movilidad (Fig. 4E). Este último estado se observó en la especie del complejo *Ornithidium*. Para este caracter no se asignó una polaridad, sin embargo, varias características observadas en esta fusión hacen suponer que este último estado es derivado. En la parte de la fusión del labelo, se observaban unos pliegues a los lados de la unión, lo que ocasionaba que perdiera movilidad y permitiera la acumulación de líquidos (néctar); sin embargo, era evidente una zona de diferente textura que recordaba un labelo articulado. Sin la presencia de estos pliegues, este tipo de unión de labelo se consideraría como articulado. Codificación: articulado (0), fusionado (1).

36. Superficie de la columna. Generalmente la parte ventral de la columna es mas lisa, incluso brillante, que la parte dorsal, en este caso se consideró que ambas partes presentaban una textura lisa, aunque ligeramente diferente (Fig. 4F). En otras especies se observó que ambas superficies, dorsal y ventral tenían una superficie papilosa, muy evidente y distinta a las observadas en los grupos (Fig. 4G). En las especies del género *Lycaste* se observaron excrescencias más prominentes en forma de pelos en la parte ventral de la columna, a esta superficie se le denominó pilosa. Codificación: lisa (0), papilosa (1), pilosa (2).

37. Superficie dorsal de los pétalos. Se encontró variación en la textura de la parte dorsal de los pétalos. Para este caracter se establecieron dos estados. Se podía observar una textura lisa similar al resto del pétalo (Fig. 4H) y en algunas especies esta zona presentaba una textura papilosa, similar a la textura que se encontraba en la columna (Fig. 4I). Codificación: lisa (0), papilosa (1).

38. Mucrón sub-apical del pétalo.- El mucrón es una estructura que se forma por debajo del ápice del pétalo, asemejando una quilla. Esta estructura es más evidente cuando se observa el reverso de los pétalos. En el análisis de se codificaron dos estados para este caracter, presente y ausente. Codificación: ausente (0), presente (1).

39. Mucrón sub-apical del sépalo. El mucrón es una estructura que se forma por debajo del ápice del sépalo, asemejando una quilla o una uña. Esta estructura es más evidente cuando se observa el reverso de los pétalos. Codificación: ausente (0), presente (1).

40. Textura de la flor. Se encontró variación en la textura de las flores en los distintos grupos. Para este caracter se establecieron tres estados. Unas flores presentaban

una textura membranosa, las partes de las flores eran delgadas y con pocas capas de grosor. En otras especies la textura se designó como fibrosa, ya que estas presentaban una consistencia fuerte y eran evidentes fibras en las partes de la flor; estas flores se podían manipular con facilidad, ya que son flexibles y son difíciles de romper cuando se doblan. En otras especies las partes de la flor presentaban una mayor cantidad de capas de tejidos dando una apariencia carnosa, estas flores se rompían fácilmente al doblarlas. Codificación: membranosa (0), carnosa (1), fibrosa (2).

41. Margen de los pétalos. Se observó variación en la textura de la superficie de los pétalos en las plantas estudiadas. Para este carácter se establecieron dos estados. El margen de los pétalos podía presentar una textura lisa (Fig. 4J) en toda la superficie ó tener la parte apical con una textura papilosa, lo que le daba una apariencia serrada al margen (Fig. 4K). Codificación: liso (0), serrado (1).

42. Lóbulos del labelo. Se encontró variación en la forma del labelo cuando este se extendía en un solo plano. Esta variación se codificó únicamente para las especies que tenían flores carnosas. Para este carácter se establecieron dos estados. El labelo podía presentar lóbulos en la parte media del labelo, al desplegarlo en un solo plano el labelo tenía dos lóbulos laterales bien marcados y un ápice bien marcado (Fig. 4L). Las especies que no presentaban estos lóbulos tenían una forma más o menos entera cuando se extendía en un plano (Fig. 4M). Codificación: entero con ápice ovado (0), ligeramente trilobulado con ápice ovado (1), ligeramente trilobulado con ápice cuadrado (2), ligeramente trilobulado con ápice agudo (3), entero y agudo en el ápice (4).

43. Forma del callo.- Esta estructura es variable dentro de los complejos estudiados y se codificaron 5 estados para este carácter. Se encontró un callo carnoso que se encontraba desde la base hasta la mitad del labelo, este tipo de callo tenía la misma textura en toda su superficie (Fig. 4L). En otras especies se observó un callo carnoso desde la base hasta el ápice del labelo, este callo podía estar continuo o presentar una discontinuidad a mitad del labelo y tenía la misma textura en toda su superficie (Fig. 4M), se observaron callos con dos texturas, en la primera parte era de textura carnosa y la segunda mitad de textura farinosa (en forma de granos de polen ó pseudopolen) (Fig. 4N), en otras especies el callo tenía una textura carnosa desde la base hasta la mitad del labelo y en la segunda mitad formaba una depresión o concavidad (Fig. 4O). En otras especies se observó un callo de textura carnosa reducido únicamente a la parte media y el ápice únicamente (Fig. 4P). Codificación: carnoso de la base a la mitad (0), carnoso de la base al ápice (1), carnoso de la base a la mitad y farinoso en el ápice (2), carnoso a la mitad y cóncavo en el ápice (3), reducido (4), ausente (5).

- 44. Polinario.** La información usada para el establecimiento de los tipos de polinario se baso principalmente en las observaciones de Carnevali (1991) y de algunas descripciones e ilustraciones de las especies. En pocas especies fue posible obtener y observar los polinarios. Para este estado se establecieron cinco estados. El polinario tipo I se caracterizaba por carecer de estipe o presentarlo muy reducido, los polinios eran desiguales y el viscidio lunado (Fig. 4Q). El tipo II se caracterizaba por tener el estipe romboide-subcuadrado con polinios desiguales y viscidio en forma de casco de caballo (Fig. 4R). El tipo III tenía polinios redondos más o menos del mismo tamaño y viscidio pequeño, el color de esta estructura es hialina (Fig. 4S). El polinario tipo IV del género *Lycaste*. El polinario tipo V poseía polinios pequeños, obpiriformes y subdesiguales, con viscidio pequeño, subcircular o redondeado y sin estipe (Fig. 4T). El tipo VI presenta un viscidio arqueado, un estipe reducido y los polinios proporcionalmente del mismo tamaño. Codificación: tipo I (0), tipo II (1), tipo III (2), tipo IV (3), tipo V (4), tipo VI (5).
- 45. Bordes de la antera.-** Se observó variación en los bordes de la antera que se unen a la columna. En el complejo *Ornithidium* estos se doblaban hacia los lados, dando una apariencia a la antera de una ventosa (Fig. 4U), en los otros complejos la el borde de la antera no se une de esta manera a la columna y la antera no tiene esta apariencia de ventosa (Fig. 4V). Codificación: sin pliegue (0), con pliegue (1).
- 46. Margen de la antera.** La superficie de la antera que se une a la columna podía presentar dos texturas. En algunas especies esta parte de la antera presentaba unas excrecencias que le conferían una superficie fimbriada (Fig.4V); en otras especies esta se encontraba sin excrecencias y lisa (Fig. 4Y). Codificación: fimbriada (0), lisa (1).
- 47. Forma del labelo.** Se observó variación en la forma del labelo cuando este se encontraba unido a la columna. En algunas especies el labelo visto de perfil tenía una forma de saco, la primera parte del labelo formaba una bolsa que le daba esta apariencia al labelo (Fig. 4G). En otras especies el labelo presentaba una forma de bisagra (Fig. 4F). Codificación: no sacciforme (0), sacciforme (1).

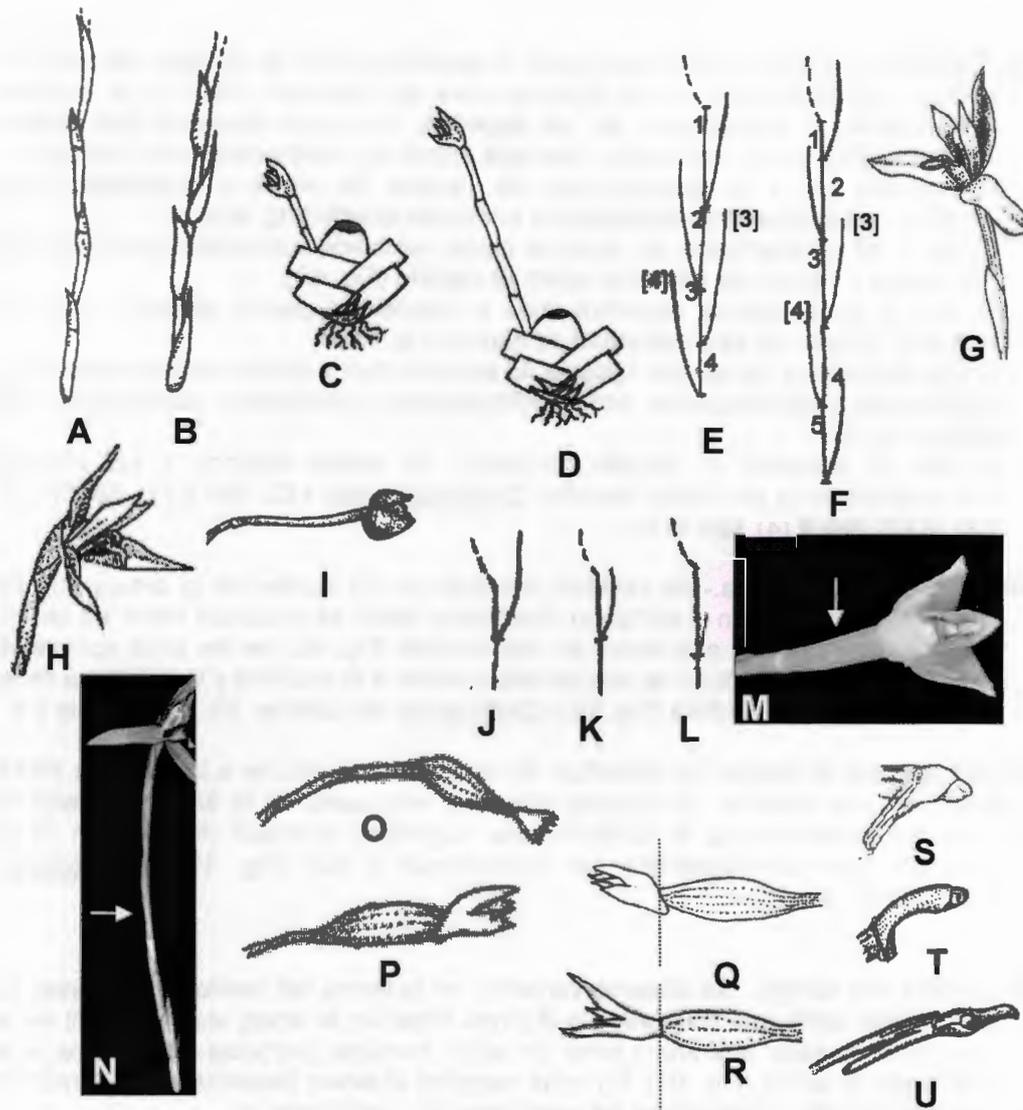


Figura 3. Variación en la disposición de las vainas del pedúnculo de la inflorescencia, (A) vainas envolviendo el pedúnculo, (B) cuando esta no envolvía totalmente al pedúnculo disposición de las vainas del pedúnculo de la inflorescencia; variación en la longitud del pedúnculo de la inflorescencia, (C) corto y (D) más largo que los pseudobulbos; (E) y (F) variación en el tamaño de las vainas y entrenudos de la inflorescencia; (G). bráctea floral sin cubrir el ovario pero sí el pedicelo, (H) cubriendo el pedicelo y el ovario, (I), sin cubrir el ovario ni el pedicelo; (J) 1ª vaina cubriendo el ovario, (K) cubriendo la bráctea floral y (L) sin alcanzar la articulación; (M) pedicelo del ovario engrosado y (N) de grosor similar al pedúnculo; (O) pedicelo del ovario largo y (P) corto; (Q) ápice del fruto adelgazado y (R) sin zona de adelgazamiento; (Q) articulación de la columna al ovario en ángulo y (R) perpendicular; variación en el pie columnar, (S) largo, (T) reducido y (U) cuando alcanza la articulación del pedicelo (U) .

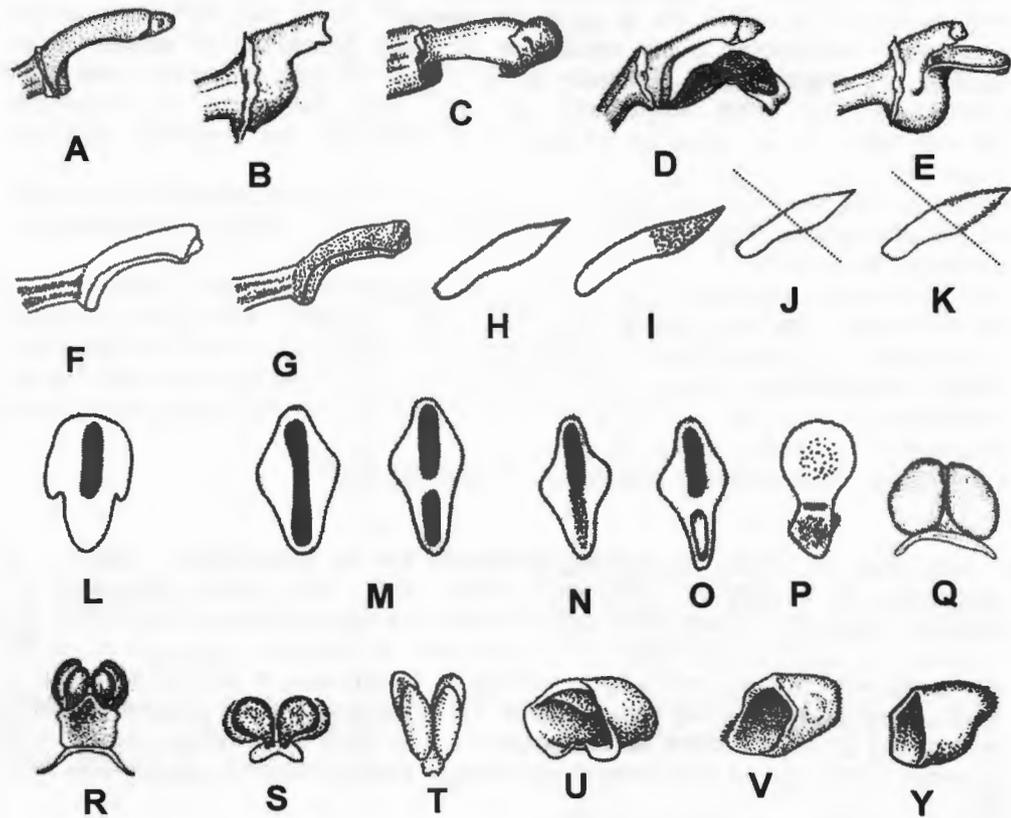


Figura 4. Variación en la forma de la columna, (A) arqueada, (B) sigmoideo y (C) en forma recta; (D) labelo articulado a la columna y (E) fusionado; (F) superficie lisa de la columna y (G) papilosa; superficie dorsal de los pétalos (H) lisa y (I) papilosa; (J) bordes enteros de los pétalos y (K) serrados; variación en la textura y tamaño de los callos (L) carnoso hasta la parte media, (M) carnoso desde la base hasta el ápice, (N) carnoso el primer medio y farinoso el segundo, (O) carnoso la primera mitad y con una concavidad en la segunda y (P) con el callo reducido a ciertas zonas del labelo; tipos de polinario observados en (Q) *Xylobium*, (R) en el complejo *Heterotaxis*, (S) *Omithidium* y (T) en *Cryptocentrum*; (U) pliegues de los bordes de la antera en *Omithidium* y (V) ausentes; textura de los bordes de la antera, (V) papilosos y (Y) sin papilas.

Caracteres anatómicos

48. Tilosomas. Los tilosomas son excrecencias lignificadas de las paredes más profundas de las células de la capa del velamen de la raíz, los tilosomas se encuentran adyacentes a las células de la pared gruesa de la exodermis de muchas orquídeas epifitas (Pridgeon *et al.*, 1983). Se han reportado siete tipos morfológicos de estas estructuras que son casi exclusivas de orquídeas Neotropicales. En el siguiente análisis se consideraron los siguientes tipos de tilosomas.

Los tilosomas lamelados son placas constituidos con surcos paralelos y han sido reportados como el más común en Orchidaceae (Fig. 5A); este tipo de tilosoma se encuentra en *Lycaste*.

Los tilosomas reticulados son redes rectangulares de finos filamentos y relativamente grandes intersticios (Fig. 5B); ocurren solo en *Xylobium*, *Cryptocentrum* y *Mormolyca*. Los tilosomas baculados son masas irregulares de barras independientes orientadas perpendicularmente a las paredes externas de las células de paso (Fig. 5C). Este tipo de tilosomas ocurre únicamente en especies del género *Maxillaria*.

Codificación: lamelados (0), reticulados (1), baculados (2).

49. Paquetes de fibras esclerénquimatosas en la hipodermis adaxial. La hipodermis de la hoja es usada según Esau (1960, 1977) para representar las distintas capas por debajo de la epidermis sin una diferenciación ontogenética. La variación observada se encontró en los paquetes de fibras en esta parte del tejido. Estos paquetes son pequeñas agrupaciones de células que se encuentran cerca de la hipodermis tanto adaxial como abaxial. En algunos grupos se observaron estas estructuras en ambos lados de la hipodermis (Fig. 5D y E), mientras que en otras especies estos solo se encontraban únicamente en la hipodermis abaxial (Fig. 5F y G).

Codificación: presentes (0), ausentes (1).

50. Ubicación de los haces vasculares en el mesófilo. En las secciones transversales de las hojas, los haces vasculares estaban agrupados en dos posiciones dentro del mesófilo. Estos se localizaban alineados en un solo plano (Fig. 6A), esto es, los diferentes tamaños de haces que se encontraban en el mesófilo se ubicaban sobre un mismo eje y estos no se salían de este eje. En el otro estado los haces vasculares no se encontraban distribuidos sobre un mismo plano, los haces de distintos tamaños se localizaban en distintos ejes dentro del mesófilo. (Fig. 6B). Codificación: en un mismo eje (0), es distintos ejes (1).

51. Patrón de haces vasculares. Para describir la disposición y el intercalado del tamaño de haces vasculares en las especies observadas se establecieron los siguientes tipos de patrones para la distribución de los haces vasculares. Estos patrones se refieren a la repetición de estos módulos en la hoja.

Este patrón no se considera desde el haz central y únicamente se observó que era constante sin tomar en cuenta el primer módulo del haz medio.

Tipo I, se encontraban haces vasculares grandes, de hasta 10 veces el tamaño del resto de los haces, y entre dos haces de este tamaño se encontraban alternado hasta 15 haces vasculares de dos tamaños (Fig. 6C).

Tipo II, en este tipo de patrón los haces vasculares son mas homogéneos en tamaño, aunque aún existe dos tamaños de haces, estos se disponen en un patrón que se repite y es constante entre las especies en las que se observó. Entre dos haces vasculares grandes se encuentran tres haces vasculares de menor tamaño (Fig. 6D). Tipo III, en este tipo de patrón se observan igual dos tamaños de haces vasculares y este patrón es muy similar al anterior; entre dos haces vasculares grandes se encuentran entre 4-7 haces vasculares de menor tamaño (Fig. 6E).

Tipo IV, en este tipo de patrón los haces vasculares alternan entre dos haces grandes un haz pequeño seguido de un haz de tamaño intermedio. Este patrón se repite unas cuatro veces entre dos células grandes (Fig. 6F). Codificación: tipo I (0), tipo II (1), tipo III (2), tipo IV (3).

52. Número total de haces vasculares de distinto tamaño en la hoja. Se encontró variación no solo en el patrón en que se encontraban dispuestos los haces vasculares, sino también en la cantidad de haces de distinto tamaño observados en la hoja. Aquí no se manejan los tamaños exactos de los haces para poder establecer distintos tamaños. Solo se consideraron el número de haces que se podían diferenciar por tamaño en los módulos que se observaron sin hacer mediciones exactas de estos. En algunas especies se alternaban tres tamaños distintos de haces vasculares en los módulos, mientras que en otras especies solo se encontraron dos distintos tamaños de haces vasculares. Codificación: tres (0), dos (1).

53. Disposición de las células hipodérmicas abaxiales. Se encontró variación en la disposición de la capa de células hipodérmicas de la cara abaxial de las hojas. En algunas especies estas se encontraban del mismo tamaño del resto del mesófilo y no se distinguían por formar una capa mas compacta (Fig. 7A). En otras especies en esta región se formaba una capa en forma ondulada de células más compactas en comparación al resto del mesófilo (Fig. 7B). En otras especies esta capa de células compactas era de mayor grosor (más células en la capa) y esta se encontraba como un bloque homogéneo (Fig. 7C). Codificación: células no compactas (0), capa de 2-3 células compactas en forma ondulada (1), capa de 4-5 células compactas (2).

54. Vainas del esclerénquima rodeando el haz vascular. Los haces vasculares encontrados en las especies estudiadas podían presentar alrededor una capa de tejido esclerenquimatoso; esto ocasionaba que los bordes del haz se encontraran bien definidas (Fig. 7D). En otras especies esta capa de esclerénquima estaba ausente o muy poco desarrollada y esto ocasionaba que los bordes del haz se

observaran difusos con respecto al resto del mesófilo (Fig. 7E). Codificación: ausente (0), presente (1).

55. Cápsula de esclerénquima rodeando el xilema. Esta capa podía estar presente en el xilema y se observaba como una zona de células más densa rodeando el xilema (Fig. 7F), mientras en otras especies el xilema carecía de esta cápsula y el xilema presentaba bordes difusos (Fig. 7G). Codificación: ausente (0), presente (1).

56. Posición del haz vascular medio. El haz vascular central o medio es aquel que se ubica en la zona central de las hojas conduplicadas. Su posición presentó variación, ya que en algunas especies este haz vascular se encontraba en posición abaxial (Fig. 8A) cerca de la epidermis, mientras en otras especies el haz vascular se encontraba en una zona central o media dentro del mesófilo (Fig. 8B). Codificación: abaxial (0), intermedia (1).

57. Tejido acumulador de agua. En algunas especies se encontró un tejido parenquimatoso de acumulación de agua. Por lo general, este tejido estaba compuesto de una gran cantidad de capas de células (hasta 15 células de grosor) (Arditi, 1992) (Fig. 8C) y en otras especies estaba ausente (Fig. 8D). Codificación: ausente (0), presente (1).

58. Número de veces que se repita el patrón de haces vasculares. En este estudio se establecieron módulos que se repiten a lo largo de la hoja. Estos módulos corresponden a los tipos de haces vasculares establecidos en el carácter 51. De esta manera, en algunas especies (las que tenían hojas anchas) se encontraba más veces repetido este patrón en comparación de las hojas angostas. En algunas especies este patrón no se repetía más de 10 veces, mientras que en otras especies este patrón se repetía muchas veces y por ser hojas anchas era mayor a 10. Codificación: < 10 (0), >10 (1).

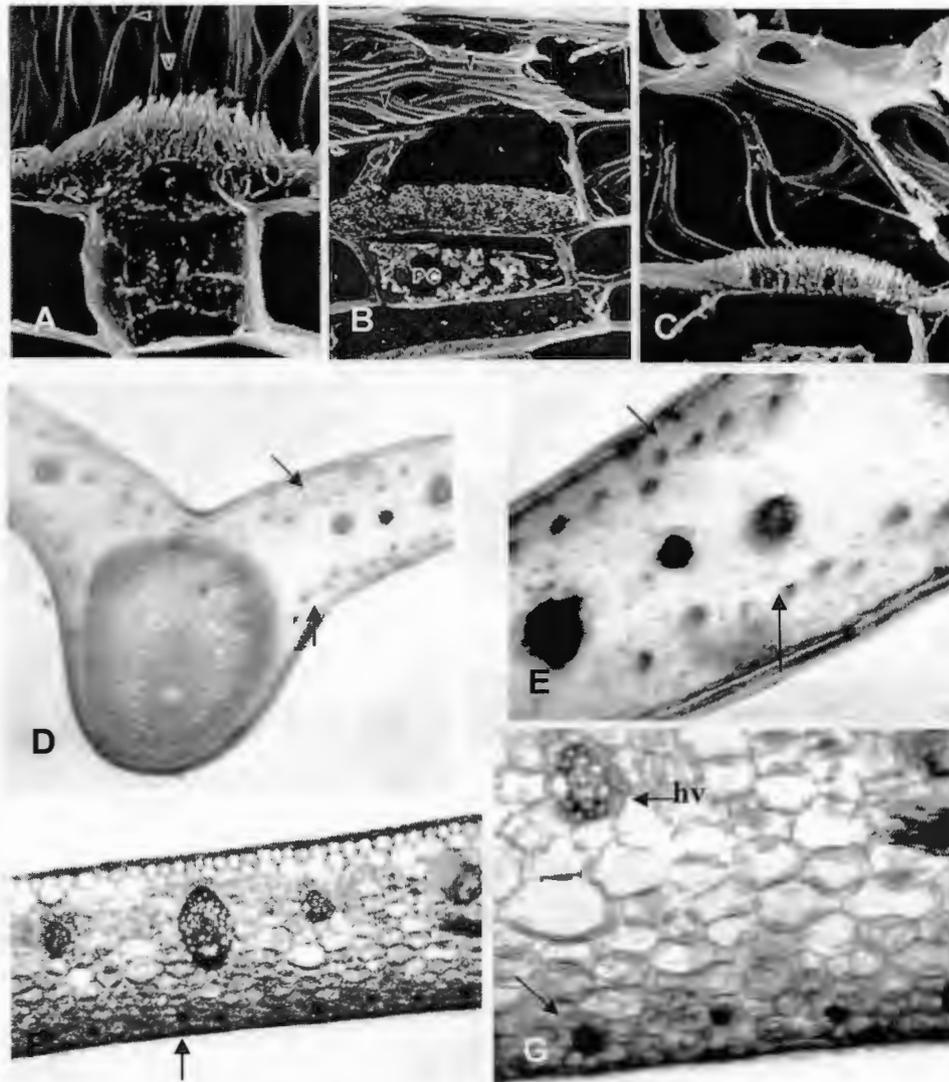


Figura 5. (A) tilosomas lamelados reportados en *Lycaste*, (B) tilosomas reticulados reportados en *Xylobium*, *Cryptocentrum* y *Mormolyca* y (C) tilosomas baculados reportados para especies del género *Maxillaria*; tomados de Pridgeon *et al.* (1983) (V = velamen, PC = células de la pared del conducto). (D) microfotografías de cortes transversales de hojas de *X. zarumense* mostrando los paquetes de fibras vasculares en ambas caras (abaxial y adaxial) de la hipodermis (3X) y (E) su localización con respecto al resto de los haces vasculares (6.3X); (F) corte transversal de una hoja de *M. discolor* donde se observan los paquetes de fibras esclerenquimatosas en posición abaxial (3X) y (G) su localización con respecto al resto de los haces vasculares (6.3X).

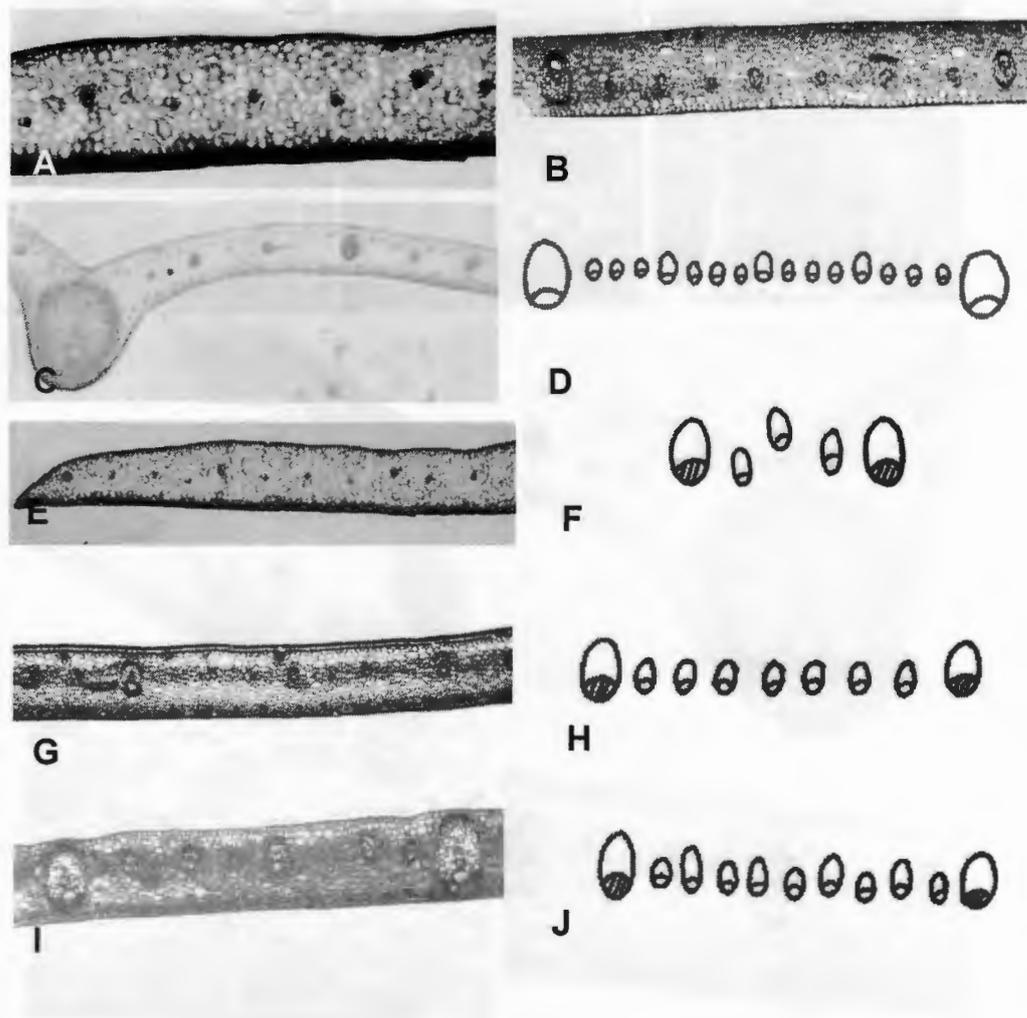


Figura 6. (A) Microfotografía de un corte transversal de hoja de *M. crassifolia* con los haces vasculares en varios ejes (2X) y (B) corte transversal de hoja de *M. discolor* mostrando la disposición de los haces vasculares en un solo eje. (C) Microfotografía del patrón de haces vasculares en *Xylobium* (Tipo I) y (D) la representación esquemática; (E) microfotografía del patrón de haces vasculares en *M. crassifolia* (Tipo II) y (F) la representación esquemática; (G) microfotografía del patrón de haces vasculares en *M. discolor* (Tipo III) y (H) su representación esquemática; (I) microfotografía de los haces vasculares en *M. nasuta* y (J) su representación esquemática. Cortes teñidos con safranina y tomadas a un aumento de 3X (B-J).

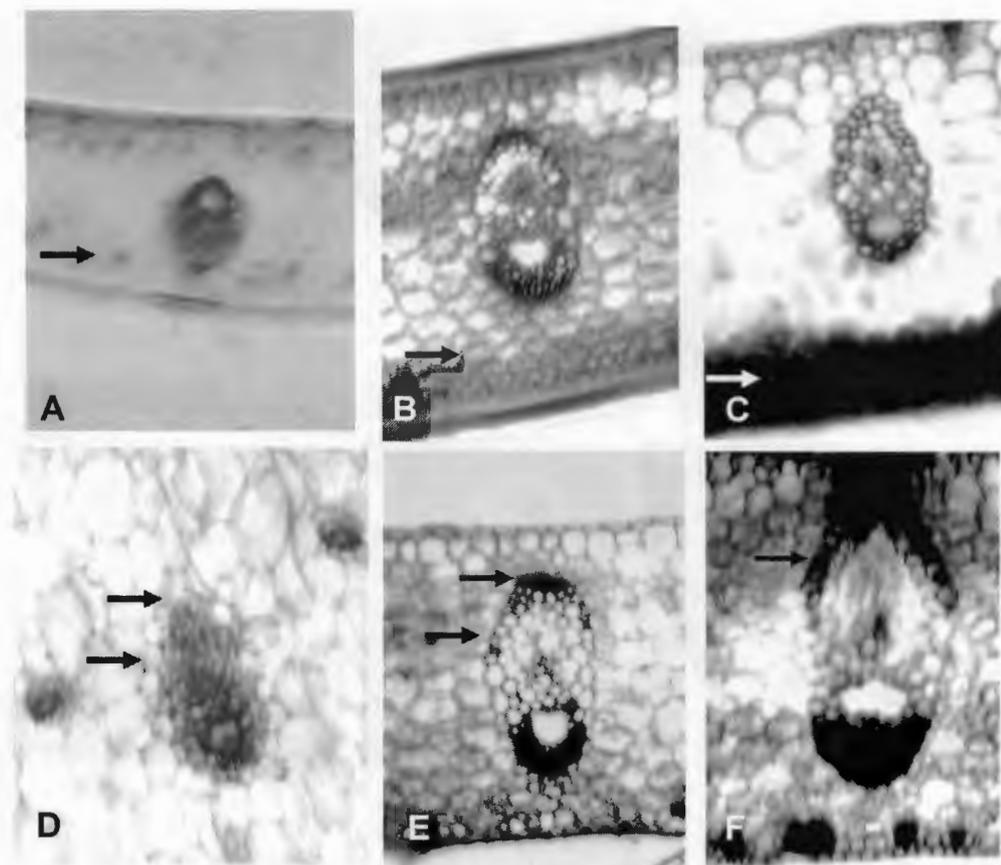


Figura 7. (A) microfotografías de corte transversal de hojas de *Xylobium* donde se observan la disposición de las células hipodérmicas abaxiales; (B) disposición de las células del la hipodérmis abaxial en *M. maleolens*, (C) capa de células compactas encontradas en la hipodérmis abaxial de *M. fulgens*, (D) haz vascular en *M. valenzuelana* con bordes difusos; (E) haz vascular en *M. proboscidea*, donde se observan el esclerénquima rodeando el haz vascular; (F) cápsula de esclerénquima rodeando el xilema en haces vasculares de la hoja de *M. maleolens*. Microfotografías a 6.3 X teñidas con safranina al 1%.

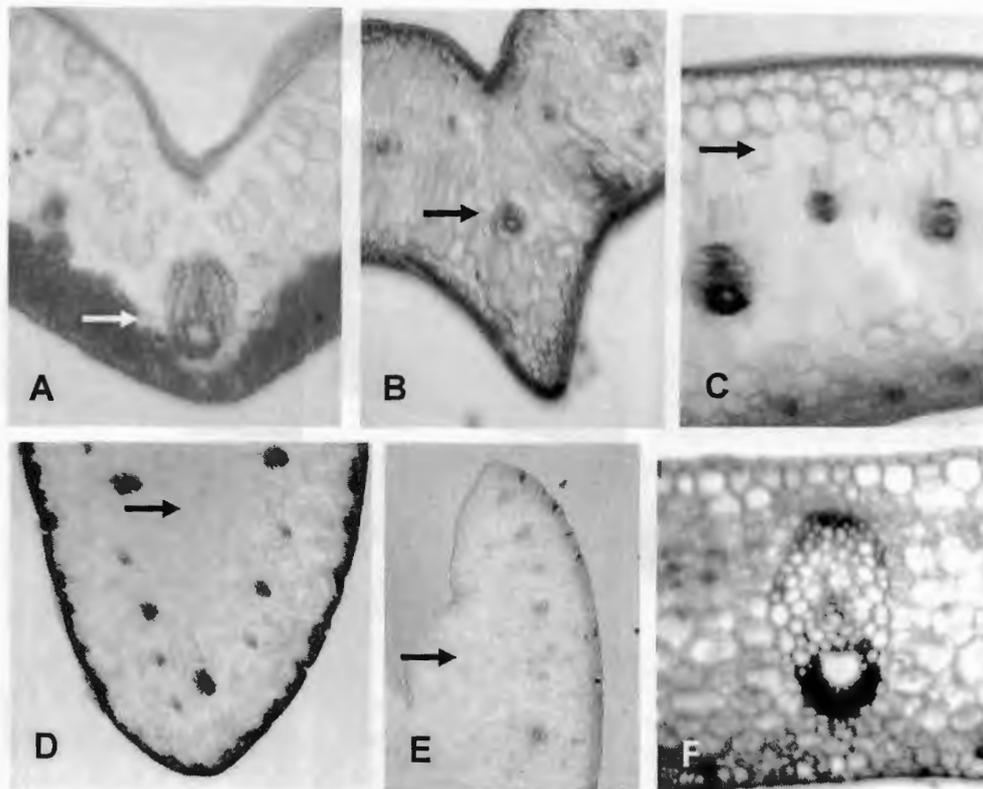


Figura 8. (A) corte transversal de la parte central de una hoja de *M. fulgens*, donde se observa la ubicación del haz vascular central en posición abaxial (3X), (B) posición del haz vascular en *M. crassifolia* (3X); (C) tejido acumulador de agua en corte transversal de hoja *M. santanae* (5X) y (D) tejido acumulador de agua en corte transversal de hojas en *M. equitans* (2X) y (E) en *M. fritzii* (2X). (F) corte transversal de hoja de *M. proboscidea* sin tejido acumulador de agua (5X). Cortes teñidos con safranina al 1%.

Análisis cladístico

La matriz de morfología y anatomía comprendió 58 caracteres, de los cuales dos no fueron filogenéticamente informativos: foliación del pseudobulbo [13] y el tipo de inflorescencia [18]. En la búsqueda heurística se encontraron 20 árboles igualmente parsimoniosos de una longitud de 106 pasos con un CI = 0.85, RI = 0.92 (L = 103, CI = 0.85 y RI = 0.92 excluyendo caracteres no informativos). En este análisis se encontraron tres clados dentro del grupo interno. En posición basal se ubica un grupo de tres especies, clado *Maxillaria nasuta* y afines, el clado de las especies de *Ornithidium* y un clado de las especies de *Heterotaxis*.

Clados encontrados en el análisis

Maxillaria nasuta, *M. cymbidioides* y *M. proboscidea* forman un grupo basal en este clado (referido aquí como *M. Nasuta* y afines), el cual es el grupo hermano de los otros dos clados encontrados, *Heterotaxis* y *Ornithidium*. Las cuatro especies del complejo *Ornithidium* forman el clado hermano del resto de las especies de *Heterotaxis* s.s (excluyendo *M. nasuta* y afines) (Fig. 9). De estos tres clados encontrados, *Ornithidium* junto con *M. nasuta* y afines son los que reciben un mayor soporte en el análisis. El clado de *Heterotaxis* s.s. recibe un bajo soporte de *jackknife* y del índice de Bremer (Fig. 9).

Dentro de *Heterotaxis* s.s. se encontraron dos clados, ambos con el mismo soporte en el análisis. En un clado se ubican a las especies que presentan mayor talla y una menor succulencia (referido aquí como clado *Violaceopunctata*). Dentro de este clado, *M. discolor* se encuentra en una posición basal; no se obtiene más resolución de las relaciones en el resto de las especies.

En el otro clado encontrado dentro de *Heterotaxis* s.s. (referido aquí como clado *Crassifolia*) la especie *M. schultesii* se ubica en una posición basal en el árbol de consenso; *Maxillaria valenzuelana* y *M. equitans* se ubican como especies hermanas y en una posición derivada dentro del clado *Crassifolia*. No se encuentra resolución para el resto de las especies y estas forman una politomía dentro del clado (Fig. 10).

A pesar que en el árbol de consenso *M. schultesii* se ubica en una posición basal dentro del clado *Crassifolia*, esta ubicación no recibe soporte del análisis de *jackknife* y la posición de esta especie no está resuelta.

Como se observa en la figura 10, la evidencia morfológica presentó poca información entre especies del mismo clado y solamente fue informativa entre los complejos de especies. Los clados de *Ornithidium* y *M. nasuta* y afines son de los clados con mayor número de caracteres sinapomórficos. En *Heterotaxis* se encontró poca variación morfológica y únicamente se pueden reconocer dentro de este a dos clados internos.

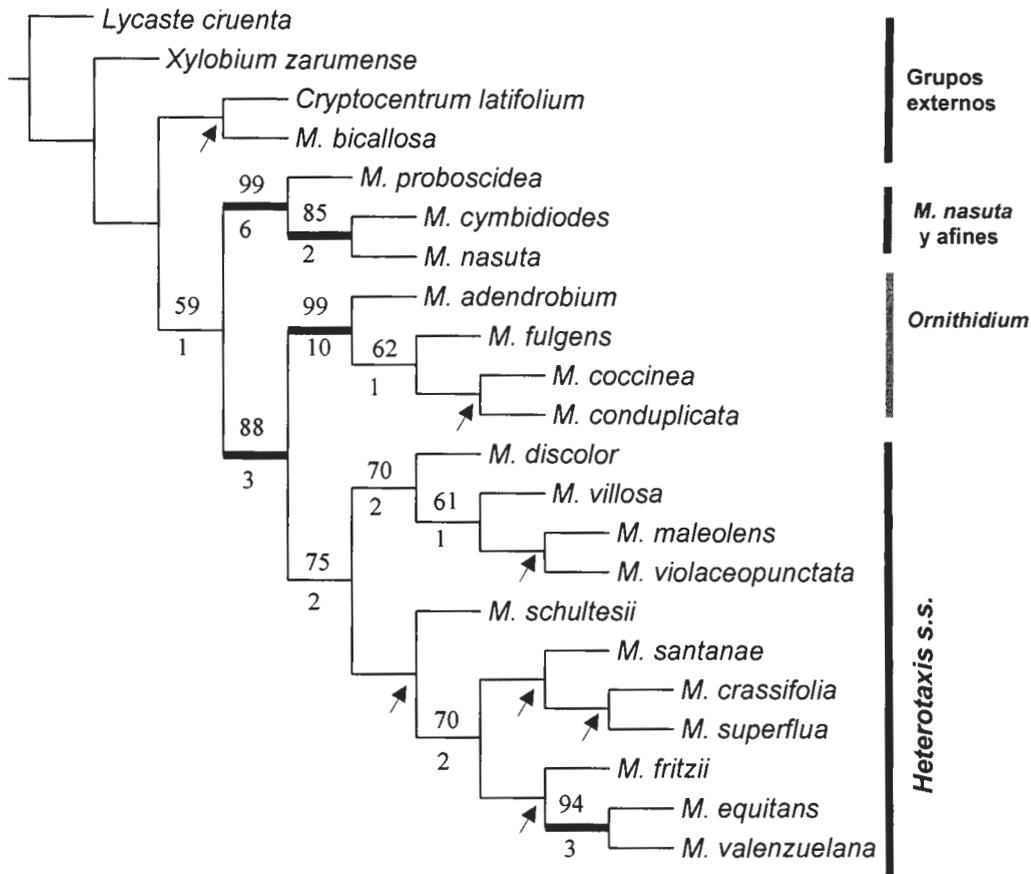


Figura 9. Uno de los 20 árboles igualmente parsimoniosos encontrados de las relaciones filogenéticas del complejo *Heterotaxis*. Búsqueda heurística h 1000, $mult*N$ 1000 $h/10$. Con una longitud de 106 pasos, $CI = 0.85$, $RI = 0.92$ ($L = 103$, $CI = 0.85$ y $RI = 0.92$ excluyendo caracteres no informativos). Los números sobre las ramas son los valores de *jackknife* (1000 réplicas) y los números debajo de las ramas son los valores para el índice de Bremer. Las ramas de mayor grosor son las que reciben un mayor soporte (> 85 %). Las flechas indican los clados que colapsan en el árbol de consenso de soporte de *jackknife*. El árbol fue escogido en base a las hipótesis de relación según el autor.

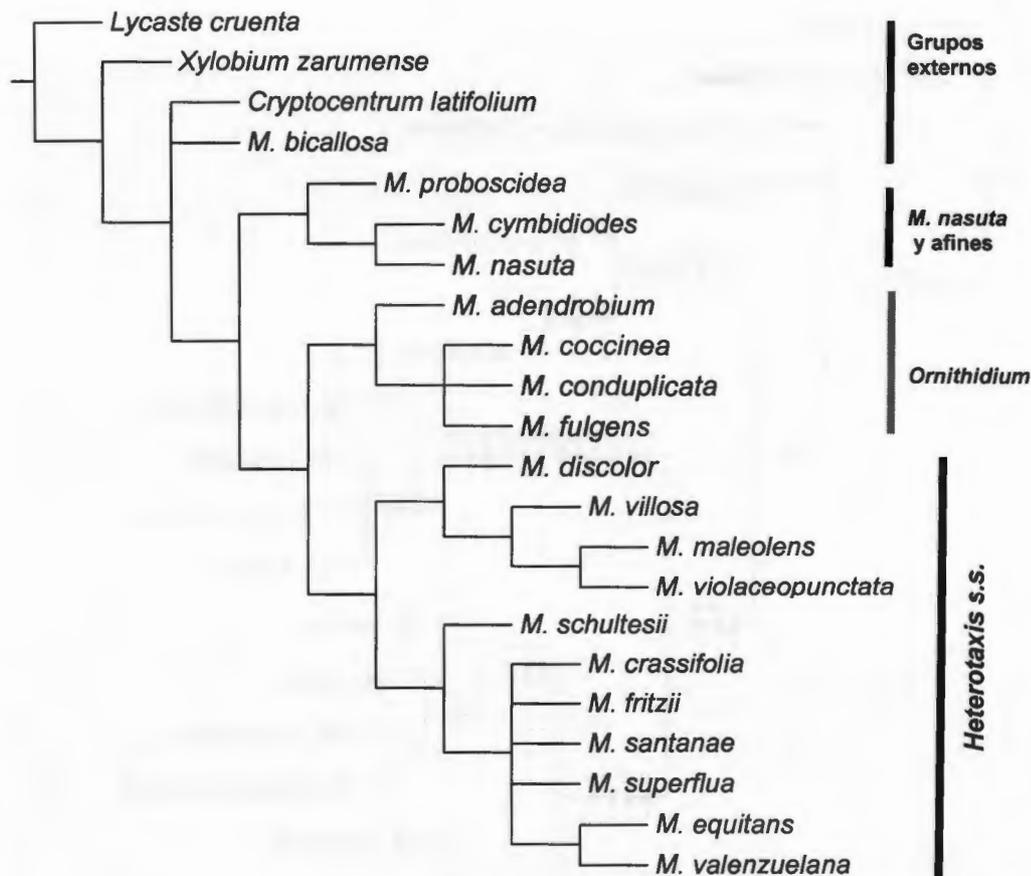


Figura 10. Árbol de consenso de los 20 árboles igualmente parsimoniosos encontrados en la búsqueda heurística de las relaciones filogenéticas del complejo *Heterotaxis* con base en caracteres morfológicos. Se encontraron tres grupos, *M. nasuta* y afines, *Ornithidium* y *Heterotaxis*.

Sinapomorfias del clado *Heterotaxis* - *Ornithidium*

En este análisis la única sinapomorfía encontrada para el clado *Heterotaxis* - *Ornithidium* fue el tamaño del pie columnar, el cual con respecto al resto de las especies de los grupos externos está reducido y es de mucho menor tamaño con respecto al resto de la columna (Fig. 11).

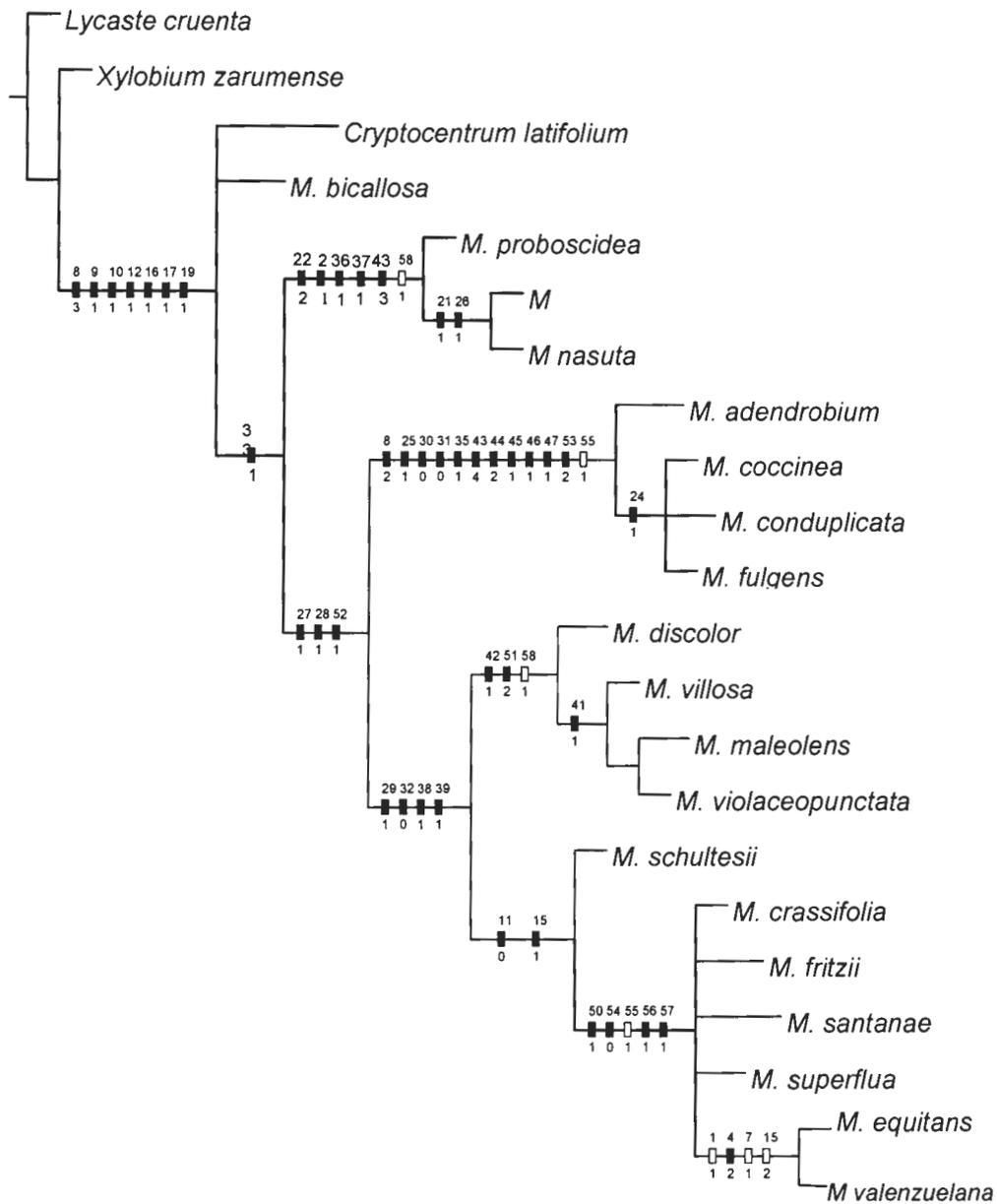


Figura 11. Árbol de consenso de las relaciones filogenéticas del complejo *Heterotaxis* y grupos relacionados. Las barras sólidas sobre las ramas representan sinapomorfías de los clados y las claras son caracteres homoplásicos. Los números sobre las barras indican el carácter y los números por debajo se refieren al estado del carácter.



Sinapomorfias de *Maxillaria nasuta* y afines

El grupo de las especies de *M. nasuta*, *M. cymbidioides* y *M. proboscidea* (referidas aquí como *M. nasuta* y afines) se encontraron una sinapomorfía vegetativa y cuatro sinapomorfías florales. Estas especies comparten la superficie del seudobulbo, la cual es brillante y carece de surcos. El pedúnculo de la inflorescencia es más grande que el seudobulbo y es una estructura que sobresale en las plantas y presenta cinco internodos. La superficie dorsal de la columna es papilosa al igual que el ápice de la parte dorsal de los pétalos. En el labelo el callo presenta en su primera parte una textura camosa y en la segunda parte el callo presenta una concavidad de textura lisa (Fig. 12). Dentro de este grupo, *M. nasuta* y *M. cymbidioides* comparten las siguientes sinapomorfías: la primera vaina del pedúnculo de la inflorescencia cubre no solo el siguiente entrenudo, sino que alcanza a cubrir hasta el ovario. La posición de las vainas en el pedúnculo envuelve completamente los entrenudos y dan el aspecto de estar articulada (Fig. 13).

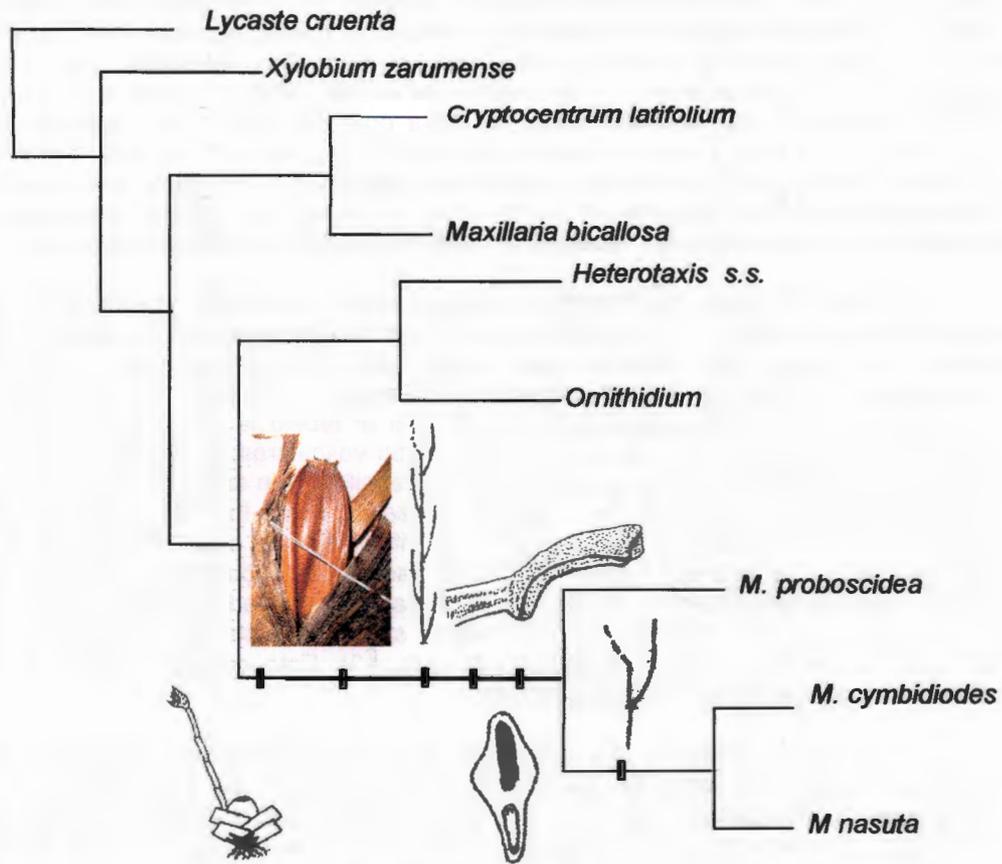


Figura 12. Sinapomorfias del clado *M. nasuta* y afines; caracteres que presentaron variación dentro del grupo.

Sinapomorfías de *Heterotaxis* s.s. – *Ornithidium*

Con base en la evidencia morfológica, *Heterotaxis* s.s. y las especies consideradas del complejo *Ornithidium* son grupos hermanos. Se encontraron dos sinapomorfías florales y una anatómica. Ambos grupos tienen el 3° y 4° entrenudo del pedúnculo de la inflorescencia reducidos con respecto al resto de los otros entrenudos. También comparten la presencia de únicamente dos tamaños de haces vasculares distintivos en los módulos descritos para los patrones de haces vasculares (Fig. 13).

Sinapomorfías de *Heterotaxis* s.s.

En este clado se encontraron tres sinapomorfías asociadas a estructuras de la flor, no se encontró ninguna sinapomorfía vegetativa o anatómica del grupo. En este grupo el grosor del pedicelo de la flor es mayor con respecto al resto de los entrenudos del pedúnculo de la inflorescencia. Este es muy característica en plantas vivas y no es tan perceptible en material de herbario a menos que sea re-hidratado. Esta estructura presenta además unas costillas profundas características. Otra sinapomorfía es la articulación de la columna al ovario, esta se encuentra en una posición inclinada de aproximadamente 45°, esta posición es evidente tanto en las flores como en el fruto y es muy fácil de identificar. Las especies de este complejo comparten también la presencia de un mucrón sub-apical en el pétalo y el sépalo. Esta estructura es muy evidente en plantas vivas y también en material re-hidratado. Es más fácil de observar en las especies de mayor talla, como *M. violaceopunctata*.

En este complejo se encontraron dos clados: uno donde se encuentra la especie tipo del complejo, *M. crassifolia* (clado *Crassifolia*) y en el otro se agrupan las especies de mayor talla (referido aquí como clado *Violaceopunctata*). El clado *Violaceopunctata* presenta dos sinapomorfías, las especies de este clado presentan en sus labelos dos lóbulos marcados, que le dan al labelo la apariencia de estar trilobulado. La otra sinapomorfía es el tipo de haces vasculares, presentan la misma cantidad y disposición de haces que en el clado *Crassifolia*; sin embargo, los módulos encontrados en el patrón de haces vasculares presenta entre los haces vasculares grandes de 4 a 7 haces de menor tamaño, a diferencia del clado *Crassifolia* que solamente tiene tres de estos haces. Dentro del clado *Violaceopunctata* solamente un carácter floral mostró variación, el contorno de la parte apical de los pétalos es lisa en *M. discolor*, como con el resto de *Heterotaxis* s.s., pero esta es serrada en *M. maleolens*, *M. villosa* y *M. violaceopunctata* (Fig. 13). Este carácter separa a *M. discolor* del resto del clado *Violaceopunctata*.

En el clado *Crassifolia* esta soportado por dos sinapomorfías vegetativas; en este clado las especies tienen los pliegues de las hojas articuladas a las vainas están parcialmente fusionados en la base y presentan un nervio medio quillado en las vainas de las hojas. En estas especies los pliegues de la hoja no se pueden extender en un solo plano, ya que en la base se encuentra esta estructura. En *M. equitans* y *M. valenzuelana* el grado de fusión es mayor. En este análisis *M. schultesii* se agrupa en este clado, sin embargo, su posición no está soportada por el análisis de *jackknife* ni de

Bremer, excluyendo a esta especie el clado Crassifolia esta soportado por cuatro sinapomorfías anatómicas. La distribución de los haces vasculares en estas especies no se encuentra en un mismo plano. Las vainas de esclerénquima que rodean los haces vasculares están ausentes, el haz vascular medio esta en una posición intermedia en el mesófilo y hay presencia de tejido acumulador de agua (Fig. 13).

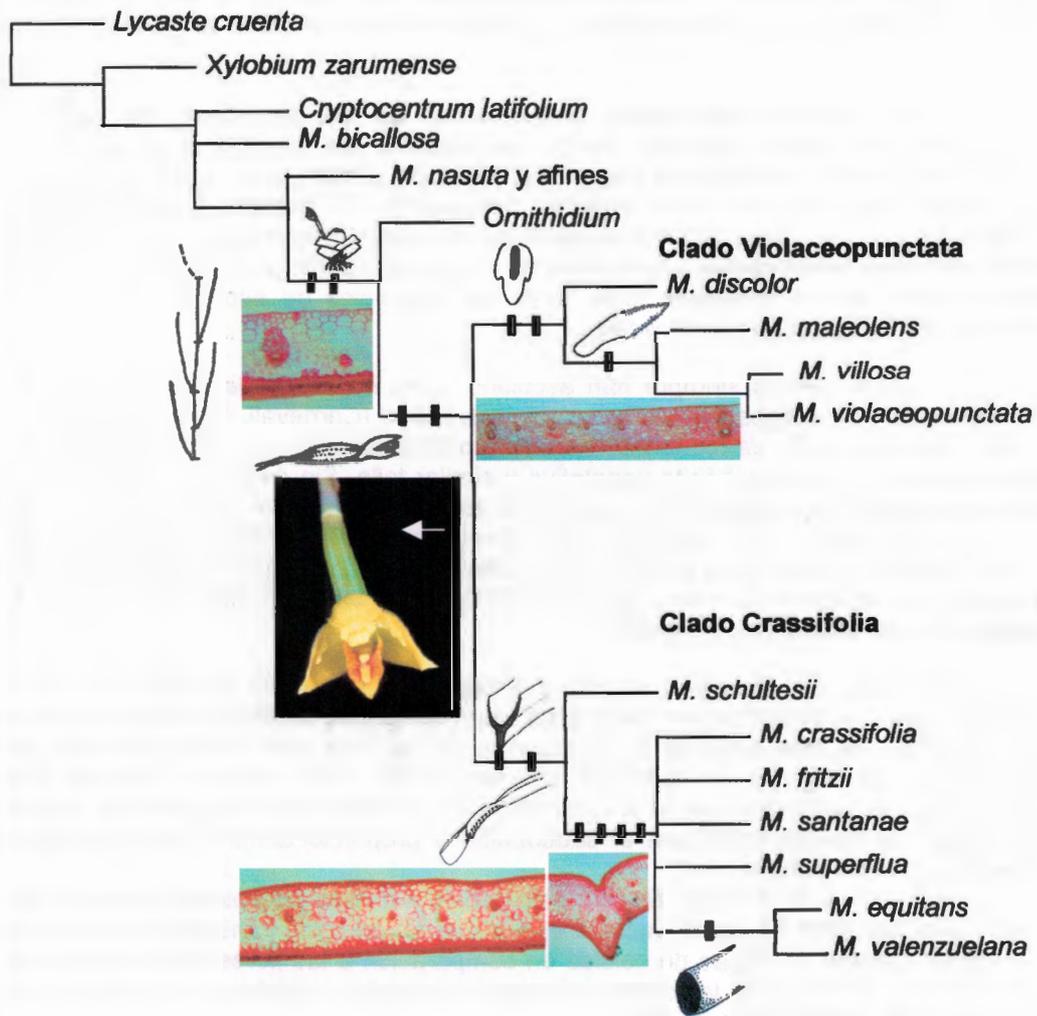


Figura 13. Sinapomorfías del clado *Heterotaxis - Ornithidium*, del complejo *Heterotaxis* s.s y los caracteres que presentaron variación dentro de este último clado.

Discusión

En el clado *Heterotaxis* – *Ornithidium* solo se encontró una sinapomorfia, el pie columnar reducido. Este carácter podría no representar una sinapomorfia al considerar una mayor cantidad de especies de *Maxillaria*, ya que otros grupos dentro de este género presentan esta característica y al parecer esta ha evolucionado varias veces dentro del género. Un estudio considerando una mayor cantidad de especies podría resultar en el reconocimiento de sinapomorfias de este grupo dentro de *Maxillaria*.

Como se ha mencionado previamente, las características morfológicas vegetativas son poco variables dentro del clado y los caracteres asociados a estructuras florales presentaron una mayor variación (Christenson, 1999). De los 58 caracteres considerados en el análisis, únicamente 17 fueron de la morfología vegetativa y esta fue más informativa entre los complejos, presentando poca variación entre especies relacionadas. Los caracteres de estructuras florales fueron más (30) y estos fueron más informativos tanto entre los complejos de especies como entre especies cercanamente relacionadas.

Autores previos siempre han asociado a las especies *Maxillaria nasuta*, *M. cymbidioides* y *M. proboscidea* al complejo *Heterotaxis* (Carnevali, 1991; Christenson, 1999; *Atwood, *et al.*, datos no publicados). Morfológicamente son indistinguibles, ya que presentan el mismo hábito vegetativo y similar talla. Sin embargo, contrario a lo que se especulaba anteriormente, estas tres especies forman un grupo separado del resto de las especies del complejo *Heterotaxis* s.s. En este análisis se encontraron características morfológicas vegetativas, florales y anatómicas que las diferencian del resto de las especies del complejo *Heterotaxis*, y que sugieren que *Heterotaxis* s.s. esta más relacionado con *Ornithidium*.

El clado de *Maxillaria nasuta* y afines esta soportado por las siguientes sinapomorfias: la superficie lisa del seudobulbo (con pocas costillas) y de cierto brillo, este carácter es más evidente en ejemplares de herbario que en plantas vivas; en ejemplares de herbario la superficie del seudobulbo luce como si hubiese sido barnizada. Los pedúnculos de la inflorescencia tiene cinco entrenudos, esta es mucho más larga en comparación con el seudobulbo y proporcionalmente los entrenudos poseen el mismo tamaño.

La textura de la flor es fibrosa, esto debido a que en los pétalos y sépalos hay una mayor cantidad de haces vasculares y a que en un corte transversal se observa un menor número de capas de células en comparación a las flores de los complejos *Heterotaxis* y *Ornithidium*, las cuales presentan una textura carnosa y son más fácil de re-hidratar de material de herbario.

Tanto la columna como la parte dorsal de los pétalos presentan una superficie papilosa; diferente a las especies de *Ornithidium* y *Heterotaxis* s.s., donde la superficie es lisa y la única zona donde algunas especies presentan estas papilas es en la zona del rostelo y el clinandro.

En el callo se observa una textura carnosa en la primera mitad y una concavidad en la parte apical del pétalo cuando se estudia material rehidratado; en las plantas vivas la segunda mitad del callo es lisa y con cierto brillo.

Desde el punto de vista morfológico las tres especies de *M. nasuta* y afines son muy similares a las especies del clado *Violaceopunctata* de *Heterotaxis* s.s. Presentan el mismo hábito vegetativo y la misma talla; y es muy común observar material de herbario mal anotado con esta confusión. Las diferencias florales observadas entre estos dos grupos se soportan con las diferencias anatómicas observadas, ya que si bien las hojas de ambos grupos son difíciles de diferenciar, un simple corte transversal de una hoja articulada a una vaina revelará a que grupo pertenece. El clado *M. nasuta* y afines presenta un patrón de haces vascular distinto; los haces vasculares más grandes que separan los módulos establecidos ocupan un área de mayor proporción en el mesófilo y alternan en este patrón tres tamaños de haces vasculares. Estudios previos sobre anatomía de hojas de especies de *Maxillaria* han mostrado su valor en la reconstrucción filogenética y la importancia de incluirlos cuando la morfología vegetativa es poco variable (Holtzmeier *et al.*, 1998, Davies, 1999).

Excluyendo a estas tres especies, el complejo *Heterotaxis* está más asociado al complejo *Ornithidium*; en este análisis las cuatro especies utilizadas de este último complejo forman el clado hermano de *Heterotaxis* s.s. Aunque estos dos son grupos hermanos y comparten ciertas características (el número de entrenudos del pedúnculo de la inflorescencia, la proporción del tamaño del tercer y cuarto pedúnculo, el tamaño de la inflorescencia de igual o menor tamaño con respecto al seudobulbo, flores de textura carnosa y la presencia de haces vasculares de dos tamaños diferentes en los módulos observados), el complejo *Ornithidium* es muy distintivo y presenta muchas características florales, vegetativas y anatómicas que la diferencian.

Dentro del complejo *Heterotaxis* s.s. se encontraron dos cladogramas internos, ambos reciben poco soporte y morfológicamente tienen pocas sinapomorfias que las definan. La especie tipo del complejo forma un clado con *M. superflua*, *M. santanae* y *M. fritzii*, y en una ubicación derivada se encuentran *M. valenzuelana* y *M. equitans*; estas últimas dos especies presentan un hábito vegetativo diferente al resto de las *Heterotaxis* s.s. y este hecho fue el que hallan sido consideradas junto con *Maxillaria witsinioides* en el género *Marsupiarina* (Hoehne, 1947; Senghas, 1993, 1994, 2000). A pesar de las diferencias morfológicas de la arquitectura vegetativa, las características florales han sido usadas para ubicarlas por algunos autores dentro de *Heterotaxis* (o *Dicrypta*) (Carnevali, 1991; Christenson, 1999; Atwood *et al.*, datos no publicados) o al menos muy relacionadas a (Barros, 2002).

La posición de *Maxillaria schultesii* no se resuelve en el análisis. En el árbol de consenso esta se ubica más relacionada al clado *Crassifolia*, sin embargo, su posición no se soporta en el árbol de consenso de *jackknife*. Esta especie presenta el hábito simpodial y su tamaño varía desde tamaños pequeños, como ejemplares de *M. crassifolia*, hasta plantas más robustas y de mayor talla como *M. violaceopunctata*. En estructura floral es muy parecida al clado *Crassifolia*, pero los caracteres anatómicos

soportan más la hipótesis de pertenecer al clado *Violaceopunctata*. Es posible que estudios más detallados de la anatomía y las secuencias de los ITS 1 y 2 aporten evidencia sobre la ubicación de esta especie.

El otro clado dentro de *Heterotaxis* s.s. incluye a las especies de mayor talla y menor suculencia. Morfológicamente son muy similares y salvo ligeras diferencias en la flor, este grupo de especies es muy homogéneo morfológicamente y anatómicamente. Dentro del clado *Heterotaxis* s.s. la morfología vegetativa presentó poca variación y no aportó caracteres para la resolución de las relaciones de las especies. Dentro de este clado los caracteres florales y anatómicos presentaron una mayor variación y fueron más informativos.

Bibliografía

- Arditi, J** (1992) *Fundamentals of orchid biology*. Ed. Wiley. USA
- Atwood JT** (1989) Orchids of Costa Rica 1. *Icones Plantarum Tropicarum* 14.
- Atwood JT and DEM de Retana** (1990) Family No. 39 Orchidaceae: Tribe Maxillarieae Subtribes Maxillarinae and Oncidiinae. *Flora Costarricensis* No. 40.
- Barriel V and P Tassy** (1998) Rootin with multiple outgroups: consensus versus parsimony. *Cladistics* 14: 193-200.
- Barros F** (2002) Notas taxonomicas para espécies brasileiras dos generos *Epidendrum* e *Heterotaxis* (Orchidaceae). *Hoehnea* 29: 109-113.
- Bremer K** (1988) The limits of aminoacid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Bremer K** (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304
- Brieguer FG** (1977) On the Maxillariinae (Orchidaceae) with sepaline spur. *Bot. Jahrb. Syst.* 97: 548-574.
- Carnevali G and I Ramirez** (1989) New or noteworthy orchids for the Venezuelan flora. VII. additions in *Maxillaria* from the Venezuelan Guayana. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76:374-380.
- Carnevali G** (1991) *Citology and the pollinaria in the Maxillarinae (Orchidaceae)*. Master of Science Thesis in Biology. University of Missouri-St. Louis, USA. 171 p.
- Carnevali G** (1996) Systematics, phylogeny, and twig epiphytism in *Cryptocentrum* (Orchidaceae). Ph. D. Thesis. University of Missouri-St. Louis, USA. 334 p.
- Carnevali G** (2001) A synoptical view of the classification of *Cryptocentrum* (Orchidaceae) new taxa, and key to the genus. *Harvard Papers in Botany* 5: 467-486.
- Davies KL** (1999) A preliminary survey of foliar anatomy in *Maxillaria*. *Lindleyana* 14: 126-135.
- Davis JI** (1993) Character removal as a means for assessing stability of clades. *Cladistics* 9: 201-210.
- Dodson CH and DE Bennett** (1989) Orchids of Perú. *Icones Plantarum Tropicarum* 2.



- Dodson CH and P Mármol** (1989) Orchids of Ecuador. *Icones Plantarum Tropicarum* 6.
- Dodson CH and R Vásquez** (1989) Orchids of Bolivia. *Icones Plantarum Tropicarum* 4.
- Esau K** (1960) *Anatomy of seed plants*. NY. John Wiley and Sons.
- Esau K** (1977) *Anatomy of seed plants*. 2° ed. NY. John Wiley and Sons.
- Farris JS** (1969) A successive approximations approach to character weighting. *Syst. Zool.* 18: 374-385.
- Farris JS** (1989) The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Farris JS, VA Albert, M Källersjö, D Lipscom and AG Kluge** (1996) Parsimony jackknifing outperforming neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Fitch WM** (1971) Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- Forey PL, CJ Humphries, IL Kitching, RW Scotland, DJ Siebert and DM Williams** (1992) *Cladistics. A practical course in systematics*. Ed. Oxford University Press. USA. p. 191.
- Golobof P** (1993) Nona, ver. 1.6. Program and documentation. Distributed by the author. , Buenos Aires.
- Hágsater E and GA Salazar** (1990) Orchids of Mexico. *Icones Orchidacearum* 1.
- Haeckel E** (1866) *Generelle Morphologie der organismen*. G. Reimer, Berlin.
- Henning W** (1950) *Grundzüge einer theorie der phylogenetischen systematic*. Berlin.
- Henning W** (1966) *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press. USA.
- Hoehne FC** (1947) Reajustamento de algunas especies de Maxillarieas do Brasil, com criação de dois novos generos para elas. *Arqv. Bot. Estado Sao Paulo f.m.* 2: 65-74
- Holtzmeier MA, WL Stern and WS Judd** (1998) Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). *Bot. J. Linnean Soc.* 127: 43-82.
- Judd WS, CS Campbell, EA Kellog and PF Stevens** (1999) *Plant systematics. A phylogenetic approach*. Ed. Sinauer Associates. USA. pp. 9-21.
- Kluge AG and JS Farris** (1969) Quantitative phyletics and the evolution of Anurans. *Syst. Zool.* 18: 1-32.
- Kluge AG and AJ Wolf** (1993) Cladistics: what's in a word? *Cladistics* 9: 183-199.
- McLeish I, NR Pearce and BR Adams** (1995) *Native orchids of Belize*. Ed. Balkema. Netherlands. p. 278.
- Nixon KC and JM Carpenter** (1993) On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- Nixon K** (2001) Winclada ver. 1.00.08. Program and documentation. Published by the author. Ithaca, NY.
- Olmstead RG, B Bremer, KM Scott and JD Palmer** (1993) A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on rbcL sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 700-722.
- Pridgeon AM, WL Stern and DH Benzing** (1983) Tilosomes in roots of Orchidaceae: Morphology and systematic occurrence. *Amer. J. Botany* 70: 1365-1377.
- Rasmussen H** (1986) The vegetative architecture of orchids. *Lindleyana* 1:42-50.
- Romero G and G Carnevali** (2000) *Orchid of Venezuela. An illustrated field guide*. Vol II. ed. 2a. Ed. Armitano editores. Pp. 516-599.



- Roth VL** (1988) The biological basis of homology. In: *Ontogeny and systematics*. C.J. Humpries (ed) Columbia University Press, USA. pp.-1-26.
- Sanderson MJ** (1995) Objections to bootstrapping phylogenies: a critique. *Syst. Biol.* 44: 299-320.
- Senghas K** (1993) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 28. In: R. Schlechter, *Die Orchidien*. Berlin: Blackwell, 1727-1776
- Senghas K** (1994) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 29. In: R. Schlechter, *Die Orchiden*. Berlin: Blackwell, 1777-1792.
- Senghas K** (2000) *Maxillaria*, un genre chaotique. *Richardiana* II (1): 29-38.
- Solano GRA** (2002) *Filogenia y evolución de la subtribu Pleurothaliinae (Orchidaceae)*. Tesis de doctorado. UNAM. México, D.F. 183 p.
- Stevens PF** (1991) Character states, morphological variation, and phylogenetic analysis: a review. *Systematic Botany* 16: 553-583.
- Williams OL, P Allen and RL Dressler** (1980) Orchids of Panama. *Monographs in Systematic Botany* 4: 109-590.



CAPITULO III

Análisis filogenético del complejo *Heterotaxis* Lindley con base en las secuencias de ADN de las regiones espaciadoras del gene ribosomal (ITS 1 & 2)

Introducción

Un diverso número de genes moleculares del cloroplasto (*rbcl*, *atpB*, *ndhF*, *trnL*, *trnF*, 16S rDNA, *rps2*) y nucleares (26S rDNA, 5.8S rDNA, *adh 1*, 18SrDNA, IGS e ITS) son usados actualmente en la reconstrucción (inferencia) filogenética de plantas a distintos niveles jerárquicos (Soltis *et al.*, 1998). Previo a su utilización en angiospermas, las regiones espaciadoras de los genes ribosomales 18S-26S (ITS 1 & 2 por sus siglas en ingles *internal transcribed spacers*) han sido ampliamente utilizados en distintos grupos de organismos desde hongos (Oomicetos) hasta homínidos (Lee & Taylor, 1992; González *et al.*, 1990).

La información de las secuencias de los ITS ha probado ser útil en la reconstrucción filogenética a nivel de géneros cercanamente relacionados y entre especies congénéricas tanto en plantas como en animales (Baldwin *et al.*, 1995).

Los ITS son parte del transcrito del ADN nuclear del ribosoma (Fig. 14), pero no son incorporados a este en la etapa final de formación; al parecer tienen un papel importante en la maduración del ARNr, situando en proximidad a la subunidad grande y pequeña del ribosoma. Esta función de los ITS sugiere que se encuentran bajo cierta presión de selección (Baldwin *et al.*, 1995).



Figura 14. Estructura general de las unidades repetidas del ADN ribosomal en plantas. La unidad esta compuesta por una región espaciadora externa (ETS), la región que codifica para el gen 18 S ARNr, una región espaciadora (ITS 1-ITS 2) a cada lado de la región que codifica para el gen 5.8S y la región que codifica para el gen 26 S. Cada una de estas unidades repetidas esta separada por una región espaciadora no transcribible (NTS).

Varias características generales de estas regiones facilitan su uso; los ITS junto con otros componentes de la familia de multigenes del ADNr se encuentran repetidos hasta en miles de copias en el genoma nuclear (Hamby & Zimmer, 1992), lo cuál facilita su extracción, detección, amplificación y secuenciación. A pesar de que los ITS están en grandes números de copias en el genoma en regiones repetidas (tandem),

estas son homogenizadas por el proceso de evolución concertada, lo que evita problemas de paralogía en el uso de estas secuencias al inferir filogenias (Hills *et al.*, 1991).

El tamaño de los ITS (< 700 pb en angiospermas) también facilita su extracción y su secuenciación, incluso de material proveniente de muestras de herbario. Además, se encuentran flanqueados por zonas altamente conservadas de los genes del ribosoma (18S, 5.8S y 26S), lo que facilita su amplificación, incluso usando iniciadores universales (White *et al.*, 1990) y su posterior alineación en las matrices de datos.

Las regiones espaciadoras ITS han sido probados como buena fuente de caracteres nucleares en la inferencia de relaciones evolutivas a niveles intergenéricos e intragenéricos en distintas familias de angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995) y también han sido utilizados en la reconstrucción filogenética en Orchidaceae en la subfamilias Cypripedioideae (Cox *et al.*, 1997), en las subtribus Oncidiinae (Pridgeon *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001a), Orchidiinae (Bateman *et al.*, 1997), Catasetiinae (Pridgeon & Chase, 1998), Laeliinae (van der Berg, *et al.*, 1999; van der Berg, *et al.*, 2000), Pleurothaliinae (Solano, 2002) y Caladeniinae (Molvray *et al.*, 2000), así como en los géneros *Diseae* (Douzery *et al.*, 1999), *Lycaste* y *Anguloa* (Ryan *et al.*, 1999), *Dignathe* (Sosa *et al.*, 2001), *Encyclia* (Higgins *et al.*, datos no publicados) y *Myrmecophyla* (Carnevali, datos no publicados).

Materiales y métodos

Taxa terminales

En este análisis se incluyeron 4 especies representativas del complejo *Ornithidium* y todas las especies que han sido asociadas al complejo *Heterotaxis*, excepto *M. witsinoides* y *M. chartacifolia*, las cuales están asociadas a otros complejos de especies dentro de *Maxillaria* (Whitten *et al.*, datos no publicados). Tampoco se incluyeron a tres especies del complejo *Heterotaxis*; *Maxillaria fritzii*, *M. schultesii* y *M. santanae*. La primera ha sido colectada una sola vez y solo se preserva una flor en alcohol al 70 %. De las últimas dos no se logró obtener una buena calidad de ADN de los ejemplares de herbario. El cuadro 9 presenta una lista de las especies incluidas en el análisis y el origen del material de donde se extrajo el ADN. En el presente trabajo se obtuvieron las secuencias de cinco individuos utilizados en el análisis; el resto de las secuencias se obtuvieron de Whitten *et al.* (datos sin publicar*).

*<http://www.flmnh.ufl.edu/herbarium/max/downloads/downloads.htm>



Métodos moleculares

Las muestras para extracción de ADN fueron tomadas tanto de material en fresco como de material conservado en sílica gel (Chase & Hills, 1991) (cuadro 8). La extracción del ADN se realizó de acuerdo al método de Doyle & Doyle (1987) usando entre 50-100 mg de tejido. El ADN fue precipitado durante toda la noche a -20°C con 0.65 volúmenes de isopropanol, centrifugado, lavado dos veces con etanol al 70 % y secado. El *pellet* se resuspendió en 75 μl del buffer Tris-EDTA (TE) y almacenado a -20°C . La amplificación se realizó mediante una mezcla de reacción de 50 μl con 35 ciclos, 2.5 mmol/l MgCl_2 , buffers y *Taq* polimerasa (SIGMA o Promega). La amplificación se llevo a cabo con una temperatura de alineación inicial de 76°C , decreciendo un grado cada ciclo por 15 ciclos seguidos de 16 ciclos con 61°C . Los iniciadores usados para la amplificación y secuenciación son aquellos reportados por Sun *et al.*, (1994). Los productos de PCR fueron purificados con columnas de QIAquick (Quiagen Inc) y secuenciados directamente utilizando el estándar big-dye terminador (Applied Biosystems, Inc.). Los programas de computo Sequence navigator^{MR} y Autoassembler^{MR} fueron usados para editar y ensamblar las secuencias de ADN. Las secuencias de ADN se alinearon manualmente.

Análisis filogenético

La matriz de secuencias de los ITS 1 & 2 se analizaron usando el programa Winclada (Nixon, 2001). Todos los caracteres se consideraron con el mismo peso, se utilizó parsimonia de Fitch y todos fueron considerados como no ordenados. Los valores con *gaps* fueron considerados como valores perdidos. El análisis de parsimonia se corrió usando el programa NONA (Golobof, 1993) y los árboles se analizaron y se editaron usando la opción de winclado implementado en Winclada (Nixon, 2001).

Se realizó una búsqueda heurística con la estrategia múltiple TBR+TBR (*mult*max**), con un total de 1000 réplicas (*mult.*1000*). Cada réplica se inició con 10 árboles en la memoria (*h/10*) y se conservaron un máximo de 1000 árboles (*hold 1000*).

A cada árbol obtenido se le calculó la longitud (L) y la homoplasia se evaluó con el índice de consistencia y el índice de retención (RI). Para el soporte de los árboles se utilizó el análisis de *jackknife* (Farris *et al.*, 1996), utilizando una búsqueda con 1000 réplicas (*h 1000*), realizando 10 réplicas de la búsqueda (*mult* 10*) y reteniendo 10 árboles en la memoria (*h/10*).

El soporte de las ramas se evaluó mediante el índice de Bremer (Bremer, 1988, 1994); este valor se obtuvo sometiendo la matriz de caracteres y el árbol obtenido al programa NONA desde Winclada; se sometió la matriz a una búsqueda TBR y reteniendo los árboles de longitud mayor a la del árbol en la memoria. Para el análisis se uso una memoria de 10000 árboles (*h 10 000*), tomando un número de pasos extra de 10 con el comando *bs 10*.

Grado de divergencia molecular de los ITS 1 & 2

Los datos de las secuencias de ADN fueron analizados también con el método de similitud *neighbor-joining* (NJ) usando la distancia de 2-parámetros de Kimura (Saitou & Nei, 1987; Kimura, 1980).

Cuadro 8. Lista de especies incluidas en el análisis y el origen de cada una de las muestras.

† Especies que se secuenciaron en el presente estudio.

Taxon	Voucher	Sitio de origen	Herbario
Grupo interno			
<i>Maxillaria adendrobium</i> (Reichb.f.) Dressler	SEL 1995-0365A		SEL
<i>Maxillaria coccinea</i> (Jacq.) L.O. Wms	<i>Atwood & Whitten</i> 5072		SEL
† <i>Maxillaria conduplicata</i> (Ames & C. Schweinf.) L. O. Wms	<i>M. Blanco</i> 1660	Costa Rica	Lankester Garden, 03296
<i>Maxillaria crassifolia</i> (Reichb.f.) Lindley			
† <i>Maxillaria crassifolia</i> IS-4 (Reichb.f.) Lindley	-	Manchiques	Planta en cultivo
† <i>Maxillaria crassifolia</i> IS-7 (Reichb.f.) Lindley	-	Tucuco, Zulua	Planta en cultivo
<i>Maxillaria cymbioides</i> Dodson, J.T. Atwood, & Carnevali	SEL 1995-0447A		SEL
<i>Maxillaria discolor</i> (Lodd.) C. Schweinf.	<i>Atwood & Whitten</i> 5099		SEL
† <i>Maxillaria equitans</i> (Schltr.) Garay	<i>Ex C. García es</i> <i>Atwood & Whitten</i> 5091		SEL
<i>Maxillaria fulgens</i> (Reichb.f.) L.O. Wms.	<i>Atwood & Whitten</i> 5083		SEL
<i>Maxillaria maleolens</i> Schltr.	Whitten 1869		FLAS
<i>Maxillaria nasuta</i> Reichb.f.	<i>Atwood & Whitten</i> 5056	Venezuela	SEL
† <i>Maxillaria superflua</i> Reichb.f.		Atazapo, VEN	Planta en cultivo
<i>Maxillaria valenzuelana</i> (Sw.) Nash	SEL 1985-0356A		SEL
<i>Maxillaria villosa</i> (Barb.Rodr.) Cogn.	<i>Atwood</i> 5609		SEL
<i>Maxillaria violaceopunctata</i> Reichb.f.	SEL 1981-2139		SEL
Grupos externos			
<i>Maxillaria bicallosa</i> (Reichb.f.) Garay	<i>Whitten</i> 1713		FLAS
<i>Cryptocentrum latifolium</i> Schltr.	SEL 1979-0403		SEL
<i>Xylobium zarumense</i> Dodson	<i>Whitten</i> 89096		FLAS
<i>Lycaste cruenta</i> Lindl.	<i>Oakley</i> 17.11.95		K

Nota: los ejemplares *M. crassifolia* IS-4 y IS-7 provienen de poblaciones de esta especie que ha sido considerada como *M. gatunensis* Schltr.

Resultados

La longitud de la matriz de las secuencias alineadas de los ITS 1 y 2 fue de 787 posiciones, de las cuales únicamente 93 fueron filogenéticamente informativos (11.8%). En el análisis heurístico se encontró solamente un único árbol más parsimonioso con una $L = 279$, $CI = 0.75$, $RI = 0.76$ ($L = 177$, $CI = 0.62$ y $RI = 0.76$ cuando se excluyeron los caracteres no informativos) (Fig. 15). El grupo interno está fuertemente soportado en el análisis (*jackknife* 100 % y *bremer* >10).

Dentro del grupo interno se forman dos clados, en el clado basal se encuentran *M. nasuta*, *M. cymbidioides* y *M. proboscidea*; este clado recibe poco soporte (*jackknife* 68 %), pero la ubicación de *M. nasuta* como especie hermana de *M. cymbidioides* está bien soportada (*jackknife* 85%).

Las cuatro especies de *Ornithidium* se agrupan en un grupo monofilético con poco soporte (*jackknife* 72 %), y a pesar que en el único árbol encontrado está colocado como grupo hermano de *Heterotaxis* s.s., en el árbol del análisis de *jackknife* no se resuelve si *Ornithidium* es el grupo hermano de *Heterotaxis* o del clado basal formado de *M. nasuta* y afines (Fig. 15). El clado que comprende a *Heterotaxis* s.s. se encuentra fuertemente soportado (*jackknife* 91 %); con poco soporte de *jackknife* (<60 %) se encuentran *M. valenzuelana* y *M. equitans* en una posición basal dentro del clado.

Derivados dentro de *Heterotaxis* se encuentran dos clados, en uno se encuentran *M. superflua* y *M. crassifolia* (*jackknife* 60 %) y en el otro se encuentran *M. maleolens*, *M. villosa* y *M. violaceopunctata* (*jackknife* 98 %). La posición basal de *M. maleolens* tiene buen soporte (*jackknife* 95%), pero las relaciones de las otras tres especies no se resuelven y en el árbol del soporte de *jackknife* este clado colapsa (Fig. 15).

Grado de divergencia molecular de los ITS 1 & 2

La divergencia de las secuencias de los ITS 1 & 2 en el clado basal de *M. nasuta* y afines varió del 4.7 al 3.05 %. La divergencia de las secuencias en *Heterotaxis* s.s. fue entre 5.95 y 0.14 %. Las especies incluidas de *Ornithidium* mostraron una variación entre 3.9 y 1.5 %. El nivel de variación de las muestras incluidas de *M. crassifolia* IS4–IS7 mostraron una variación de 0.56 % con respecto de *M. crassifolia*, la variación de *M. violaceopunctata* y *M. discolor* fue de 0.14 % y entre *M. violaceopunctata* y *M. villosa* fue de 0.71 %.

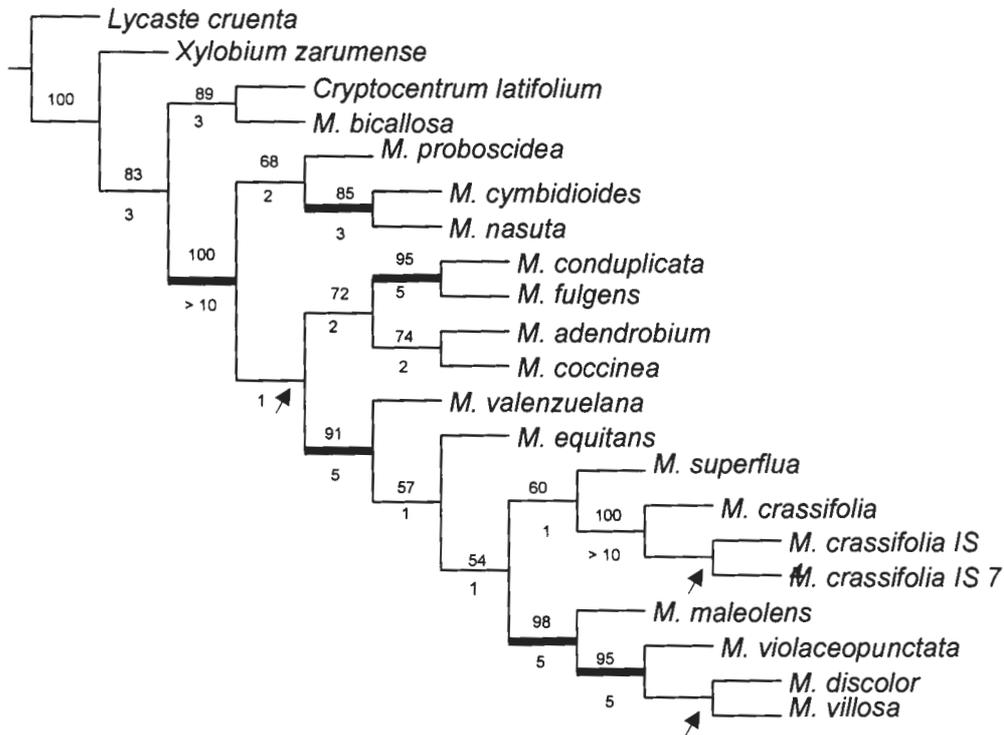


Figura 15. Único árbol encontrado de las relaciones filogenéticas de los complejos *Heterotaxis* y *Omithidium* basado en las secuencias de ADN (ITS 1 y 2) utilizando una búsqueda heurística. De los 787 pb solo 93 fueron informativos. Estrategia de búsqueda *h* 1000, *mult***N* 1000 *h*/10. *L* = 279, *CI* 0.75, *RI* = 0.76 (*L* = 177, *CI* = 0.62 y *RI* = 0.76 excluyendo caracteres no informativos). Los números sobre las ramas son los valores de *jackknife* y los números debajo de las ramas son los valores del índice Bremer. Las ramas de mayor grosor son las que reciben un mayor soporte. Las flechas indican los clados que no se encontraron en el árbol de consenso obtenido en el análisis de *jackknife*.

Discusión

La información obtenida de la secuencia de los ITS fue informativa entre las especies dentro de los complejos y brindó menor resolución a niveles más altos entre las relaciones de los complejos. La cantidad de sitios informativos en las secuencias se ubico entre los valores más bajos reportados en otros grupos de orquídeas (Pridgeon *et al.*, 1997; Bateman *et al.*, 1997; Pridgeon & Chase, 1998; van der Berg, *et al.*, 1999; Douzery *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2000; Molvray *et al.*, 2000; van der Berg, *et*



al., 2000; Sosa et al., 2001; Williams et al., 2001a; Williams et al., 2001b; Solano, 2002), los cuales oscilan entre el 18 y 71%.

En estos trabajos se consideran varios géneros cercanamente relacionados, lo que resulta en una mayor cantidad de sitios informativos. Valores similares de variación se han observado en estudios con especies de orquídeas dentro de un género y con respecto a géneros cercanamente relacionados, brindando mayor resolución dentro de los géneros y una menor resolución entre las relaciones de los géneros (Carlswald, 2003).

De acuerdo a resultados preliminares con secuencias de los ITS 1 y 2 de especies de *Maxillaria* y de géneros relacionados (*Cryptocentrum* Benth, *Mormolyca* Fenzl, *Chrysocycnis* Lindl. & Rchb. f., *Cyrtidiorchis* Rauschert, *Anthosiphon* Schltr., *Pitiphyllum* Schltr., y *Trigonidium* Lindl.), el clado considerado como grupo interno en el presente estudio se encuentra en una posición basal (Whitten et al., datos no publicados *); en su análisis estos autores consideran a este grupo como uno de los clados con mayor soporte y lo ubican como el grupo hermano de las especies de *Maxillaria* y de los géneros mencionado con anterioridad. A pesar de que en el presente estudio solamente se incluyen cuatro grupos externos, el grupo interno recibe el mayor soporte en el análisis.

En el único árbol obtenido se encontró a *Heterotaxis* como un grupo monofilético (excluyendo *M. nasuta*, *M. cymbidiodes* y *M. proboscidea*); este resultado es distinto a lo que se había mencionado por diversos autores basados en estudios morfológicos (Carnevali, 1991; Senghas, 1996; Christenson, 1999; Senghas, 2000); según este análisis *M. bicallosa* no pertenece a *Heterotaxis*, pero si se encuentra cercanamente relacionada al clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*.

A pesar de que *M. nasuta*, *M. cymbidiodes* y *M. proboscidea* forman un clado basal que en el único árbol encontrado es el grupo hermano de *Heterotaxis* s.s. – *Ornithidium*, esta topología no se soporta con el análisis de *jackknife*, ya que a este nivel se observa una politomía de tres clados: *M. nasuta* y afines, las especies de *Ornithidium* y *Heterotaxis* s.s. Las secuencias de los ITS no fueron informativos a este nivel y no permiten la resolución sobre las relaciones de estos tres clados. Esta topología también recibe poco soporte de bremer, ya que con un paso adicional colapsa la posición de estos tres clados.

En el clado *M. nasuta* y afines la especie *M. proboscidea* se ubica en posición basal dentro del clado y se ubica como el grupo hermano de *M. nasuta* y *M. cymbidiodes*. La posición como especies hermanas de estas dos últimas dos especies está bien soportado por los índices usados en el análisis y concuerda con la topología encontrada con el análisis basado en caracteres morfológicos.

* <http://www.filmnh.ufl.edu/natsci/herbarium/max/phylogenetics/phylogenetics.htm>

La topología encontrada sugiere que en el complejo *Heterotaxis* las especies pseudomonopdiales, *M. equitans* y *M. valenzuelana*, tienen una posición basal dentro del clado. Sin embargo, la posición de estas dos especies como basales dentro de este complejo no está fuertemente soportada. En *Heterotaxis* se reconocen dos subclados: el clado *Crassifolia* y el clado *Violaceopunctata*; a pesar de que ambos fueron también encontrados en el estudio morfológico, el clado *Violaceopunctata* recibe un mayor soporte. El poco soporte observado en el clado *Crassifolia* podría incrementarse cuando se incluyan las tres especies restantes (*M. fritzii*, *M. santanae* y *M. schultesii*), ya que según la morfología estas tres especies se agrupan en este clado y de acuerdo con observaciones preliminares que la adición de taxa a los análisis filogenéticos incrementa no solo la resolución, sino también el soporte de los árboles (Graybeal, 1998; Bremer *et al.*, 1999).

A pesar de que uno de los principios básicos del análisis filogenético es la inferencia de las relaciones por arriba del nivel de especies donde existe una jerarquización, en muchos trabajos se han incluyen muestras que representan subespecies, variedades o muestras de las cuales se tiene dudas sobre su pertenencia a una especie en particular; esto no como una prueba para delimitar la especie, sino como una evidencia más de que posiblemente sea necesario considerar una o dos especies (Andreasen & Bremer, 2000; Sun *et al.*, 2002; Carlsmard, 2003). En algunos trabajos la ubicación de las muestras en la topología es una evidencia sobre los límites de las especies (Andreasen & Bremer, 2000) y en otros la comparación de grado de divergencia entre las muestras también brinda una idea de los límites específicos (Sun *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se incluyeron dos muestras de *M. crassifolia* (IS 4 e IS 7) que provienen de poblaciones de esta especie que han sido consideradas como *Maxillaria gatunensis* Schltr.; autores previos han considerado a esta especie como más relacionada a *M. maleolens*, sin embargo, tanto la evidencia morfológica como molecular no soportan tal aseveración. El nivel de divergencia encontrado entre *M. crassifolia* y las dos muestras de *M. gatunensis* fue de 0.56 %, muy por debajo de lo observado entre *M. crassifolia* y *M. superflua* (3.6 %), dos especies cercanamente relacionadas. Sin embargo, el valor de divergencia entre *M. crassifolia* y *M. gatunensis* es mayor que el observado entre *M. violaceopunctata* y *M. discolor* (0.14 %) dos especies reconocidas como válidas, y del valor de *M. violaceopunctata* y *M. villosa* (0.71 %). Esto sugiere que estas entidades, tanto *M. crassifolia* y *M. gatunensis* como *M. villosa*, *M. discolor* y *M. violaceopunctata* deben ser estudiadas en mayor detalle considerando un número mayor de muestras de distintas poblaciones con el fin de delimitar la cantidad de especies incluidas en *Heterotaxis* s.s.

Bibliografia

- Baldwin BG, MJ Sanderson, JM Porte, MF Wojciechowski, CS Campbell, and MJ Donoghue** (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Bateman RM, AM Pridgeon and WM Chase** (1997) Phylogenetics of subtribe orchidiinae (Orchioideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* 12: 113-141.
- Bremer K** (1988) The limits of aminoacid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Bremer K** (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304
- Bremer B, RK Jansen, B Oxelman, M Backlund, H Lantz and K.Kim** (1999) More characters or more taxa for a robust phylogeny- case study from coffee family (Rubiaceae). *Syst. Biol.* 48:413-435.
- Carnevali G** (1991)*Citology and the pollinaria in the Maxillarinae (Orchidaceae)*. Master of Science Thesis in Biology. University of Missouri-St. Louis, USA. 171 p.
- Carlsward BS, WM Whitten and NH Williams** (2003) Molecular phylogenetics of Neotropical leafless Angraecinae (Orchidaceae): reevaluation of generic concepts. *Int. J. Plant Sci.* 164: 43-51.
- Chase WM and HG Hills** (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.
- Cox AV, AM Pridgeon, VA Albert, and WM Chase** (1997) Phylogenetics of slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Syst. Evol.* 208:197-223.
- Christenson EA** (1999) *Maxillaria*, an overview. Proceedings of the 16th world orchid conference. pp. 279-292.
- Douzery EJP, AM Pridgeon, P Kores, HP Linder, H Kurzweil and MW Chase** (1999) Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae) a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *Amer. J. Bot.* 86: 887-899.
- Doyle JJ and JL Doyle** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15
- Farris JS, VA Albert, M Källersjö, D Lipscom and AG Kluge** (1996) Parsimony jackknifing outperforming neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Golobof P** (1993) Nona, ver. 1.6. Program and documentation. Distributed by the author. , Buenos Aires.
- Gonzalez IL, JE Sylvester, TF Smith, D Stambolian and RD Schmickel** (1990) Ribosomal RNA gene sequences and hominid phylogeny. *Molec. Biol. Evol.* 7:203-219.
- Graybeal A** (1998) Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst. Biol.* 47: 9 17.
- Hamby RK and EA Zimmer** (1992) Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: *Molecular systematics of plants*. P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle (eds). Chapman & Hall, NY. Pp.- 50-91.
- Hillis DM, C Moritz, CA Porter and RJ Baker** (1991) Evidence for biased gene conversion concerted evolution of ribosomal RNA. *Science* 251:308-310.



- Kimura M** (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotid sequences.
- Lee SB and JW Taylor** (1992) Phylogeny of five fungus-like protocistian (*Phytophthora*) species inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molec. Biol. Evol.* 9:636-653.
- Molvray M, P Kores, S Hopper and A Brown** (2000) A phylogentic analysis of the subtribe Caladeniinae (Orchidaceae): based on ITS sequences. *Amer. J. Bot.* 87: 144 (Abstract)
- Nixon K** (2001) Winclada ver. 1.00.08. Program and documentation. Published by the author. Ithaca, NY.
- Pridgeon AM, RM Bateman, AV Cox, JR Hapeman and WM Chase** (1997) Phylogenetics of subtribe Oncidiinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences 1: Intergeneric relationships and poliphly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* 12: 89-109.
- Pridgeon AM and WM Chase** (1998) Phylogenetics of subtribe Catasetiinae (Orchidaceae) from nuclear and chloroplast DNA sequences. *Proceedings of the 15th world orchid conference*. Pp.- 275-281
- Ryan A, WM Whitten, MAT Johnson and MW Chase** (2000) A phylogenetic asesment of *Lycaste* and *Anguloa* (Orchidaceae: Maxillarieae). *Lindleyana* 15: 33-45.
- Saitou N and M Nei** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanderson MJ** (1995) Objections to bootstapping phylogenies: a critique. *Syst. Biol.* 44: 299-320.
- Senghas K** (1996) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 29. In: R. Schlechter, *Die Orchiden*. Berlin: Blackwell, 1727-1792.
- Senghas K** (2000) *Maxillaria*, un genre chaotique. *Richardiana* II (1): 29-38.
- Solano GRA** (2002) Filogenia y evolución del subtribu Pleurothaliidiinae (Orchidaceae). Teisi docotral. UNAM. 183 p.
- Soltis DE, PS Soltis and JJ Doyle** (1998) *Molecular systematics of plants II. DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers, USA.
- Sosa V, WM Chase, G Salazar, MW Whitten and NH Williams** (2001) Phylogenetic position of *Dignathe* (Orchidaceae: Oncidiinae): evidence form nuclaer ITS ribosomal DNA sequences. *Lindleyana* 16: 94-101.
- Sun Y, DZ Skinner, GH Liang and SH Hulbert** (1994) Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89: 26-32.
- van der Berg C, WE Higgins, RL Dressler, WM Whitten, A Culham and WM Chase** (1999) Molecular systematics of Laeliinae. *Proc of the 16th world orchid conference*. Pp.- 170-176.
- van der Berg C, WE Higgins, RL Dressler, WM Whitten and MW Soto** (2000) A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15: 96-114.
- White TJ, T Bruns, S Lee and J Taylor** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to*



methods and applications. M. Innis, D. Gelfand, J. Snisky and T. White (eds). Ac. Press. Pp.-315-322.

Whitten WM, NH Williams and MW Chase (2000) Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopinae: combined molecular evidence. *Amer. J. Bot.* 87: 1842-1856.

Williams NH, MW Chase, T Fulder and WM Whitten (2001a) Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence region: expanded circumscriptions of *Cyrtorchilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus. (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 113-139.

Williams NH, MW Chase and WM Whitten (2001b) Phylogenetic positions of *Milioniopsis*, *Caucaea*, a new genus, *Cyrtorchiloides*, and *Oncidium phymatochilum* (Orchidaceae: Oncidiinae) based on nuclear and plastid DNA sequence data. *Lindleyana* 16:272-285.



CAPITULO IV

Análisis filogenético del complejo *Heterotaxis* Lindley con base en la evidencia total: evolución de la arquitectura vegetativa y de los síndromes de polinización

Introducción

El principal objetivo de una filogenia es el reconstruir la historia evolutiva de un grupo de organismos. Si se considera que esta historia evolutiva es única para este conjunto de organismos, entonces, es posible pensar que cualquier fuente de información que se utiliza para reconstruirla nos debe llevar a la misma historia.

La congruencia entre diferentes estudios usando distintas fuentes de datos es una evidencia fuerte de que lo que se esta encontrando refleja la historia evolutiva real del grupo (Hillis, 1987).

Los caracteres morfológicos han sido los tradicionalmente utilizados por los taxónomos y de estos se han generado los sistemas básicos de clasificación con los que contamos hoy en día (Stevens, 1984, 1986). El uso de estos caracteres presenta ventajas y desventajas según el grupo en cuestión. En ciertos grupos de organismos presentan suficiente variación informativa para la reconstrucción filogenética. En cambio, en algunos grupos de organismos los caracteres morfológicos por si solos no han podido resolver la filogenia. La incorporación de nuevas fuentes de datos, tales como la fotoquímica, micromorfología, anatomía, el número cromosómico y la ultraestructura, han venido a aportar nueva evidencia sobre las relaciones de los organismos.

El rápido desarrollo de las técnicas moleculares para la obtención de secuencias de los ácidos nucleicos ha revolucionado el estudio de la sistemática filogenética en las últimas dos décadas. Esto ha traído no solo una nueva fuente de datos de rápida obtención, sino también un debate sobre sus ventajas sobre los caracteres morfológicos (Hillis, 1987).

Con el tiempo se ha demostrado el valor de ambas fuentes de datos y cada día son más comunes los trabajos que combinan ambas fuentes de datos para maximizar la información, la explicación y la estabilidad de sus estudios. No es de esperarse que una fuente única de datos sea informativa a distintos niveles; por ello, el uso combinado de distintas fuentes brinda resolución a distintos niveles de la jerarquía taxonómica y un mejor entendimiento de las relaciones de los organismos.

La disposición de distintas fuentes de datos ha llevado al desarrollo de diversas filosofías y procedimientos para el análisis de estos datos múltiples (Ballard *et al.*, 1998).

La congruencia taxonómica fue propuesta por Mickevich (1978); en este método los datos se dividen y se analiza cada parte de los caracteres por separado,



construyendo al final un árbol de consenso que resume las características topológicas compartidas en los análisis separados (Jones *et al.*, 1993).

Faith & Cranston (1991) desarrollaron el método de evidencia jerárquica combinada para datos con serios problemas homoplásicos, en este análisis los datos son divididos y a cada partición se le evalúa su estructura usando una prueba de permutación probabilística; finalmente, se construye un árbol de las particiones con estructura jerárquica (Faith, 1990).

Ballard *et al.* (1998) desarrollaron el método denominado evidencia compatible, el cuál consiste de un análisis de congruencia taxonómica seguida de una combinación de datos condicionales.

Finalmente, Kluge (1989) sugirió que todos los grupos de datos deben ser analizados de manera simultánea de acuerdo a la evidencia total o análisis simultáneo (Nixon & Carpenter, 1993). En este análisis se busca la hipótesis que mejor ajuste y, que en términos cladísticos, involucre la maximización de la congruencia entre los caracteres.

En el presente capítulo se presenta una análisis de la evidencia total de los caracteres usados en la reconstrucción filogenética del complejo *Heterotaxis*. Se discute la congruencia o el conflicto observado en los análisis de los capítulos anteriores y en la topología encontrada se estudia la evolución de la arquitectura vegetativa y de las características florales asociadas a los síndromes de polinización.

Materiales y métodos

Taxa terminales

En el análisis de evidencia total se consideraron 19 taxa terminales en el grupo interno y se utilizaron los mismos grupos externos que en capítulos anteriores. No se incluyeron a *Maxillaria fritzii*, *M. schultesii* ni a *M. santanae*.

Análisis filogenético

La matriz de datos morfológicos se combinó con la matriz de secuencias de ADN de los ITS 1 & 2 usando la opción winclado implementado en Winclada ver. 1.00.08 (Nixon, 2001). Todos los caracteres se consideraron con el mismo peso, se utilizó parsimonia de Fitch y todos fueron considerados como no ordenados. El análisis de parsimonia se corrió usando el programa NONA (Golobof, 1993).

Se realizó una búsqueda heurística con la estrategia múltiple TBR+TBR (*mult*max**), con un total de 1000 réplicas (*mult.*1000*). Cada réplica se inició con 10 árboles en la memoria (*h/10*) y se conservaron un máximo de 1000 árboles (*hold 1000*).

A cada árbol obtenido se le calculó la longitud (L) y los niveles de homoplasia se evaluaron con el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI). Para el soporte de los árboles se utilizó el análisis de *jackknife* (Farris *et al.*, 1996), utilizando una búsqueda con 1000 réplicas (*h 1000*), realizando 10 réplicas de la búsqueda (*mult* 10*) y reteniendo 10 árboles en la memoria (*h/10*).

El soporte de las ramas se evaluó mediante el índice de Bremer (Bremer, 1988, 1994); este valor se obtuvo sometiendo la matriz de caracteres y el árbol obtenido al programa NONA desde Winclada; se sometió la matriz a una búsqueda TBR reteniendo los árboles de longitud mayor a la del árbol en la memoria. Para el análisis se usó una memoria de 10 000 árboles (*h 10 000*), tomando un número de pasos extra de 10 con el comando *bs 10*.

Para estimar la incongruencia entre los datos provenientes de la morfología (vegetativa, floral y anatomía) y las secuencias de los ITS 1 y 2 se realizó la prueba de incongruencia (ILD) de Farris *et al.*, (1995), implementada en Winclada ver. 1.00.08 (Nixon, 2001). Ambas matrices se sometieron a 1000 réplicas, 2 réplicas por replicación (*mult reps/replication*), reteniendo dos árboles por réplica (*trees to hold/mult rep*) y reteniendo 10 árboles (*trees for hold*).

Los árboles resultantes y la distribución de los caracteres se examinó usando CLADOS (Nixon, 2001), usando la optimización ACCTRAN (*fast*).

Resultados

La matriz de la combinación de las matrices morfológicas y moleculares resultó en una matriz de 845 caracteres, de los cuales 141 fueron filogenéticamente informativos. La búsqueda heurística resultó en un único árbol más parsimonioso, con una L = 388, un CI = 0.78 y RI = 0.79 (L = 274, CI = 0.68 y RI = 0.79 excluyendo los caracteres no informativos).

En el árbol encontrado se observan tres subclados con un fuerte soporte dentro del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*. En una posición basal se encuentra el clado *M. nasuta* y afines (100% *jackknife*, 9 de Bremer) y como clados hermanos se encuentran las especies de *Ornithidium* y *Heterotaxis s.s* (97% *jackknife*, 4 pasos de índice de Bremer). El clado que incluye a estos tres complejos de especies recibe fuerte soporte (100% *jackknife*, >10 de pasos) (Fig. 16).

Dentro del clado *M. nasuta* y afines, *M. proboscidea* es la especie basal y *M. nasuta* y *M. cymbioides* se agrupan como especies hermanas (99% *jackknife*, 6 de Bremer); las relaciones dentro de este clado están resueltas y reciben un fuerte soporte

En *Heterotaxis* se encontraron dos clados, en uno se agrupan las especies de mayor talla, referido en capítulos previos como el clado *Violaceopunctata* (99% *jackknife*, 10 pasos de Bremer); en este clado *M. maleolens* es la especie basal y a pesar de que en el único árbol las relaciones del resto de las especies se encuentra resuelta, en el árbol obtenido del análisis de *jackknife* a este nivel se forma una politomía. El otro clado (referido en capítulos anteriores como clado *Crassifolia*) dentro de *Heterotaxis* recibe poco soporte (71% *jackknife*, 2 pasos de Bremer); en él se encuentran *M. equitans* y *M. valenzuelana* como especies hermanas y *M. crassifolia* y *M. superflua* como especies hermanas. De estos, el primer grupo formado por las especies pseudomonopodiales recibe un mayor soporte (93% *jackknife*, 3 pasos de Bremer) (Fig. 16).

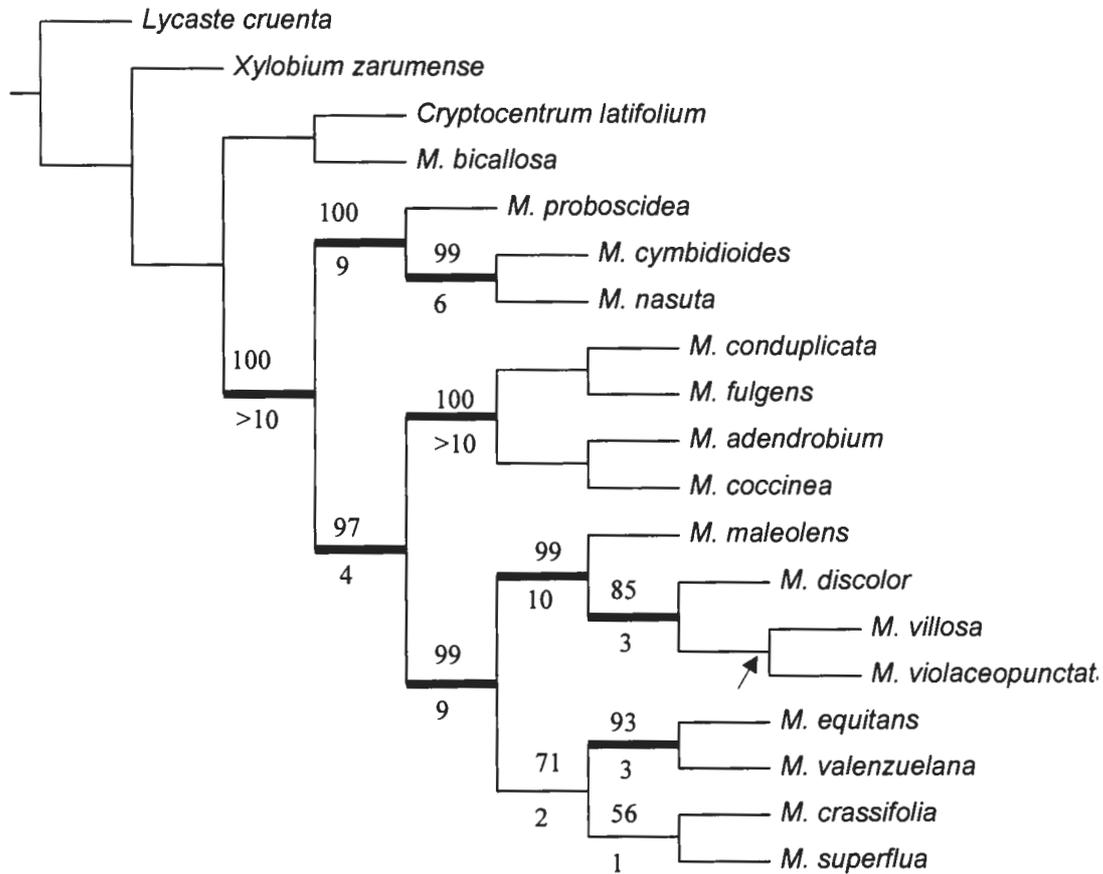


Figura 16. Único árbol encontrado de las relaciones filogenéticas de los complejos *Heterotaxis* y *Omithidium* basado en la evidencia total de las secuencias de ADN (ITS 1 & 2) y de los caracteres morfológicos y anatómicos. Estrategia de búsqueda *h 1000, mult*N 1000 h/10*. Los números sobre las ramas son los valores de *jackknife* y los números debajo indican los valores del índice de Bremer. Las ramas de mayor grosor son las que reciben un mayor soporte en el análisis. La flecha indica las ramas que colapsan en el árbol encontrado con el uso *jackknife*.

Discusión

Existe una fuerte discusión metodológica y conceptual sobre la “mejor” manera de utilizar distintas fuentes de datos (morfología, molecular, comportamiento, química, etc.) en la reconstrucción filogenética (de Queiroz *et al.*, 1995). Existe evidencia tanto a favor como en contra de analizarlos por separado y comparar los árboles en búsqueda de congruencia taxonómica o combinarlos en un solo análisis de evidencia total (Baum, 1992; Bull *et al.*, 1993; Miyamoto & Fitch, 1995).

Uno de los métodos más usados para analizar datos de distintas fuentes es el de congruencia taxonómica (Mickevich, 1978). En este los datos se analizan por separado y se examina la incongruencia de los cladogramas obtenidos mediante un árbol de consenso. Los resultados obtenidos de las filogenias con base en la morfología y de las secuencias de los ITS 1 & 2 del clado *Heterotaxis* - *Ornithidium* mostraron ser congruentes en la mayoría de los cladogramas obtenidos. En ambos análisis se reconocen tres cladogramas en el grupo interno y en ambos el clado de *M. nasuta* y afines se encuentra en una posición basal; ambas fuentes de datos soportan la hipótesis de que *Ornithidium* es el clado hermano de *Heterotaxis* s.s. (Fig. 17).

La única incongruencia en los resultados obtenidos se observó en la posición de *M. equitans* y *M. valenzuelana*. En ambos análisis se agrupan como especies hermanas; sin embargo, su posición con respecto al resto de las especies dentro de *Heterotaxis* s.s. es distinta en los análisis. De acuerdo a la morfología, estas dos especies se encuentran en una posición derivada dentro del clado *Crassifolia*; mientras la evidencia molecular las ubica en una posición basal dentro de *Heterotaxis* s.s. La evidencia total ubica a estas dos especies en el clado *Crassifolia* y en una posición derivada dentro de *Heterotaxis* s.s. (Fig. 17).

Esta incongruencia en los resultados obtenidos podría deberse en parte a la disparidad en el número de taxa incluidos en los análisis por separado de la morfología y las secuencias de los ITS 1 y 2, ya que aún falta por incluir tres especies en el análisis molecular que se incluyeron en el análisis morfológico; este hecho de la disparidad en las reconstrucciones filogenéticas ha sido mencionado como uno de los factores de incongruencia entre topologías de distintas fuentes (de Queiroz *et al.*, 1995).

Tal como se ha mencionado con anterioridad (Baum, 1992; Bull *et al.*, 1993; Chippindale & Wiens, 1994; de Queiroz *et al.*, 1995), el análisis combinado de los datos de la morfología y las secuencias de ADN resultó no solo en un incremento de los cladogramas con mayor soporte (cuadro 9), sino en una mejor resolución del análisis a distintos niveles de la topología.

Los caracteres morfológicos presentaron muy poca variación entre especies cercanamente relacionadas y de hecho la mayor información se dio de características de estructuras florales y de la anatomía de la hoja; estudios previos de la anatomía en especies del género *Maxillaria* han mostrado ser una buena fuente de caracteres para la reconstrucción de la filogenia entre especies cercanas y complejos de especies (Holtzmeier, 1998; Davies, 1999). La morfología fue más informativa entre los cladogramas de especies.

A pesar de que solo el 11.8 % de las secuencias de los ITS fue filogenéticamente informativa, esta variación permitió reconstruir las relaciones entre especies cercanas; sin embargo, las secuencias de los ITS no permitieron establecer las relaciones entre los cladogramas *Ornithidium*, *Heterotaxis* s.s. y *M. nasuta* y afines; a este nivel estos tres cladogramas forman una politomía; la resolución sobre cual de estos es el grupo hermano de *Heterotaxis* s.s. solo fue posible cuando se incorporó la evidencia morfológica y anatómica.

El análisis combinado de ambos datos presentado en este capítulo muestra también congruencia con lo encontrado en capítulos anteriores basados en análisis separados de la morfología y en las secuencias de ADN.

La evidencia total de la morfología y las secuencias resulta en la existencia de tres clados dentro de *Heterotaxis* – *Ornithidium*. Contrario a lo que se había pensado con anterioridad, las tres especies del clado *M. nasuta* y afines no están comprendidas en lo que se ha considerado como el complejo *Heterotaxis* (o *Dicrypta*); tal como se había considerado antes a el complejo *Heterotaxis* (incluyendo *M. bicallosa*, *M. chartacifolia* y *M. nasuta* y afines) (Carnevali, 19991; Christenson, 1999; Atwood, *et al.*, *datos no publicados*) este es polifilético. Las especies de *Heterotaxis* s.s. están más relacionadas con las especies incluidas del complejo *Ornithidium*.

Cuadro 9. Resultados obtenidos de las relaciones filogenéticas del complejo *Heterotaxis* usando la morfología y las secuencias en análisis separados y combinados.

Estadísticos	Morfología	ITS 1 & 2	Combinado (morfología + ITS 1 & 2)
No. de posiciones en la matriz	58	787	845
No. de sitios filogenéticamente informativos	56	93	141
No. de árboles encontrados	20	1	1
Longitud del árbol (L)	106	279	388
CI	0.85	0.75	0.78
RI	0.92	0.76	0.79
No. de clados con > 85% de soporte en el árbol de consenso de <i>jackknife</i>	4	6	9

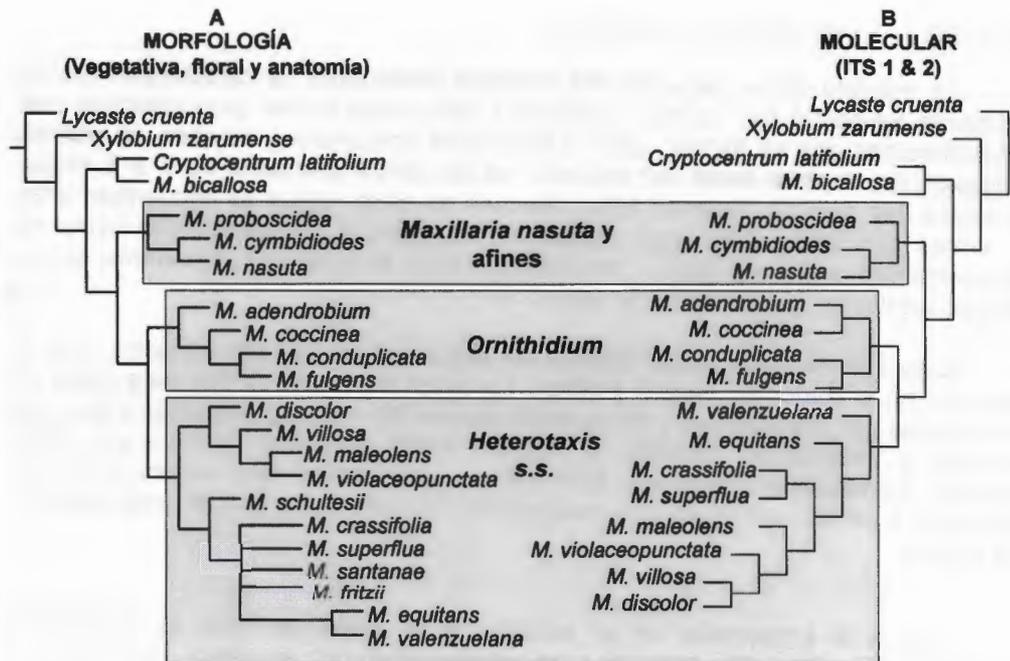


Figura 17. Árbol de consenso de la relaciones filogenéticas del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium* basado en (A) datos morfológicos y (B) secuencias de los ITS 1 & 2. Los recuadros en gris señalan los clados encontrados en el análisis que representan a los complejos de especies reconocidos por previos autores.

Dentro del clado de *Heterotaxis* s.s. las diversas fuentes de datos apuntan a la existencia de dos clados en el complejo. El análisis separado de los datos de la morfología y las secuencias de los ITS establecen la presencia del clado *Violaceopunctata*, el cual incluye a las especies de mayor talla, que presentan una menor suculencia de sus partes vegetativas y las cuales presentan un incremento en las partes tanto florales como vegetativas con respecto al resto de *Heterotaxis* s.s. Este clado también presenta los conteos cromosómicos mas altos dentro de *Heterotaxis* s.s (Carnevali, 1991).

El clado *Crassifolia* no se encuentra en el análisis de las secuencias de los ITS 1 & 2, esto en parte a la ausencia de tres especies, que en el análisis morfológico la ubican dentro de este clado (Fig. 18). La evidencia total soporta la hipótesis de dos clados dentro de *Heterotaxis* s.s., que corresponden a los mismos clados encontrados en el análisis morfológico. *Maxillaria valenzuelana* y *M. equitans* se ubican como especies hermanas y más relacionadas a *M. crassifolia* y a *M. superflua*, que con las especies del clado *Violaceopunctata*.

Evolución de la arquitectura vegetativa

La mayoría de las especies del complejo *Heterotaxis* se caracterizan por un crecimiento simpodial con rizomas rastreros y entrenudos cortos que ocasionan que los pseudobulbos que se forman estén fuertemente agrupados y resulten en plantas cespitosas. En la parte basal del simpodio se encuentra una serie de 3 a 6 vainas imbricadas que carecen de limbo foliar, después de estas vainas se encuentran unas 4-7 vainas con limbo foliar que rodean al pseudobulbo. El pseudobulbo presenta únicamente una hoja en el ápice y las inflorescencias se producen únicamente en las axilas de las vainas que tienen limbo foliar.

Este tipo de crecimiento también se encuentra en las tres especies que se agruparon en el clado *M. nasuta* y afines. La única diferencia es que este clado en dos especies (*M. proboscidea* y *M. cymbidioides*) se ha reportado individuos con dos hojas en el pseudobulbo (Dodson & Atwood, 1997; Carnevali & Ramírez, 2003; Carnevali, *comunicación personal*). Este hecho puede representar evidencia que las especies que se encuentran en este clado podría ser más de las que se consideran en este análisis.

Según lo encontrado en el análisis de la evidencia total, el crecimiento simpodial con entrenudos reducidos es plesiomórfico en el clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*. Esta arquitectura vegetativa se encuentra en la mayoría de las especies del complejo *Heterotaxis* s.s., todas las especies del clado *Violaceopunctata* lo presentan y en el clado *Crassifolia* solo *Maxillaria crassifolia* y *M. superflua*. Aunque en el análisis de evidencia total no se encuentran *Maxillaria schultesii*, *M. santanae* y *M. fritzii*, estas presentan el mismo hábito que *M. crassifolia* y la hipótesis es que cuando sean incluidas se agruparan en este clado (Fig. 18).

De hecho, el tipo de arquitectura vegetativa de *M. fritzii* es simpodial con pseudobulbos, pero estos (al igual que en *M. crassifolia*) están cubiertos por las vainas y son poco visibles; a simple vista *M. fritzii* parecería la transición entre las especies simpodiales y las pseudomonopodiales.

El hábito pseudomonopodial de *Maxillaria valenzuelana* y *M. equitans* es derivado dentro del clado *Crassifolia*. Este tipo de crecimiento presenta rizomas rastreros (pre-yema de renuevo) con entrenudos cortos como en las especies simpodiales y de los cuales se originan los simpodios (post-yema de renuevo) de crecimiento erecto o péndulo según la especie; la ausencia de pseudobulbos parece haberse debido a una supresión de estos en una etapa temprana del crecimiento (neotenia) (al menos para *M. valenzuelana*), con un alargamiento posterior de la post-yema de renuevo.

La pérdida de los pseudobulbos en *M. equitans* en este hábito no pudo deberse por una reducción de estos hasta su completa supresión (como la observada en *M. fulgens* del complejo *Ornithidium*) ya que un análisis exhaustivo de varias muestras de herbario y material vivo de esta especie no reveló la presencia de pseudobulbos

reducidos. En *M. equitans* y *M. valenzuelana* al parecer se dio una supresión de los pseudobulbos por un proceso neoténico y un alargamiento de los entrenudos del simpodio. De igual manera no se encontró evidencia de que esta pérdida se halla dado de manera gradual durante el desarrollo de la planta, ya que no se encontraron pseudobulbos reducidos.

La post-yema de renuevo originada del rizoma del hábito pseudomonopodial sigue el mismo patrón de crecimiento observado en las plantas simpodiales. Primero se producen las vainas sin limbo foliar y posterior a estas se encuentran las vainas que presentan limbo foliar. Las inflorescencias de igual manera solo se producen en las vainas que presentan limbo foliar. Lo particular de este tipo de crecimiento (de allí su nombre) es que los simpodios tienen un crecimiento limitado, que al finalizar surge otra post-yema de renuevo del rizoma rastrero con el mismo patrón de crecimiento.

A pesar de que en el presente estudio no se consideran más de cuatro especies del complejo *Ornithidium*, se puede concluir algunas generalidades sobre la evolución de la arquitectura vegetativa en este grupo. Este grupo presenta una mayor variación de arquitecturas simpodiales. El tipo de arquitectura vegetativa simpodial que presenta tanto el clado de *M. nasuta* y afines y el de la mayoría de las especies de *Heterotaxis* s.s. esta ausente en este complejo (observación personal; Atwood, comunicación personal).

La arquitectura simpodial más cercana a la observada en *Heterotaxis* s.s. es la de *M. coccinea*; la cual es similar a la encontrada en el complejo *Heterotaxis*, excepto por el hecho de que los rizomas rastreros (pre-yema de renuevo) presentan entrenudos alargados que originan que los pseudobulbos estén separados a intervalos mas o menos constantes.

Con la cantidad de especies incluidas en el análisis no es posible explicar la manera como toda esta variedad de hábitos vegetativos evolucionó; sin embargo, al parecer dentro de este complejo después de la aparición de especies con rizomas rastreros con entrenudos largos se originaron las especies que presentan los hábitos simpodiales con tallos aéreos, seguido de la supresión paulatina de la producción de pseudobulbos hasta llegar a la formación de plantas monopodiales.

Evolución de las estrategias de polinización en el clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*

La información relacionada a la polinización en el género *Maxillaria* es escasa. Las abejas han sido reportadas como los principales polinizadores, estas incluyen a *Bombus volucellioides* en *M. fletcheriana*, *Eulaema cingulata* en *M. grandiflora* y *M. sanderinana*, *Trigona testaceae* y *T. amaltea* en *M. reichenmiana* y *Melipona eburnea* en *M. furstenbergae*. Pájaros de la especie *Pantrope insignis* han sido observados en especies no identificadas de *Maxillaria* con flores tubulares rosadas (van der Pijl & Dodson, 1966).

La evidencia que soporta el papel de las abejas en la polinización de este género ha sido reportada con la observación de polinios de *M. rufescens* en el tórax de *Eulaema cingulata* (Dodson, 1962). Al parecer los principales atrayentes de polinizadores este grupo de orquídeas es la producción de ceras y elseudopolen (van der Pijl & Dodson, 1966). Porsch (1905) reportó la recolección grandes masas de cera blanca del labelo *M. divaricata* sin néctar y al parecer esta es usada para la construcción de nidos. La recolección de cera también ha sido observada en especies de avispas (Dressler, 1993). En *Maxillaria pendens* (= *Maxillaria rigida* Barb. Rodr.) se ha reportado polinización por *Stelopolybia*, una avispa véspida que al parecer recolecta cera del callo del labelo (Braga, 1978).

En *Maxillaria* el términoseudopolen es utilizado para referirse a los tricomas moniliformes con células componentes que se separan en la madurez (Davies & Winters, 1998; Davies *et al.*, 2000). En *M. rufescens* y otras especies, elseudopolen consiste de tricomas unicelulares de pared delgada con granos de aleurona y gotas de aceite y carecende tricomas moniliformes (Davies, *datos no publicados*). La producción deseudopolen ha sido observada en al menos unas 50 especies del género *Maxillaria* (van der Pijl & Dodson, 1966). Este síndrome de polinización por abejas que recolectan polen ha sido confirmado en *Maxillaria grandiflora* y *M. sanderiana* (Dodson & Frymire, 1961; Dodson, 1962). La recolección deseudopolen ha sido también reportada por especies de *Melipona* en especies de *Maxillaria* no identificadas de Ecuador (Dressler, 1993).

No existen reportes sobre la biología de la polinización de las especies del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*. El clado basal de *M. nasuta* y afines presenta una inflorescencia de mayor tamaño con respecto a los otros dos clados. Este grupo de especies poseen flores de colores amarillos y el labelo presenta un callo carnoso y liso en el ápice. Los labelos son de color púrpura oscuro y al menos en *M. nasuta* las flores producen un aroma suave y agradable (*observación personal*).

Las especies de *Heterotaxis* s.s. presentan una inflorescencia de menor tamaño, las flores son amarillas y de una textura carnosa. Hay una mayor variación en la superficie de los callos; algunas especies presentan callos en todo lo largo del labelo, mientras otras solo en la parte basal. La consistencia también es variable, algunas tienen una consistencia carnosa y agregada mientras en otras la superficie del labelo asemejaseudopolen. La producción de fragancias solo ha sido reportada en *M. maleolens*, *M. discolor* y *M. villosa*.



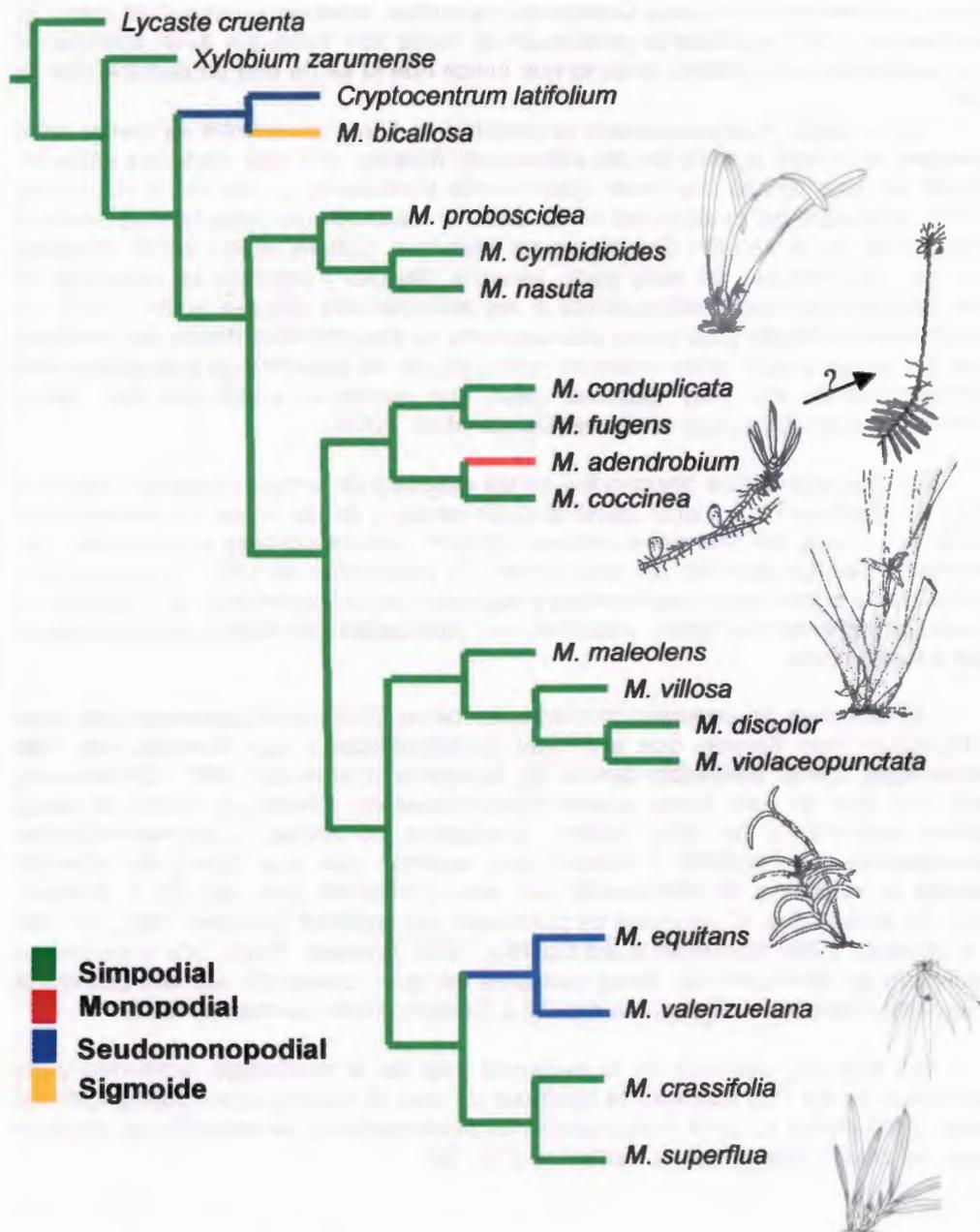


Figura 18. Hipótesis para explicar la posible evolución de la arquitectura vegetativa del clado *Heterotaxis - Ornithidium*. El hábito simpodial es plesiomórfico dentro del clado. En *Heterotaxis* s.s. la arquitecturaseudomonopodial es derivada. L = 4, CI = 0.75 RI = 0.50.

En *Heterotaxis* s.s. las especies que producen un número mayor de flores por axila se encuentran en el clado Crassifolia; es común observar en especies como *M. valenzuelana* y *M. crassifolia* la producción de hasta tres flores por axila, además de varias abortadas en la misma axila; lo que indica que si se da una producción alta de flores.

En el clado Violaceopunctata la cantidad de flores producidas es menor, pero presentan un mayor tamaño de las estructuras florales; en esta clado las especies también se caracterizan por tener labelos más trilobulados y con callos reducidos. Análisis detallados del pseudopolen en *M. discolor* muestran que esta es muy similar a la observada en la sección Gradiflorae de *Maxillaria* (Davies *et al.*, 2000). Estudios recientes con especies de este clado (alianza "discolor") reportan la presencia de ceras triterpénicas como recompensa a los polinizadores (Singer *et al.*, 2002). Al parecer esta estrategia para atraer polinizadores es plesiomórfica dentro de *Maxillaria* y esta ha evolucionado varias veces en varios grupos de especies de este género que morfológicamente son muy distintos, pero que desde el punto de vista de la ultraestructura del labelo son similares (Davies *et al.*, 2000).

Las características observadas en las especies de ambos clados (*M. nasuta* y afines y *Heterotaxis* s.s ; tales como el color amarillo de las flores, la presencia de labelos con callos de diferentes texturas (granos, masas cerosas o carnosas) que asemejan polen (producción de pseudopolen), la producción de cera, la ausencia de producción de néctar como recompensa y la presencia de fragancia en *M. maleolens* y *M. nasuta*, sugieren que estas especies son polinizadas por abejas recolectores de ceras o pseudopolen.

El complejo de especies consideradas como *Ornithidium* presentan una serie de modificaciones florales que son muy características y que siempre han sido mencionadas como derivadas dentro de *Maxillaria* (Camevali, 1991; Christenson, 1999); los taxa de este clado poseen flores tubulares, labelos en forma de saco, polinario reducido y de color hialino, producción de néctar y colores brillantes principalmente rojo, amarillo y blanco, que sugieren que este grupo de especies presenta el síndrome de polinización por aves (colibríes) (van der Pijl & Dodson, 1966). Se piensa que *M. coccinea* es polinizada por colibríes (Dodson, 1962; van der pijl & Dodson, 1966; Ackerman & del Castillo, 1992; Dressler, 1993); una especie no identificada de *Maxillaria* con flores tubulares de color rosado tal vez sea polinizada por el colibrí *Pantrope insignis* (van der Pijl & Dodson, 1966; Clements, 1981).

La filogenia obtenida de la evidencia total de la morfología, anatomía y las secuencias de los ITS soportan la hipótesis de que el síndrome por polinización de abejas recolectoras de cera o pseudopolen es plesiomórfica y la ornitofilia es derivada dentro del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium* (Fig. 19).

Implicaciones taxonómicas

Existe evidencia morfológica, anatómica y de las secuencias de ADN de los ITS 1 & 2 que sugieren el estado poli o parafilético de *Maxillaria* y que varios complejos de especies podrían reconocerse a un nivel genérico (Carnevali, 1991; Holtzmeier, 1998; Whitten *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, *datos no publicados*). El clado *Heterotaxis - Ornithidium* es uno de los complejos de especies que podrían ser reevaluados desde el punto de vista taxonómico.

Un análisis filogenético basado en las secuencias de los ITS 1 & 2 de aproximadamente 147 especies del género *Maxillaria* y géneros relacionados (*Cryptocentrum*, *Antosiphon*, *Pityphyllum*, *Crysocycnis*, *Mormolyca*, *Trigonidium*) ubica a el clado *Heterotaxis - Ornithidium* en una posición basal dentro de la filogenia de *Maxillaria* s.l, ubicandolo como uno de los clados con mayor soporte de *bootstrap* (Whitten *et al.*, *datos no publicados*).

La evidencia morfológica, anatómica y molecular (ITS 1 & 2) soporta la hipótesis de que este clado no está incluido dentro de lo que actualmente se considera *Maxillaria* (Carnevali, 1991; Holtzmeier, 1998; Whitten *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, *datos no publicados*). Si uno de los objetivos de un sistema de clasificación es reflejar las relaciones filogenéticas de los taxa y de reconocer solamente grupos monofiléticos, el clado *Heterotaxis - Ornithidium* debe ser reevaluado taxonómicamente.

A este clado se asocian cinco nombres de géneros descritos. El más antiguo de estos dentro del clado es *Ornithidium* Salisb. (basado en *M. coccinea*) y descrito en 1824; *Maxillaria adendrobium*, una de las especies de este complejo, ha sido descrita bajo el nombre de *Neurbania* (Rchb. f.) Dressler; a este nombre se asocian un grupo de especies que además de algunas características de *Ornithidium* comparten la presencia de una quilla en el labelo y el grado de fusión del labelo.

En el clado *Heterotaxis* s.s. están asociados dos nombres, *Heterotaxis* y *Dicrypta*, ambos basados en *M. crassifolia*; el primero cuatro años más antiguo que el segundo. A pesar de que *Dicrypta* es el más comúnmente usado para referirse a este grupo de especies, los argumentos presentados por Lindley (Lindley, 1830-1840) no invalidan la prioridad de *Heterotaxis* sobre *Dicrypta*.

Más recientemente, Hoehne (1947) describió el género *Marsupiarina* en donde agrupa a las especies con crecimiento pseudomonopodial, *Maxillaria valenzuelana* y *M. equitans*. A este género también se ha asociado a *M. witsinioides* (Senghas, 1993, 1994, 2000).

La evidencia presentada en el presente trabajo soporta la hipótesis de la presencia de tres clados con alto soporte dentro del clado *Heterotaxis - Ornithidium* y con sinapomorfias morfológicas.

Una de las posibilidades para la reevaluación taxonómica de este clado podría ser el reconocimiento de todo el clado bajo el nombre *Ornithidium*; sin embargo, esto resultaría en un agrupamiento de taxa muy heterogéneas floral y vegetativamente y difícilmente definible por sinapomorfias morfológicas. En este análisis únicamente la

presencia de un pie columnar reducido fue una sinapomorfía del clado *Heterotaxis* – *Ornithidium*; este carácter esta presente en otros grupos dentro de *Maxillaria* y no sería un buen caracter para delimitar el clado.

Otra posible opción sería reconocer el género *Heterotaxis* (excluyendo a *Maxillaria nasuta*, *M. cymbidiodes* y *M. proboscidea*) y describir un nuevo género para *M. nasuta* y afines. Tanto la evidencia morfológica, anatómica y molecular soportan la separación de estas tres especies de *Heterotaxis*.

Para el caso de *Marsupiarina* la evidencia presentada aquí no soporta el hecho de reconocerlo como un género válido; a pesar de las dos especies analizadas (*M. valenzuelana* y *M. equitans*) tienen un alto soporte como especies hermanas, su posición derivada dentro del clado *Crassifolia* de *Heterotaxis* s.s. y el hecho de que *M. witsinioides* esta más relacionado al complejo de *M. acuminata*, son evidencias de que estas dos especies deben ser consideradas como *Heterotaxis* y que el género *Marsupiarina* es artificial y solo representa la evolución convergente de esta arquitectura vegetativa en especies de distintos linajes. Además, su separación implicaría la creación de otro género nuevo para el clado *Violaceopunctata*.

Este trabajo se inclina más por la segunda opción, reconocer a un nivel de género *Heterotaxis* y describir un nuevo género para *M. nasuta* y afines.

Biogeografía

De la filogenia del clado se puede decir que este grupo de origen amazónico. El patrón observado en los cladogramas *Heterotaxis* y *M. nasuta* y afines es la presencia de una especie a un área restringida y una de más amplia distribución. A pesar de que en la figura 20 faltan tres especies, estas también presentan este comportamiento en los cladogramas a los que pertenecen. En el clado de *Maxillaria nasuta* y afines la especie basal *M. proboscidea* es de distribución restringida de la cordillera de la costa en Venezuela. *Maxillaria nasuta* es de una distribución más amplia en Sudamérica. De este grupo, *M. nasuta* ha sido reportada en Chiapas, México.

La mayoría de las especies del complejo *Ornithidium* se encuentran en los Andes; este grupo presenta su mayor diversidad en esta zona. Otras especies como *Maxillaria coccinea* tienen una distribución más amplia en el Neotrópico.

El clado *violaceopunctata* es básicamente Sudamericano. Dos especies de este grupo, *M. maleolens* y *M. discolor* se distribuyen hasta Centroamérica. En el clado *Crassifolia*, hay especies de distribución exclusiva en la amazonía. Las tres especies que no se encuentran en la figura 20, *M. santanae*, *M. schultesii* y *M. fritzii* son sudamericanas. En este grupo, *M. crassifolia* es la que presenta un mayor rango de distribución, se ha reportado desde el sur de Florida y en Centroamérica; poblaciones de esta especie en Sudamérica podrían representar una especie distinta (*M. gatunensis*) o una variedad de *M. crassifolia*. *Maxillaria valenzuelana* y *M. equitans* se distribuyen en Sudamérica.



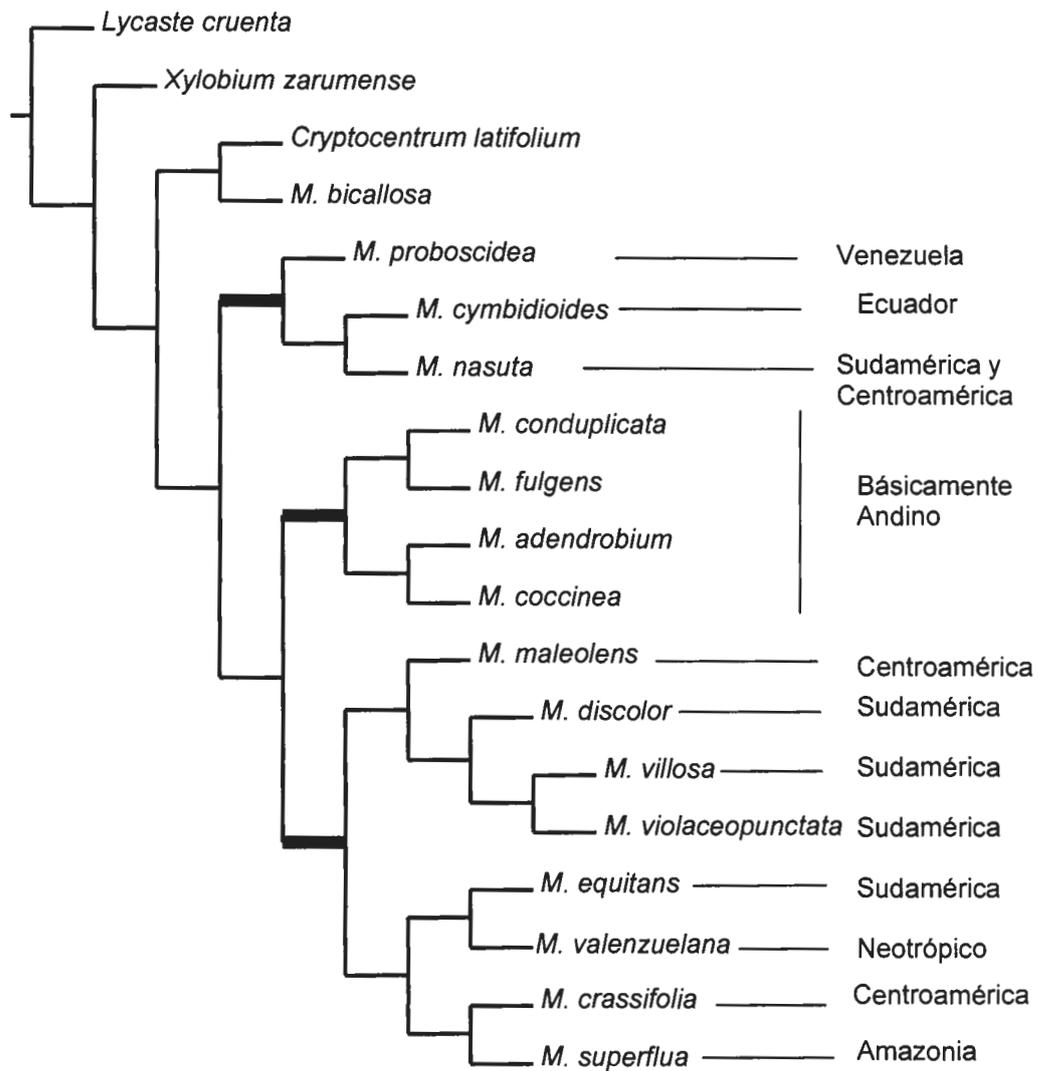


Figura 20. Distribución geográfica conocida de las especies de los complejos *Heterotaxis* s.s., *Maxillaria nasuta* y *Ormithidium*

Bibliografía

- Ackerman JD and M del Castillo** (1992) *The orchids of Puerto Rico and the virginid islands*. San Juan, Puerto Rico. University of Puerto Rico Press. pp.- 70-71.
- Ballard JW, MK Thayer, AF Newton and ER Grismer** (1998) Data sets, partitions, and characters: Philosophies and procedures for analyzing multiple data sets. *Syst. Biol.* 47: 36-396.
- Baum BR** (1992) Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability of combining gene trees. *Taxon* 41: 3-10
- Braga PI** (1978) Aspectos biológicos das Orchidaceae duma campina da Amazonia Central. *Acta Amazónica* 7: 1-89.
- Bremer K** (1988) The limits of aminoacid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Bremer K** (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Bull JJ, JP Huelsenbach, CW Cunningham, DL Swofford and PJ Waddel** (1993) Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42:384-397.
- Carnevali G** (1991) *Citology and the pollinaria in the Maxillarinae (Orchidaceae)*. Master of Science Thesis in Biology. University of Missouri-St. Louis, USA. 171 p.
- Christenson EA** (1999) *Maxillaria*, an overview. Proceedings of the 16th world orchid conference. pp. 279-292
- Chippindale PT and JJ Wiens** (1994) Weighting, partitioning, and combining characters in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 43: 278-287.
- Clements J** (1981) *Birds of the world.: a checklist*. London. Croom Helm, Ltd.
- Davies KL and C Winter** (1998) Ultrastructure of the labelar epidermis in selected *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Bot. J. of Linn. Society* 126: 349-361.
- Davies KL** (1999) A preliminary survey of foliar anatomy in *Maxillaria*. *Lindleyana* 14: 126-135.
- Davies KL , C Winters and P. Turner** (2000) Pseudopolen: Its structure and development in *Maxillaria* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 85: 887-895.
- Davis JI** (1993) Character removal as a means for assessing stability of clades. *Cladistics* 9: 201-210.
- Dodson CH and GP Frymire** (1961) Preliminary studies in the genus *Stanhopea*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 48: 137-172.
- Dodson CH** (1962) The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *American Orch. Soc. Bull.* 31:
- Dodson CH and JT Atwood** (1997) Dos especies nuevas de *Maxillaria* del Ecuador que habian pasado desapercibidas. *Orquideología* 20: 266-270.
- Dressler RL** (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides, Press, Portland, Oregon, USA.
- Faith DP** (1990) Chance marsupial relationships. *Nature* 345: 393.
- Faith DP and P Cranston** (1991) Could a cladogram this short have arisen by chance alone?: On permutation tests for cladistic structure. *Cladistics* 7: 1-28.
- Farris JS, M Kallersjo, AG Kluge and C Bult.** (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315-319.



- Farris JS, VA Albert, M Källersjö, D Lipscom and AG Kluge** (1996) Parsimony jackknifing outperforming neighbour-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Golobof P** (1993) Nona, ver. 1.6. Program and documentation. Distributed by the author. Buenos Aires.
- Hillis DM** (1987) Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 23-42.
- Hoehne FC** (1947) Reajustamento de algunas especies de Maxillarieas do Brasil, com criação de dois novos generos para elas. *Arqv. Bot. Estado Sao Paulo f.m.* 2: 65-74
- Holtzmeier MA, WL Stern and WS Judd** (1998) Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 127: 43-82.
- Jones TR, AG Kluge and AJ Wolf** (1993) When theories and methodologist clash: A phylogenetic reanalysis of the North American ambystomid salamanders (Caudata: Ambystomatidae). *Syst. Biol.* 42: 92-102.
- Kluge AG** (1989) A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Syst. Zool.* 38: 7-25.
- Kluge AG and AJ Wolf**, (1993) Cladistics: what's in a word?. *Cladistics* 9: 183-199.
- Lindley** (1830-1840) *Genera and Species of Orchidaceous Plants*, Ridgways, London,
- Mickevich MF** (1978) Taxonomic congruence. *Syst. Zool.* 27: 143-158.
- Miyamoto, MM and WM Fitch** (1995) Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Syst. Biol.* 44: 64-76.
- Nixon K and JM Carpenter** (1993) On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- Nixon K** (1999) The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- Nixon K** (2001) Winclada ver. 1.00.08. Program and documentation. Published by the author. Ithaca, NY.
- Olmstead RG, B Bremer, KM Scott and JD Palmer** (1993) A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on rbcL sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 700-722.
- Porsch O** (1905) Beiträge zur histologischen Blütenbiologie. I. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 55: 165-173, 227-235, 253-260.
- Senghas K** (1993) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 28. In: R. Schlechter, *Die Orchidien*. Berlin: Blackwell, 1727-1776
- Senghas K** (1994) Subtribus: Maxillariinae, Band I/B, Lieferung 29. In: R. Schlechter, *Die Orchiden*. Berlin: Blackwell, 1777-1792.
- Senghas K** (2000) *Maxillaria*, un genre chaotique. *Richardiana* II (1): 29-38.
- Singer RB, Dondon R and do Carmo MEA** (2002) Estudios sobre filogenia y biología reproductiva en orquídeas Maxillariinae brasileñas. VIII Congreso Latinoamericano de Botánica, Cartagena, Colombia.
- Stevens PF** (1984) Metaphors and typology in the development of botanical systematics. 1690-1960 or the art of putting new wine in old bottles. *Taxon* 33: 169-211.
- Stevens PF** (1986) Evolutionary classifications in botany, 1960-1985. *Journal of the Arboretum* 67: 313-339.
- van der Pijl L and CH Dodson** (1966) *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Ed. University of Miami Press. p 244.



Conclusiones generales

- En el clado *Heterotaxis* – *Ornithidium* se encontraron tres grupos de especies fuertemente soportados. *Maxillaria nasuta*, *M. cymbidioides* y *M. proboscidea* forman un grupo basal dentro del clado y no caen en la circunscripción de *Heterotaxis*. *Heterotaxis* y las especies incluidas de *Ornithidium* son grupos hermanos.
- La evidencia presentada aquí sugiere que *Heterotaxis* debe ser reconocido a nivel de género y que el grupo de *M. nasuta* y afines debe ubicarse en un nuevo género.
- La superficie del pseudobulbo lisa y brillante (barnizada), el pedúnculo de la inflorescencia con cinco entrenudos y vainas envolviendo la inflorescencia son sinapomorfias morfológicas del grupo de *M. nasuta*. Una sinapomorfia anatómica de este grupo el patrón de haces vasculares alternando tres tamaños diferentes de haces vasculares con capas de esclerénquima cubriendo el xilema.
- Las sinapomorfias de *Heterotaxis* son la articulación de la columna al labelo en ángulo, engrosamiento del pedicelo de la flor, la presencia de mucrón subapical de los pétalos y sépalos. Este clado presenta muy poca variación de la morfología vegetativa y los caracteres más informativos dentro del complejo fueron las características morfológicas de las partes reproductivas y algunos caracteres anatómicos.
- En *Heterotaxis* se reconocieron dos clados, en un clado (*Crassifolia*) se encuentran las especies de menor talla, con hábitos simpodial y pseudomonopodial; el otro clado (*Violaceopunctata*) agrupa únicamente especies simpodiales que presentan una mayor talla.
- La arquitectura simpodial con entrenudos del rizoma reducido es plesiomórfico dentro del clado. En *Heterotaxis* la arquitectura pseudomonopodial es derivada y al parecer se origina por retención de estados neoténicos en *M. valenzuelana* y por elongación de los tallos y supresión de los pseudobulbos en *M. equitans*. En *Ornithidium* la arquitectura simpodial con entrenudos alargados del rizoma rastrero es plesiomórfica y en este complejo se encuentra una mayor diversidad de arquitecturas vegetativas en comparación a los otros complejos desde la simpodial hasta las monopodiales. En este último clado la arquitectura observada en *Heterotaxis* está ausente.
- La polinización por avispas es plesiomórfica en el clado y las características observadas en *Ornithidium* son derivadas en el clado. *Heterotaxis* muestra una tendencia a la reducción del tamaño y variedad en la textura de los callos, y a un incremento del tamaño de las partes florales (acompañado de un incremento en las partes vegetativas).

Perspectivas

- Obtener la secuencia de las tres especies no incluidas en el análisis.
- Estudiar con mayor detalle la anatomía de *Heterotaxis*.
- Un análisis más exhaustivo del complejo *Heterotaxis*, junto con trabajo de campo resultaría en la delimitación de la cantidad exacta de especies incluidas en este grupo. Particular atención merecen *M. crassifolia* y el grupo de *M. discolor*, *M. villosa* y *M. violaceopunctata*.
- La delimitación de especies dentro del clado *M. nasuta* y afines es aún incierta. Para este clado se han descrito tres especies; sin embargo, existen poblaciones de *M. proboscidea* que podrían representar otra entidad específica.

Apéndice

Matriz de caracteres morfológicos y anatómicos usados en el análisis cladístico de los complejos *Heterotaxis* y algunas especies del complejo *Omithidium*. Se utilizaron como grupos externos a *Lycaste cruenta*, *Xylobium zarumense*, *Cryptocentrum latifolium* y *Maxillaria bicallosa* (caracteres 1-26).

Taxón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6		
<i>L. cruenta</i>	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	-	0	1	-	-	0	0	2	0	-	-	0	-	-	02	-		
<i>X. zarumense</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	01	-	-	0	0	0	0	-	01	01	-	-	02	-		
<i>C. latifolium</i>	1	-	-	1	-	-	-	3	1	1	1	1	-	-	0	1	1	1	1	0	0	2	?	0	0	0		
<i>M. bicallosa</i>	1	-	-	3	-	-	-	3	1	1	1	1	-	-	0	1	1	1	1	0	0	0	?	0	0	0		
<i>M. adendrobium</i>	1	-	-	1	-	-	-	2	1	1	1	1	-	-	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	
<i>M. coccinea</i>	0	2	2	0	1	0	0	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	
<i>M. conduplicata</i>	0	2	2	0	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	
<i>M. crassifolia</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0		
<i>M. cymbidioides</i>	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1
<i>M. discolor</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0		
<i>M. equitans</i>	1	-	-	2	0	0	1	1	1	1	0	1	-	-	2	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0		
<i>M. fritzii</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	2	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0		
<i>M. fulgens</i>	0	2	2	0	0	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	
<i>M. maleolens</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0		
<i>M. nasuta</i>	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1
<i>M. proboscidea</i>	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0
<i>M. santanae</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
<i>M. schultesii</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
<i>M. superflua</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	
<i>M. valenzuelana</i>	1	-	-	2	0	0	1	1	1	1	0	1	-	-	2	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0		
<i>M. villosa</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	2	
<i>M. violaceopunctata</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	2	



