



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

**FILOGENIA Y EVOLUCIÓN FLORAL EN SPIRANTHINAE (ORCHIDACEAE,
CRANICHIDEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

COYOLXAUHQUI FIGUEROA BATALLA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA TERRAZAS SALGADO

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

DRA. PATRICIA DOLORES DÁVILA ARANDA

UBIPRO, FES IZTACALA.

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

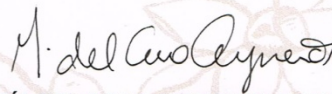
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de febrero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **FIGUEROA BATALLA COYOLXAUHQI** con número de cuenta **509013783** con la tesis titulada: **"Filogenia y evolución floral en Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae)"**, realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**:

Presidente:	DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Vocal:	DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Secretario:	DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO
Suplente:	DRA. ROSAURA GREYHER GONZALEZ
Suplente	DR. ANICETO RODOLFO SOLANO GÓMEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 11 de abril de 2014.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formar parte de su alumnado, por facilitar mi aprendizaje por medio de sus recursos y de personal excelente.

Al pueblo de México, con profundo respeto y admiración, que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de apoyo 166820) y la Universidad Nacional Autónoma de México ha financiado esta parte de mi formación profesional.

Al Dr. Gerardo Salazar Chávez, por su paciencia, por motivarme para perfeccionar mi trabajo, por sorprenderme siempre con nuevos conocimientos biológicos acerca de las orquídeas.

A la Dra. Teresa Terrazas Salgado, por su apoyo crucial durante mi examen de candidatura y sus valiosas aportaciones durante mi investigación.

A la doctora Patricia Dávila Aranda, por sus sugerencias precisas durante los exámenes tutorales y por su paciencia durante la revisión de este escrito.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A los doctores Rafael Lira Sade, Salvador Arias Montes, Rosaura Grether González y Alejandrina Graciela Ávila Ortiz, por sus sugerencias durante el examen de candidatura.

A la Dra. Rosaura Grether González por revisar la primera vez el artículo incluido en el primer capítulo de este escrito.

A la Dra. Victoria Sosa y al Dr. Rodolfo Solano por fungir como revisores de los artículos de revisión que constituyeron un par de mis actividades académicas complementarias.

A los doctores integrantes del jurado Rodolfo Solano Gómez, Rosaura Grether González, Salvador Arias Montes y Sonia Vázquez Santana, por sus atinadas sugerencias al manuscrito.

A Berenit Mendoza Garfías, por su apoyo durante el procesamiento de muestras, las horas de observación en el microscopio electrónico de barrido y por la amistad incondicional que compartimos.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera y al Sr. Miguel Vega del Colegio de Postgraduados, por permitirme utilizar el laboratorio de anatomía vegetal y sugerirme métodos para mejorar mis preparaciones biológicas.

Al profesor Isaías Gil Vázquez de la Universidad Autónoma Chapingo, por su apoyo durante mi formación académica desde el año 1999, por su amistad y por la confianza que ha depositado en mí.

A mis familiares y amigos por acompañarme en múltiples salidas de campo, por su paciencia, por compartir su alegría conmigo y hacer más llevaderas mis obligaciones.

A mis amigos: Karen, Liliana, Carolina, Víctor, Daniel, Miguel, Claudia, Lidia, por compartir nuestro crecimiento académico y muchas otras vivencias.

A mis amigos del Kamaxtli Matlalcueitl: Roxana, Diego, Edith, Totle, Seldy, Teoyaomiki, Nauyotzin, Citlal, Jaz, Ady, Ramón, Nacho, Yohualli, Atotolin y a todos aquellos danzantes que no mencioné, por tantas flores y cantos compartidos.

A mis amigos de Guerrero: Liz, Elisa, Yahir, Víctor, Lili, Javier, Miguel, David, Abel, Estela, Martha, Alex, Gerardo y todos los que no menciono, por tanto cariño, por ser parte de mi vida.

A mis amigos de Querétaro: Minea, Yola, Mateo, Carlos, Germán, gracias por sus palabras, por sus ánimos y por tantos detalles compartidos.

Una mención especial para el maestro Agustín Barrios Guevara, por ser uno de los ejemplos a seguir en mi vida, por enseñarme que la disciplina es un arte, por inculcar en mi el aprecio por la danza, la música y las tradiciones de México y por conducirme para ser un mejor ser humano.

DEDICATORIA

A mi padre Antonio Batalla Fajardo (†), te

amamos y extrañamos...

A DIOS, por bendecir cada uno de mis pasos y permitirme disfrutar cada día de mi vida.

A mi familia Ameyalí y David, por compartir conmigo incontables experiencias de amor y aprendizaje.

A mis dos mamás Julia (†) y Merced, es un orgullo ser una parte de ustedes.

A mis hermanos Antonio, Bernardo y Roberto, por el cariño y la confianza que existe entre nosotros.

A mis queridos tíos: Alfredo, Walfre, Felipe (†), Alberto, Leonor, por ser un ejemplo de humildad y perseverancia.

A todos mis primos y sobrinos, por la alegría que me transmiten y porque también están preparándose para tener un futuro mejor.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	4
4.	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
5.	OBJETIVOS.....	27
6.	CAPÍTULO I. ESTRUCTURA Y DESARROLLO DEL GINOSTEMIO EN <i>Dichromanthus michuacanus</i> (ORCHIDACEAE, SPIRANTHINAE).....	28
	RESUMEN.....	28
	ABSTRACT.....	28
	INTRODUCCIÓN.....	28
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
	RESULTADOS.....	29
	DISCUSIÓN.....	34
	AGRADECIMIENTOS.....	36
	LITERATURA CITADA.....	36
7.	CAPÍTULO II. GYNOSTEMIUM STRUCTURE AND DEVELOPMENT IN SUBTRIBE SPIRANTHINAE (CRANICHIDEAE, ORCHIDACEAE).....	38
	ACKNOWLEDGEMENTS.....	38
	ABSTRACT.....	39
	INTRODUCTION.....	40
	MATERIALS AND METHODS.....	44
	RESULTS.....	47
	DISCUSSION.....	57
	LITERATURE CITED.....	67
	APPENDIX 1.....	102
	APPENDIX 2.....	104
	APPENDIX 3.....	106
8.	DISCUSIÓN GENERAL.....	107
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	109
10.	LITERATURA GENERAL CITADA.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. ESTRUCTURA Y DESARROLLO DEL GINOSTEMIO EN <i>Dichromanthus michuacanus</i> (ORCHIDACEAE, SPIRANTHINAE).....	28
1. Morfología floral de <i>Dichromanthus michuacanus</i>	31
2. Desarrollo floral de <i>Dichromanthus michuacanus</i> , microscopía de barrido...	32
3. Diferentes etapas de desarrollo floral de <i>Dichromanthus michuacanus</i> , microscopía de luz.....	33
CAPÍTULO II. GYNOSTEMIUM STRUCTURE AND DEVELOPMENT IN SUBTRIBE SPIRANTHINAE (CRANICHIDEAE, ORCHIDACEAE).....	38
1. Morphology of the gynostemium in selected representatives of Spiranthinae.....	74
2. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of <i>Aulosepalum pyramidale</i>	76
3. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of <i>Cyclopogon luteoalbus</i>	78
4. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of <i>Deiregyne albovaginata</i>	80
5. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of <i>Mesadenus lucayanus</i>	82
6. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of <i>Sarcoglottis assurgens</i>	84
7. Gynostemium development at late stages of selected species of Spiranthinae.....	86
8. Anatomical characteristics of gynostemia in selected Spiranthinae.....	88
9. Rupture mechanism of viscidium in Spiranthinae.....	90
10. Strict consensus of two trees found by the parsimony analysis of the morphological characters.....	92
11. Strict consensus of the two trees found by the parsimony analysis of the ITS region.....	93
12. Strict consensus of the three most parsimonious trees found by parsimony analysis of the <i>trnL-trnF</i> region.....	94
13. Most parsimonious tree from parsimony analysis of the two DNA (ITS and <i>trnL-trnF</i>).....	95
14. One of the six trees found by the parsimony analysis of DNA (ITS and <i>trnL-trnF</i>) and morphological characters.....	96
15. Optimization of the character order of organogenesis on one of the six most parsimonious trees obtained for combined analysis.....	97
16. Optimization of the character presence or absence of staminodes on one of the six most parsimonious trees obtained for combined analysis.....	98
17. Optimization of the character origin of stigmatic area on one of the six most parsimonious trees obtained for combined analysis.....	99
18. Optimization of the character shape of rostellum remnant on one of the six most parsimonious trees obtained for combined analysis.....	100
19. Optimization of the character viscidium rupture zone on one of six the most parsimonious trees obtained for combined analysis.....	101

1. RESUMEN

La subtribu *Spiranthinae* es un grupo diverso de orquídeas terrestres con distribución principalmente neotropical, que incluye aproximadamente 40 géneros y 480 especies. La clasificación del grupo se ha basado principalmente en atributos florales, básicamente del ginostemio. Las diferentes propuestas taxonómicas que existen para esta subtribu difieren entre sí, aunque todas utilizaron los mismos caracteres, los cuales se han modificado como respuesta adaptativa de las flores a un determinado polinizador. Por lo tanto, se propuso la realización de análisis comparativos del desarrollo para entender la estructura floral y evaluar la homología de los caracteres morfológicos. Por tanto, en este trabajo se realizó un estudio del desarrollo floral con énfasis en el ginostemio de 12 especies que representan los principales clados de la subtribu *Spiranthinae*. Además, por el método de parsimonia, se analizaron los caracteres morfológicos por separado y combinados con secuencias de ADN (*trnL-trnF*, ITS) y los árboles filogenéticos sirvieron como base para discutir la evolución de los caracteres morfológicos. Se encontró que la secuencia de aparición de los órganos florales es de dos tipos: el primero es el más común en orquídeas (sépalos laterales-labelo-pétalos laterales-sépalo dorsal-antera-carpelo medio-carpelos laterales) y el segundo difiere en que la antera se desarrolla antes que el sépalo dorsal. El desarrollo del ginostemio fue similar en las etapas tempranas de las especies estudiadas, mientras que las diferencias morfológicas del ginostemio y las características principales del rostelo surgieron en las etapas tardías del

desarrollo. En la mayoría de las especies la superficie receptiva del estigma está constituida únicamente por la porción inferior del ápice del carpelo medio y en algunas participan también los ápices de los carpelos laterales. Varios de los atributos rostelares usados previamente para la clasificación de *Spiranthinae*, como la forma y consistencia del remanente rostelar son variables porque las especies cercanamente relacionadas tienen morfología rostelar distinta y otras distantemente relacionadas tienen rostelo similar. Sin embargo, se necesita un muestreo más amplio de especies para aclarar adecuadamente cuáles caracteres son plesiomórficos o representan novedades evolutivas. Este estudio comparativo del desarrollo del ginostemio servirá como base para realizar investigaciones posteriores en *Spiranthinae* y grupos relacionados.

2. ABSTRACT

Subtribe *Spiranthinae* is a diverse terrestrial orchid group with predominantly Neo-tropical distribution, including approximately 40 genera and 480 species. The classification of this group has been based mainly on relatively uniform floral attributes, with a few variable characters, basically from the gynostemium. The different taxonomic proposals have been based on the same traits. However, the floral characters have been modified by flower adaptation to particular pollinators. Due to this fact, we proposed to carry out an analysis in order to understand floral morphology and evaluate the homology of the structural characters. In this work, a comparative study of the floral development of species belonging to principal

clades of the Spiranthinae subtribe, with emphasis on the gynostemium was undertaken. Also, the morphological attributes, individually and combined with DNA sequences (*trnL-trnF*, ITS), were analyzed using parsimony. The phylogeny generated was used to discuss the evolution of morphological characters. The results show that there are two types of floral organogenesis: one is widely known in orchids (lateral sepals-labellum-lateral petals-dorsal sepal-anther-median carpel-lateral carpels), whereas in the second one the anther develops before the dorsal sepal. Gynostemium development is similar among the studied species, at the end stages, morphological differences of the gynostemium and the principal traits of the rostellum were generated. The stigma may be constituted by one or three carpel apices. Several attributes of rostellum previously used for taxonomic delimitation in Spiranthinae, as the shape and consistency of the rostellum remnant are variable, because those closely related species have different rostellum morphology, while others distantly related, have similar rostellum. A broader sample of species will have to be studied to clarify if rostellum characters either represent homoplasy or ancestral conditions. This comparative study of the gynostemium development will be the basis for subsequent works in Spiranthinae and related groups.

3. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Los resultados de este trabajo se presentan en dos capítulos principales. En el primero se describe en detalle el desarrollo floral, con énfasis en el ginostemio, de la especie *Dichromanthus michuacanus*, preparado con la finalidad de familiarizarse con la estructura y el desarrollo floral de la subtribu Spiranthinae y establecer una base para posteriores estudios ontogenéticos que incluyan otras especies de Spiranthinae. El artículo que fue publicado es: Figueroa, C., G. A. Salazar, T. Terrazas y P. Dávila. 2012. Estructura y desarrollo del ginostemio en *Dichromanthus michuacanus* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 73–82. El segundo capítulo es el manuscrito: Gynostemium structure and development in subtribe Spiranthinae (Cranichideae, Orchidaceae), que será sometido a la revista *American Journal of Botany* y presenta la mayor parte de los resultados de la investigación realizada durante el doctorado, además aborda de manera comparativa la descripción y discusión de los caracteres del ginostemio que se han utilizado en la taxonomía del grupo. Asimismo, incluye las nuevas aportaciones al estudio de la anatomía floral del grupo, tales como información detallada del viscidio y su mecanismo de ruptura. Los materiales y métodos se detallan en cada capítulo principal, así como la literatura citada. Además como tercer capítulo se incluye una breve discusión general acerca de las aportaciones y perspectivas de esta investigación. Finalmente, se presentan las conclusiones generales del trabajo. Las citas mencionadas en la introducción y discusión general no mencionadas en los artículos, se enlistaron en el apartado de literatura general citada.

4. INTRODUCCIÓN GENERAL

La subtribu *Spiranthinae* es un grupo diverso de orquídeas terrestres con distribución principalmente neotropical, que incluye aproximadamente 40 géneros y 480 especies. Las diferentes propuestas taxonómicas que existen para esta subtribu difieren entre sí, aunque todas utilizaron los mismos caracteres florales, los cuales se han modificado como respuesta adaptativa de las flores a un determinado polinizador. Por lo tanto, se propuso la realización de análisis comparativos del desarrollo para entender la estructura floral y evaluar la homología de los caracteres morfológicos. A continuación se describen los antecedentes taxonómicos y del desarrollo que fundamentan este trabajo.

Antecedentes taxonómicos de Spiranthinae

Históricamente, la clasificación de *Spiranthinae* ha sido debatida y cuestionada hasta la actualidad¹. La clasificación genérica de este grupo se ha basado principalmente en atributos de la morfología floral, particularmente del ginostemio² y aunque todos los taxónomos se han basado en los mismos caracteres existen discrepancias entre las clasificaciones propuestas (Lindley, 1840; Schlechter, 1920; Garay, 1982; Balogh, 1982; Burns-Balogh, 1986; Szlachetko, 1995; Szlachetko et al. 2005; Rutkowski et al. 2008).

¹ Las citas bibliográficas no se repiten, cada artículo tiene las que corresponden y en la literatura general citada se encuentran solo las que no se mencionan en ellos.

² Ginostemio es una estructura constituida por la fusión del estilo con los filamentos de los estambres (Dressler, 1993).

Lindley (1840) reconoció Spiranthideae como un grupo de la tribu Neottieae. Él estableció que consistía de cinco géneros: *Cnemidia* Lindl., *Spiranthes* Rich. ex Spreng., *Stenorrhynchos* Rich. ex Spreng., *Pelexia* Poit. ex Lindl. y *Sauroglossum* Lindl.³, distinguiendo cada género por una combinación particular de características del perianto.

Posteriormente, Bentham (1881) publicó una nueva clasificación, en la que amplió el concepto de las Spiranthideae de Lindley, incluyendo en el grupo a Listerideae, Physurideae y Cranichideae. La subtribu Spiranthideae delimitada por Bentham fue equivalente a la tribu Cranichideae (sensu Dressler, 1993). Bentham propuso dos grupos basado en el tipo de polinios⁴, granulares o séctiles y reconoció solo dos géneros atribuibles a Spiranthinae: *Spiranthes* y *Pelexia*.

Después, Pfitzer (1887) propuso una clasificación alternativa de Orchidaceae, la cual difiere de las anteriores en el uso de caracteres vegetativos. Pfitzer removi6 de Spiranthae a los géneros con polinios séctiles (ahora Goodyerinae). Spiranthae sensu Pfitzer incluy6 cuatro géneros spirantoides aceptados por Lindley (1840), pero también comprendió *Listera*, *Neottia*, *Stenoptera* y *Baskervillea*. Actualmente, *Listera* R. Br. y *Neottia* Gueth. (Neottieae,

³ El nombre de las autoridades es mencionado la primera vez que aparece una especie u otras agrupaciones por arriba de este nivel.

⁴ Masas de granos de polen con diferentes grados de agregación, que suelen equivaler al contenido de una teca. Los polinios granulares tienen miles de tétradas aglutinadas en una estructura farinácea; los polinios séctiles tienen paquetes de tétradas de polen llamados másulas (Balogh y Funk, 1986).

Listerinae) fueron transferidos a la subfamilia Epidendroideae; mientras que *Stenoptera* C. Presl. y *Baskervilla* Lindl. permanecen en la subfamilia Orchidoideae y son miembros de la subtribu Cranichidinae, la cual es el grupo hermano de Spiranthinae (Salazar et al. 2003, 2009).

Schlechter (1920) reconoció 280 especies agrupadas en 24 géneros de Spiranthinae, basando sus conceptos principalmente en las características del ginostemio y el espolón⁵. Él transfirió especies originalmente incluidas en *Spiranthes* en otros 23 géneros, entre ellos algunos nuevos como: *Beloglottis*, *Brachystele*, *Buchtienia*, *Coccineorchis*, *Deiregyne*, *Discyphus*, *Funkiella*, *Galeottiella*, *Gamosepalum*, *Lyroglossa*, *Mesadenus*, *Pseudogoodyera* y *Schiedeella*. Por su parte, la propuesta de Schlechter no fue aceptada por algunos taxónomos norteamericanos (Correll, 1950; Williams, 1951; Ames, 1922; Ames y Correll, 1952; Luer, 1975) porque consideraban irrelevantes los caracteres del ginostemio ya que en material prensado eran difíciles de observar, por lo tanto continuaron utilizando el concepto amplio de *Spiranthes*.

En 1982 se publicaron casi simultáneamente dos propuestas de clasificación, la de Balogh y la de Garay. La primera autora propuso que la subtribu Spiranthinae consistía de 250 a 300 especies incluidas en 16 géneros, 11 de ellos agrupados en cuatro alianzas genéricas que fueron retomadas de

⁵ Espolón es una proyección tubular y aguda o en forma de saco que se origina en el perianto, usualmente del labelo.

Schlechter, usando las características del rostelo⁶, polinario⁷, posición del canal estilar⁸ y el tipo de viscidio⁹; sin embargo, cinco géneros no encajaron en sus agrupaciones (*Deiregyne*, *Cutsis* Burns-Bal., E.W. Greenw. & R. González, *Pseudogodyera*, *Eurystyles* Wawra y *Buchtienia*), por lo que Balogh (1982) propuso que eran resultado de líneas evolutivas independientes. La alianza *Pelexia* fue la mejor definida por sus características uniformes, como el rostelo laminar y el viscidio con porción adhesiva dorsal. Por otro lado, Garay (1982) aceptó 44 géneros y aunque las características del rostelo fueron importantes en su clasificación no las usó para distinguir alianzas genéricas. Su delimitación de *Spiranthinae* incluyó géneros que han sido transferidos a otras subtribus como *Manniella* Rchb.f. (*Maniellinae*) y *Pseudocranichis* Garay (= *Galeoglossum* A. Rich. & Galeotti, *Cranichidinae* s. l., Salazar, 2009).

Hasta 1982 y algunos trabajos posteriores donde se proponen nuevos géneros (e.g. Burns-Balogh et al. 1985, Szlachetko, 1991, 1994; Szlachetko y González Tamayo, 1996; Szlachetko et al. 2000), se utilizaron en general los

⁶ Rostelo es la porción no receptiva del ápice del carpelo medio que separa los polinios de la superficie fértil del estigma e interviene en la dispersión del polen porque produce el viscidio (Dressler, 1993).

⁷ Polinario es la unidad de dispersión que incluye los polinios y estructuras accesorias (e.g. viscidio) que sirven para adherirlos a los polinizadores (Dressler, 1993).

⁸ Canal estilar es un espacio que comunica el estigma con el ovario, tiene las paredes cubiertas de tejido de transmisión que sirve como trayectoria para el tubo polínico (Esau, 1987).

⁹ Viscidio es la porción adhesiva del rostelo que adhiere el polinario al polinizador (Dressler, 1993).

mismos caracteres florales, principalmente del ginostemio, dando más peso a uno u otro de manera intuitiva, pero en todos los casos se careció de hipótesis filogenéticas explícitas.

Excepcionalmente, en algunos artículos comenzaron a construirse cladogramas basados en la argumentación de caracteres¹⁰ (Burns-Balogh y Robinson, 1983; Burns-Balogh y Funk, 1986; Burns-Balogh, 1986, 1988; Dressler, 1981, 1993) a diferentes niveles taxonómicos.

Para la familia Orchidaceae se realizaron dos análisis. El primero lo realizó Dressler (1981, 1993), en este trabajo se presentó toda la información disponible hasta ese momento. En este contexto, la mayoría de los grupos propuestos a nivel intrafamiliar han sido corroborados en la actualidad. Particularmente en *Spiranthinae* el autor hizo notar la disparidad de las clasificaciones, sugiriendo que era necesario analizar nuevamente las propuestas taxonómicas y los caracteres utilizados para la clasificación de la subtribu.

El segundo análisis de Orchidaceae lo llevaron a cabo Burns-Balogh y Funk (1986). Ellos realizaron un análisis a nivel tribal y subtribal, para lo cual utilizaron

¹⁰ En un sentido amplio, la argumentación de caracteres de Henning es el primer método de construcción de cladogramas. Es un método manual en el que se consideraba cada carácter individual, los grupos se conformaban por la posesión de apomorfias, éstas eran consideradas a priori, es decir los caracteres son polarizados antes de construir el árbol por comparación con un grupo externo. Después se construyen árboles hasta encontrar el de menor longitud. Por lo tanto, en estos trabajos no se usaron algoritmos específicos para la construcción de los cladogramas (Henning, 1966).

68 caracteres organizados en 42 series de transformación, para construir un cladograma con 26 tribus de la familia. Utilizaron la polarización de caracteres por comparación con el grupo externo, tomando en cuenta caracteres vegetativos y florales. Los caracteres fueron discutidos con detalle y el cladograma se usó para desarrollar una clasificación pretendidamente natural de las tribus. Ellos reconocieron 7 subfamilias, de las cuales ya no son aceptadas *Spiranthoideae* ni *Neottioideae*. También reconocieron que su trabajo era una propuesta que podría cambiar con la adición de información nueva, pues su muestreo fue limitado principalmente en la subfamilia *Epidendroideae*.

En *Spiranthinae*, se han realizado dos estudios que incluyeron análisis cladísticos, uno para la alianza *Pelexia* (Burns-Balogh y Robinson, 1983) y otro para el género *Deiregyne* (sensu Burns-Balogh, 1988). La alianza *Pelexia* (Balogh, 1982) incluye a los géneros *Pelexia*, *Sarcoglottis* C. Presl y *Cyclopogon* C. Presl. Estos fueron tratados cladísticamente también por argumentación de Henning (1966). Se analizaron 17 caracteres principalmente de la flor. Los caracteres que diagnosticaron a la alianza *Pelexia*, fueron la forma truncada del remanente rostellar¹¹ aparentemente como producto de la posición retrorsa del viscidio, así como la posición del viscidio entre los ápices divergentes de los polinios y la cubierta del viscidio que se rompe al contacto con el polinizador. Los autores mencionaron como un carácter distintivo para *Sarcoglottis* y *Pelexia* la posición de

¹¹ El remanente rostellar es la porción de tejido del rostelo que queda una vez que es desprendido el polinario, el viscidio como parte del rostelo es desprendido junto con los polinios.

la entrada del canal estilar la cual es adaxial a la superficie receptiva del estigma. Ellos interpretaron que el ápice del carpelo medio del estigma está formando solo al rostelo y que la porción receptiva está constituida por los dos ápices de los carpelos laterales¹². Además mencionaron que algunos caracteres como la presencia o ausencia de hojas durante la floración están más relacionados con la adaptación de la plantas al ambiente y no son útiles para distinguir grupos taxonómicos.

La revisión sobre el género *Deiregyne* sensu Burns-Balogh, 1988 (= *Aulosepalum* Garay) (Burns-Balogh, 1988), fue realizada debido a los desacuerdos previos entre las propuestas de Garay (1982) y Balogh (1982) acerca del contenido y concepto del género. Balogh (1988) analizó ocho especies y las agrupó en dos secciones con base en el nectario y la morfología del labelo; encontrando que las características del ginostemio fueron similares entre las especies. También realizó un análisis de los caracteres para construir un cladograma.

Posteriormente, Szlachetko (1995) revivió la tribu Spirantheae de Endlicher. Aunque aceptó la mayoría de los géneros de Schlechter y Garay. Su propuesta fue distinta a las previas porque dividió al grupo en 57 géneros y creó varios

¹² El estilo es una prolongación hacia arriba de los carpelos fusionados y en la parte apical está ubicado el estigma constituido por los ápices de los tres carpelos (en las monocotiledóneas), la entrada del canal estilar está ubicada en la parte central donde éstos confluyen (Esau, 1987); de la misma manera, en las orquídeas la posición de la entrada del canal estilar es central y no en el margen superior como fue sugerido por Burns-Balogh (1983).

nuevos, basándose en las llamadas por él “estructuras generativas” (aquellas que tienen que ver con las flores, principalmente rostelo y viscidio). Algunos de los géneros que propuso fueron *Burnsbaloghia* Szlach (= *Deiregyne*), *Gracielanthus* (= *Aulosepalum*) R. González & Szlach, *Warscaea* Szlach., entre otros. Además distinguió seis subtribus dentro de Spirantheae. Sin embargo, los caracteres morfológicos que utilizó para realizar sus agrupaciones no fueron explicados adecuadamente y no indicó cuales sinapomorfias diagnosticaron a los grupos. Además, a la fecha existen discrepancias entre la propuesta de clasificación de Szlachetko y aquellas basadas en secuencias de ADN, revelando entre otras cosas que muchas de sus agrupaciones no son monofiléticas.

Durante las últimas décadas el uso de los caracteres moleculares como fuente de información independiente ha permitido construir hipótesis filogenéticas explícitas que a su vez han servido como base para abordar preguntas de diferente índole. Entre ellas destacan aspectos biogeográficos, anatómicos, evolución de los caracteres morfológicos, delimitación de géneros, resolución de complejos de especies, etc. (Sinclair et al. 2005).

A partir de 1997, se han realizado varios trabajos basados en secuencias de ADN de diferentes compartimentos del genoma y en diversos grupos de orquídeas (Kores et al. 1997, 2000, 2001; Cameron et al. 1999; Chase et al. 2001; revisión en Cameron, 2007). El primer estudio filogenético molecular de la tribu Cranichideae fue el de Salazar et al. (2003), quienes basados en secuencias de cuatro regiones de ADN nuclear y de cloroplasto (ITS, *matK-trnK*, *rbcL*, *trnL-trnF*), establecieron hipótesis explícitas acerca de las relaciones filogenéticas de la

subtribu *Spiranthinae*. Ellos redefinieron los límites de la subtribu para conformar un grupo monofilético y evaluaron por primera vez las relaciones genéricas. Ellos también consideraron 24 especies previamente asignadas en *Spiranthinae* y representantes de las otras subtribus que constituyen *Cranichideae* (Dressler, 1993). Ellos encontraron que con la exclusión de *Galeottiella*, la subtribu *Spiranthinae* es monofilética y consiste de cuatro linajes principales, a los que se refirieron como los clados de *Stenorrhynchos*, *Pelexia*, *Spiranthes* y uno que consiste de los géneros *Eurystyles* y *Lankesterella* Ames. Tales clados no corresponden por completo con los límites propuestos previamente en las “alianzas genéricas” de Schlechter (1920) y Balogh (1982) o con las subtribus de Szlachetko (1995). También sugirieron la convergencia de varios de los caracteres utilizados en la clasificación (e.g. remanente rostelar), como respuesta a la adaptación de las especies a un determinado polinizador. Fue evidente la parafilia de varios de los géneros propuestos hasta ese momento. Por ejemplo, especies como *Dichromanthus aurantiacus* (La Llave & Lex.) Salazar & Soto-Arenas y *Deiregyne albovaginata* (C. Schweinf.) Garay que tienen remanente aguzado han sido ubicadas en *Stenorrhynchos* (Szlachetko, 1995), aunque están distantemente relacionadas con este género. En vista de estas relaciones inesperadas en *Spiranthinae*, se consideró necesaria la corroboración de estos resultados o su refutación a la luz de nuevas evidencias.

Posteriormente al estudio de Salazar et al. (2003) se han llevado a cabo una serie de trabajos que intentaron resolver las incógnitas surgidas (Górniak et al. 2006; Figueroa et al. 2008; Salazar et al. 2009, 2011; Salazar y Ballesteros-

Barrera, 2010; Salazar y Dressler, 2011; Salazar y Just, 2012), cuyos resultados han corroborado los hallazgos de este primer estudio filogenético molecular, en relación a los cuatro clados principales y a la circunscripción de los géneros.

Górniak et al. (2006) exploraron las relaciones filogenéticas de 19 especies de *Spirantheae* (sensu Szlachetko, 1995) usando las secuencias de ADN nuclear de los espaciadores internos transcritos (nrITS), y secuencias de ocho especies tomadas del GenBank. Los resultados de estos autores no mostraron evidencias de monofilia, es decir tanto *Spiranthinae* como *Stenorrhynchidinae*, fueron polifiléticos y *Cyclopogoninae* fue parafilético debido a que *Odontorrhynchos variabilis* Garay estaba incluida en este clado. Esto contrasta con Szlachetko (1995) y otras propuestas previas (Balogh 1982, Burns-Balogh y Robinson, 1983) quienes ubicaron a esta especie en la alianza *Brachystele* (clado *Spiranthes*). Así mismo, varios de los conceptos genéricos aceptados por Szlachetko (1995) no son monofiléticos, por ejemplo *Stenorrhynchos*.

Rutkowski et al. (2008) llevaron a cabo un análisis sobre la filogenia y taxonomía de las subtribus *Spiranthinae*, *Stenorrhynchidinae* y *Cyclopogoninae* (sensu Szlachetko, 1995) y presentaron sus resultados en forma de un libro. Ellos abordaron el análisis de los datos morfológicos vegetativos y florales (= reproductivos) por métodos fenéticos y cladísticos. Además, hicieron análisis filogenéticos con los marcadores moleculares nrITS y *matK-trnK* y abordaron aspectos biogeográficos. Finalmente propusieron una clasificación, basada principalmente en la propuesta previa de Szlachetko (1995), aunque los mismos autores reconocieron que ninguna de las tres subtribus propuestas por Szlachetko

(1995) son monofiléticas.

Figuroa et al. (2008) llevaron a cabo una evaluación de las relaciones filogenéticas de 26 especies de Cranichideae basados en secuencias de ADN nuclear (nrITS) y de plastidios (*matK-trnK*). Estos autores utilizaron cuatro caracteres estructurales para examinar sus posibles rutas evolutivas y el valor sistemático de los caracteres anatómicos de la raíz. A nivel morfológico, encontraron que los engrosamientos de la pared del velamen¹³ representan una sinapomorfia del clado Spiranthinae-Prescottinae, y los tilosomas lamelados¹⁴ solo diagnosticaron Spiranthinae.

Posteriormente, Salazar y Ballesteros-Barrera (2010) analizaron las relaciones filogenéticas de 36 especies representantes de 21 géneros de la subtribu Spiranthinae y grupos externos, por medio de secuencias de ADN del núcleo y cloroplasto (nrITS y *trnL-trnF*), con la finalidad de resolver la posición filogenética de *Deiregyne confusa* Garay y *D. durangensis* (Ames & C. Schweinf.) Garay. Encontraron que aunque estas dos especies son similares morfológicamente, filogenéticamente no están relacionadas. Además, al realizar el modelado de sus nichos climáticos encontraron diferentes preferencias ecológicas

¹³ Velamen es la epidermis pluriestratificada de la raíz, que está compuesta de células muertas con paredes engrosadas por la acumulación de celulosa, hemicelulosa y lignina. Está presente en orquídeas y en otras familias como Araceae, Cyperaceae y Veloziaceae.

¹⁴ Tilosomas son excrecencias de la pared celular periclinal más interna de las células del velamen adyacentes a las células de paso de la exodermis. Los tilosomas lamelados consisten de engrosamientos paralelos de la pared (Figuroa et al. 2008).

entre las dos especies, proponiendo así, con evidencias morfológicas, ecológicas y reproductivas, su nuevo género *Sotoa* Salazar.

Salazar y Dressler (2011) evaluaron las relaciones filogenéticas de 29 especies de 22 géneros de Spiranthinae y grupos externos para aclarar la posición filogenética de *Eurystyles* y *Lankesterella*. Ellos analizaron una matriz de 4500 caracteres de secuencias de ADN nuclear (nrITS) y de plastidios (*matK-trnK*, *trnL-trnF*). Sus análisis confirmaron que *Eurystyles* y *Lankesterella* son grupos hermanos, como lo sugiere su gran similitud vegetativa, concluyendo que en algunos grupos de Orchidaceae la morfología floral es lábil y por sí sola puede ser menos informativa para inferir relaciones filogenéticas que la estructura vegetativa. Por otro lado, las características vegetativas por ser más conservadas son mejores para indicar las relaciones filogenéticas en estos grupos.

Más recientemente, Salazar et al. (2011) realizaron un estudio filogenético molecular de Spiranthinae para aclarar la posición filogenética de *Stenorrhynchos* y *Dichromanthus* Garay, basados en la región nrITS del núcleo y *trnL-trnF* del cloroplasto. Incluyeron 40 especies y 22 géneros. Encontraron que *Dichromanthus s. l.* es monofilético e incluye cuatro especies. Además *Stenorrhynchos s. l.* como fue propuesto por Szlachetko et al. (2005) y Rutkowski et al. (2008) es polifilético y requiere dilucidar sus límites adecuadamente, probablemente eliminando del clado a las siguientes especies: *Dichromanthus aurantiacus*, *D. michuacanus* (La Llave & Lex.) Salazar y Soto-Arenas, *Deiregyne albovaginata* y *D. densiflora* (C. Schweinf.) Salazar & Soto-Arenas. La morfología y coloración de la flor sugieren la convergencia en las características florales entre las especies de *Dichromanthus*,

Stenorrhynchos, así como de otros géneros distantemente relacionados (e.g. *Svenkoeltzia*) como resultado de la adaptación independiente a la polinización por colibríes. La variación en los síndromes de polinización entre especies cercanamente relacionadas de *Dichromanthus s.l.* indica que la morfología floral es lábil y que dichos caracteres no deberían usarse para la clasificación del grupo antes de ser analizados detalladamente, pues reflejan síndromes de polinización más que relaciones de parentesco. Aunque en ese trabajo se discuten varios de los caracteres florales, fue evidente la necesidad de un análisis formal de dichos caracteres de la morfología floral.

Salazar y Jost (2012) realizaron un análisis filogenético que incluyó 48 especies de 25 géneros de Spiranthinae, para entender la posición filogenética de *Spiranthes glabrescens* T. Hashim., utilizando secuencias de ADN (*matK-trnK*, *trnL-trnF* e ITS). Estos autores propusieron un nuevo género, *Quechua*, para *Spiranthes glabrescens*, que se diferencia morfológica y molecularmente de los géneros en que había sido incluido previamente (*Spiranthes* y *Cyclopogon*), el cual fue recuperado como hermano de *Eurystyles* y *Lankesterella*.

Toda la información generada hasta ahora sustenta que la subtribu Spiranthinae como fue delimitada por (Salazar, 2003) incluye aproximadamente 40 géneros y 480 especies y por lo tanto constituye uno de los linajes más diversos de orquídeas terrestres del neotrópico. Consta de cuatro clados principales dentro de la subtribu, los cuales son: *Pelexia*, *Stenorrhynchos*, *Eurystyles/Lankesterella* y *Spiranthes*.

Morfología de *Spiranthinae*

La subtribu *Spiranthinae* consiste de plantas terrestres, litófitas o raramente epífitas (Salazar, 2003). Tienen raíces fasciculadas, o a veces distribuidas a lo largo de un rizoma; el velamen generalmente es uniseriado o a veces multiseriado (*Sauroglossum nitidum*, 9-10 capas celulares, Franco y dos Santos, 2008), con engrosamientos de pared paralelos, poros y tilosomas (Figueroa et al. 2008). Las hojas pueden ser solitarias o numerosas formando una roseta basal, raramente distribuidas a lo largo del tallo. La inflorescencia es un racimo terminal. Las flores son usualmente resupinadas¹⁵, y tubulares. Los sépalos están libres o parcialmente adheridos, los laterales son decurrentes sobre el ovario, en ocasiones formando un mentón o espolón. Los pétalos están usualmente adheridos al sépalo dorsal, formando una capucha sobre el ginostemio, con sus bases decurrentes en el pie de la columna. El labelo está marginalmente adherido a los lados de la porción apical de la columna o raramente libre, unguiculado o sésil, la base del labelo tiene glándulas de néctar, libres y prominentes o adnadas al margen. El ovario es glabro a lanuginoso, a veces torcido. La cápsula es erecta con semillas cortamente fusiformes, curvadas o sigmoides, con celdas de la testa oblongas, las de la parte media más largas que las distales (Salazar, 2003).

El ginostemio en todas las especies de *Spiranthinae* es erecto, recto o ligeramente arqueado (*Aulosepalum pyramidale* (Lindl. M. A. Dix & M. W. Dix) y

¹⁵ Excepto en *Aracamunia liesneri* Carnevali & I. Ramírez, *Hapalorchis trilobatus* Schltr. y *Quechua glabrescens* (T. Hashim.) Salazar & Jost

Deiregyne albovaginata), predominantemente de color blanco-cremoso o verde y a veces amarillo, naranja o rosa. La parte columnar¹⁶ del ginostemio tiene una extensión ventral en la base llamada pie de columna (Dressler, 1993), que en *Sacoila* y *Sarcoglottis* comprende más de la mitad de la longitud total del ginostemio, pero en otros taxa es más corto. En algunas especies como *Aulosepalum pyramidale*, *Deiregyne albovaginata*, *Dichromanthus aurantiacus* y *D. cinnabarinus* hay apéndices membranáceos a cada lado del estigma, los cuales no están ausentes en el resto de las especies. La antera es dorsal, erecta, paralela y subigual al rostelo, o a veces lo sobrepasa como en *Mesadenus*; su base está asentada en una cavidad con márgenes membranáceos llamada clinandrio. La antera generalmente está dividida en dos lóculos y produce dos polinios longitudinalmente sulcados unidos a un viscidio común. El rostelo constituye la parte apical de la superficie ventral del ginostemio y su porción distal constituye el viscidio, el cual usualmente está unido a los ápices de los polinios, excepto en *Mesadenus lucayanus* (Britton) Schltr., en la cual está ubicado aproximadamente en la parte media. La forma del rostelo es variable, más o menos ovado en *Aulosepalum pyramidale*, sub-rectangular en *Cyclopogon luteoalbus* (A. Rich & Galeotti) Schltr., oblongo-triangular en *Sarcoglottis*, triangular en *Deiregyne albovaginata*, sub-linear en *Dichromanthus*, *Sacoila* y *Stenorrhynchos*, u oval en

¹⁶ La parte principal de la columna inferior al estigma, rostelo y antera, formada por la fusión de los filamentos de los estambres y el estilo. Ésta se desarrolla a partir de un meristemo intercalar ubicado en la base del estigma.

Kionophyton sawyeri (Standl. & L. O. Williams) Garay y *Mesadenus lucayanus*. Las especies examinadas de *Cyclopogon* y *Sarcoglottis* tienen un viscidio tipo cuña, caracterizado por tener la porción adhesiva localizada en la superficie dorsal y los polinios unidos lateralmente. El resto de las especies de Spiranthinae tienen viscidio tipo cojín con una superficie adhesiva ventral y los polinios dorsalmente unidos (Greenwood, 1982). Después de remover el polinario el tejido que queda es llamado remanente rostelar, el cual tiene forma variada: a) aguzado en *Dichromanthus aurantiacus*, *D. michuacanus*, *Sacoila* y *Stenorrhynchos* (Fig. 1 J); b) truncado en *Sarcoglottis* y *Cyclopogon* (Fig. 1 I); c) tridentado en *Deiregyne albovaginata* (Fig. 4 J); d) apiculado en *Mesadenus lucayanus* y *Kionophyton sawyeri* (Fig. 5 J, 7 L) o e) ausente en *Aulosepalum pyramidale* (Fig. 1L). La consistencia del remanente rostelar también es variable, desde grueso y carnoso en *Sarcoglottis* y *Cyclopogon*, membranáceo en *Mesadenus*, *Kionophyton* y *Dichromanthus cinnabarinus* o rígido en *Dichromanthus aurantiacus*, *D. michuacanus*, *Stenorrhynchos*, *Sacoila* y *Deiregyne*. El estigma es ventral, generalmente orbicular o elíptico, más o menos plano y raramente con margen inferior prominente (e.g. *Sacoila lanceolata* y *Dichromanthus michuacanus*).

Antecedentes de los estudios de la ontogenia del ginostemio en la subtribu Spiranthinae

La estructura del ginostemio de Spiranthinae ha sido investigada en muy pocos trabajos. Rasmussen (1982) condujo un estudio sobre la morfología y ontogenia del ginostemio de las orquídeas “neottioides”, un grupo polifilético que incluía miembros de tres subfamilias *sensu* Chase et al. (2003), Vanilloideae

(*Lecanorchis* Bloom, *Vanilla* Plum. ex Mill.), Epidendroideae basales (Gastrodieae, Neottieae, Nervilieae, Tropicdieae) y Orchidoideae (Cranichideae, Diurideae). Dicho estudio incluyó descripciones breves de los ginostemios de las especies de ocho géneros de Spiranthinae durante la post-antesis¹⁷, pero careció de una descripción detallada del desarrollo, debido, en primera instancia, a que la finalidad del trabajo de Rasmussen era analizar comparativamente la morfología del ginostemio de Orchidaceae y revisar la terminología para los caracteres que lo componen. En segundo lugar, porque utilizó material preservado y particularmente en Spiranthinae, no contó con material adecuado para examinar la ontogenia.

Greenwood (1982) documentó la estructura del viscidio de Spiranthinae, examinando representantes de 10 géneros. Describió dos tipos de viscidio en la subtribu, que llamó tipo cojín” y tipo cuña¹⁸.

Posteriormente, Kurzweil (1988) estudió comparativamente el desarrollo floral de las orquídeas neottioides incluyendo una especie de *Cyclopogon* y una de *Sarcoglottis* (Spiranthinae), para las cuales describió algunas etapas ontogenéticas del ginostemio tales como la emergencia del carpelo medio y los carpelos laterales, así como la diferenciación del estigma y viscidio, a partir del lóbulo medio del estigma.

¹⁷ Post-antesis se refiere a la fase posterior a la apertura de la flor. Pre- antesis, fases previas a la apertura de la flor.

¹⁸ Viscidio tipo cojín se caracteriza por tener formas variadas pero con la porción adhesiva ventral y los polinios adheridos dorsalmente. Viscidio tipo cuña es carnoso, con la porción adhesiva dorsal y los polinios se adhieren lateralmente (Greenwood, 1982).

Subsecuentemente, Szlachetko y Rutkowski (2000) publicaron un libro en el que describieron sucintamente los distintos ginostemios de todos los géneros aceptados por ellos en la familia Orchidaceae. En tal escrito, los autores realizaron interpretaciones de la morfología de este órgano pero solo en etapa post-antética, no realizaron cortes anatómicos ni microscopia electrónica. También presentaron algunos datos ontogenéticos retomados de otros artículos, particularmente de Rasmussen (1982).

Figuroa et al. (2012) describieron detalladamente el desarrollo del ginostemio de *Dichromanthus michuacanus* (Spiranthinae). Los autores encontraron que el estigma está formado por la base del carpelo medio exclusivamente, que los estaminodios no están presentes. Además observaron con detalle los cambios celulares que ocurren en el viscidio durante el desarrollo floral incluyendo el mecanismo de su separación del rostelo. Asimismo discutieron la relación de la estructura floral con la polinización.

Recientemente, fue discutida la estructura floral de *Nothostele* Garay, un género con morfología del perianto típica de Spiranthinae, pero con características del polinario supuestamente similares a la subtribu Cranichidinae (Batista et al. 2011). *Nothostele* tiene flores no resupinadas (razón por la que fue incluido en Cranichidinae) e incluso algunos autores (Szlachetko, 1995; Szlachetko y Rutkowski, 2000) creyeron que tenía un hamulus¹⁹, característica distintiva de

¹⁹ Hamulus o estípote hamular (Dressler, 1993) es una extensión formada por el ápice recurvado del rostelo que forma una conexión entre el polinio y el viscidio, éste último no es apical.

Cranichidinae. Sin embargo, esas interpretaciones fueron erróneas. Los análisis moleculares indicaron la inclusión de *Nothostele* en Spiranthinae y llevaron a un examen más minucioso del viscidio, que permitió descartar que se tratara de un hamulus.

En seguida, se realizó una investigación que combinó los análisis de DNA y un estudio detallado de los caracteres morfológicos de los *Cotylobium* Garay, un género monoespecífico cuya posición filogenética como hermano del resto de las Spiranthinae es crítica para interpretar la evolución floral en la subtribu Spiranthinae (Borba et al. en prensa). *Cotylobium* ha sido ubicado en el género *Stenorrhynchos* por sus flores amarillas, más o menos tubulares y su remanente rostellar aguzado (Szlachetko, 1995; Rutkowski et al. 2008). Borba et al. (en prensa) investigaron con detalle diversos aspectos de la morfología y anatomía floral de *Cotylobium* y descubrieron varias novedades anatómicas y morfológicas, principalmente del labelo. En primera instancia, vieron que las flores no tienen un tubo sepalino, pues los sépalos laterales solo están fusionados en la base y que el resto de su porción está extendida. En segundo término observaron que el labelo tiene una lámina transversal de tejido que lo divide en dos partes, llamada trabécula²⁰; este carácter es diagnóstico para el género. Además,

²⁰ Trabécula en este texto se refiere al callo carnoso formado por dos crestas pubescentes que convergen, ubicadas en posición transversal y que divide al labelo en dos porciones: epiquilo e hipoquilo (Borba et al. en prensa). Anatómicamente se define trabécula como la parte de la pared celular parecida a una varilla o carrete que se extiende radialmente a través del lumen de una célula, en las iniciales y derivadas del cambium vascular en las plantas con semilla (Esau, 1987).

discutieron diversos aspectos estructurales, biogeográficos y funcionales. Las filogenias construidas a partir de datos del ADN indican que *Cotylolabium* no forma parte de ninguno de los otros cuatro clados principales de Spiranthinae, mencionados previamente, si no que es hermano del resto de la subtribu. Nuevamente fue evidenciado que el uso de caracteres morfológicos exclusivamente para la clasificación puede resultar en la agrupación no natural de los taxones y se propuso que el remanente rostelar aguzado no representa una convergencia entre varios grupos de Spiranthinae sino la condición ancestral que se ha modificado derivadamente en varios linajes de la subtribu.

Hasta ahora, el número de especies y de géneros de Spiranthinae que han sido estudiados ontogenéticamente en algún grado es muy pequeño (8 de 480 especies) es necesario el estudio detallado de las estructuras para poder interpretar adecuadamente su evolución. Además, si se analiza el ginostemio solo en etapa post-antética no es posible determinar con certeza el origen de las estructuras que constituyen este órgano complejo. Por tanto, una manera de entender mejor el origen y homología de los órganos es el estudio del desarrollo floral comparativo. Una mejor comprensión de la estructura del ginostemio sería útil para terminar con las interpretaciones morfológicas erróneas y diversos casos de confusión taxonómica derivada de la revisión superficial de los caracteres.

Enfoque del estudio

En este proyecto se estudió el desarrollo floral de las Spiranthinae, con énfasis en el ginostemio de 12 especies de orquídeas pertenecientes a nueve géneros que representan a tres de los cuatro linajes principales de la subtribu

Spiranthinae recuperados en los estudios filogenéticos moleculares recientes, denominados los clados de *Spiranthes* (siete especies), *Pelexia* (tres especies) y *Stenorrhynchos* (dos especies) (Salazar et al. 2003, 2011; Salazar y Ballesteros-Barrera, 2010; Batista et al. 2011; Salazar y Dressler, 2011; Salazar y Jost, 2012).

El interés primario del estudio se enfocó al clado de *Spiranthes* porque presenta una notable variación morfológica floral entre las especies que lo conforman. Una de las ventajas para el estudio es que varias de las especies del clado son abundantes en el centro de México, situación que facilita encontrar las etapas ontogenéticas necesarias para nuestro estudio. Así, consideramos tres de las cuatro especies actualmente reconocidas en *Dichromanthus*, porque este género forma un grupo monofilético fuertemente apoyado en los análisis de ADN, pero que sus especies difieren entre los atributos florales, como la coloración, la fragancia, la forma y el tamaño del rostelo y presentan dos síndromes de polinización melitófilo y ornitófilo (Sarmiento y Romero, 2000; Salazar, 2003; Hágsater et al. 2005; Salazar y García-Mendoza, 2009; Salazar et al. 2011). Se estudió a *Deiregyne albovaginata* por ser *Deiregyne* el grupo hermano de *Dichromanthus*. También se incluyeron a las especies con morfología particular del rostelo como *Aulosepalum pyramidale*, que carece de remanente rostelar, *Mesadenus lucayanus* porque tiene un rostelo corto que apenas alcanza la mitad de la longitud de la antera y *Kionophyton sawyeri* por su viscidio acanalado, con el fin de saber si los procesos de desarrollo eran similares. Se incorporó también a *Sacoila lanceolata* y *Stenorrhynchos glicensteinii* porque comparten características morfológicas con *Dichromanthus*, aunque están distantemente relacionados,

según indican los análisis con datos de ADN (Salazar et al. 2011). También se analizaron algunas especies del clado de *Pelexia* (*Cyclopogon luteoalbus*, *Sarcoglottis assurgens* y *S. schaffneri*), porque tienen un ginostemio distintivo con viscidio tipo cuña, en contraste a los clados *Spiranthes* y *Stenorrhynchos* con viscidio tipo cojín.

En este estudio se realizó una comparación de la morfología y desarrollo del ginostemio por medio de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Se analizaron diferentes etapas ontogenéticas del ginostemio, desde la emergencia de los ápices de los carpelos hasta la post-antesis. La finalidad fue comprender la estructura del ginostemio y aclarar el origen de las estructuras que conforman este órgano en Spiranthinae, además de evaluar la hipótesis de homología por medio de la comparación del desarrollo. Se seleccionaron además caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos y se codificaron para conformar una matriz de datos para realizar análisis de parsimonia solo con ellos y en combinación con caracteres del ADN (espaciador interno transcrito ribosomal nuclear, por sus siglas en inglés nrITS y *trnL-trnF* del cloroplasto), con el fin de sopesar su valor como marcadores taxonómicos. También se llevó a cabo la optimización de algunos caracteres, tales como la forma del remanente rostelar, el orden de la organogénesis, el origen del estigma y la presencia o ausencia de estaminodios, para tratar de entender la evolución de estos caracteres en la subtribu. En síntesis, esta investigación pretende sentar las bases para estudios comparativos futuros acerca del desarrollo en Spiranthinae y otras orquídeas.

5. OBJETIVO GENERAL

Se propone analizar y comparar la estructura y ontogenia del ginostemio de especies selectas de la subtribu *Spiranthinae* como base para investigaciones futuras acerca de la evolución de este órgano en *Spiranthinae* y otros grupos relacionados de la tribu *Cranichideae*.

5.1 Objetivos particulares

1) Elaborar descripciones detalladas de las etapas ontogenéticas y la estructura floral de especies representantes de *Spiranthinae*, con énfasis en el ginostemio.

2) Analizar comparativamente el origen de estructuras particulares del ginostemio de las especies de *Spiranthinae*, incluyendo los apéndices del clinandrio, la porción receptiva del estigma, el rostelo y el viscidio.

3) Analizar el valor taxonómico de los caracteres morfológicos y ontogenéticos de las especies seleccionadas para la subtribu *Spiranthinae*, en el marco de una filogenia basada en caracteres moleculares y morfológicos.

4) Optimizar los caracteres morfológicos del ginostemio sobre la filogenia generada con los datos del ADN y morfológicos para entender sus diversos cambios.

6. CAPÍTULO I.



Estructura y desarrollo del ginostemio en *Dichromanthus michuacanus* (Orchidaceae, Spiranthinae)

Gynostemium structure and development in *Dichromanthus michuacanus* (Orchidaceae, Spiranthinae)

Coyolxauhqui Figueroa¹✉, Gerardo A. Salazar¹, Teresa Terrazas¹ y Patricia Dávila²

¹Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-367, 04510 México, D. F., México.

²Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios s/n, Los Reyes Iztacala 54090 Tlahuepanitla, Estado de México, México.

✉ cfigueroa@ibiologia.unam.mx

Resumen. Se describe e ilustra la morfología y el desarrollo floral de *Dichromanthus michuacanus*, con énfasis en el ginostemio. Se examinaron inflorescencias en diferentes estadios de desarrollo mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz. Los órganos florales se diferencian en dirección adaxial-abaxial en el orden siguiente: sépalos laterales, labelo, pétalos, antera y sépalo dorsal. Los ápices carpelares aparecen después, entre la antera y el labelo. Inicialmente hay alargamiento de antera y carpelo medio; el ápice de este último da origen al estigma, rostelo y viscidio y los ápices de los carpelos laterales no contribuyen a la superficie receptiva del estigma. El remanente rostelar es angostamente triangular y el viscidio lo envaina; en la antesis se aprecia una zona de ruptura entre ambas estructuras. Al final del desarrollo crece la parte columnar. La organogénesis temprana de *D. michuacanus* es similar a la de otros géneros de Spiranthinae y las diferencias estructurales entre las flores se generan en etapas tardías del desarrollo. La estructura del rostelo y viscidio muestra una correspondencia con la morfología del polinizador (*Bombus diligens*, Apidae); el angosto viscidio de *D. michuacanus* se adhiere a la superficie dorsal de la lengua del insecto.

Palabras clave: antera, carpelos, estigma, ginostemio, ontogenia, polinización, rostelo, viscidio.

Abstract. Floral morphology and development of *Dichromanthus michuacanus*, with an emphasis on the gynostemium, are described and illustrated. Inflorescences at different stages of development were examined by means of scanning electron microscopy and light microscopy. The floral organs differentiate in an adaxial-abaxial direction, in the following sequence: lateral sepals, labellum, petals, anther and dorsal sepal. The carpel apices appear last between the anther and the labellum. Initially there is elongation of the anther and the median carpel; the latter gives rise to the stigma, rostellum and viscidium, and the lateral carpels do not contribute to the stigmatic receptive surface. The rostellum remnant is narrowly triangular and the viscidium sheaths it almost entirely; at anthesis, a zone of rupture between both structures is evident. The columnar part arises at the end of development. Early organogenesis of *D. michuacanus* is similar to that of other genera of Spiranthinae studied previously and the structural differences observed originate at the later stages. The structure of the rostellum and viscidium shows a correspondence with the morphology of the pollinator (*Bombus diligens*, Apidae); the narrow viscidium of *D. michuacanus* adheres to the dorsal surface of the tongue of the insect.

Key words: anther, carpels, stigma, gynostemium, ontogeny, pollination, rostellum, viscidium.

Introducción

La subtribu Spiranthinae es un grupo de orquídeas predominantemente terrestres con distribución neotropical (excepto por el género *Spiranthes* s.s.) que incluye 40 géneros y ca. 400 especies (Salazar, 2003). Está ubicada en la tribu Cranichideae de la subfamilia Orchidoideae

(Chase et al., 2003; Salazar et al., 2003, 2009; Figueroa et al., 2008). La circunscripción genérica en la subtribu se ha basado casi exclusivamente en características del ginostemio, particularmente el rostelo (la porción no receptiva del lóbulo medio estigmático, una parte de la cual se diferencia en el viscidio; Richard, 1817; Dressler, 1993; Kurzweil, 1987a, 1987b, 1998). El énfasis que se ha hecho en el uso de unos cuantos caracteres florales, evaluados de manera intuitiva, para clasificar un grupo tan grande de especies, ha dado como resultado notables inconsistencias en la deli-

Recibido: 24 noviembre 2010; aceptado: 28 junio 2011

mitación de los géneros (Schlechter, 1920; Garay, 1982; Balogh, 1982; Szlachetko, 1995; Salazar, 2003; Salazar et al., 2003, 2011).

Por otra parte, pocos trabajos han investigado de manera comparativa la estructura del ginostemio de las Spiranthinae. El de Rasmussen (1982) fue el primer estudio comparativo de la morfología y desarrollo del ginostemio de las orquídeas “neottioides”, un grupo polifilético en el cual estaba incluida la subtribu Spiranthinae. Dicho estudio comprendió representantes de 6 géneros de la subtribu con descripción sucinta de la morfología del ginostemio en post-antesis. Por otra parte, Greenwood (1982) estudió el viscidio en numerosas Spiranthinae mexicanas y planteó la existencia de 2 tipos principales, que denominó “tipo cojin” y “tipo cuña”. Sin embargo, indicó que su estudio se basó en una fracción de los géneros y especies conocidos en la subtribu, siendo necesario estudiar más taxa para verificar la generalidad de sus observaciones. Kurzweil (1988), en un estudio comparativo del desarrollo de las orquídeas “neottioides”, observó algunas etapas de la ontogenia del ginostemio de una especie de *Cyclopogon* sp. (Spiranthinae). Más recientemente, Szlachetko y Rutkowski (2000) presentan descripciones generales de los 51 géneros que reconocen en Spiranthinae; sin embargo, las descripciones no son completamente comparables y sólo se refieren a los ginostemios en post-antesis.

No existen trabajos previos que investiguen en detalle el desarrollo y la morfología post-antesis del ginostemio de una especie de la subtribu Spiranthinae. En el presente estudio se describe la morfología post-antesis y la ontogenia floral de *Dichromanthus michuacanus* (Lex.) Salazar et Soto Arenas, con énfasis en el ginostemio, con el fin de sentar una base para posteriores estudios comparativos del desarrollo y la estructura floral de la subtribu Spiranthinae. También se examina la relación entre la estructura y la función de las partes del ginostemio con la polinización y se discute la homología de las estructuras reproductivas florales en el contexto de la familia Orchidaceae, un tópico históricamente debatido.

Materiales y métodos

Recolección del material. Se obtuvieron inflorescencias de material fresco en diferentes estadios de desarrollo durante visitas a varias localidades del Estado de México, con los siguientes números de colecta: *Figueroa 192, 260, 263; Salazar 6047 7250; Soto 10166* (ejemplares de respaldo en el herbario MEXU). Se enfatizó la obtención de inflorescencias que presentaron primordios florales para la observación desde la diferenciación inicial de los órganos de la flor hasta flores en post-antesis. Las inflorescencias se fijaron en FAA (5% formalina, 5% ácido acético, 50% etanol;

Sass, 1958), y permanecieron en el fijador al menos durante 24 h; posteriormente fueron lavadas con agua y almacenadas en etanol al 50% hasta su procesamiento.

Morfología del ginostemio en post-antesis. Las flores abiertas se disectaron bajo un estereomicroscopio (Stemi SV 6, Carl Zeiss) y fueron fotografiadas con una cámara digital (Coolpix 5200, Nikon).

Microscopía electrónica de barrido. Las muestras se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales (etanol 50%, 70%, 80%, 90% y 3 cambios en 100%), permaneciendo durante 48 h en cada cambio. Posteriormente se secaron a punto crítico y se les recubrió con oro para su observación en un microscopio electrónico Hitachi S-2460 N, operado a 15 kv. Las micrografías se tomaron con una cámara Pentax Z10, usando película de 35 mm Kodak 100 TMAX. Los negativos se digitalizaron con un escáner Nikon Super Coolscan 5000.

Anatomía. A partir de las observaciones de la microscopía electrónica de barrido se eligieron 6 etapas del desarrollo floral para su estudio mediante cortes anatómicos: 1), organogénesis inicial; 2), surgimiento del ápice del carpelo medio y carpelos laterales; 3), inicio de diferenciación del viscidio; 4), viscidio diferenciado antes de la antesis; 5), ginostemio en antesis y 6), ginostemio en post-antesis. Las muestras se deshidrataron con alcohol isopropílico durante 12 h por cada concentración en un cambiador Fisher Tissue-maton y posteriormente se incluyeron en parafina. Con un micrótomo American Optical Company 820 se obtuvieron secciones transversales y longitudinales de 10 µm de grosor que se tiñeron con safranina verde-rápido y se montaron en resina sintética. Las preparaciones permanentes se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico Olympus BX51 con cámara digital Evolution LC Color.

Resultados

Morfología floral de *Dichromanthus michuacanus*. La inflorescencia es un racimo terminal con las flores densamente arregladas en varias espirales (Fig. 1A). Las flores son tubulares con los ápices de los segmentos recurvados; su coloración varía de blanco a verde o amarillo intenso. Los segmentos florales tienen nervaduras longitudinales verde oscuro, con superficie exterior de pilosa a lanada (Figs. 1B, C). El margen interior de los pétalos está adherido al sépalo dorsal; el labelo envuelve parcialmente el ginostemio y sus márgenes laterales están adheridos a los lados del ginostemio al nivel del estigma. En la base del labelo se encuentra el nectario, que es acanalado (Fig. 1D). La adhesión del labelo a la columna resulta en un pasaje estrecho por el que se accede al nectario. El ginostemio es recto, de color verde y pubescente ventralmente; la antera es dorsal y erecta, mientras que el estigma es ventral. La

base de la antera se ubica en una cavidad con márgenes membranáceos, el clinandrio (Fig. 1F). La parte apical del ginostemio está formada por el rostelo, cuya superficie ventral constituye la porción adhesiva del viscidio. Este último es subulado y del tipo cojín (Greenwood, 1982; Figs. 1E-G). Los 2 polinios son alargados y sulcados longitudinalmente, con sus porciones apicales adheridas a la superficie dorsal del viscidio (Fig. 1J). Tras la remoción del viscidio con los polinios (= polinario), lo que queda del rostelo es una proyección rígida y angosta que constituye el remanente rostelar (Figs. 1H, I). El estigma es una superficie transversalmente elíptica, lustrosa y viscosa al tacto, algo convexa, con los lados ligeramente curvados hacia atrás (Figs. 1 E, G, H). En material fijado, la superficie estigmática consiste en una superficie convexa con papilas digitiformes de 50-300 μm y perpendiculares a la capa de células prosenquimáticas subyacentes (Fig. 3J) que de acuerdo con Dannenbaum et al. (1989) corresponde a un estigma del tipo II A.

Desarrollo floral. El desarrollo se inicia cuando el primordio floral surge en la axila de la bráctea como una protuberancia transversalmente elíptica (Fig. 2A); en el nivel tisular se observan divisiones iniciales periclinales seguidas por otras anticlinales. A continuación aparece una depresión transversal en su parte central debido al crecimiento más rápido del tejido periférico, que forma un reborde (Fig. 2B). Del margen adaxial del reborde del primordio, primero se diferencian los sépalos laterales, seguidos por el labelo y los pétalos hacia el interior (Figs. 2B, C); posteriormente se diferencia la antera y subsecuentemente surge el sépalo dorsal (Figs. 2C, D). Los segmentos del perianto crecen a lo largo y ancho adquiriendo su estructura laminar (Fig. 3A) y la antera también incrementa su tamaño.

Una vez que la antera ha crecido, se observa la aparición del ápice del carpelo medio entre la antera y el labelo (Figs. 2E, 3B). Dicho ápice consiste primero en una protuberancia redondeada (Fig. 2E) que se alarga rápidamente hasta alcanzar aproximadamente la misma longitud que la antera (Figs. 2F-G, 3B-D). Al tiempo que se inicia el alargamiento del ápice del carpelo medio, aparecen frente a éste 2 pequeñas prominencias redondeadas y fusionadas de manera congénita que constituyen los ápices de los carpelos laterales (Figs. 2E, 3C). Posteriormente, estas 2 prominencias forman el reborde inferior del estigma y son indistinguibles en la antesis (Fig. 2H).

Cuando ocurre el alargamiento del carpelo medio, pero antes de que éste iguale a la antera en longitud, se inicia la diferenciación del viscidio. El viscidio se encuentra en la porción apical del rostelo, es decir, la porción del carpelo medio que no formará parte del tejido receptivo del estigma. La diferenciación es visible superficialmente

porque el ápice del rostelo se ensancha ligeramente y se observa una desorganización de las hileras de células epidérmicas (Fig. 2F). En esta etapa, las células que formarán el viscidio son parenquimatosas e isodiamétricas (Fig. 3F).

Durante la diferenciación del viscidio, las células de la superficie ventral del rostelo se alargan anticlinalmente y tienen protoplastos densos (Fig. 3G). En esta etapa también se inicia la diferenciación del estigma (Figs. 2G-H) y se observa el crecimiento de las papilas en la parte basal del ápice del carpelo medio. El reborde formado por los ápices de los carpelos laterales no desarrolla papilas.

Poco antes de la antesis, en el viscidio las células del parénquima se diferencian en 2 grupos; las de posición ventral, que tienen protoplastos densos y generalmente están alargadas anticlinalmente (transversalmente al eje de la columna) y las dorsales que son isodiamétricas de tamaño diverso (Fig. 3H). El haz vascular del carpelo medio, que llega hasta el rostelo, termina donde comienza el viscidio.

A partir de la diferenciación del estigma y el viscidio, cuando el rostelo ha alcanzado la longitud de la antera, se forma la parte "columnar" del ginostemio por crecimiento intercalar, lo que hace que el estigma y el rostelo se alejen de la base (Fig. 2I). En ninguna fase se observan estructuras que pudieran interpretarse como estaminodios. Los segmentos del perianto y el ginostemio adquieren su forma y tamaño definitivos justo antes de la antesis y se desarrollan entonces la pubescencia en la superficie ventral de la parte columnar del ginostemio (Fig. 2K).

Durante la antesis, las papilas digitiformes del estigma alcanzan su máxima longitud; la superficie estigmática presenta la película viscosa que secretan las papilas y le da su aspecto brillante, y permite la adhesión de fragmentos de polinios durante la polinización. El reborde inferior del estigma, formado por los ápices carpelares laterales fusionados, no tiene papilas pero está cubierto por la misma sustancia viscosa y brillante que cubre el resto del estigma (Fig. 3J).

La antera es uninervada, con el haz vascular anficribal rodeado por una vaina de parénquima. El haz termina en el conectivo ubicado entre las 2 tecas. El endotecio presenta engrosamientos secundarios de la pared a manera de barras anticlinales paralelas, correspondiendo al tipo IIIb propuesto por Freudenstein (1991). La parte columnar es relativamente corta.

En la antesis, la epidermis dorsal del viscidio, a la cual se adhieren los polinios, consta de células comparativamente grandes más o menos cuadradas, mientras que la epidermis ventral consta de células rectangulares papilosas, alargadas periclinalmente (Fig. 3H). En el interior del viscidio, la mayor parte del volumen hacia el lado ventral está compuesta de células alargadas tangencialmente con protoplastos densos y grandes vacuolas (Fig. 3H). Al

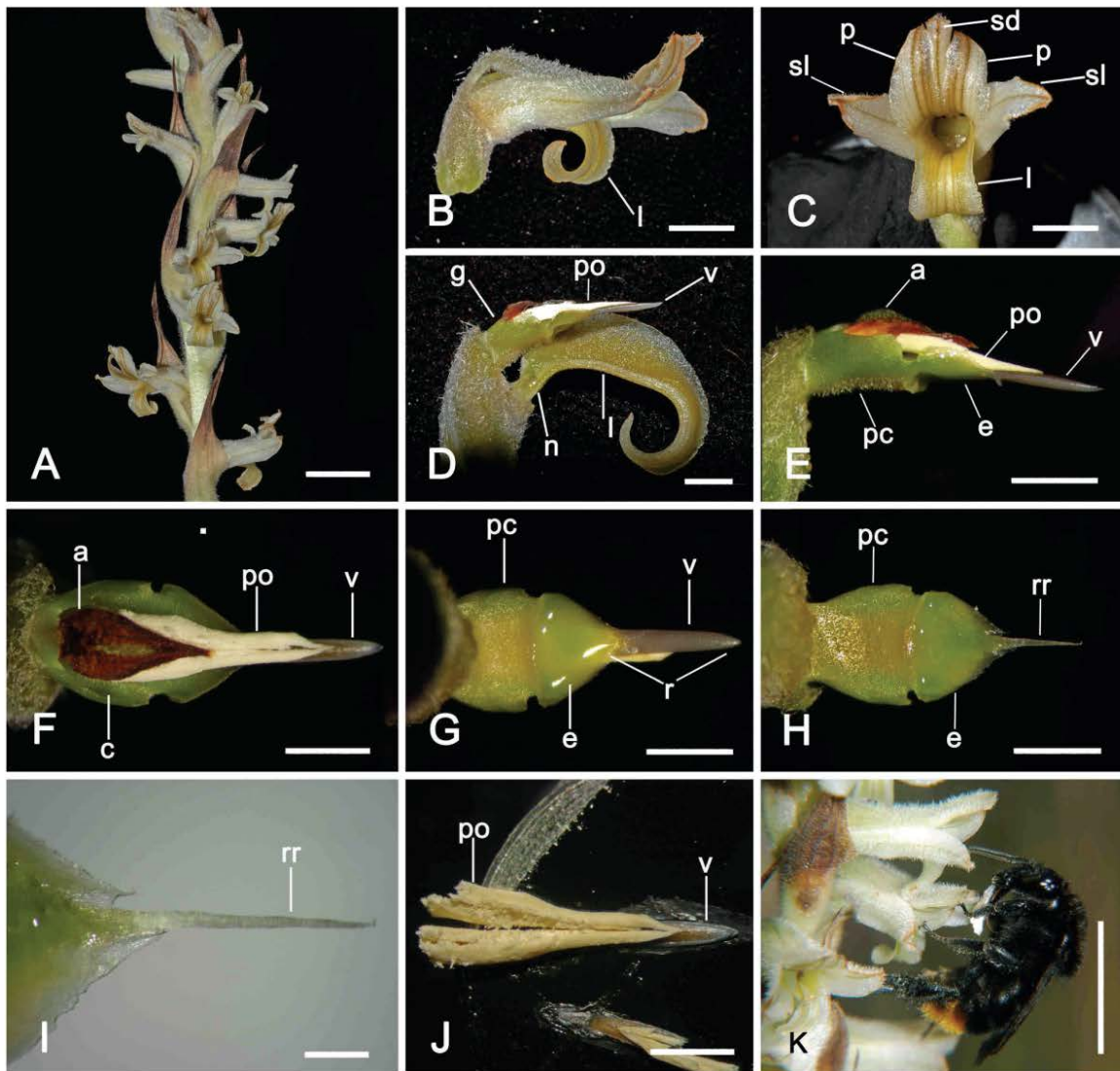


Figura 1. Morfología floral de *Dichromanthus michuacanus* (basada en Salazar 7250, MEXU.). A, Inflorescencia; B, flor en vista lateral; C, flor en vista frontal; D, labelo y ginostemio en vista lateral con el labelo cortado longitudinalmente; E, ginostemio en vista lateral; F, ginostemio en vista dorsal; G, ginostemio en vista ventral antes de la remoción del polinario; H, ginostemio en vista ventral tras la remoción del polinario, mostrando el remanente rostellar; I, acercamiento del remanente rostellar en vista ventral; J, polinario en vista dorsal; K, polinización de *D. michuacanus* por *Bombus diligens* en el Estado de México. *Abreviaturas:* a, antera; c, clinandrio; e, estigma; g, ginostemio; l, labelo; n, nectario; pc, parte columnar del ginostemio; p, pétalos; po, polinio; rr, remanente rostellar; sd, sépalo dorsal; sl, sépalos laterales; v, viscidio. *Escala:* A, K= 1 cm; B, C= 0.5 cm; D-H, J= 2mm; I= 0.5 mm.

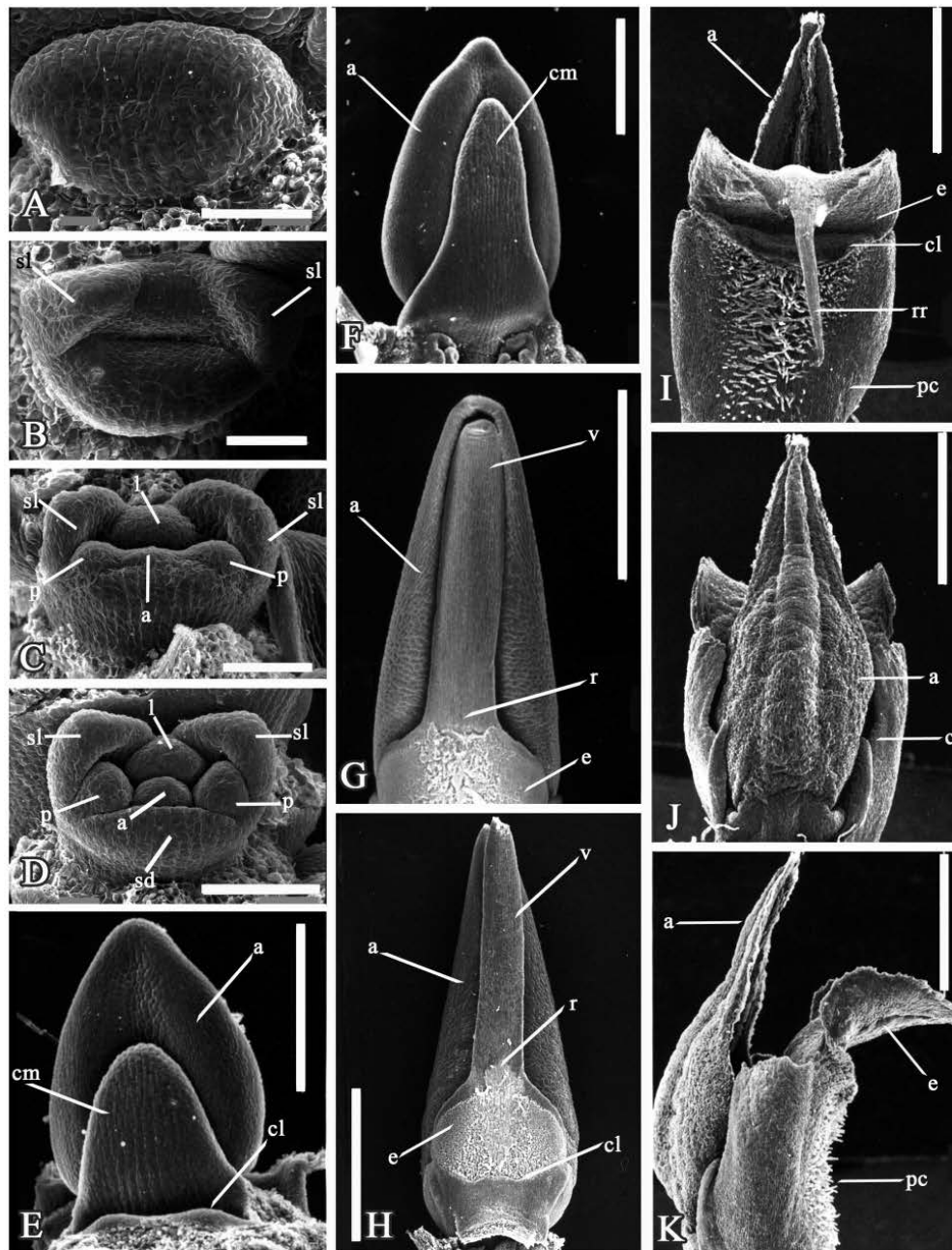


Figura 2. Desarrollo floral de *D. michuacanus*, microscopía electrónica de barrido. A, primordio floral elíptico; B, iniciación de los sépalos laterales; C, iniciación de los pétalos; D, flor completa; E, flor sin perianto mostrando el carpelo medio y los laterales; F, antera y carpelo medio en desarrollo; G, viscidio empezando a diferenciarse; H, zona receptiva del estigma y viscidio diferenciados y ápices fusionados de los carpelos laterales; I, vista ventral del ginostemio en anthesis con la parte columnar formada y remanente rostellar expuesto; J, vista dorsal del ginostemio en anthesis mostrando la antera; K, vista lateral del ginostemio. *Abreviaturas:* a, antera; c, clinandrio; cl, ápices de los carpelos laterales; cm, ápice del carpelo medio; e, estigma; l, labelo; p, pétalos; pc, parte columnar del ginostemio, r, rostellar; rr, remanente rostellar; sd, sépalo dorsal; sl, sépalos laterales; v, viscidio. A-D en posición no resupinada; E-K en posición resupinada. *Escala:* A, B= 100 µm; C, D= 200 µm; E= 400 µm; F= 500 µm; G-K= 2 mm.

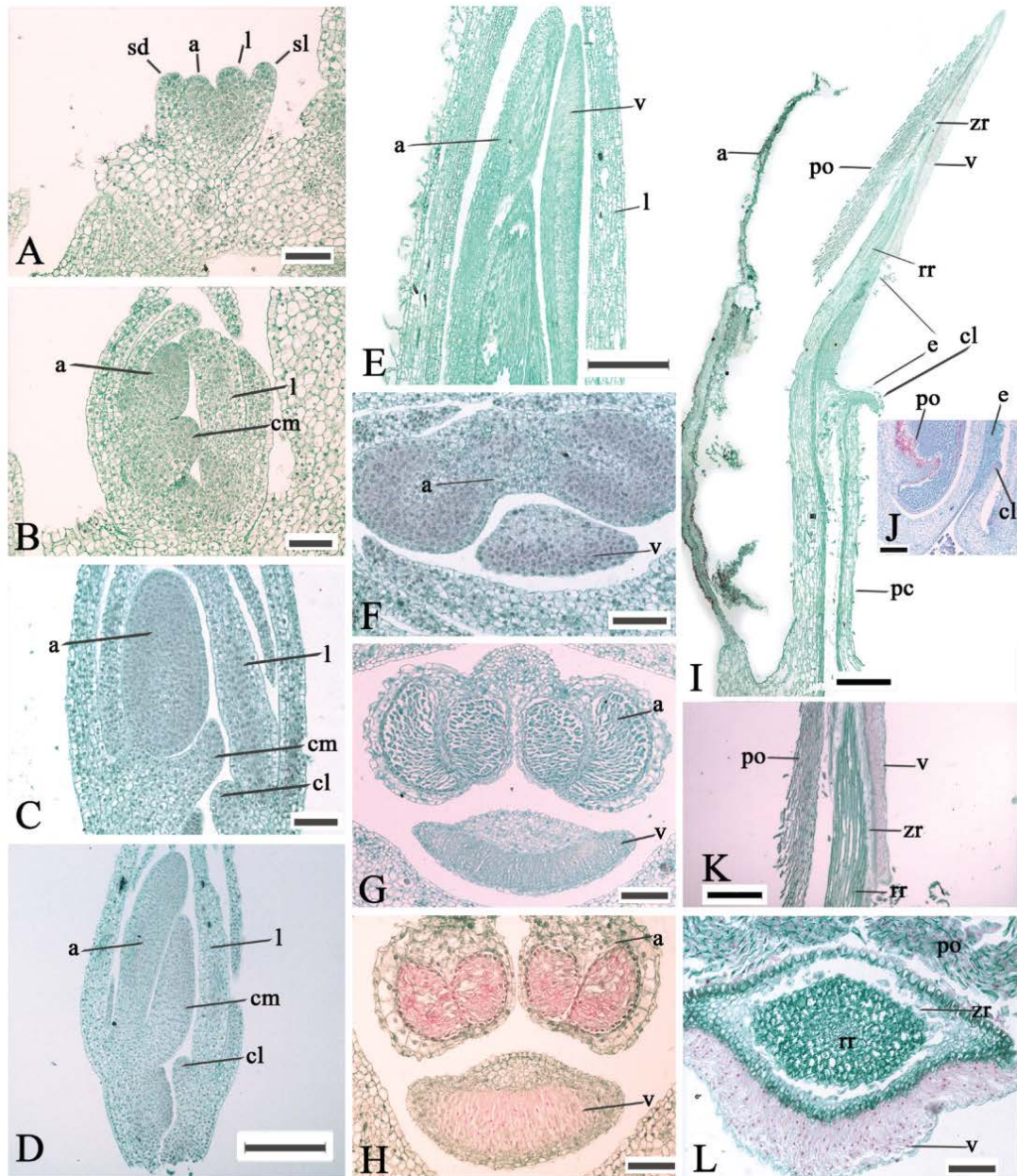


Figura 3. Diferentes etapas de desarrollo floral de *D. michuacanus*, de microscopía de luz. A, organogénesis temprana, indicando sépalos, antera y labelo; B, diferenciación del ápice del carpelo medio; C, diferenciación de los ápices de los carpelos laterales; D, carpelo medio alargado, casi de la misma longitud que la antera, viscidio iniciando su desarrollo; E, corte transversal del viscidio y antera en diferenciación; F, corte longitudinal del viscidio casi completamente diferenciado; G, corte transversal del viscidio justo antes de la antesis; H, viscidio al inicio de la antesis y antera con algunos engrosamientos del endotecio; I, corte longitudinal del ginostemio en post-antesis; J, corte longitudinal del ginostemio en post-antesis mostrando el estigma; K, corte longitudinal del viscidio en post-antesis, obsérvese la zona de ruptura; L, corte transversal del viscidio en post-antesis. *Abreviaturas:* a, antera; cl, ápices de los carpelos laterales; cm, ápice del carpelo medio; e, estigma; l, labelo; po, polinios; rr, remanente rostral; sl, sépalos laterales; v, viscidio; zr, zona de ruptura. *Escala:* A-C, G-H, L= 100 μ m; D-F, I-K= 300 μ m.

contacto de un objeto sólido, las paredes de las células adhesivas del viscidio se disuelven y sus contenidos se mezclan y forman una sola masa compacta. Hacia la parte dorsal existe una zona transversalmente elíptica donde las células del parénquima se diferencian en colenquimatosas y constituirán el remanente rostral tras la remoción del polinario (Figs. 3I, K-L). Varios días después de la antesis, en ginostemios cuyo polinario no fue removido se observó degeneración del estrato de células parenquimáticas que rodean el remanente rostral (Fig. 3L), causando la separación del viscidio y el remanente (aunque en esta etapa la superficie adhesiva del viscidio está seca y no es funcional; Figs. 3I, K-L).

Discusión

Organogénesis floral. La organogénesis inicial de *D. michuacanus* es similar a la descrita para otras orquídeas de las subfamilias Epidendroideae, Vandoideae y Orchidoideae (Kurzweil, 1987a, 1987b, 1998, 2000), incluyendo otros miembros de la subtribu Spiranthinae. En todas existe una direccionalidad en la secuencia de aparición de los órganos florales que va del lado adaxial del primordio floral hacia el abaxial, aunque existe variación en el orden de aparición de algunos órganos en particular (Endress, 1990; Rudall y Bateman, 2002; Pabón y González, 2008). La condición más común es que se diferencien, en ese orden, sépalos laterales, labelo, pétalos, sépalo dorsal y antera (Kurzweil, 1988). En *D. michuacanus* la secuencia sólo difiere de la anterior en que primero es evidente la antera y después el sépalo dorsal (Fig. 2C), como ocurre en *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (subtribu Orchidinae; Kurzweil, 1987b). Se han observado diferencias en la secuencia de aparición de los órganos florales aún entre especies cercanamente relacionadas. Pabón y González (2008) encontraron que la secuencia de iniciación de órganos es variable entre especies del género *Telipogon* Kunth. El labelo aparece ya sea antes o después de pétalos y la variación en el tiempo de iniciación de los órganos puede estar directamente relacionada con diferencias morfológicas de las flores en antesis. Por ejemplo, cuando los pétalos se desarrollan antes que el labelo, éste es similar en forma a los otros 2 pétalos, originando una corola polisimétrica, mientras que cuando es el labelo el que aparece antes, generalmente resulta una corola monosimétrica (Pabón y González, 2008). El desarrollo direccional (adaxial a abaxial) está relacionado con la adquisición y mantenimiento de la monosimetría (zigomorfa) de las flores (Endress, 1990, 1999), aunque Pabón y González (2008) observaron que en *Telipogon* las proporciones de los segmentos del perianto también pueden cambiar en etapas tardías de desarrollo, dando origen a una flor con perianto

polisimétrico (actinomorfo). En la mayoría de las orquídeas se define el color, la forma y el tamaño final de los órganos florales durante etapas tardías del desarrollo.

Ginostemio. El desarrollo del ginostemio en *D. michuacanus* es similar al que se registra para otros miembros de Cranichideae, incluso para *Prescottia plantaginea* Hook. (Cranichidinae) y *Cyclopogon* sp. (Spiranthinae; Kurzweil, 1988). En *P. plantaginea*, Kurzweil (1988) observó primordios de los 2 estambres laterales del verticilo interno, que luego constituyen los “dientes” laterales del clinandrio. Sin embargo, no existen indicios de estaminodios en *D. michuacanus* ni en *Cyclopogon* sp. En una revisión de la ontogenia floral de la familia Orchidaceae, Kurzweil (1998) enfatizó que en la tribu Cranichideae (como “subfamilia Spiranthoideae”, en parte), los estaminodios son muy reducidos o están ausentes. Otros autores (Szlachetko y Rutkowski, 2000; Rutkowski et al., 2008) suponen que los márgenes membranáceos del clinandrio de prácticamente todos los géneros de Spiranthinae representan estaminodios. Sin embargo, en este estudio, las observaciones en *D. michuacanus* no apoyan la naturaleza estaminodial del clinandrio, puesto que en ninguna fase del desarrollo se aprecian indicios de primordios de los estambres internos laterales similares a los que Kurzweil (1988) registró para *P. plantaginea*, así como por el hecho de que los márgenes membranáceos del clinandrio carecen de haces vasculares.

El estigma de *D. michuacanus* está formado solamente por la porción basal del ápice del carpelo medio, en contraste a lo reportado para *Spiranthes* sp. (Spiranthinae) por Rasmussen (1982) y para *Prescottia plantaginea* (Cranichidinae), *Cyclopogon* sp. *Sarcoglottis* sp. (Spiranthinae) y *Goodyera* sp. (Goodyerinae) por Kurzweil (1988, 1998); así como para otras orquídeas de las subfamilias Apostasioideae, Cypripedioideae, Epidendroideae y Orchidoideae, donde la superficie receptiva del estigma está constituida por parte de los ápices de los 3 carpelos, aunque el carpelo medio ocupa la mayor proporción de la superficie receptiva (Kurzweil, 1998).

Szlachetko y Rutkowski (2000) malinterpretaron la estructura del estigma y del rostelo de las Orchidaceae. Para ellos, la zona receptiva de polen la constituyen los ápices de los carpelos laterales (*lateral stigma lobes*) mientras que la del carpelo medio (*median stigma lobe*) no es receptiva y corresponde enteramente al rostelo. Esta confusión se deriva probablemente de que esos autores adoptan la definición dada por Rasmussen (1982) para rostelo, quien lo redescubre como “el lóbulo medio del estigma”, en contraste con el significado original del término que sólo se refiere a la porción no receptiva derivada del carpelo medio (Richard, 1817; Kurzweil, 1987a, 1987b, 1998; Dressler, 1993). En sus estudios ontogenéticos, Kurzweil (1988,

1998) demuestra que en las orquídeas de las subtribus Cranichidinae y Spiranthinae que él analizó, la superficie receptiva (estigma) está constituida principalmente por la parte basal del ápice del carpelo medio. Las observaciones del presente estudio confirman que lo anterior también es el caso en *D. michuacanus*, donde los ápices de los carpelos laterales, fusionados congénitamente, solamente constituyen el reborde inferior del estigma, no presentando en la antesis las papilas que caracterizan la superficie receptiva propiamente dicha (Fig. 3J).

El remanente rostelar, que es angostamente triangular y tiene una longitud de aproximadamente la tercera parte del largo total del ginostemio, está casi completamente envainado por el viscidio (Figs. 1G, 2H). Las características morfológicas del viscidio de *D. michuacanus* corresponden con las del "tipo cojín" propuesto por Greenwood (1982): es envainante y con la superficie ventral adhesiva. Con respecto al mecanismo de desprendimiento del viscidio, Greenwood (1982) postuló la posible existencia de una línea de abscisión que permitiría la separación del viscidio y el remanente rostelar. Esta sugerencia la corroboran las observaciones de este estudio, que indican la existencia de una zona de células alrededor del remanente rostelar que en flores abiertas se observa degradada, aparentemente facilitando la separación (Fig. 3L).

Rasmussen (1982) observó que el viscidio en post-antesis de *Spiranthes spiralis* (Spiranthinae), en corte transversal, consta de 3 capas de células: una ubicada ventralmente que consiste en una sustancia viscosa derivada de células desintegradas; otra central, de células esclerenquimáticas, y otra más, dorsal, consistente en una epidermis formada por células muy grandes con paredes delgadas. La estructura del viscidio de *D. michuacanus* es similar en las células que se desintegran para producir la sustancia adhesiva ventral y en la epidermis dorsal, pero difiere en la posesión de una zona central de células colenquimáticas que corresponderían al remanente rostelar y en que no muestra células esclerosadas (Fig. 3H). En *Spiranthes* el viscidio no es envainante y por lo tanto no queda un remanente rostelar tras su remoción; en su lugar, todo el viscidio es removido, dejando una hendidura angosta en el ápice del rostelo (e.g. Szlachetko y Rutkowski, 2000: Fig. 309).

En las etapas iniciales de su diferenciación, las células que darán origen al adhesivo del viscidio en *D. michuacanus* están densamente agrupadas y posteriormente se van separando gradualmente al secretar sustancias hacia los espacios intercelulares (Figs. 3F-G). En la antesis las paredes de estas células han degenerado completamente y la sustancia emerge como una masa pegajosa (Fig. 3H). Las características histológicas y el desarrollo del viscidio

de *D. michuacanus* son similares a lo reportado por Yeung (1987) para *Epidendrum ibaguense* Kunth (subfamilia Epidendroideae).

Polinización. La adaptación morfológica de las flores a los polinizadores se considera un factor importante para explicar la diversidad y evolución floral (Darwin, 1862; van der Pijl y Dodson, 1966; Catling, 1983; Proctor et al., 1996; Benítez-Vieyra et al., 2006; Salazar et al., 2011). Las flores se adaptan a un polinizador mediante atributos que las hacen atractivas para el tipo particular de animal que las poliniza, incluyendo aspectos como coloración, morfología, producción de recompensas tróficas, aromas, etc. (Singer et al., 2006). En el caso de las orquídeas, existe en general una marcada sinorganización del perianto y los órganos sexuales, principalmente del labelo y el ginostemio, que resulta en mecanismos precisos para la transferencia de polen (Dressler, 1981, 1993; Endress, 1994; Proctor et al., 1996; Rudall y Bateman, 2002; Singer et al., 2006).

Diversos autores han considerado que en las Orchidaceae la variación de la estructura del rostelo es muy importante porque existe una relación directa entre la forma y posición del viscidio y el sitio del polinizador donde éste se adhiere (Johnson, 1997; Singer, 2002; Benítez-Vieyra et al., 2006). En la subtribu Spiranthinae, las flores son tubulares, ofrecen néctar como recompensa para los polinizadores y tanto su forma como la estructura del rostelo y el polinario (que incluye el viscidio) resultan en especificidad del mecanismo de polinización.

Como se mencionó antes, las flores de *D. michuacanus* son tubulares, su coloración va del blanco al amarillo verdoso, el perianto presenta nervaduras contrastantes y las flores producen un intenso perfume durante el día. A partir de estas características, Salazar (2003) sugirió que esta especie podría ser polinizada por abejorros (*Bombus* spp.) u otras abejas que recolectan néctar. La polinización natural de *D. michuacanus* por el abejorro *Bombus diligens* fue observada recientemente en el Estado de México (M. A. López Rosas, com. pers. 2008; Fig. 1K). El abejorro fue visto probando varias flores en la inflorescencia, introduciendo sus partes bucales en el tubo floral para alcanzar el néctar. Un polinario se adhirió a la superficie dorsal de la lengua, a semejanza de lo que se ha observado en algunas especies de *Spiranthes* polinizadas por *Bombus* spp. (e.g. *Spiranthes romanzoffiana* y *S. lacera*; Catling, 1983). La adhesión del polinario a la lengua del polinizador es favorecida por la forma alargada y angosta del viscidio (Fig. 1K). Algo similar parece suceder en *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar et Soto Arenas y *D. cinnabarinus* (Lex.) Garay. Aunque estas 2 especies son polinizadas por colibríes (Sarmiento y Romero, 2000; Hågsater et al., 2005; Salazar et al., 2011), el angosto viscidio tipo cojín

al parecer se adhiere a la superficie dorsal del pico del polinizador, a semejanza de lo que se observa en *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay y *Stenorrhynchos speciosum* (Jacq.) Rich., también polinizadas por colibríes (Catling, 1987; Singer y Sazima, 2000; Siegel, 2011; Salazar et al., 2011). Es evidente que existe una cercana correspondencia entre la morfología de las partes florales y su papel funcional durante la polinización.

Los estudios ontogenéticos son una herramienta valiosa para entender la morfología (Rasmussen, 1986; Kurzweil, 1998, 2000; Kocyan y Endress, 2001; Box et al., 2008). En este trabajo, el estudio del desarrollo del ginostemio de *D. michuacanus* contribuyó a entender mejor como se originan sus diferentes componentes estructurales y constituye una base para futuros estudios comparativos de la morfología floral de la subtribu Spiranthinae. Dichos estudios se beneficiarían también de información sobre la polinización natural de las especies, lo cual ayudará a dilucidar el papel funcional de las estructuras florales.

Agradecimientos

A Marco A. López Rosas, por proporcionarnos información, material botánico y fotografías inéditas de la polinización de *Dichromanthus michuacanus*, a Berenit Mendoza Garfías, por su ayuda con la microscopía electrónica de barrido; a Miguel Véga, por las técnicas anatómicas y a Paula Rudall y un revisor anónimo, por las atinadas sugerencias al manuscrito. Coyolxauhqui Figueroa agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología el apoyo financiero para estudios de doctorado (beca Núm. 164890).

Literatura citada

- Balogh, P. 1982. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69:1119-1132.
- Benítez-Vieyra, S., A. M. Medina, E. Glinos y A. A. Cocucci. 2006. Pollinator mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* 20:948-957.
- Box, M. S., R. M. Bateman, B. J. Glover y P. J. Rudall. 2008. Floral ontogenic evidence of repeated speciation via paedomorphosis in subtribe Orchidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 157:429-454.
- Catling, P. M. 1983. Pollination of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 61:1080-1093.
- Catling, P. M. 1987. Notes on the breeding Systems of *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay (Orchidaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden* 74:58-68.
- Chase, M. W., K. M. Cameron, R. L. Barrett y J. V. Freudenstein. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In *Orchid Conservation*, K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (eds.). Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. p. 69-89.
- Dammenbaum, C., M. Wolter y R. Schill. 1989. Stigma morphology of the orchids. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 110:441-460.
- Darwin, C. 1862. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized. Murray, London. 365 p.
- Dressler, R. L. 1981. The orchids: Natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 332 p.
- Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides, Portland, Oregon. 314 p.
- Endress, P. K. 1990. Patterns of floral construction in ontogeny and phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society* 39:153-175.
- Endress, P. K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press. 511 p.
- Endress, P. K. 1999. Symmetry in flowers: diversity and evolution. *International Journal of Plant Science* 160:S3-S23.
- Figueroa, C., G. A. Salazar, A. Zavaleta y M. Engleman. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101:509-520.
- Freudenstein, J. V. 1991. A systematic study of endothelial thickenings in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 78:766-781.
- Hágsater, E., M. A. Soto, G. A. Salazar, R. M. Jiménez, M. R. López y R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México, D.F. 304 p.
- Garay, L. A. 1982. A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 28:277-425.
- Greenwood, E. W. 1982. Tipos de viscidio en Spiranthinae. *Orquídea* 8:283-290.
- Johnson, S. D. 1997. Insect pollination and floral mechanisms in South African species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 204:195-206.
- Kocyan, A. y P. K. Endress. 2001. Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasioideae) and their relationships to other orchids. *International Journal of Plant Science* 162:847-867.
- Kurzweil, H. 1987a. Developmental studies in orchid flowers I: epidendroid and vandoid species. *Nordic Journal of Botany* 7:427-442.
- Kurzweil, H. 1987b. Developmental studies in orchid flowers. II. Orchidoid species. *Nordic Journal of Botany* 7:443-451.
- Kurzweil, H. 1988. Developmental studies in orchid flowers.

- III. Neottioid species. *Nordic Journal of Botany* 4:1-5.
- Kurzweil, H. 1998. Floral ontogeny of orchids: a review. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 71:45-100.
- Kurzweil, H. 2000. The value of early floral ontogeny on the systematics of Orchidaceae. *In* *Monocots: systematics and evolution*, K. L. Wilson y D. A. Morrison (eds.). CSIRO: Melbourne. p. 436-439.
- Pabón, N. y F. González. 2008. Floral ontogeny of *Telipogon* spp. (Orchidaceae) and insights on the perianth symmetry in the family. *International Journal of Plant Sciences* 169:1159-1173.
- Proctor, M., P. Yeo y A. Lack. 1996. *The natural history of pollination*. Timber Press, Portland, Oregon. 479 p.
- Rasmussen, F. N. 1982. The gynostemium of the neottioid orchids. *Opera Botanica* 65:1-96.
- Rasmussen, F. N. 1986. Ontogeny and phylogeny in orchidaceae. *Lindleyana* 1: 114-124.
- Richard, L. 1817. *De orchideis Europaeis Annotationes*. Mémoires du Museum d'Histoire Naturelle Paris 4:1-37.
- Rudall, P. J. y R. M. Bateman. 2002. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. *Biological Reviews* 77:403-441.
- Rutkowski, P., D. L. Szlachetko y M. Górniak. 2008. Phylogeny and taxonomy of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Spirantheae, Orchidaceae) in Central and South America. *Wydawnictwo Uniwersytetu Gdanskiego, Gdansk*. 348 p.
- Salazar, G. A. 2003. Spiranthinae. *In* Pridgeon, A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F. N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum vol.3 Orchidoideae part 2, Vanilloideae*. Oxford University Press, New York. p. 164-278.
- Salazar, G. A., M. W. Chase, M. A. Soto y M. Ingrouille. 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90:777-795.
- Salazar, G. A., L. I. Cabrera, S. Madriñán y M. W. Chase. 2009. Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 104:403-416.
- Salazar, G. A., L. I. Cabrera y C. Figueroa. 2011. Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 167:1-18.
- Sarmiento, M. y C. Romero. 2000. *Orquídeas mexicanas*. Banco Nacional de Obras y Servicios Públicos/ Miguel Ángel Porrúa, México, D.F.
- Sass, J. E. 1958. *Botanical microtechnique*, tercera edición. Iowa State College Press, Ames, Iowa. 228 p.
- Siegel, C. 2011. Orchids and hummingbirds: sex in the fast lane. *The Orchid Digest* 75:8-17.
- Singer, R. B. 2002. The pollination biology of *Sauvoglossum elatum* Lindl. (Orchidaceae: Spiranthinae): moth-pollination and protandry in neotropical spirantheae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 138:9-16.
- Singer, R. B. y M. Sazima. 2000. The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 223:221-227.
- Singer, R. B., A. J. Marsaioli, A. Flach y M. G. Reis. 2006. The ecology and chemistry of pollination in Brazilian orchids: recent advances. *In* *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, vol. IV, J. da Silva (ed.). Global Science, Isleworth, Middlesex. p. 570-583.
- Schlechter, R. 1920. Versuch einer systematischen Neuordnung der Spiranthinae. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 37:317-454.
- Szlachetko, D. L. 1995. *Systema orchidalium*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica (Supplement)* 3:1-152.
- Szlachetko, D. L. y P. Rutkowski. 2000. *Gynostemium orchidalium*. I. Apostasiaceae, Cyripediaceae, Orchidaceae (Thelymitroideae, Orchidoideae, Tropidioideae, Spiranthoideae, Neottioideae, Vanilloideae). *Acta Botanica Fennica* 169:1-379.
- Van der Pijl, L. y C. H. Dodson. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida. 404 p.
- Yeung, E. C. 1987. The development and structure of the viscidium in *Epidendrum ibaguense* H. B. K. (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 148:149-155.

**7. CAPÍTULO II. GYNOSTEMIUM STRUCTURE AND DEVELOPMENT IN
SUBTRIBE SPIRANTHINAE (CRANICHIDEAE, ORCHIDACEAE).**

American Journal of Botany

COYOLXAUHQUI FIGUEROA^{1, 3}, GERARDO A. SALAZAR¹, TERESA
TERRAZAS¹ and PATRICIA DÁVILA²

¹Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-367, 04510 México D.F., MEXICO; and ²Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, C.P. 54090, Tlalnepantla, Edo. De México. MEXICO.

¹Manuscript received _____; revision accepted _____.

The authors thank Berenit Mendoza and Miguel Vega for their technical aid with SEM and light microscopy work. The first author thanks the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for scholarship 166820.

³Author for correspondence (e-mail: coyolfigueroa@gmail.com)

ABSTRACT

Premise of the study: We comparatively analyzed the development and morphology of the gynostemium of 14 species of terrestrial orchids, 12 of Spiranthinae and two of Cranichidinae, in order to understand the structure and to assess the homology in this complex organ.

Methods: Flowers and flower buds in different stages of development of the selected species were examined by means of scanning electron and light microscopy. A matrix of combined characters (morphology: anatomical, ontogenetic, vegetative and floral characters and DNA: nrITS, *trnL-trnF*) were cladistically analyzed by parsimony to generate a phylogenetic hypothesis as a background to interpreting character evolution.

Key results: The early ontogeny of gynostemium is similar among the analyzed species, whereas, most of the differences arose at the later stages of development. Firstly, the median carpel apex emerged between the anther and the labellum, then the lateral carpel apices emerge separately and soon joint to form a rim of tissue on the proximal margin of the stigma; this rim which can be receptive or not. The base of the median carpel apex contributes most of the receptive zone and apically develops the viscidium. Staminodes were absent in Spiranthinae during all development stages.

Conclusions: The morphological differences observed among various gynostemium are mostly due to allometric process at late stages of the flower development. The rostellum is the most variable part of the gynostemium.

Key words: organogenesis; gynostemium; rostellum; rostellum remnant; staminodes; stigma; viscidium.

INTRODUCTION

Subtribe *Spiranthinae* Lindl. is one of the most diverse lineages of terrestrial orchids in the Neotropics, including approximately 40 genera and 480 species (Salazar, 2003). *Spiranthinae* belongs to the tribe *Cranichideae* Endl., subfamily *Orchidoideae* (Chase et al. 2003) and can be distinguished from its close relatives by its usual fasciculate and tuberous roots, its resupinate and tubular flowers, by having a labellum adhered to the sides of the gynostemium and by showing nectar glands at its base (Salazar, 2003; Salazar et al. 2003). Traditionally, the generic classification of this group has been based mainly on attributes of its floral morphology, especially features of the rostellum, i.e. the modified, non-receptive part of the median carpel apex, a portion of which develops into the viscidium (Richard, 1817; Dressler, 1993; Kurzweil, 1987a, b, 1998). Several classifications of *Spiranthinae* were published during the last century, which in spite of being largely based on the same floral characters, were strikingly different from each other regarding the number of genera accepted and the assignment of particular species to such genera (Schlechter, 1920; Balogh, 1982, 1986; Garay, 1982; Szlachetko, 1995).

Salazar et al. (2003) assessed the phylogenetic relationships in the tribe *Cranichideae*, with a special focus on the subtribal and generic delimitation of the *Spiranthinae*, using nuclear and plastid DNA sequences to evaluate previous

classifications. That study revealed several incongruences between the clades recovered in the molecular phylogenetic analysis and the taxonomic limits established previously by intuitive assessment of morphological characters. Salazar et al. (2003) suggested that some floral attributes used by taxonomists to define the limits of some genera are directly involved in pollination, and that distantly related species may have a similar floral structure, as a result of adaptation to the same type of pollinator. In fact, a recent molecular phylogenetic study supported the idea of convergence in floral attributes by independent adaptation to hummingbird pollination, in different lineages of Spiranthinae (Salazar et al. 2011). Similar conclusions have been reached in phylogenetic studies of other lineages of Orchidaceae, including members of subfamily Orchidoideae such as *Platanthera* Rich. (Hapeman and Inoue, 1997) and *Satyrium* L. (van der Niet et al. 2011), as well as in some members of Epidendroideae Lindl., such as Oncidiinae Benth. (Chase and Palmer, 1997; Chase et al. 2009) and Pleurothallidinae Lindl. (Pridgeon et al. 2001).

Few studies have comparatively investigated the structure of the gynostemium in Spiranthinae. Rasmussen (1982) carried out a survey of gynostemium morphology and ontogeny of the “neottiid orchids”, a polyphyletic assemblage now known to include member’s subfamilies Vanilloideae Szlach. (*Lecanorchis* Bloom, *Vanilla* Plum. ex Mill.), “lower” Epidendroideae Lindl. (Gastrodieae Kostel., Neottieae Lindl., Nervilieae Dressler, Tropicdieae Dressler), and Orchidoideae (Cranichideae, Diurideae (Endl.) Lindl.) (Chase et al. 2003). The author presented brief descriptions of the gynostemium in post-anthesis of six

species belonging to six genera of Spiranthinae. On the other hand, Greenwood (1982) described the structure of the viscidium (the portion of the rostellum that produces viscid matter, which adheres the pollinarium to the pollinator) of representatives of ten genera of Spiranthinae.

Subsequently, Kurzweil (1988) conducted a comparative study of the flower development in the “neottioid” orchids, including one species each of *Cyclopogon* C.Presl and *Sarcoglottis* C.Presl (Spiranthinae), describing some ontogenetic stages of the gynostemium. Szlachetko and Rutkowski (2000) published general descriptions of the post-anthetic gynostemium of the 51 genera that they recognize in Spiranthinae. More recently, Figueroa et al. (2012) studied the floral morphology and the gynostemium development of *Dichromanthus michuacanus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas, providing the first detailed description of the gynostemium ontogeny for a member of the Spiranthinae subtribe.

A better understanding of the structure and development of floral organs would contribute to establish a firm ground for undertaking homology assessments and will enable the clarification of controversies regarding the nature of certain floral parts. For instance, Szlachetko and Rutkowski (2000) interpreted the usually pointed membranaceous appendages located at each side of the clinandrium (cavity near the apex of the gynostemium surrounding the base of the anther; Dressler, 1981) of many Spiranthinae, as staminodes. In contrast, some authors reported that these staminodes are missing in all development stages in Spiranthinae (Kurzweil, 1988, for *Cyclopogon* sp.; Figueroa et al. 2012 for *Dichromanthus michuacanus*). Furthermore, Szlachetko and Rutkowski (2000)

claimed that in most orchids the receptive surface of the stigma is formed by the lateral carpel apices. However, the few ontogenetic studies published so far suggest that stigma ontogeny is different in subtribe Spiranthinae (Rasmussen, 1982; Kurzweil 1988, 1998; Figueroa et al. 2012). However, further developmental studies are required to attain a better understanding of the nature of this origin and homology of these and other floral organs.

In this study, we conducted a comparative survey of gynostemium morphology and development in 12 species belonging to eight genera that represent three of the four major lineages of Spiranthinae recovered in recent molecular phylogenetic analyses of this subtribe, namely the clades of *Spiranthes* Rich. *Pelexia* Poit. ex Lindl., and *Stenorrhynchos* Rich. ex Spreng. (Salazar et al. 2003, 2011; Salazar and Ballesteros-Barrera, 2010; Batista et al. 2011; Salazar and Dressler, 2011; Salazar and Jost, 2012; Borba et al. in press). We also conducted a phylogenetic analysis of separate and combined morphological and molecular characters to provide a phylogenetic framework to interpret the evolution of the gynostemium. The aims of this study are to: 1) provide a detailed description of gynostemium structure and the ontogeny of representative species of the subtribe Spiranthinae; 2) explore possible evolutionary paths and the taxonomic value of morphological characters of the gynostemium, within the framework of an explicit phylogenetic hypothesis of the taxa analyzed; 3) evaluate competing ideas on the nature of some floral parts, including the clinandrium appendages, the receptive part of the stigma, and the rostellum/viscidium; 4) set up a comparative

framework for future studies of the flower and the gynostemium structure and evolution in Spiranthinae and the related groups in Cranichideae.

MATERIALS AND METHODS

Taxonomic sampling—Specimens of 14 species were sampling; 12 of them belong to eight genera of Spiranthinae that represent three of the four major lineages of the subtribe, as follows: 1) *Pelexia* clade: *Cyclopogon* (one species), *Sarcoglottis* C.Presl (two species); 2) *Spiranthes* clade: *Aulosepalum* Garay (one species), *Deiregyne* Schltr. (one species), *Dichromanthus* Garay (three species), *Kionophyton* Garay (one species), and *Mesadenus* Schltr. (one species); 3) *Stenorrhynchos* clade: *Sacoila* Raf. (one species) and *Stenorrhynchos* Rich. ex Spreng. (one species). Additionally, we analyzed two species of the subtribe Cranichidinae s.l. (Salazar et al. 2009), *Ponthieva racemosa* (Walter) C. Mohr. and *Prescottia plantaginea* Hook., as outgroups, following previous phylogenetic studies (Salazar et al. 2003, 2009; Figueroa et al. 2008; Álvarez-Molina & Cameron, 2009). In addition, we studied three of the four known species of *Dichromanthus* because the species of this monophyletic genus exhibit two different pollination syndromes (nectar-bee and hummingbird pollination) and interspecific variation in several floral characters, including gynostemium morphology (Salazar et al. 2011).

Plant material—Inflorescences at different stages of development were collected either directly in the field or from plants cultivated in a greenhouse in

Mexico City. A list of voucher specimens for the morphological and developmental observations is provided in Appendix 1. The material was fixed in FAA (5 % formalin, 5 % acetic acid, 50 % ethanol; Sass, 1958) for at least 24 h.

Subsequently it was rinsed in water and stored in ethanol 50 %.

Morphological observations—Fresh flowers at anthesis were dissected and photographed directly with a digital camera provided by a macro lens (Nikon D80) or under a stereomicroscope (Stemi SV 6, Carl Zeiss) with a digital camera (Coolpix 5200, Nikon). Additionally, specimens were analyzing for add vegetative characters.

Scanning electron microscopy—Inflorescences were dissected excising the floral bracts, in order to observe the early stages of development. The sepals and petals of the flower buds in later stages of development were removed to enable the observation of the gynostemium. Samples were dehydrated in an ethanol series from 50 % to 100 % in increases of 10 %, being immersed in each concentration for at least 48 h; then the samples were critical point-dried, coated with gold and examined in a scanning electron microscope (Hitachi S-2460 N, Tokyo, Japan) operating at 15 kV. Micrographs were taken with a camera (Pentax Z10, Japan) using 35-mm Kodak 100 TMAX film and the negatives were subsequently digitized using a scanner (Nikon Super Coolscan 5000, Tokyo, Japan).

Light microscopy—Floral buds were prepared by conventional dehydration using isopropyl alcohol and subsequently they were embedded in paraffin. Transverse and longitudinal sections (10 μ m thick) were cut using a microtome

(American Optical Company 820, New York, USA), stained with safranin and fast green, and mounted in synthetic resin. The permanent slides were examined using a light microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan) and photographed with a digital camera (Evolution LC Color digital, Maryland, USA).

Phylogenetic analyses—We generated explicit phylogenetic hypotheses for the species studied conducting separate and combined cladistic parsimony analyses of a molecular data set (plastid *trnL-trnF* and nuclear ITS regions); plus a morphological set that resulted from vegetative, floral, anatomical, and ontogenetic studies (Appendix 2 and 3).

The analyses were carried out using the computer program PAUP*, version 4.02b10 for Macintosh (Swofford, 2002). All analyses consisted of branch and bound searches, with all characters treated as unordered and equally weighted (Fitch, 1971), and with simple addition sequence. Clade support was evaluated by means of 1000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985) each consisting of a branch and bound search with addition sequence simple, and all characters were unordered and have equal weight.

Structural character optimization— Changes in the morphological characters of interest were analyzed by examining their optimization on the one of six most-parsimonious trees (MPTs) that resulted from the combined analysis using the program Mesquite version 2.75 (Maddison and Maddison, 2011), using the option trace character history because it displays the reconstructed ancestral states at each node on a tree, by an unordered parsimony, and calculates the most parsimonious ancestral states at the nodes of the tree, assuming one step per

state change (this assumption is known as unordered or Fitch parsimony). We choose the reconstruction that included the majority of the consistent clades (those showed in the results of separate and combined analyses). We choose five characters: presence or absence of staminodes and origin of receptive stigmatic area because have been historically controversial, order of organogenesis because are the contributions in this work and rostellum remnant and the mechanism of rupture because have been using repeatedly in taxonomy of the subtribe *Spiranthinae*.

RESULTS

Gynostemium morphology in post-anthesis—The gynostemium in all the species examined is erect, straight or sometimes slightly arcuate (in *Aulosepalum pyramidale* (Lindl.) M.A.Dix & M.W.Dix and *Deiregyne albovaginata* (C.Schweinf.) Garay), predominantly cream-white or green or less commonly yellow, orange, or pink (*Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus*, *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay and *Stenorrhynchos glicensteinii* Christenson), and usually bearing indumentum on the ventral surface (Fig. 1 A-C). The columnar part of the gynostemium (i.e, the main body of the column below the stigma, rostellum, and anther) usually has a ventral extension at the base (“column foot”; e.g. Dressler, 1993; Fig. 1 B, D) that in *Sacoila* and *Sarcoglottis* comprises over one-half of the total length of the gynostemium, but in the rest of the taxa is shorter, and it is absent in *Ponthieva racemosa*. In some species (*Aulosepalum pyramidale*, *Deiregyne albovaginata*, *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus*, and

Prescottia plantaginea) there is a membranaceous appendage at each side of the stigma, named for us clinandrium appendages (ca), which is missing in the rest of the species (Fig. 1 A, C, J). The anther is dorsal, erect, parallel and subequal or sometimes overgrows to the rostellum (*Mesadenus*), two-celled, and its base is lodged in the clinandrium (Fig. 1 C). The pollinarium consists of two deeply cleft pollinia joined to form a common viscidium (Fig. 1 E, H). The rostellum constitutes the apical part of the ventral surface of the gynostemium (above the stigma) and its distal portion constitutes the viscidium (Figs. 2 I, 3 H, 4 H, 5 G, 6 J), which usually is attached to the apices of the pollinia, except in *Mesadenus lucayanus*, in which it is placed around the middle of the ventral surface of the pollinium (Fig. 5 I). The shape of the rostellum is variable, being ovate in *Aulosepalum pyramidale* (Fig. 2 J), sub-rectangular in *Cyclopogon luteoalbus* (Fig. 3 G), oblong-triangular in *Sarcoglottis* (Fig. 7 O), triangular in *Deiregyne albovaginata* (4 I), sublinear in *Dichromanthus*, *Sacoila*, and *Stenorrhynchos* (Fig. 7 C, H), oval in *Kionophyton sawyeri* (Fig. 7 K) and *Mesadenus lucayanus* (Fig. 5 I), and finger-shaped in *Ponthieva racemosa*. The viscidium of the species of Spiranthinae and in *Prescottia plantaginea* is tegular (constituted by epidermal straps from the rostellum), whereas, in *Ponthieva racemosa* it is hamular (hamulus is the recurved apical part of rostellum formed by apical growth) (Rasmussen, 1986). The examined species of *Cyclopogon* and *Sarcoglottis* have wedge type viscidia, characterized by having the adhesive portion located on the dorsal surface and the pollinia laterally attached (Fig. 1 H-I), whereas, the rest of the species of Spiranthinae have cushion type viscidia, with a ventral adhesive surface and the

pollinia attached dorsally (Greenwood, 1982; Fig. 1 F-G). After removal of the pollinarium, what remains is the rostellum remnant. It is variable, being distinctly pointed in *Dichromanthus aurantiacus*, *D. michuacanus*, *Sacoila* and *Stenorrhynchos* (Fig. 1 J), truncate in *Sarcoglottis*, tridentate in *Deiregyne albovaginata* (Fig. 4 J, K), apiculate in *Mesadenus lucayanus* (Fig. 5 J) or missing in *Aulosepalum pyramidale* (Fig. 1 L). The rostellum remnant also varies in its consistency, being thick and fleshy (e.g. *Sarcoglottis* Fig. 1 I), membranaceous (*Dichromanthus cinnabarinus*, *Mesadenus*; Fig. 1 K, 5 J), or stiff (*Dichromanthus aurantiacus*, *D. michuacanus* and *Stenorrhynchos*; Fig. 1 J) (see in Appendix 2). The stigma is ventral, generally orbicular-elliptic, more or less flat (Fig. 1 J), and rarely with prominent lower margin (*Sacoila lanceolata*, *Dichromanthus michuacanus*).

Flower and gynostemium development— Early floral organogenesis is similar in the 14 species. There are only slight differences in the anther initiation order and the dorsal sepal (see below). Development initiates with a floral primordium located at the axil of the floral bract. Initially the floral primordium is a transversely elliptic prominence, which then develops a transverse depression due to the proliferation of the peripheral tissue (Figs. 2-6 A, B). Organ differentiation follows an adaxial-abaxial direction: the lateral sepals are the first organs to appear, followed by the primordium of the labellum (median petal) and then the others lateral petals (Figs. 2-6 C, D). In *Aulosepalum pyramidale*, *Deiregyne albovaginata*, the three species of *Dichromanthus*, and *Mesadenus lucayanus*, the anther primordium develops after the appearance of the petals primordia and the

dorsal sepal is the last organ to differentiate (Figs. 2 D, E; 4 C, D; 5 C, D). In *Cyclopogon luteoalbus* and *Stenorrhynchos glicensteinii* the dorsal sepal differentiates before the anther (Fig. 3 C, D) and the same occurs in *Prescottia plantaginea* (see Kurzweil, 1988). In the two species of *Sarcoglottis* examined, the anther appears to develop earlier than the dorsal sepal, but since the differentiation of the inflorescence occurs very fast (almost simultaneously), it was not possible to obtain flower buds at the appropriate stage of development, in order to verify this, therefore further observations are required to corroborate the order of differentiation of those organs in *Sarcoglottis* (Fig. 6 C, D). Two of the species, *Kionophyton sawyeri* and *Sacoila lanceolata* were only observed at relatively late stages of development and we could not determine whether the anther or the dorsal sepal develops first. The perianth segments subsequently get their laminar shape due to periclinal and anticlinal cell divisions and the anther rapidly increases its size and soon the thecae start to differentiate (Figs. 2 F, 3 D, 4 D, 5 E).

Anther initiation is followed by the emergence of the median carpel apex, which is located between the anther and the labellum (Figs. 2 G, 3 E, 4 E, 5 F, 6 E). The median carpel emerges as a rounded bulge on the ventral side of the anther primordium and quickly elongates to the point that it almost equals the length of the anther (Figs. 2 G-J, 3 E-G, 4 E-I, 6 E-J), except in *Mesadenus lucayanus*, in which the median carpel stops elongating when it has reached about one-half of the length of the anther (Figs. 5 F-H). As the median carpel apex elongates, the lateral carpel apices emerge as two, congenitally united, crescent-shaped prominences located ventrally at its base (Figs. 2 G, 3 E, 4 E, 5 F, 6 E).

Such prominences form a rim at the proximal (basalmost) margin of the mature stigma (Figs. 7 B, F, J, N, R). The median carpel apex gives rise to both, the receptive surface of the stigma and the rostellum (Figs. 7 D, H, L, P, T).

Approximately at the time the lateral carpel apices merge with one another to form the basal stigma margin, the viscidium starts to differentiate from the apical portion of the rostellum (Figs. 7 B, F, J, N, R). Viscidium differentiation involves an increase in protoplast density and, sometimes, changes in the cellular organization/orientation. During this stage the surface of the rostellum acquires a distinctive grayish coloration (in contrast with the whitish coloration of the rest of the developing gynostemium at that time; Fig. 1 A, I; 8 E, I). In most of the studied species there are tangentially elongated cells on the ventral surface, but in some species (*Aulosepalum pyramidale*, *Mesadenus lucayanus*) the cells remain isodiametric throughout the entire development process.

At the same time the viscidium starts to differentiate, the differentiation of the stigma also begins. It is recognized by the development of papillae on the proximal part of the median carpel apex (i.e. excluding the rostellum; Fig. 8 C, F). In some species, the rim of tissue derived from the fusion of the lateral carpel apices usually lacks papillae and thus the receptive surface of the stigma is derived exclusively from the proximal portion of the median carpel apex (for example, in *Aulosepalum pyramidale*, *Cyclopogon luteoalbus*, *Deiregyne albovaginata*, *Dichromanthus* spp., and *Sarcoglottis* spp.) (Fig. 8 C). However, in *Mesadenus lucayanus*, *Kionophyton sawyeri*, *Sacoila lanceolata*, and *Stenorrhynchos glicensteinii*, as well as in both *Ponthieva racemosa* and *Prescottia plantaginea*

(Cranichidinae), the lower stigmatic rim has papillae. In these cases, it seems that the three carpel apices participate in the receptive surface of the stigma (Fig. 8 F, longitudinal section, stigmatic inferior portion of stigma shows the fused lateral carpels apices). The stigmatic papillae reach their maximum size as anthesis approaches, and the stigmatic area develops a viscous film secreted by the papillae, which gives a shiny appearance to the mature wet stigma (Fig. 1 I, J, L).

After the rostellum, viscidium, and stigma have differentiated, the columnar part of the gynostemium starts elongating by intercalary growth of the tissue located between the base of the anther and the carpel apices. The length of the columnar elongation is variable, depending on the species (Figs. 2 L, 3 G, 4 I, 5 I, 6 L, N).

Only in *Prescottia plantaginea* we observed staminodial appendages, which are visible as small bulges (Fig. 16 A, B). The remaining species examined lack staminodes. Instead, the membranaceous appendages located at each side of the stigma in some of the species of Spiranthinae seem to be merely extensions of the clinandrium.

The perianth segments and the gynostemium reach their final size, shape, and indumentum just before anthesis. Allometric growth generates the differences in size and proportions among the gynostemias of the distinct species (Fig. 7).

At anthesis, the viscidia of all species included in this study have a rupture zone which originates from the degeneration parenchymatic cell. This rupture zone facilitates the separation of the viscidium from the rest of the rostellum when occur the pollination (Fig. 8 G-I). The morphology of the rupture zone is variable among

genera and, in some cases, among species of the same genus. In *Dichromanthus cinnabarinus* forms pouch or cavity (Fig. 9 C), whereas, in *D. michuacanus* and *D. aurantiacus* forms a sheath that surrounds the vasculature bundles. When removal of the pollinarium occurs the stiff, pointed rostellum remnant shows up. A similar, rupture zone is present in *Sacoila* and *Stenorrhynchos* (Fig. 9 A; see also Salazar et al., 2011). In *Aulosepalum pyramidale* the rostellum and viscidium are totally removed either the pollinarium and consequently, the rupture zone is transverse and broadly U-shaped (Fig. 9 D).

Similarly, in *Prescottia plantaginea* the whole minute rostellum is also completely removed with the pollinarium and therefore, a rostellar remnant is lacking. *Sarcoglottis* and *Cyclopogon* also have a transverse rupture zone, but in these species a most of the rostellum remains after the pollinarium is removed (Fig. 1 I). On the other hand, in *Deiregyne albovaginata*, *Mesadenus lucayanus*, and *Kionophyton sawyeri* the rupture zone is ventral, so it is located parallel to the rostellum (Fig. 8 I). These different species that shared this condition show two variants of the rostellum remnant: 1) tridentate (*Deiregyne albovaginata*; Fig. 4 J, K); 2) apiculate (*Mesadenus lucayanus* and *Kionophyton sawyeri*; Fig. 5 J).

Phylogenetic analysis— The morphological matrix comprised 30 characters, 20 were potentially parsimony informative. The analysis found two most parsimonious trees (MPTs) with a length of 63 steps, a consistency index (CI) of 0.71, and a retention index (RI) of 0.72. Fig. 10 shows the strict consensus of two trees, on which the bootstrap support of the clades is shown. This tree is

different with respect to the remaining trees based on DNA or combined characters. The members of Spiranthinae form a weakly supported clade (BP 64) and include a polytomy formed by *Dichromanthus* (three species), *Sacoila lanceolata* and *Stenorrhynchos glicensteinii* (with low support, BP 68). Moreover, *Kionophyton sawyeri* and *Mesadenus lucayanus* form a weakly supported clade (BP 73). Only one clade is supported by high bootstrap percentages (two *Sarcoglottis*, BP 94). Finally, three species were unresolved (*Cyclopogon luteoalbus*, *Aulosepalum pyramidale* and *Deiregyne albovaginata*).

The ITS region included 672 aligned positions, of which 115 were potentially parsimony informative. The analysis showed two MPTs with a length of 386 steps, CI of 0.74 and RI of 0.67. Fig. 11 shows the strict consensus of the two trees, indicating the bootstrap percentages (> 50) of the clades. The region ITS produced more resolution and better supported groups than the morphological data.

Spiranthinae was resolved as monophyletic with a strong support (BP 100). In addition, a weakly supported clade formed by *Sacoila lanceolata* – *Stenorrhynchos glicensteinii* as sister to a subclade with *Sarcoglottis assurgens*/*S. schaffneri* (BP 65), can be seen, as well as a strongly supported *Spiranthes* clade (BP 97), including *Aulosepalum pyramidale* to *Dichromanthus cinnabarinus* plus the three species of *Dichromanthus* form a strongly supported polytomy (BP 92).

The *trnL-trnF* region comprised 1249 aligned positions, of which 82 were potentially parsimony- informative. The analysis found three MPTs, with a length of 273 steps CI of 0.81, RI of 0.77. The strict consensus of the three trees is shown in Fig. 12. This region produced similar relationships as ITS, but slightly less resolved

because Spiranthinae formed a strongly supported trichotomy (BP 98). The first of these clades was weakly supported and includes *Sacoila lanceolata* and *Stenorrhynchos glicensteinii* (BP 69) as sister genus. The second was strongly supported (BP 99) and included *Cyclopogon luteoalbus* and *Sarcoglottis assurgens*/*S. schaffneri* (BP 100) as sister genus. The third corresponds to the strongly supported *Spiranthes* clade (BP 100), including from *Aulosepalum pyramidale* to *Dichromanthus michuacanus*. The relationship between *Mesadenus lucayanus* and *Kionophyton sawyeri* to other members of that clade was not resolved. In this case, the relationships in *Dichromanthus* were resolved (BP 91), where *D. cinnabarinus* was sister to *D. michuacanus*/*D. aurantiacus* (BP 74).

The combined analysis of the two regions DNA (ITS and *trnL-trnF*), included 1921 characters, of which 197 were potentially parsimony- informative. The analysis produced a single MPT 660 steps long, CI of 0.77 and RI of 0.71; MPT, with bootstrap percentages is shown in Fig. 13. Spiranthinae are resolved as monophyletic (BP 100), comprising two principal clades one of their including the *Pelexia* and *Stenorrhynchos* clades as sisters to one another, and the other corresponding to the *Spiranthes* clade. In general, these regions produced higher resolution and better branch support, than the separated analyses, except in that for the clade of *Sacoila lanceolata*/*Stenorrhynchos glicensteinii*, which were a sister clade to *Cyclopogon luteoalbus*/*Sarcoglottis assurgens*-*S. schaffneri* (BP 65), and *Kionophyton sawyeri*/*Deiregyne albovaginata*/*Dichromanthus* (BP 51) had weakly support of branches. The strongly supported *Spiranthes* clade (BP 100) includes from *Aulosepalum pyramidale* to *Dichromanthus michuacanus*. Similar to

trnL-trnF analysis, *Dichromanthus* was resolved; *D. cinnabarinus* was sister with *D. aurantiacus/D. michuacanus*.

The combined analysis of ITS, *trnL-trnF* and the morphological characters comprised 1951 characters, where 217 potentially parsimony- informative. The analysis found six MPTs 733 steps long, CI of 0.75 and RI of 0.69. One of the six most parsimonious trees and the consensus tree are shown in Figs. 14 and 14.1, respectively. The topology of these trees was similar to that of the combined DNA analysis (Fig.13), although the support of some branches was greater (generally BP 100), and the relation between *Stenorrhynchos* and *Pelexia* clade received low support (BP 55). The difference of this tree with respect to the consensus tree was that *Mesadenus lucayanus* was not allied to *Kionophyton sawyeri*.

Structural character optimization— The optimization of five morphological characters is shown in figures 15 to 19, organogenesis order, presence or absence of staminodes, origin of stigmatic area, shape of rostellum remnant and viscidium rupture zone.

The most parsimonious reconstruction of organogenesis order points to a unique origin of the unusual order of differentiation (i.e the anther developing prior to the dorsal sepal) in the most recent common ancestor of the *Spiranthes* clade. The typical order is present in the outgroups and the *Stenorrhynchos/Pelexia* clades, in which the perianth organs were differentiated first than the anther.

Staminodes only were present in *Prescottia plantaginea* but too reduced and late initiation. The absence of staminodes in *Spiranthinae* subtribe appears to

plesiomorphic; and their presence seems to be autapomorphy of *P. plantaginea* (Fig. 16 A, B).

The optimization points out that the stigma constituted by the base of median carpel evolved three times in Spiranthinae *Pelexia* clade, *Spiranthes* clade: in *Aulosepalum pyramidale* and *Deiregyne albovaginata* to *Dichromanthus aurantiacus*, (Fig. 17).

The optimization of the rostellum remnant indicated much variation in the shape. The pointed rostellum remnant evolved two times in parallel (*Dichromanthus aurantiacus*/*D. michuacanus* and *Sacoila lanceolata*/*Stenorrhynchos glicensteinii*). A truncate rostellum remnant is present in the species of *Pelexia* clade included here (Fig. 18). Rostellum remnant absent, tridentate and pouch like are apomorphics for *Aulosepalum pyramidale*, *Deiregyne albovaginata* and *Dichromanthus cinnabarinus*, respectively. The rupture zone shows large variation, the transverse rupture zone could be plesiomorphic attribute and other rupture mechanisms are apomorphic characters.

DISCUSSION

Early development— In general, the organogenesis in the 14 species analyzed (12 of subtribe Spiranthinae and 2 of Cranichidinae) was similar, coinciding with the data formerly described for the majority of orchids and other members of the subtribe Spiranthinae, like *Cyclopogon* sp. and *Sarcoglottis* sp. (Kurzweil, 1988, 1998). The common order of floral organ appearance in Orchidaceae (Kurzweil, 1988, 1998) occurs chronologically in the follow sequence:

lateral sepals, labellum, lateral petals, dorsal sepal, anther, median carpel and lateral carpels. This sequence was confirmed for four of the studied species (*Cyclopogon luteoalbus*, *Ponthieva racemosa*, *Prescottia plantaginea* and *Stenorrhynchos glicensteinii*). However, in six species (*Aulosepalum pyramidale*, *Deiregyne albovaginata*, *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus*, *D. michuacanus* and *Mesadenus lucayanus*), it was found that the anther differentiates before than dorsal sepal and remains prominent throughout the whole ontogeny. This kind of which has not been previously reported in the subtribe Spiranthinae, but it has been found in *Dactylorhiza maculata* (subtribe Orchidinae) by Kurzweil (1987b). In the species of *Sarcoglottis assurgens* and *S. schaffneri*, studied by us, it was not possible to determine the order of differentiation of the anther with respect to the dorsal sepal, because of the lack of available material in the adequate phases, since the flowers develop nearly simultaneously. However, we were able to observe that anther's primordium is larger than the dorsal sepal (Fig. 6 C).

Although the implications of this minor developmental change on floral morphology are not clear yet, there are references that mention that the delay or acceleration on the time of differentiation of the organs, could explain variations on the perianth symmetry (Endress, 1999; Pabón and González, 2008). Consequently in this study, it seems that these differences can also enable to explain the morphological differences among gynostemata.

In Spiranthinae like in other orchids, the order of differentiation of the organs is directional. In other words, the organs development starts adaxially and thus

abaxially. Such directionality is related to the acquisition and maintenance of the zigomorphy (Endress, 1990, 1994, 1999). The development of the anther prior to the dorsal sepal in some Spiranthinae species enhances the degree of directionality because the position of anther is adaxial. In Spiranthinae, the zygomorphy starts with the transversely elliptical floral primordium, as to other monandrous orchids (one fertile anther). This development is different in the subfamilies Apostasioideae (Kocyan and Endress, 2001) and Cyripedioideae (Kurzweil, 1993), in which the floral primordia have a rounded shape.

Gynostemia development— The gynostemium ontogeny of the species included in this work coincides with previous reports of other tribe Cranichideae species, such as, *Goodyera repens* (L) R. Br., *Ludisia discolor* (Ker Gawl.) Blume (Goodyerinae; Rasmussen, 1982), *Ponthieva parvilabris* (Lindl.) Reichb. f., (Rasmussen, 1982), *Prescottia plantaginea* (Cranichidinae; Kurzweil, 1988), *Sarcoglottis* sp. and *Cyclopogon* sp. (Spiranthinae; Kurzweil, 1988). In all these taxa, the first organ that differentiates is the anther, followed by the median carpel and concludes with the differentiation of the lateral carpels apex.

On the other hand, in Spiranthinae, the median carpel initiates earlier than the lateral ones and it is prominent and specialized, because it gives rise to the stigma at its base and the rostellum at its apex. On the other hand, the lateral carpels sometimes can contribute to form the stigma receptive surface, although frequently only constitute a rim of tissue at the base of stigma, which agrees with previous reports by Kurzweil (1998). The gynostemium column and column foot

develops at the last stage of its ontogeny. Also in this subtribe, the gynostemium remains straight until the anthesis, contrasting with other orchid groups such as Epidendroideae, in which the column curves and an inflexion of the anther (Kurzweil, 1987a). The last step in flower development of Spiranthinae is the resupination (change of the flower orientation due to the twisting of pedicellum and ovarium), placing the labellum in an abaxial position, as opposed to its original adaxial location.

The ontogeny of some of the parts that constitute the gynostemium, particularly those of controversial origin, mainly staminodes and stigma are discussed. Also, the discussion is focused in the rostellum for its high variation and because traditionally has been used in Spiranthinae taxonomy.

Staminodes— We found evidence of staminodes only in *Prescottia plantaginea* (subtribe Cranichidinae). The staminodes of *Prescottia* occurred late, after the median carpel has differentiated, in comparison to other orchids (e. g. *Caleana major* R. Br., *Orthoceras strictum* R. Br., *Prasophyllum fimbriatum* R. Br., and *Diuris longifolia* R. Br.), in which the staminodes arise in early stages of the floral development, when the median carpel its starts to differentiate (Kurzweil, 1998). Subsequently, these staminodes of *Prescottia* form a pair of small appendages at the sides of the stigma.

Some authors (Szlachetko and Rutkowski, 2000; Szlachetko et al. 2005; Rutkowski et al. 2008) had postulated that the clinandrium and the appendages of gynostemium of Spiranthinae are staminodes. Nevertheless, our data do not

support this statement because during the floral development we did not find neither prominences lateral to the anther nor vestigial vascular bundles, which would support the staminoid origin of these structures (Wilson, 1982).

Stigma structure – Our results showed that the stigma in Spiranthinae is constituted either by the three carpels or by the base of median carpel apex only. The most common stigma origin in orchids is from the three carpels (Endress, 1994). Noticeably, in the subfamily Orchidoideae, in which the tribe Cranichideae and subtribe Spiranthinae, belongs, shows the greatest variation in the stigma origin (Kurzweil, 1998). Indeed, in the Disaeae tribe the origin of the stigma has been reported in three variations: a) by the median carpel (*Huttonaea pulchra*: Kurzweil, 1989; Coryciinae subtribe: Kurzweil, 1991; *Brownleea coerulea* and *B. maculata* of the Disinae subtribe: Linder and Kurzweil, 1995); b) by the lateral carpels only (Satyriinae subtribe: Kurzweil, 1996); or c) by the three carpel apices (*Brownleea parviflora*, *Disa* spp. *Monadenia* spp. and *Schizodium bifidum*: Kurzweil, 1990 and Kurzweil, 1998).

On the other hand, the stigmas of many genera of Spiranthinae formerly reported are three-carpelar (*Spiranthes* sp., *Eurystyles* sp., *Pelexia* sp, and *Lankesterella* sp., Rasmussen, 1982), while the median carpel constitutes the greater portion of the stigma (*Cyclopogon* sp. *Sarcoglottis* sp., Kurzweil, 1988 and 1998).

Szlachetko and Rutkowski (2000) stated that the receptive area of the stigma of various genera of Spiranthinae (*Gracielanthus*= *Aulosepalum*,

Greenwoodia=Kionophyton, Stenorrhynchos, Cyclopogon, Sarcoglottis) is formed by the apices of the lateral carpels, whereas, the median carpel is not receptive and constitutes the complete rostellum. In contrast, our observations demonstrate that the stigmas of many of these genera originate only from median carpel apex (*Aulosepalum, Cyclopogon, Deiregyne* and *Sarcoglottis*), supporting the interpretation of Kurzweil (1988). Szlachetko et al. (1995, 2000, 2005, 2008) based their interpretations on comparison of anthetic gynostemium without anatomical or ontogenetic studies. Also, authors adopted a concept which considers the rostellum as equivalent to the median carpel apex (Darwin, 1862; Rasmussen, 1982), which is contrary to the original definition of Richard (1817) and subsequently Kurzweil (1987 a), whom considered the rostellum as the receptive portion of the median carpel apex, the interpretation follow in this work and corroborated by our observations.

Equating rostellum with the median carpel apex might be correct for some orchids that have two separate receptive zones, which originate from the lateral carpels apices (some species of *Habenaria* and *Bonatea*, Orchidinae; Kurzweil, 1987 b, 1998). In tribe Cranichideae, sometimes there are two receptive zones partially or completely separate (e.g. *Discyphus scopulariae* (Rchb. f.) Schltr.). Due to this fact, Rutkowski et al. (2008) assumed that these receptive zones represent the lateral carpels. In contrast, our results show that the receptive portions of the stigma originate from the base of median carpel apex and are secondarily separate by sterile tissue (Kurzweil, 1988; Rasmussen, 1982). Particularly, in *Sarcoglottis*

assurgens, two receptive zones were found, partially separated by a central non receptive tissue derived from the lateral carpels (Fig. 6).

The anatomical traits of the stigma in the species studied here are similar to those described by Dannenbaum et al. (1989) as type IIA for several species of Spiranthinae, which consist in a wet stigma, with convex surface and finger-shaped papillae.

Rostellum, viscidium and rostellum remnant– The more variable morphological traits of gynostemium in the studied species were observed at the rostellum level (viscidium and rostellum remnant), fact that has been demonstrated previously in Spiranthinae and other orchid groups (Spiranthinae: Greenwood, 1982; tribes Neottieae, Diurideae, Epipogieae, Cranichideae and Gastrodieae: Rasmussen, 1982; genus *Satyrium* spp.: Van der Niet et al. 2011). The morphologic variation of the rostellum has been partially attributed, to its adaptation to different pollinator where the pollinarium will be adhered. It has been demonstrated that the rostellum morphology determines the part of the pollinator's body where the pollinarium will be adhered (Johnson, 1997; van der Niet et al. 2011).

In Spiranthinae the viscidia show ventral adhesive surface and are dorsally adhered to the pollinia (cushion- type, Greenwood, 1982). In addition, there are other viscidia with dorsal adhesive surfaces and adhered laterally to the pollinia (wedge- type; Greenwood, 1982). The cushions- type viscidia are morphologically

more variable than the wedge- type, especially in the way its detachment occurs, and consequently, the shape and consistency of the rostellum remnant is also so.

This great variation of rostellum remnant documented here, suggests the need to re-examine major number of species to clarify the taxonomic importance and evolutionary trends of this character in Spiranthinae. Also, the rupture zone of rostellum shows high variation, similar to shape of rostellum remnant; but, one difference is that the ventral rupture zone gives rise to two different shapes of rostellum remnant: tridentate and apiculate. The transverse detachment mechanism rupture can give rise to a truncate rostellum remnant or the total rostellum is completely detached. This mechanism could be simplesiomorphic in subtribe Spiranthinae (Fig. 19).

The type of tissues detected in the viscidia of the different species included in this work, coincide with those previously report for *Spiranthes spiralis* (Rasmussen, 1982). In *Spiranthes*, three different tissues were reported: 1) parenchymatic enlarged cells, which contain a viscous adhesive substance in the abaxial surface of viscidium; 2) sclerenchymatic cells in the adaxial surface and 3) epidermis with large cells. Nevertheless, in this study the three cellular types were not always present. In *Aulosepalum pyramidale* and *Mesadenus lucayanus* the viscidium is composed of parenchymatic isodiametric cells, throughout their development. The adhesive cells only change their consistency due to the density of protoplast increment. However, in the remaining species the viscidia has parenchymatic, adhesive, elongated cells at their ventral portion and collenchyma in the rostellum remnant (*Deiregyne* and *Kionophyton*) or vascular bundles. In

particular, in *Dichromanthus aurantiacus*, *Stenorrhynchos glicensteinii* and *Sacoila lanceolata*, the stiff and pointed rostellum remnant had vascular bundles.

Phylogenetic considerations— The trees obtained by the different molecular characters (ITS, *trnL-trnF*) and those combining DNA and morphological characters were in concordance with previous studies based on DNA traits (Górniak et al. 2006; Figueroa et al. 2008; Salazar et al. 2003, 2009, 2011). Firstly, Spiranthinae was recovered as monophyletic. In the second place, the principal clades (*Spiranthes*, *Pelexia* and *Stenorrhynchos*) were recovered with strongly support. In contrast, the morphological tree is discrepant to our molecular trees and to the results of other molecular phylogenetic analyses (Salazar et al. 2003, 2009, 2011). In general terms, the morphological data have a low resolution and their branches are weakly supported. Moreover, the alliance among *Dichromanthus*, *Stenorrhynchos*, and *Sacoila* could be explained as a convergence of the same pollination syndrome by birds (Salazar, 2003; Salazar et al. 2011).

Furthermore, the inter-generic relationships obtained by Szlachek et al (1995, 2000, 2008) were wholly different with respect to our results. For example, *Stenorrhynchos aurantiacus* (as *Dichromanthus aurantiacus*), *S. michuacanus* (as *Dichromanthus michuacanus*) and *Burnsbaloghia* (as *Deiregyne*) with *Stenorrhynchos s.l.* form a group due to their pointed rostellum remnant. However, the results based on DNA showed that those genera are distantly related. Our results of character optimization indicated that the pointed rostellum remnant has

evolved three times in different clades (*Dichromanthus*: *Spiranthes* clade and *Stenorrhynchos/Sacoila*: *Stenorrhynchos* clade; Fig. 18).

Although, the rostellum characters have been used for segregation taxa, its variability is so high that it does not help to do so; for example, in *Dichromanthus cinnabarinus* proposed as monotypic genus by tubular rostellum remnant (Garay, 1982; Balogh, 1982). Although, DNA studies have been useful for clarifying the taxonomic confusion, because repeatedly show the alliance among the four existing species of *Dichromanthus* (*D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus*, *D. michuacanus*, and *D. yucundaa*).

LITERATURE CITED

- ÁLVAREZ-MOLINA, A., AND K. M. CAMERON. 2009. Molecular phylogenetics of Prescottiinae s.l. and their close allies (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear ribosomal DNA sequences. *American Journal of Botany* 96: 1020–1040.
- BALOGH, P. 1982. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119–1132.
- BATISTA, J. A. N., T. E. C. MENEGUZZO, G. A. SALAZAR, L. DE B. BIANCHETTI., AND A. J. RAMALHO. 2011. Phylogenetic placement, taxonomic revision and a new species of *Nothostele* (Orchidaceae) an enigmatic genus endemic to the cerrado of central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 348–363.
- CHASE, M. W., AND J. D. PALMER. 1997. Leapfrog radiation in floral and vegetative traits among twig epiphytes in the orchid subtribe Oncidiinae. In TJ Givnish, KJ Systema [eds.], *Molecular evolution and adaptive radiation*, 331–352. Cambridge University Press, Cambridge.
- K. M. CAMERON, R. L. BARRET., AND J. V. FREUDENSTEIN. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. In KW Dixo, SP Kell, RL Barrett, PJ Cribb (Eds.). *Orchid Conservation*, 69–89. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah.
- N. H. WILLIAMS, A. DONISETE DE FARIA, K. M. NEUBIG, M. DO C. E. AMARAL., AND W. M. WHITTEN. 2009. Floral convergence in Oncidiinae

(Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany* 104: 387–402.

DANNENBAUM, C., M. WOLTER., AND R. SCHILL. 1989. Stigma morphology of the orchids. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 110: 441–460.

DARWIN, C. 1862. The various contrivances by which orchids are fertilized by insects. 2nd ed. John Murray, London.

DRESSLER, R. L. 1981. The orchids: Natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.

— 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.

ENDRESS, P. K. 1990. Patterns of floral construction in ontogeny and phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society* 39: 153–175.

— 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press. Cambridge.

— 1999. Symmetry in flowers: diversity and evolution. *International Journal of Plant Science* 160: S3–S23.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

FIGUEROA, C., G. A. SALAZAR, A. ZAVALETA., AND M. ENGLEMAN. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101: 509–520.

- G. A. SALAZAR, T. TERRAZAS., AND P. DÁVILA. 2012. Estructura y desarrollo del ginostemio en *Dichromanthus michuacanus* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 73–82.
- FITCH, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406–416.
- GARAY, L. A. 1982. A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 28: 277–425.
- GÓRNIAK, M., J. MYTNIK-EJSMONT, P. RUTKOWSKI, P. TUKAHO, J. MINASEWICS., AND D. SZLACHETKO. 2006. Phylogenetic relationships within the subtribe Spiranthinae s.l. (Orchidaceae) inferred from the nuclear ITS region. *Biodiversity Research and Conservation* 1-2: 18–24.
- GREENWOOD, E. W. 1982. Tipos de viscidio en Spiranthinae. *Orquídea* 8: 283–290.
- HAPEMAN, J. R., AND K. INOUE. 1997. Plant–pollinator interactions and floral radiation in *Platanthera* (Orchidaceae). In TJ Givnish, KJ Systma [eds.], *Molecular evolution and adaptive radiation*, 433–454. Cambridge University Press, Cambridge.
- KURZWEIL, H. 1987a. Developmental studies in orchid flowers I: epidendroid and vandoid species. *Nordic Journal of Botany* 7: 427–442.
- 1987b. Developmental studies in orchid flowers II: orchidoid species. *Nordic Journal of Botany* 7: 443–451.
- 1988. Developmental studies in orchid flowers III: Neottioid species. *Nordic Journal of Botany* 4: 1–5.
- 1989. Floral morphology and ontogeny in *Huttonaea pulchra*. *Lindleyana* 4: 1–5.

- 1990. Floral morphology and ontogeny in Orchidaceae subtribe Disinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 102: 61–83.
- 1991. The unusual structure of the gynostemium of the Orchidaceae–Coryciinae. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 112: 273–293.
- 1993. Developmental studies in orchid flowers IV: Cypripedioid species. *Nordic Journal of Botany* 13: 423–440.
- 1996. Floral morphology and ontogeny in Satyriinae (Orchidaceae). *Flora* 191: 9–28.
- 1998. Floral ontogeny of orchids: a review. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 71: 45–100.
- LINDER, H. P., AND H. KURZWEIL. 1995. Ontogeny and phylogeny of *Brownleea* (Orchidoideae: Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 16: 345–357.
- MADDISON, W. P., AND D. R. MADDISON. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>
- PABÓN, M. N., AND F. GONZÁLEZ. 2008. Floral ontogeny of *Telipogon* spp. (Orchidaceae) and insights on the perianth symmetry in the family. *International Journal of Plant Science* 169: 1159–1173.
- PRIDGEON, A. M., R. G. SOLANO, AND M. W. CHASE. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 88: 2286–2308.
- RASMUSSEN, F. N. 1982. The gynostemium of the neottiid orchids. *Opera Botanica* 65: 1–96.

- 1986. On the various contrivances by which pollinia are attached to viscidia. *Lindleyana* 1: 21–32.
- RICHARD, L. 1817. De orchideis Europaeis Annotatione. Mémoires du Museum d'Histoire Naturelle Paris 4: 1–37.
- RUTKOWSKI, P., L. D. SZLACHETKO, AND M. GÓRNIAK. 2008. Phylogeny and taxonomy of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Spirantheae, Orchidaceae) in Central and South America. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdanskiego, Gdansk.
- SALAZAR, G. A. 2003. Spiranthinae. In AM Pridgeon, PJ Cribb, MW Chase and FN Rasmussen eds. Genera Orchidacearum vol.3 Orchidoideae part 2, Vanilloideae. 164–278. Oxford University Press, Oxford, UK.
- M. W. CHASE, M. A. SOTO, AND M. INGROUILLE. 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777–795.
- L. CABRERA, S. MADRIÑÁN, AND M. W. CHASE. 2009. Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 104: 403–416.
- L. CABRERA, AND C. FIGUEROA. 2011. Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 1–18.

- AND C. BALLESTEROS-BARRERA. 2010. *Sotoa*, a new genus of Spiranthinae (Orchidaceae) from Mexico and the southern United States. *Lankesteriana* 9: 491–504.
- AND R. L. DRESSLER. 2011. The leaves got it right again: DNA phylogenetics supports a sister-group relationship between *Eurystyles* and *Lankesterella* (Orchidaceae, Spiranthinae). In AM Pridgeon and HG Navarrete eds. Proceedings of the Third Scientific Conference on Andean Orchids. *Lankesteriana* 11: 337–347.
- AND L. JOST. 2012. *Quechua*, a new monotypic genus of Andean Spiranthinae (Orchidaceae). *Systematic Botany* 37: 78–86.
- SASS, J. E. 1958. Botanical microtechnique. 3a ed. Iowa State College Press. Ames, Iowa.
- SCHLECHTER, R. 1920. Versuch einer systematischen Neuordnung der Spiranthinae. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 37: 317–454.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), v. 4. beta 10. Sunderland: Sinauer.
- SZLACHETKO, D. L. 1995. Systema orchidalium. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* (Supplement) 3: 1–152.
- AND P. RUTKOWSKI. 2000. Gynostemia orchidalium. I. Apostasiaceae, Cyripediaceae, Orchidaceae (Thelymitroideae, Orchidoideae, Tropidioideae, Spiranthoideae, Neottioideae, Vanilloideae). *Acta Botanica Fennica* 169: 1–379.
- P. RUTKOWSKI, AND J. MYTNIK. 2005. Contributions to the taxonomic revision of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae

(Orchidaceae) in Mesoamerica and the Antilles. *Polish Botanical Studies* 20: 3–387.

VAN DER NIET, T., W. R. LILTVED, AND S. D. JOHNSON. 2011. More than meets the eye: a morphological and phylogenetic comparison of long-spurred, white-flowered *Satyrium* species (Orchidaceae) in South Africa. *Botanical Journal of the Linnean Society* 166: 417–430.

WILSON, C. L. 1982. Vestigial structures and the flower. *American Journal of Botany* 69: 1356–1365.

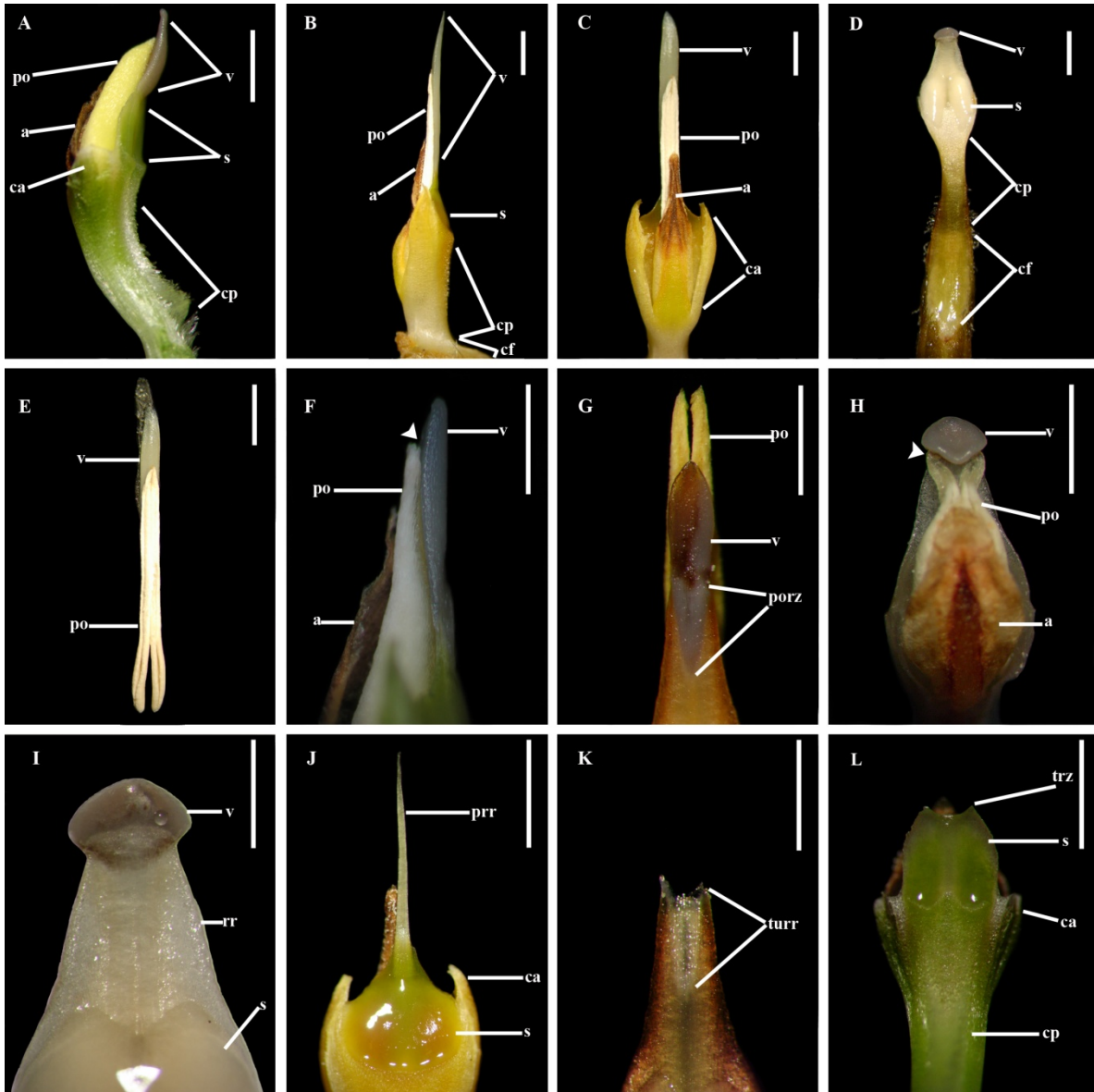


Fig. 1

Fig. 1. Morphology of the gynostemium in selected representatives of Spiranthinae. A, *Aulosepalum pyramidale* (Salazar s.n.), lateral view. B, *Dichromanthus aurantiacus*, (GAS 7724) lateral view and C, dorsal view. D, *Sarcoglottis schaffneri* (Salazar s.n.), ventral view showing the prominent column foot (cf). E, *Dichromanthus aurantiacus*, (GAS 7724) dorsal view of pollinarium. F, *Deiregyne albovaginata*, lateral view of pollinarium apex notice the contact between cushion viscidium (v) and pollinium (po). G, *Dichromanthus cinnabarinus* (GAS 7630), cushion type viscidium with the pouch rupture zone (porz). H, *Sarcoglottis schaffneri*, (Salazar s.n.) dorsal view, showing the pollinarium with wedge viscidium, the arrowhead shows the lateral adhesion of the pollinia to viscidium, and I, ventral view. J, *Dichromanthus aurantiacus* (GAS 7724) view the pointed rostellum remnant (pr). K, *Dichromanthus cinnabarinus* view tubular-membranous rostellum remnant (turr). L, *Aulosepalum pyramidale*, ventral view, gynostemium without pollinarium, the rostellum is entirely removed, the rupture zone is transverse (trz). Abbreviations: a = anther, ca= clinandrium appendages, cf= column foot, cp= column part, po= pollinium, turr= tubular rostellum remnant, prr= pointed rostellum remnant, prz= pouch rupture zone, rr= rostellum remnant, s= stigma, trz= transverse rupture zone, v= viscidium. Scales: A, F, I and L= 1mm; B-E, G, H, J, K = 2 mm.

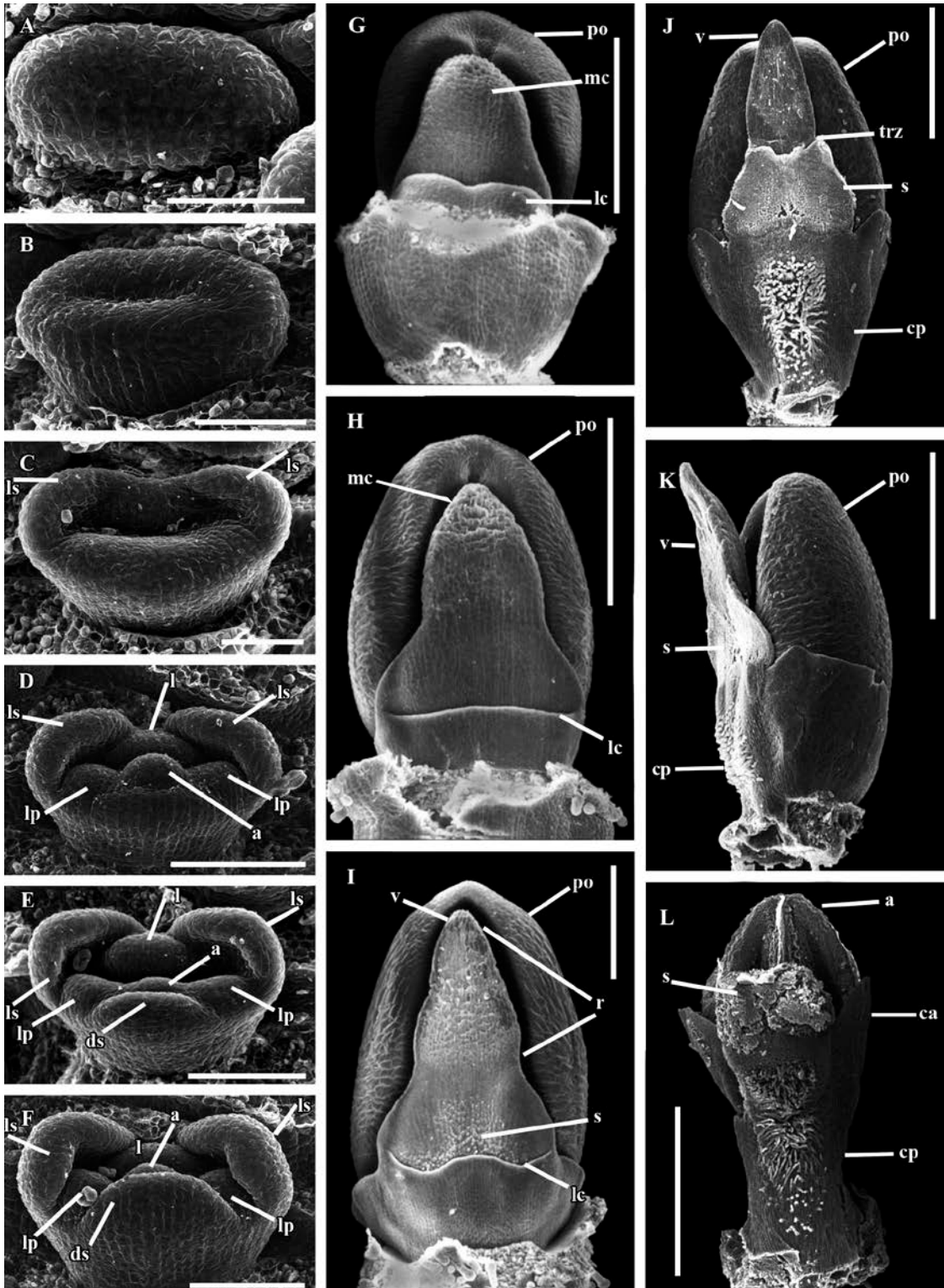


Fig. 2

Fig. 2. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of *Aulosepalum pyramidale*. A, elliptic floral primordium. B, primordium showing the transverse depression due to the proliferation of the peripheral tissue. C, initiation of lateral sepals (ls) and labellum (l). D, initiation of lateral petals (lp) and anther (a). E, beginning of dorsal sepal development (ds). F, completed flower. G, early stages of gynostemium development, occurrence of median (mc) and lateral carpels (lc). H, early differentiation of viscidium (v) showing cellular division. I, more developed viscidium and the beginning of the stigma papillae development. J, ventral view showing column part (cp) almost complete, in this phase, stigmatic papillae are differentiated (s), and K, lateral view. L, gynostemium at post-anthesis without pollinarium. Abbreviations: a = anther, ca= clinandrium appendages, cp= column part, ds= dorsal sepal, l= labellum, lc= lateral carpels, lp= lateral petals, ls= lateral sepals, mc= median carpel, po= pollinium, r= rostellum, s= stigma, trz= transverse rupture zone, v= viscidium. Scales: A-C=100 μ m; D-F=200 μ m; G=400 μ m; H-I=500 μ m; J-L=1 mm.

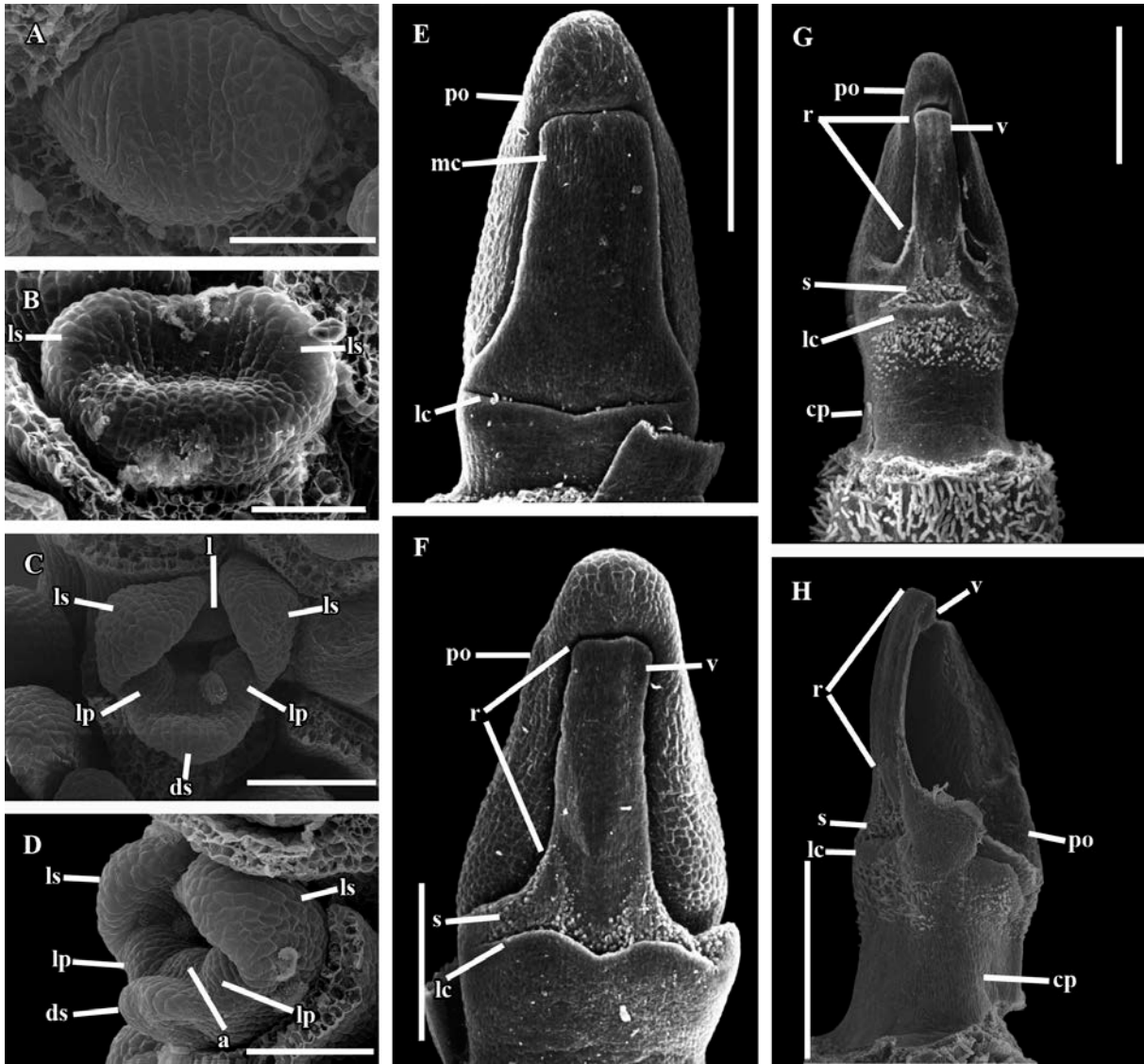


Fig. 3

Fig. 3. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of *Cyclopogon luteoalbus*. A, elliptic floral primordium. B, primordium showing the transverse depression due to the proliferation of the peripheral tissue and initiation of lateral sepals (ls). C, initiation of petals (l and lp) and dorsal sepal (ds). D, lateral view of early flower, showing the anther primordium (a). E, early development of gynostemium showing median (mc) and lateral carpels (lc), ventral view. F, early differentiation of viscidium (v) and stigmatic papillae, ventral view. G, gynostemium at post-anthesis, showing the column completely developed, ventral view. H, gynostemium at lateral view. Abbreviations: a = anther, cp= column part, ds= dorsal sepal, l= labellum, lc= lateral carpels, lp= lateral petals, ls= lateral sepals, mc= median carpel, po= pollinium, r= rostellum, s= stigma, v= viscidium. Scales: A-C=100 μ m; D-F=200 μ m; G=400 μ m; H-I=500 μ m; J-L=1 mm.

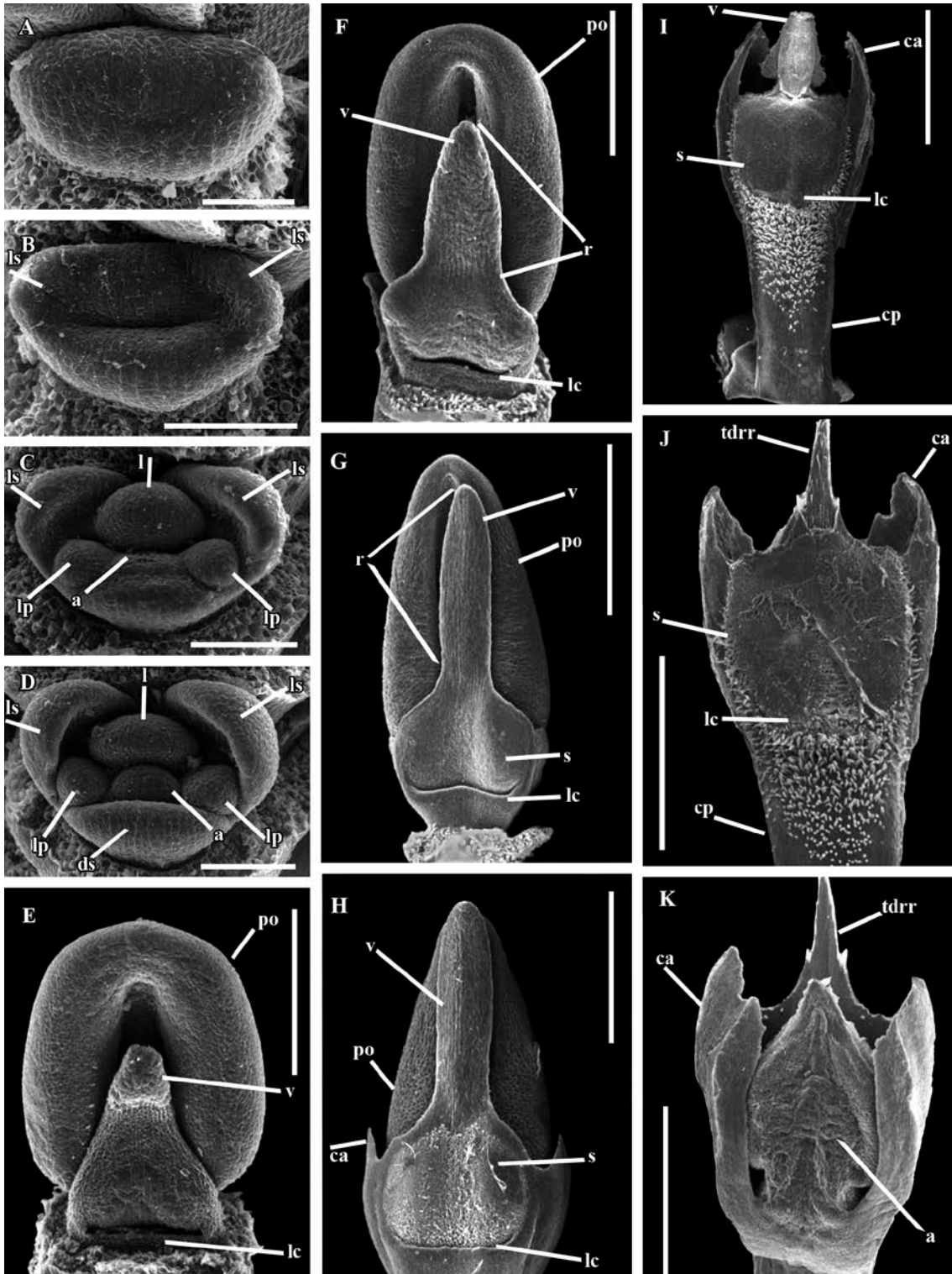


Fig. 4

Fig. 4. Floral organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of *Deiregyne albovaginata*. A, elliptic floral primordium. B, initiation of lateral sepals (ls). C, beginning of petals (l, lp) and anther development (a). D, beginning of dorsal sepal development (ds). E, gynostemium development, at early stages, with the median (mc) and lateral carpels (lc), ventral view. F, differentiation of viscidium (v) and stigma (s). G, middle differentiation of viscidium and stigma. H, gynostemium development at pre-anthesis, showing viscidium, stigma papillae and clinandrium appendages (ca). I, gynostemium at anthesis, ventral view. Intact viscidium. J, detached viscidium, showing the sharpened-tridentate rostellum remnant, ventral view. K, dorsal view, exhibits the anther and clinandrium.

Abbreviations: a = anther, ca= clinandrium appendages, cp= column part, ds= dorsal sepal, l= labellum, lc= lateral carpels, lp= lateral petals, ls= lateral sepals, po= pollinium, r= rostellum, s= stigma, tdr= tridentate rostellum remnant, v= viscidium. Scales: A=100 μ m; B-D=200 μ m; E=400 μ m; F=500 μ m; G-H=1 mm; I-K=2 mm.

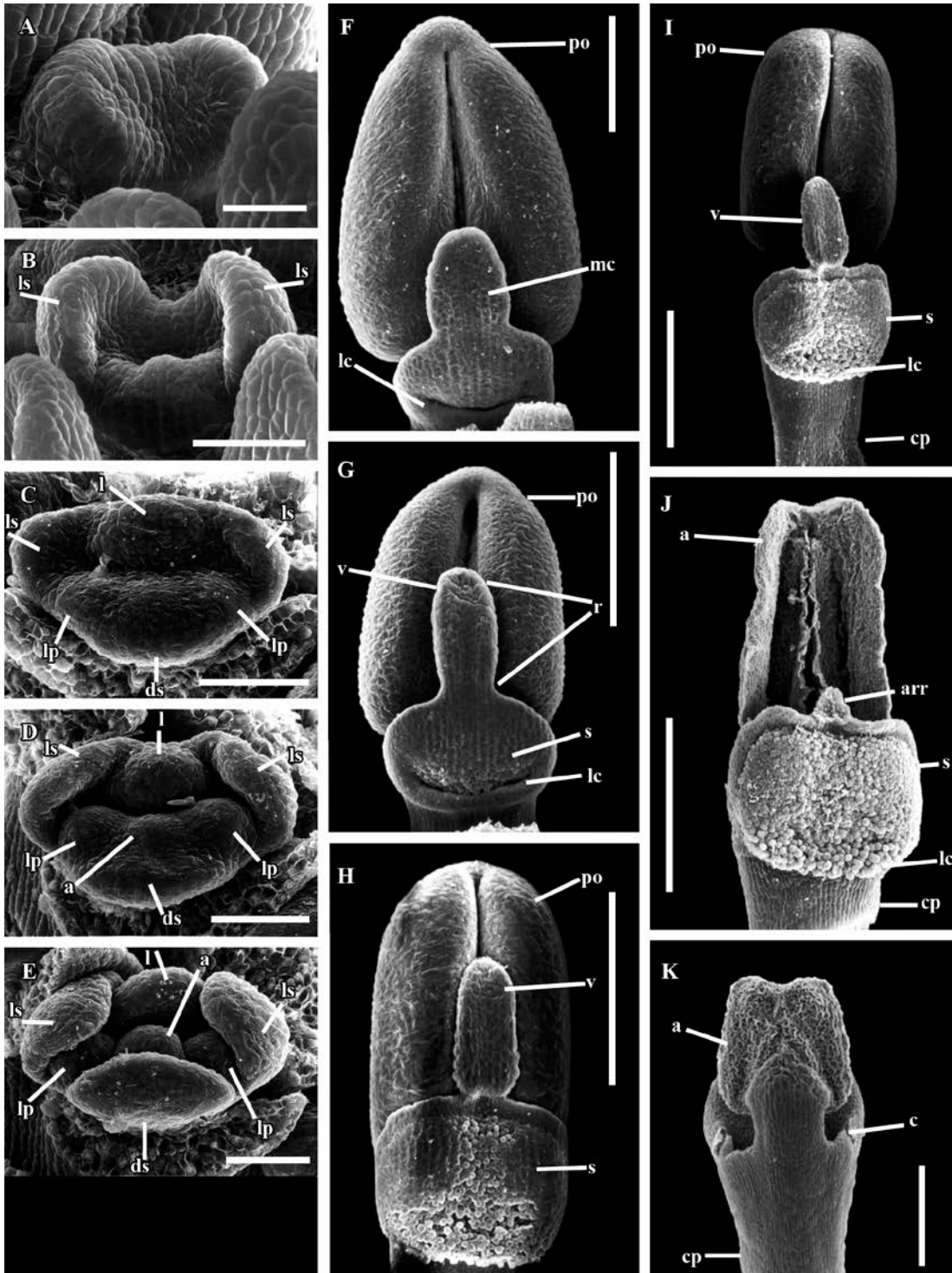


Fig. 5

Fig. 5. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of *Mesadenus lucayanus*. A, elliptic floral primordium. B, initiation of lateral sepals. C, differentiation of petals (lp), the labellum (l) is larger than lateral petals. D, initiation of dorsal sepal (ds) and anther development (a). E, completed flower. F, early development of gynostemium, with median (mc) and lateral carpels (lc), ventral view. G, final size of rostellum (r) and the beginning of the viscidium (v) and stigma (s) differentiation, ventral view. H, gynostemium before anthesis, showing the stigmatic papillae (s) and viscidium (v), ventral view. I, gynostemium completely developed, showing the column part (cp). J, gynostemium at post-anthesis, anther external tissue without pollinarium, showing the apiculate rostellum remnant (arr), ventral view, and K, dorsal view, showing anther (a) and shorted clinandrium (c). Abbreviations: a = anther, arr= apiculate rostellum remnant, c= clinandrium, cp= column part, ds= dorsal sepal, l= labellum, lc= lateral carpels, lp= lateral petals, ls= lateral sepals, mc= median carpel, po= pollinium, r= rostellum, s= stigma, v= viscidium. Scales: A= 50 μm ; B-E=100 μm ; F=200 μm ; G=400 μm ; H-K=500 μm .

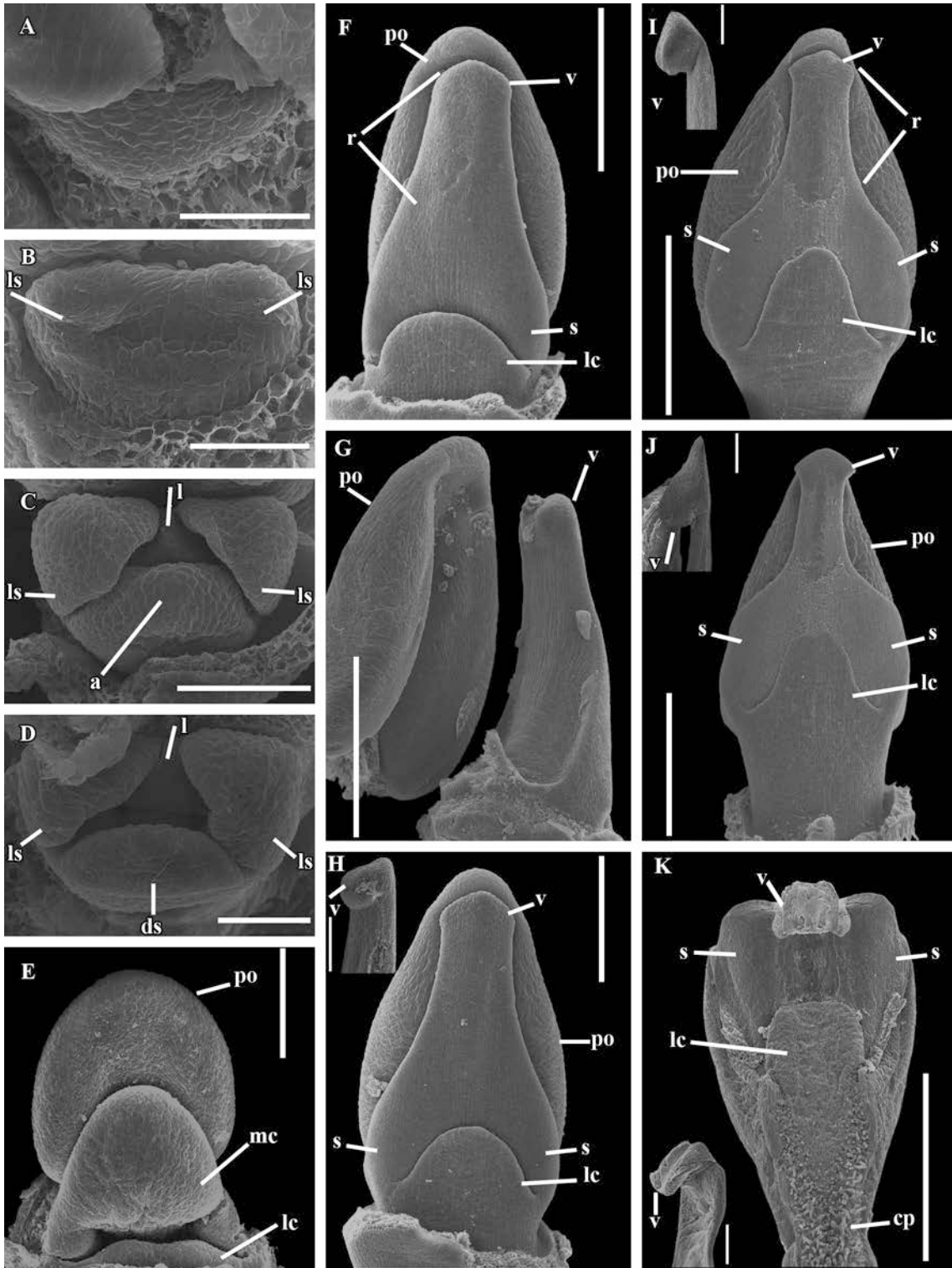


Fig. 6

Fig. 6. Organogenesis of early floral meristem and gynostemium development of *Sarcoglottis assurgens*. A, elliptic floral primordium. B, differentiation of lateral sepals (ls). C, petals. D, initiation of dorsal sepal (ds) and anther development (a), complete early flower. E, gynostemium early development, median (mc) and lateral carpels (lc), ventral view. F, beginning of viscidium and stigma differentiation, ventral view. G, same stage, dorsal portion of rostellum, showing the viscidium (v). H, gynostemium before anthesis, elongated lateral carpels, ventral view; left above, viscidium's close-up in dorsal view. I, ventral view, left above, viscidium's close-up in dorsal view. J, gynostemium almost completely developed; left above viscidium's close-up in dorsal view. K, gynostemium at post-anthesis showing stigma, viscidium and column part; bottom left viscidium's close-up in dorsal view.

Abbreviations: a = anther, cp= column part, ds= dorsal sepal, l= labellum, lc= lateral carpels, ls= lateral sepals, mc= median carpel, po= pollinium, r= rostellum, s= stigma, v= viscidium. Scales: A= 50 μm ; B-E=100 μm ; F=200 μm ; G=400 μm ; H-K=500 μm ; all close-up= 200 μm .

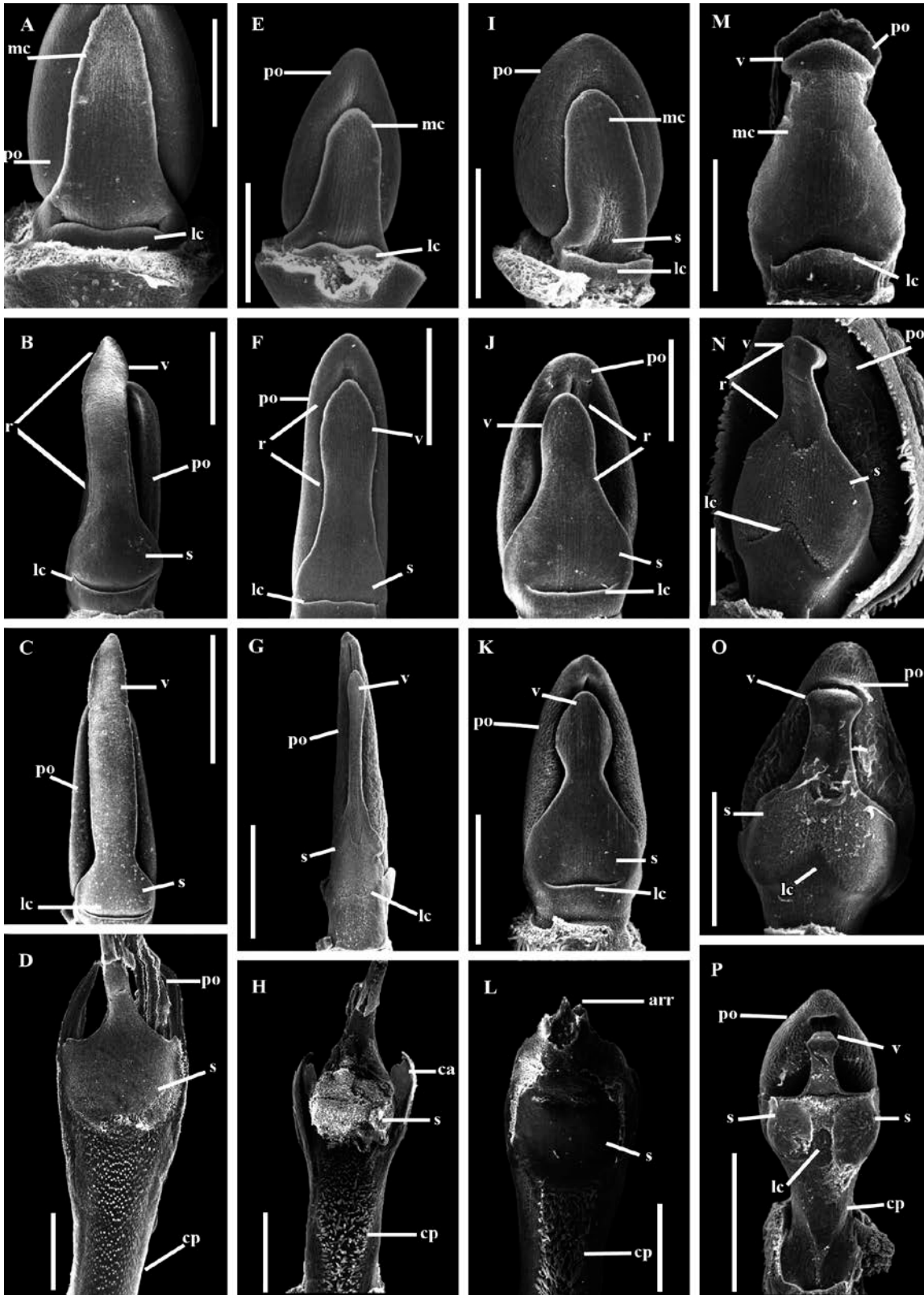


Fig. 7

Fig. 7. Gynostemium development at late stages of selected species of Spiranthinae. All gynostemias are shown in ventral view, each column belongs to one species. A-D, *Dichromanthus aurantiacus*. A, viscidium (v) early differentiation, lateral carpels fused (lc). B, elongation of rostellum (r) and differentiation of viscidium (v). C, gynostemium before anthesis showing developed viscidium (v). D, late development of gynostemium, stigma (s) with papillae. E-H, *Dichromanthus cinnabarinus*. E, early development of gynostemium, lateral carpels fused (lc), elongation of the median carpel apex (mc). F, early differentiation of viscidium (v). G, early differentiation of stigma papillae. H, late development of gynostemium, mature stigma and viscidium (v), complete column part (cp). I-L, *Kionophyton sawyeri*. I, early development of gynostemium with the lateral carpels fused (lc) and the median carpel emerging (mc). J, viscidium early differentiation. K, viscidium at middle development. L, post-anthetic gynostemium showing the apiculate rostellum remnant (arr). M-P, *Sarcoglottis schaffneri*. M, early development of viscidium, lateral carpels fused. N, stigmatic papillae middle differentiation (s), viscidium (v) with dorsal tissue. O, before anthesis, completes viscidium and stigma. P, gynostemium at anthesis, complete column part.

Abbreviations: arr= apiculate rostellum remnant, ca= clinandrium appendages, cp= column part, lc= lateral carpels, mc= median carpel, po= pollinium, r= rostellum, s= stigma, v= viscidium. Scales: M= 400 μ m; A, E, F, J, K, N, O= 500 μ m; B, L= 1 mm; C, D, G, H, P= 2 mm.

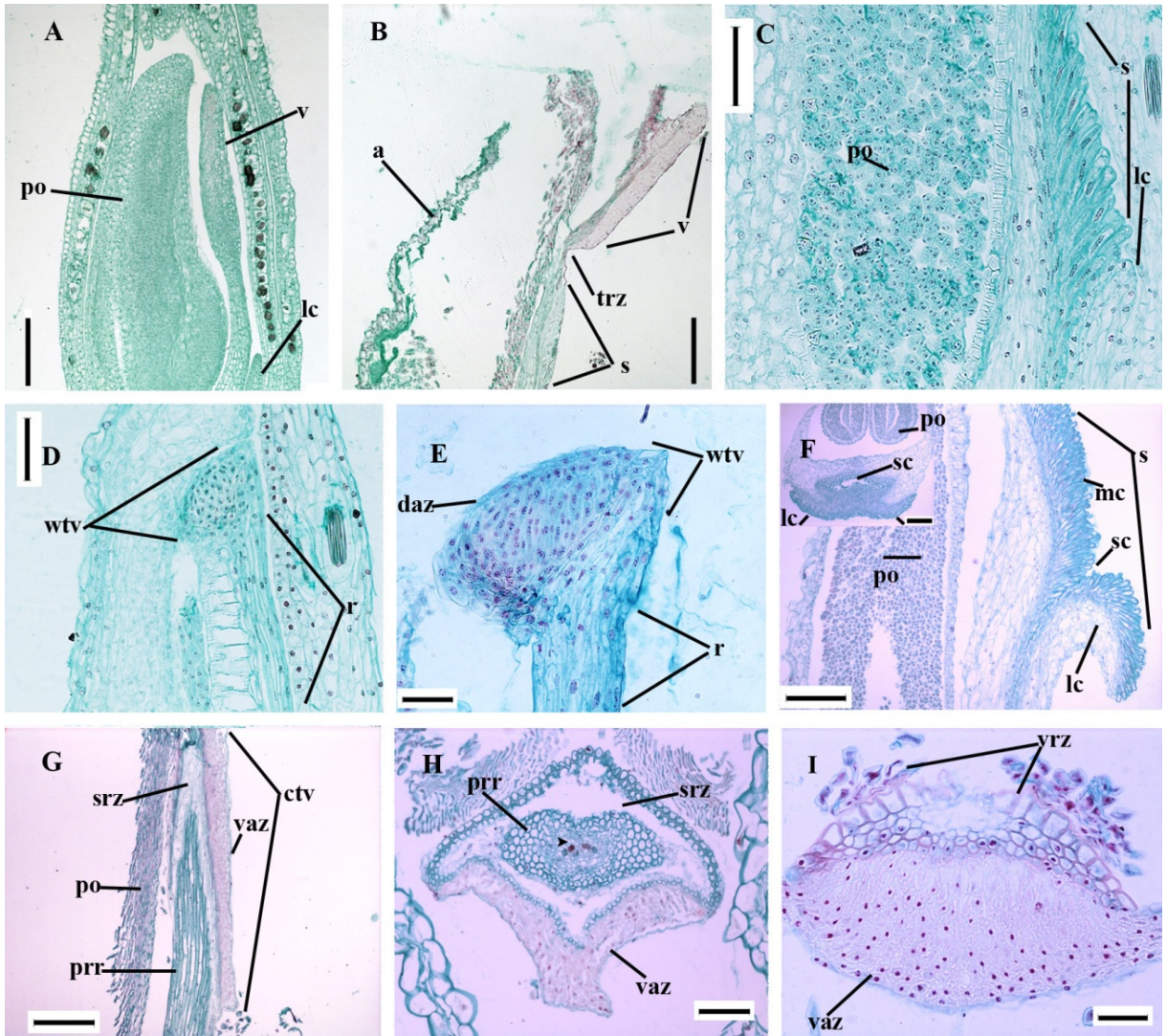


Fig. 8

Fig. 8. Anatomical characteristics of gynostemium in selected Spiranthinae. A-B, *Aulosepalum pyramidale*. A, gynostemium at middle stages of development, longitudinal section of lateral view, showing pollinia (po), median (mc) and lateral carpels (lc), and the differentiated viscidium (v). B, gynostemium at post-anthesis, longitudinal section of viscidium showing transversal rupture zone (trz). C-E, *Cyclopogon luteoalbus*. C, stigma constitute by median carpel (s), longitudinal section of lateral view, lateral carpels reduced (lc). D, wedge type viscidium (wtv). E, viscidium's close-up with a dorsal adhesive zone (daz). F, *Sacoila lanceolata*, shows the three-carpel stigma with papillae, left above transversal section showing lateral carpels (lc) and stylar channel (sc). G, *Dichromanthus michuacanus*, longitudinal section of lateral view, sheath rupture zone (srz), with a cushion type viscidium (ctv) and a ventral adhesive zone (vaz). H, *Dichromanthus aurantiacus*, with a cushion type viscidium in transversal section, showing sheath rupture zone (srz) and pointed rostellum remnant (pr), arrowhead showing the vascular bundles. I, *Deiregyne albovaginata*, with a cushion type viscidium in a transversal view, showing a ventral rupture zone (vrz) and ventral adhesive zone (vaz). Abbreviations: a = anther, ctv= cushion type viscidium, daz= dorsal adhesive zone, lc= lateral carpels, mc= median carpel, po= pollinium, prr= pointed rostellum remnant, r= rostellum, s= stigma, sc= stylar channel, srz= sheath rupture zone, trz= transversal rupture zone, v= viscidium, vaz= ventral adhesive zone, vrz= ventral rupture zone, wtv= wedge type viscidium. Scales: E, I= 50 μm ; C, D, H= 100 μm ; B= 150 μm ; A, F, G= 300 μm .

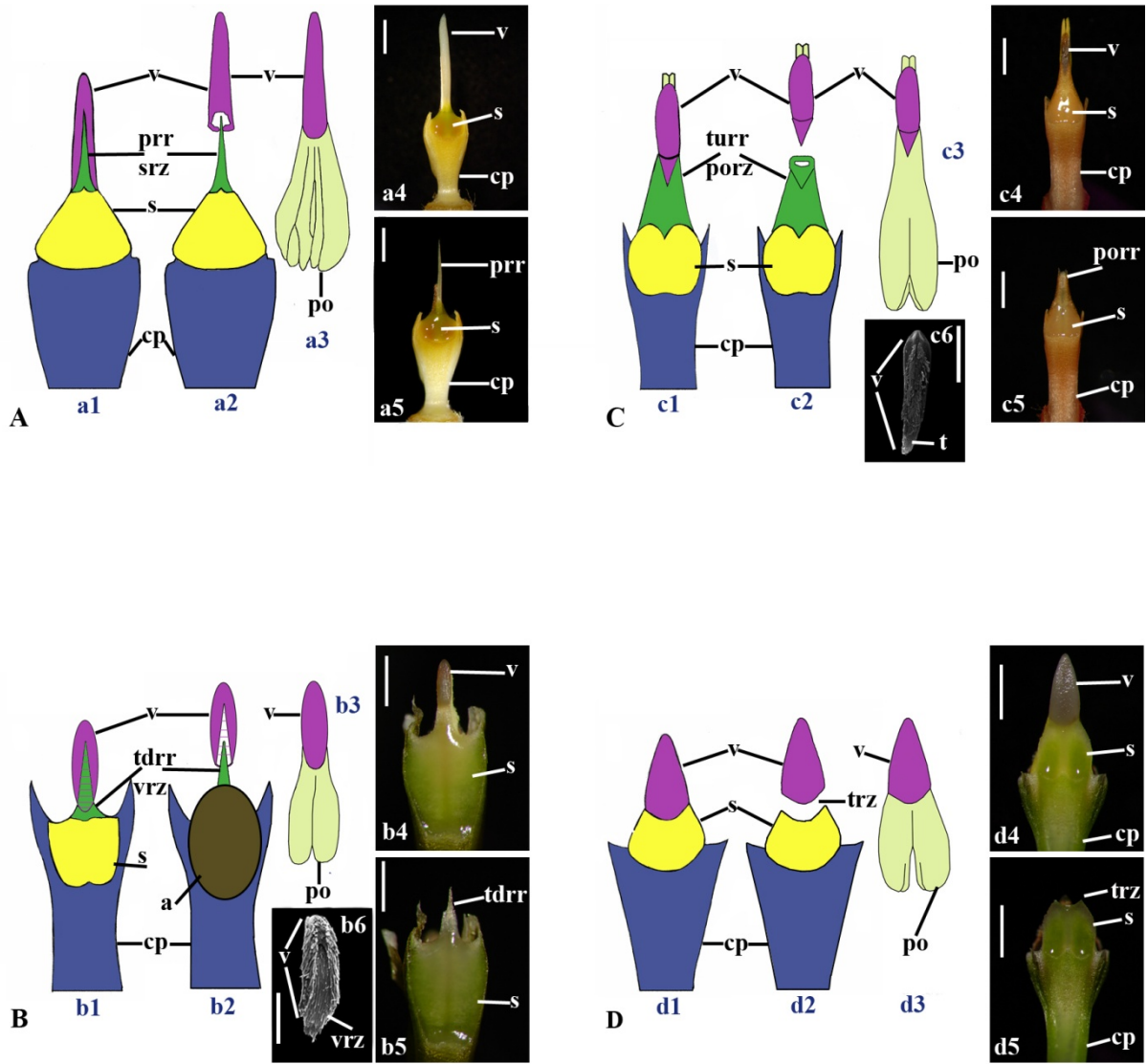


Fig. 9

Fig. 9. Rupture mechanisms of viscidium in Spiranthinae. A, sheath rupture zone (srz); a1, complete gynostemium; a2, pollinarium removal; a3, pollinarium (po); a4, complete fresh gynostemium; a5, gynostemium without pollinarium, showing pointed rostellum remnant (pr). B, ventral rupture zone (vrz); b1, complete gynostemium in ventral view; b2, pollinarium removal, b3, pollinarium (po); b4, complete fresh gynostemium; b5, gynostemium without pollinarium, showing tridentate remnant rostellum (tdrr); b6, viscidium without pollinium, in dorsal view, showing ventral rupture zone. C, pouch rupture zone (porz); c1, complete gynostemium; c2, pollinarium removal, tubular rostellum remnant (turr); c3, pollinarium (po); c4, complete fresh gynostemium; c5, gynostemium without pollinarium showing a membranous-tubular rostellum remnant (turr); c6, viscidium without pollinium, in dorsal view, showing the base tail (t) inserted. D, transversal rupture zone (trz); d1, complete gynostemium; d2, pollinarium removal, the rostellum is completely removed; d3, pollinarium (po); d4, complete fresh gynostemium; d5, gynostemium without pollinarium. Abbreviations: a = anther, cp= column part, po= pollinarium, prr= pointed rostellum remnant, turr= tubular rostellum remnant, porz= pouch rupture zone, s= stigma, srz= sheath rupture zone, t= tail of viscidium, tdrr= tridentate rostellum remnant, trz= transversal rupture zone, v= viscidium, vrz= ventral rupture zone. Scales: b6= 500 μ m; c6= 1mm; a4, a5, b4, b5, d4, d5 = 2 mm; c4, c5 =4 mm.

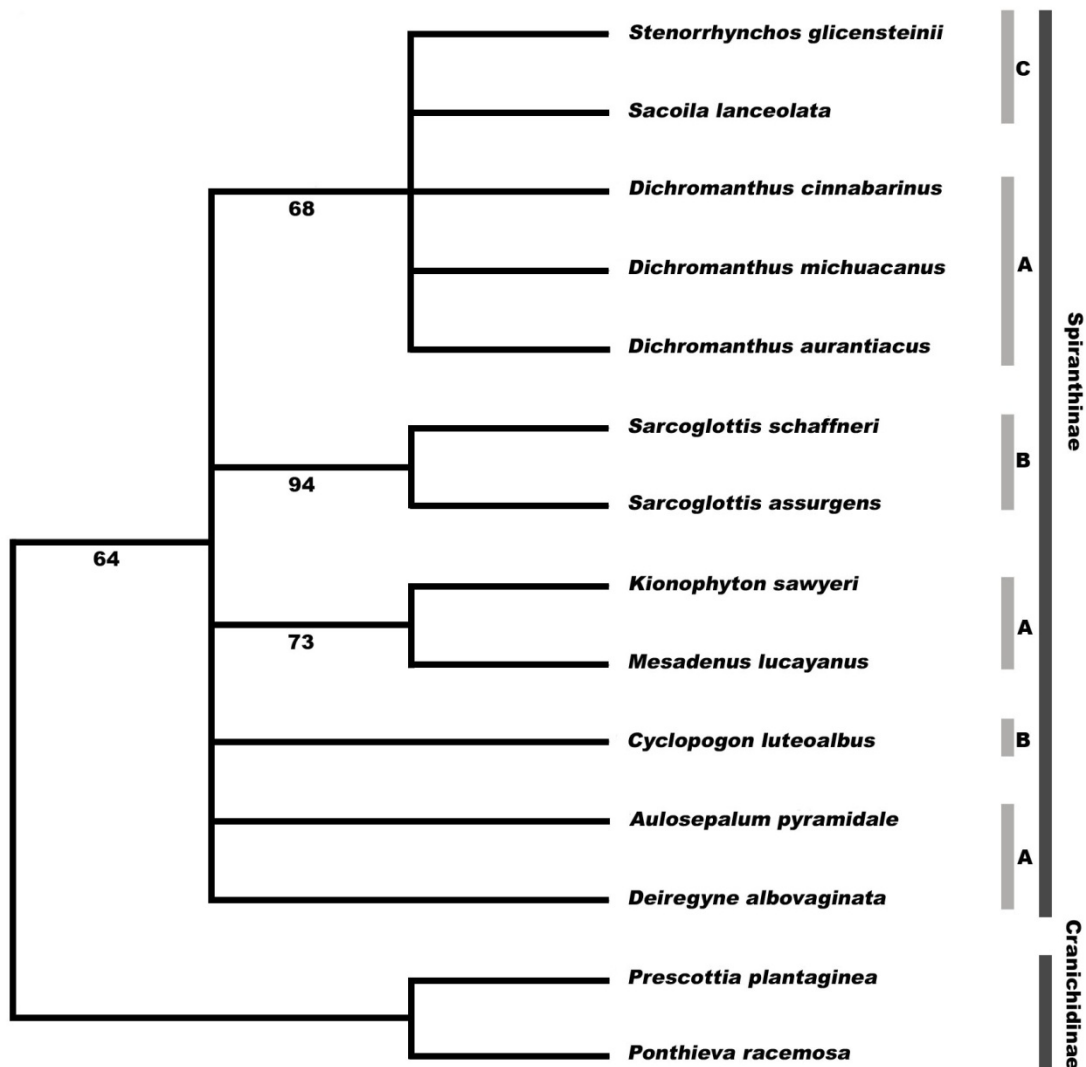


Fig. 10. Strict consensus of the two trees found by the parsimony analysis of the morphological characters (length = 63 steps, CI = 0.71, RI = 0.72). Bootstrap percentages >50 are indicated below the branches. A= *Spiranthes* clade, B= *Pelexia* clade, and C= *Stenorrhynchos* clade.

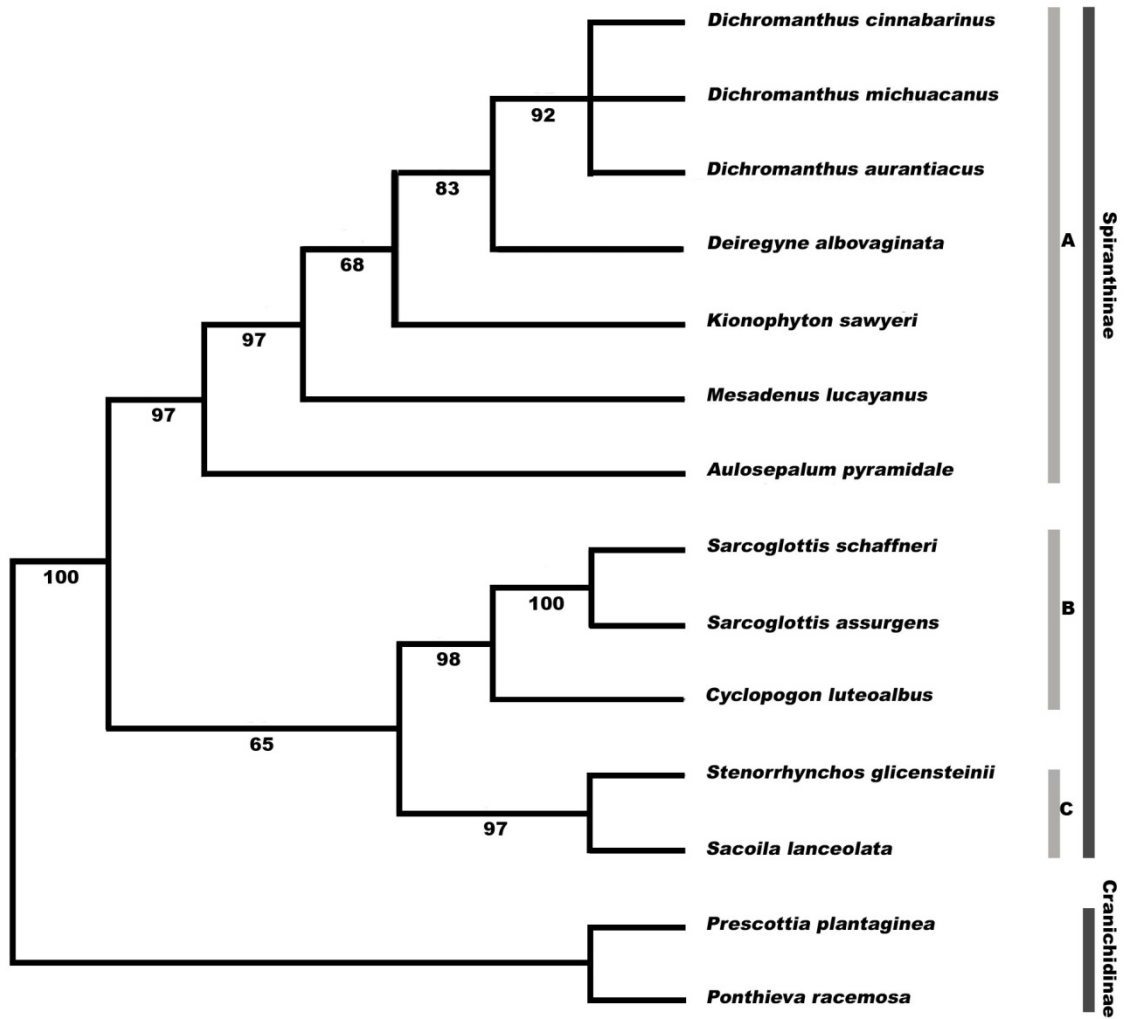


Fig. 11. Strict consensus of the two trees found by the parsimony analysis of the ITS region (length = 386 steps, CI = 0.74, RI = 0.67). Bootstrap percentages >50 are indicated below the branches. A= *Spiranthes* clade, B= *Pelexia* clade, and C= *Stenorrhynchos* clade.

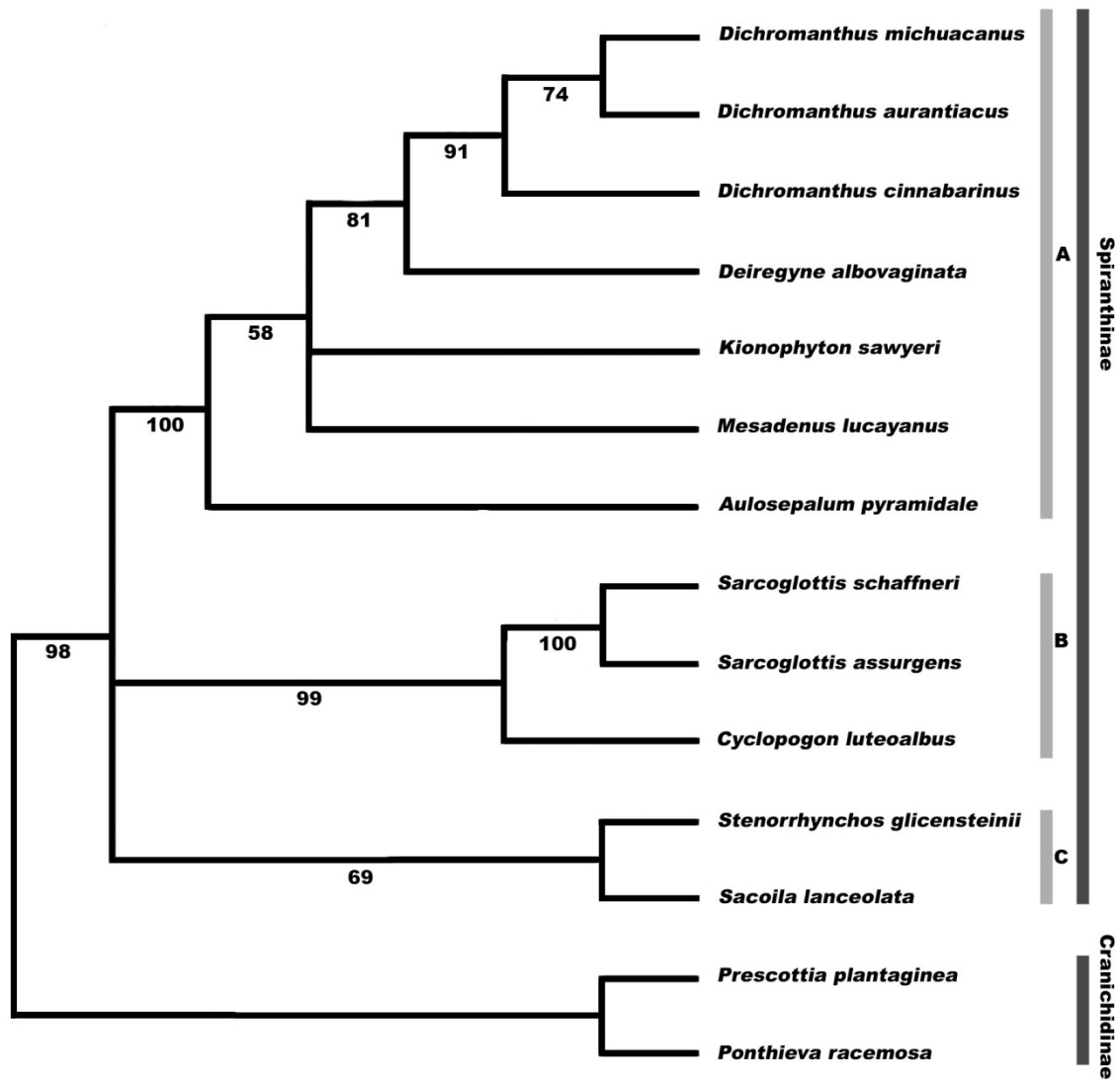


Fig. 12. Strict consensus of two three most parsimonious trees found by the parsimony analysis of the *trnL-trnF* region (length = 273 steps, CI = 0.81, RI = 0.77). Bootstrap percentages >50 are indicated below the branches. A= *Spiranthes* clade, B= *Pelexia* clade, and C= *Stenorrhynchos* clade.

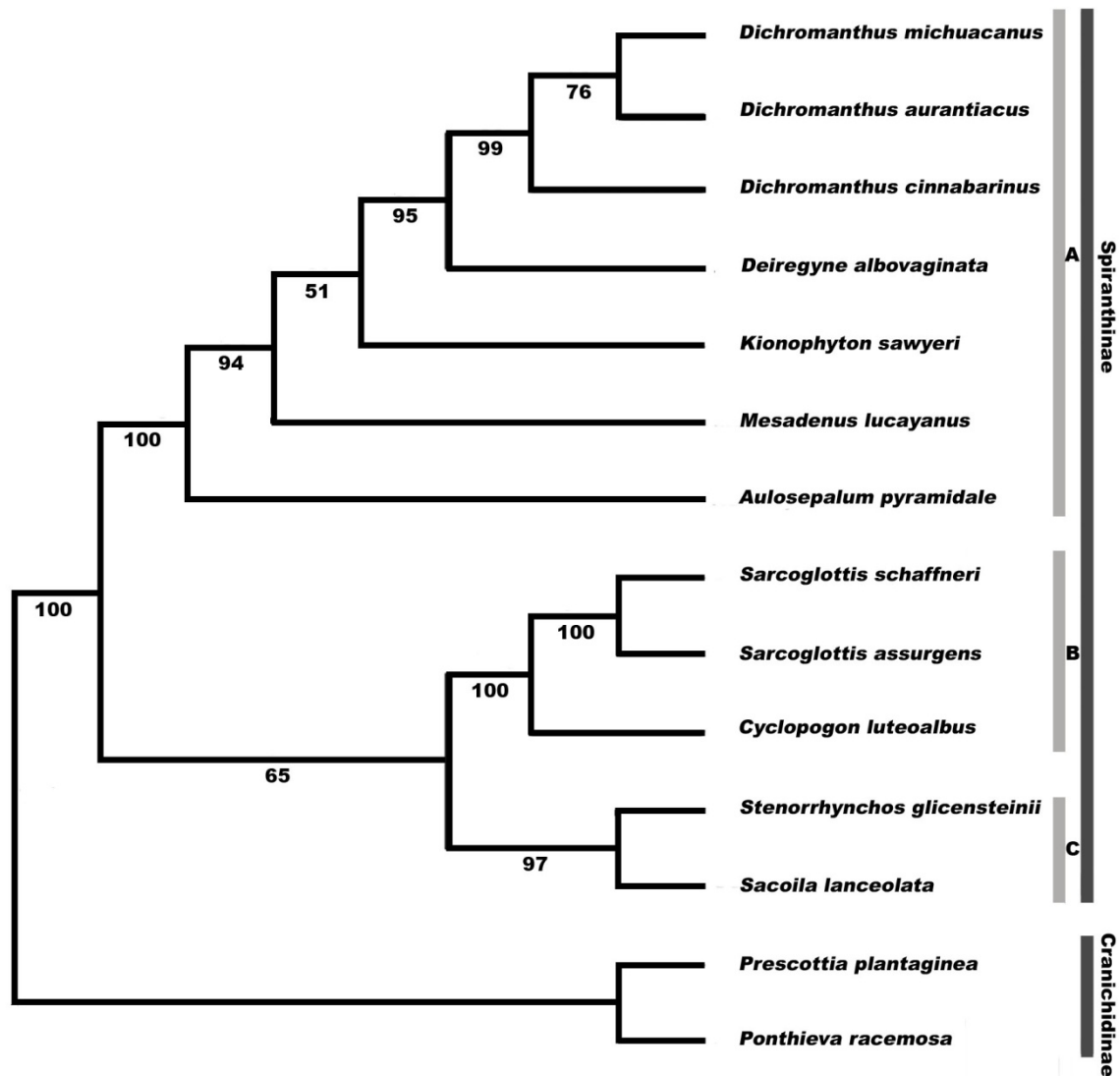


Fig.13. Most parsimonious tree found by the parsimony analysis of the two DNA regions combined (ITS and *trnL-trnF*), (length = 660 steps, CI = 0.77, RI = 0.71). Bootstrap percentages > 50 are indicated below the branches. A= *Spiranthes* clade, B= *Pelexia* clade, and C= *Stenorrhynchos* clade.

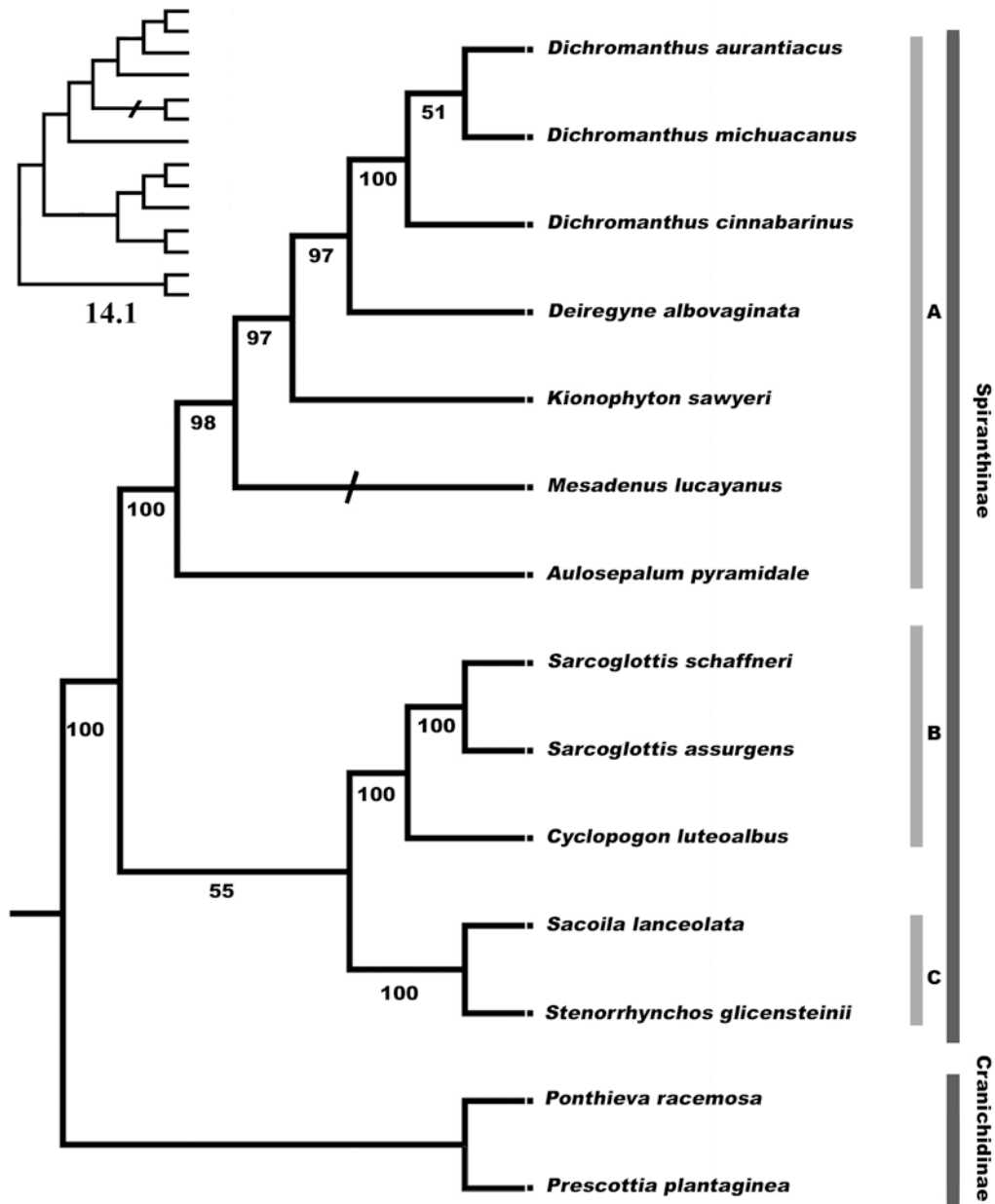


Fig. 14. One of the six trees found by parsimony analysis of DNA (ITS and *trnL-trnF*) and morphological characters (length = 733 steps, CI = 0.75, RI = 0.69). Bootstrap percentages >50 are indicated below the branches. Above left, consensus tree is shown (14.1). A= *Spiranthes* clade, B= *Pelexia* clade, and C= *Stenorrhynchos* clade.

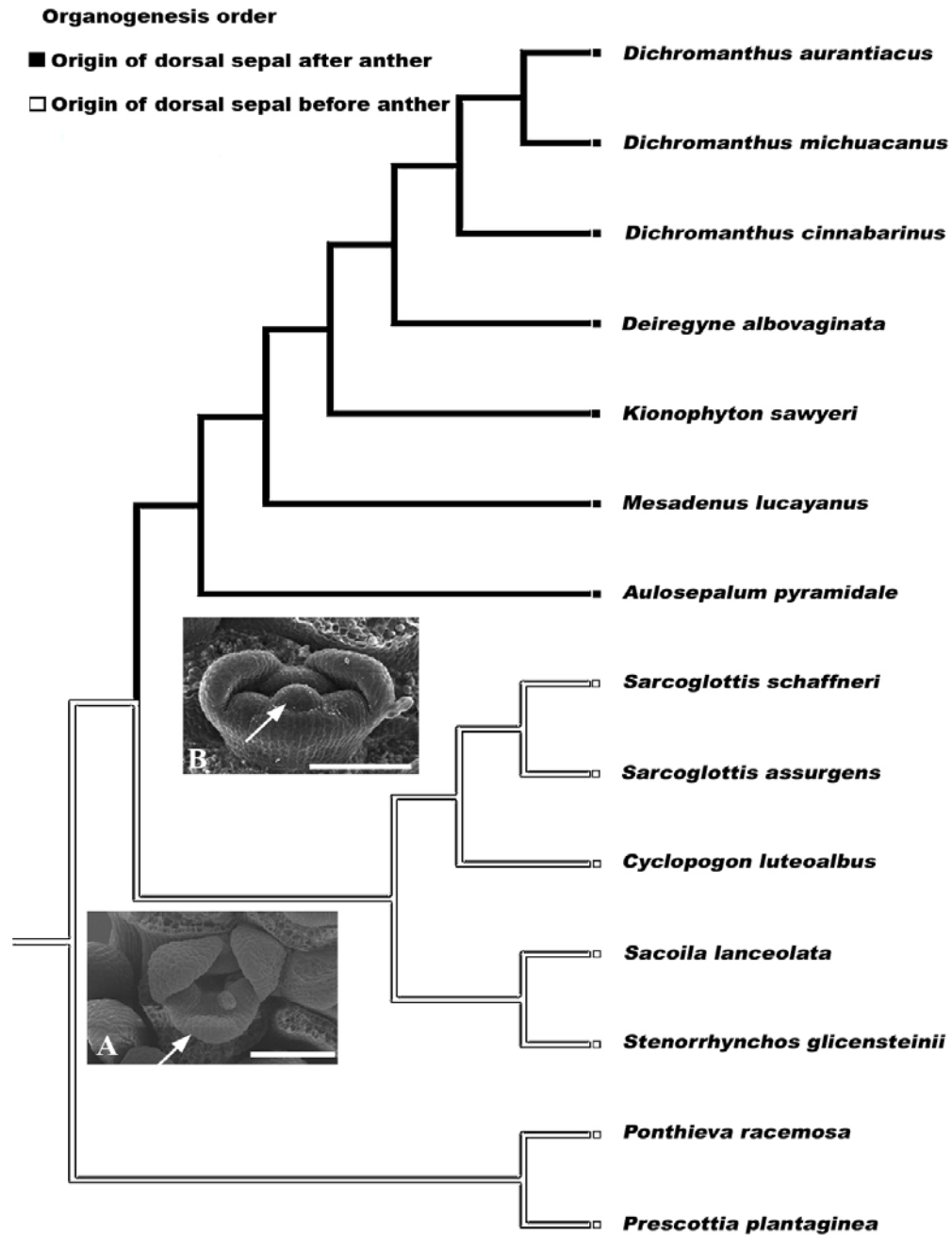


Fig.15. Optimization of the character order of organogenesis order on one of the six most parsimonious trees obtained for the combined analysis (Fig. 14). A= origin of dorsal sepal before anther (*Cyclopogon luteoalbus*, scale= 100 μ m); B= origin of dorsal sepal after anther (*Aulosepalum pyramidale*, scale= 200 μ m).

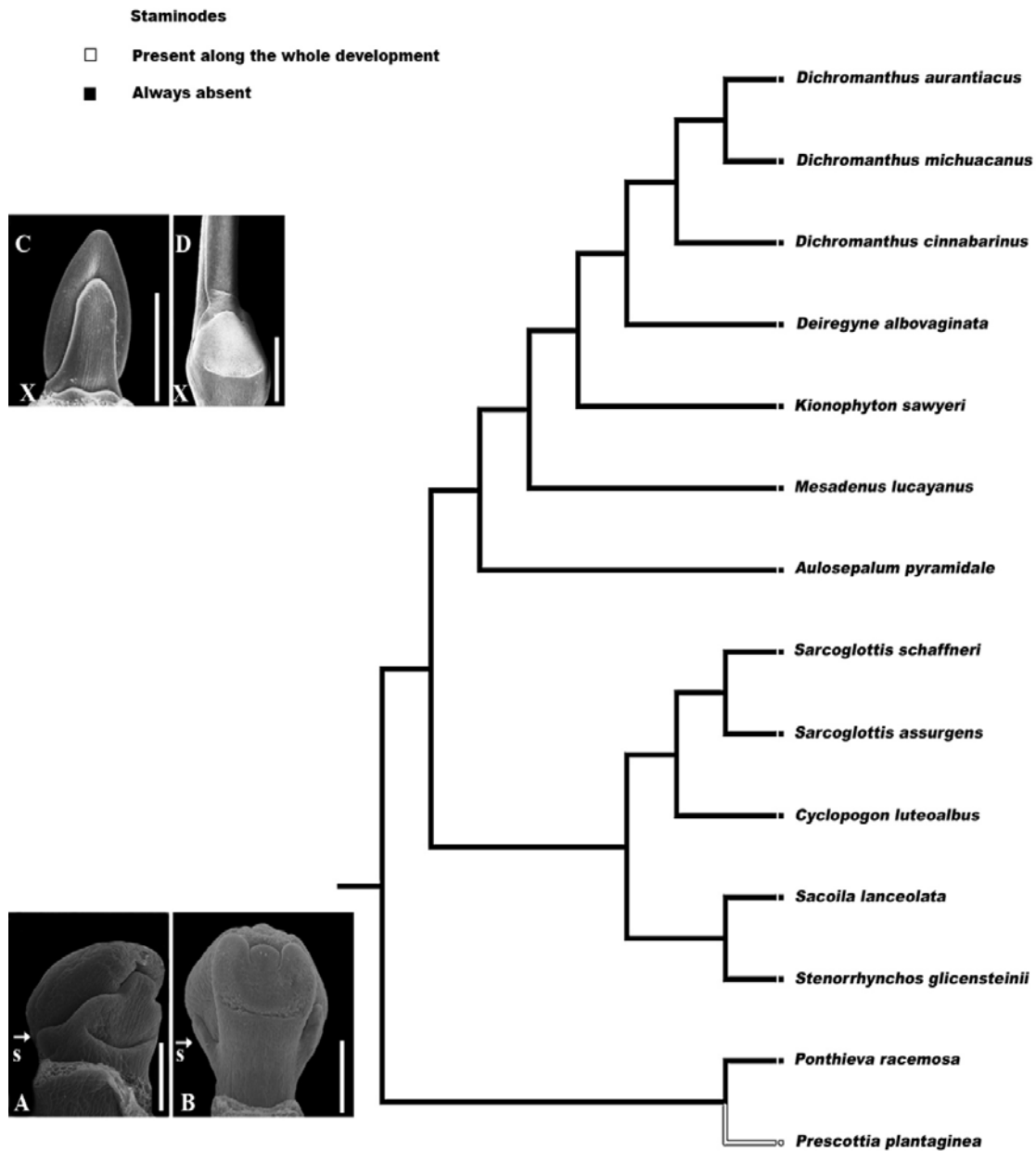


Fig.16. Optimization of the character presence or absence of staminodes on one of the six most parsimonious trees obtained for combined analysis (Fig. 14). A, B= present along the whole development (*Prescottia plantaginea*, scales: A= 200 μm, B= 500 μm); C, D= always absent (*Dichromanthus aurantiacus*, scales: C= 500 μm, D= 2mm).

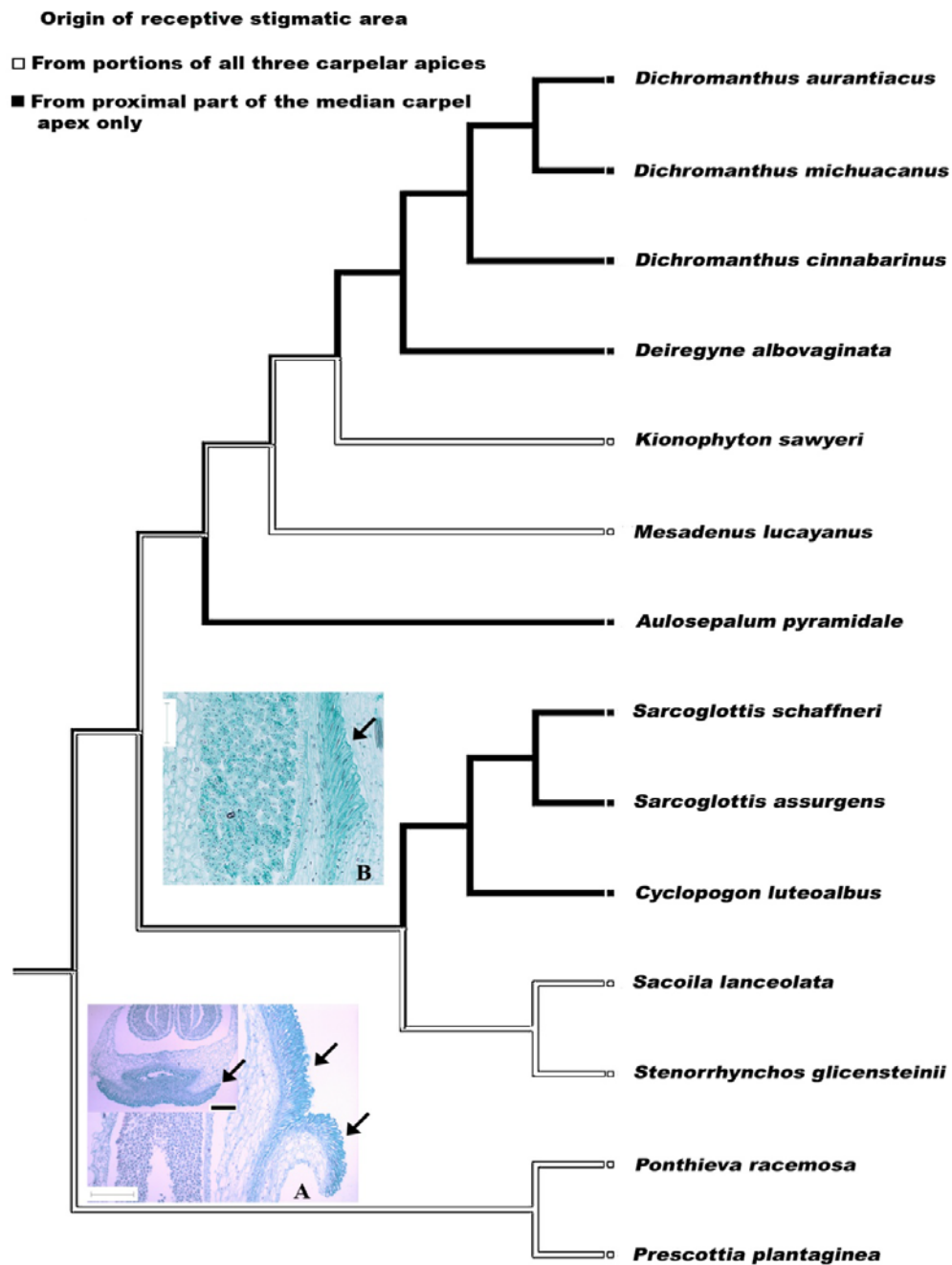


Fig.17. Optimization of the character origin of stigmatic area on one of the six most parsimonious trees obtained for the combined analysis (Fig. 14). A= from portions of all three carpelar apices (*Sacoila lanceolata*, scale= 300 μ m); B= from proximal part of the median carpel apex only (*Cyclopogon luteoalbus*, scale= 100 μ m).

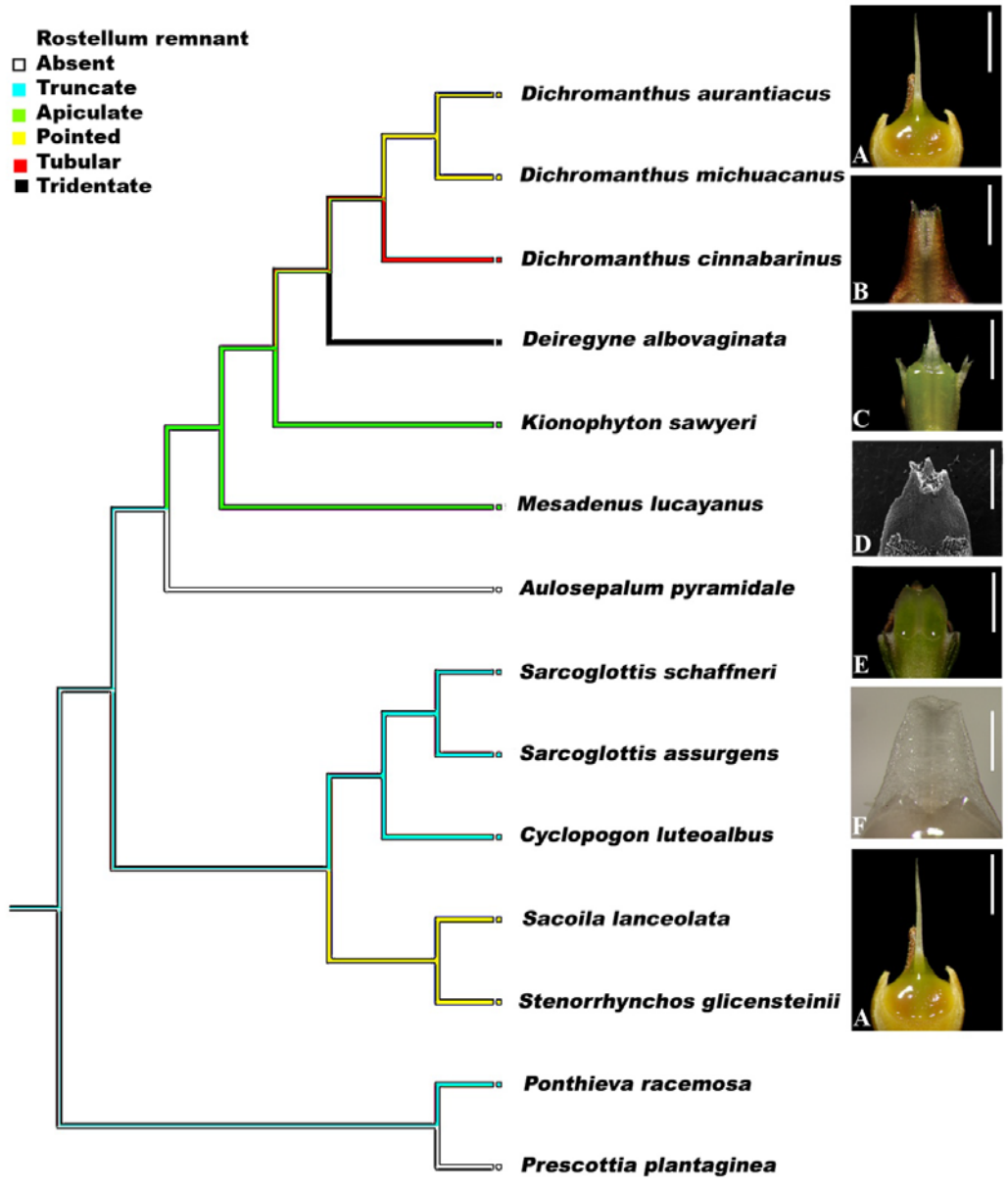


Fig.18. Optimization of the character shape of rostellum remnant on one of the six most parsimonious trees obtained for the combined analysis (Fig. 14). A= pointed (*Dichromanthus aurantiacus*, scale= 2 mm); B= tubular (*Dichromanthus cinnabarinus*, scale= 2 mm); C= tridentate (*Deiregyne* sp., scale= 2mm), D= apiculate (*Kionophyton sawyeri*, scale= 1 mm); E= absent (*Aulosepalum pyramidale*, scale= 1 mm); F= truncate (*Sarcoglottis schaffneri*, scale= 1 mm).

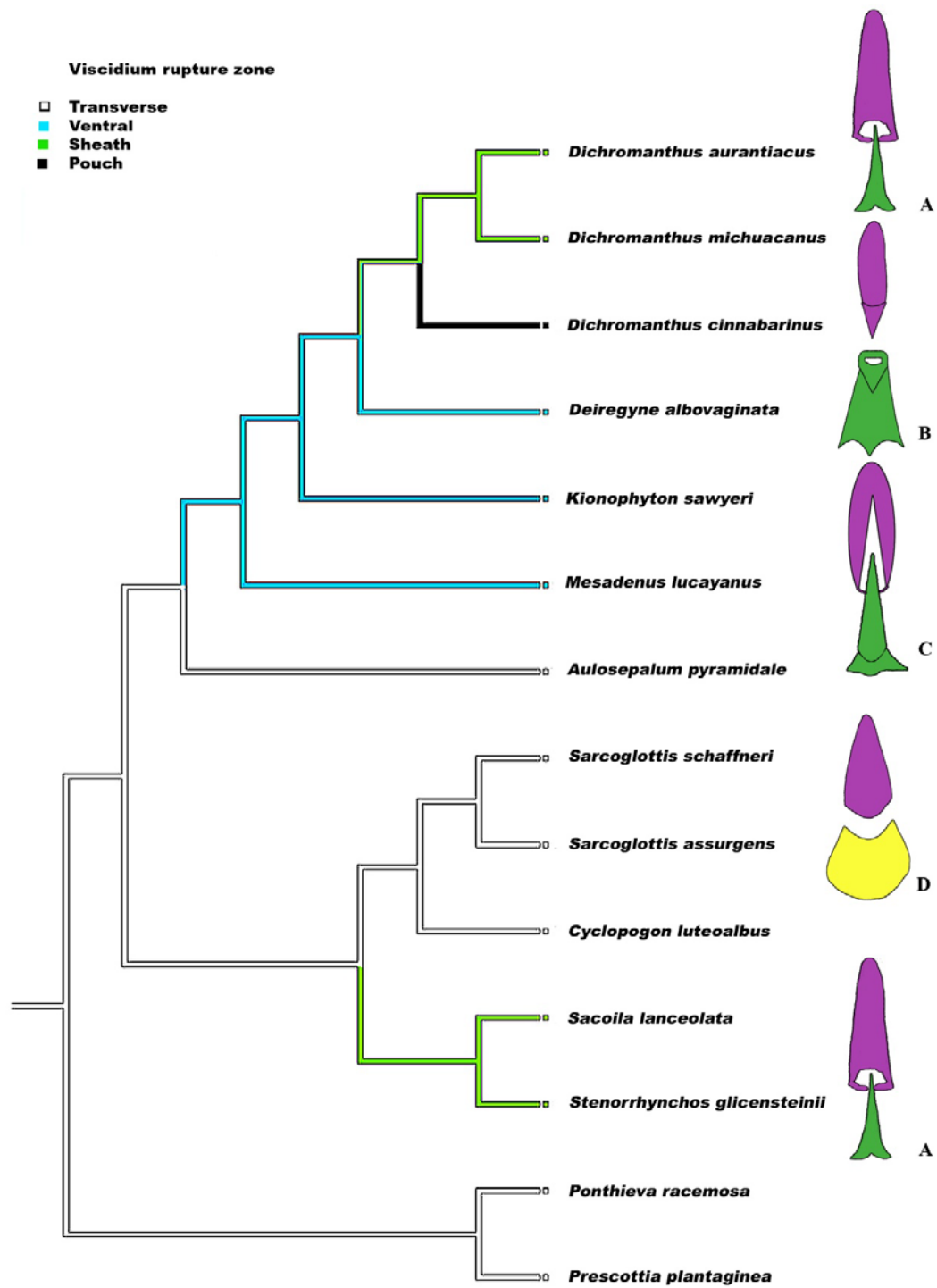


Fig.19. Optimization of the character viscidium rupture zone on one of the six most parsimonious trees obtained for the combined analysis (Fig. 14). A= sheath, B= pouch, C= ventral, D= transverse.

Appendix 1. Taxa studied and voucher information. Vouchers are deposited at

Herbario Nacional de México (MEXU).

Taxón	Origen	Voucher	GenBank	
			Anatomy ITS	<i>trnL-trnF</i>
<i>Aulosepalum pyramidale</i> (Lindl.) M.A.Dix M.W.Dix	México, Distrito Federal	Figueroa 251; Salazar 6334, 7381	–	–
<i>Deiregyne albovaginata</i> (C.Schweinf.) Garay	México, Distrito Federal	Figueroa 252, 270, 281;	Jiménez 2164, AMO FN641870	FN641882
<i>Cyclopogon luteoalbus</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	México	Salazar 5896		
<i>Dichromanthus aurantiacus</i> (Lex.) Salazar & Soto Arenas	México Distrito Federal	Figueroa 183, 249	Francke sn (MEXU) FN996956	FN996970
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> (Lex.) Garay	México Distrito Federal	Figueroa 181, 250; Salazar 6493	Linares 4469 (MEXU) AJ539486	AJ544469
<i>Dichromanthus michuacanus</i> (Lex.) Salazar & Soto Arenas	México Edo. de México	Figueroa 192; Soto 10166	Mex. Salazar 6047 (MEXU) 778177	FN996966
<i>Kionophyton sawyeri</i> (Standl. & L.O.Williams) Garay	México Edo. de México	Salazar 7252	–	–
<i>Mesadenus lucayanus</i> (Britton) Schltr.	México	Salazar 6714, 6687	Mex. Salazar 6043 AJ539488 (MEXU)	AJ544486
<i>Ponthieva racemosa</i> (Walter) C. Mohr	México	Salazar 6049	Salazar 6049 (MEXU) AJ539508	AJ544490
<i>Prescottia plantaginea</i> Hook.	México	Salazar 6350	Brazil Salazar 6350 (K)	AJ544493

<i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay	México	Kew 200 – 1578	AJ539511 Guatemala Forther 2545 (M) AJ539504	Brazil da Silva 874 (ML) AJ544487
<i>Sarcoglottis assurgens</i> (Rchb.f.) Schltr.	México, Guerrero	Figueroa 302	–	–
<i>Sarcoglottis schaffneri</i> (Rchb.f.) Ames	México, Distrito Federal	Figueroa 293, 253; Salazar 7720, Salazar 6584, 7105	–	–
<i>Stenorrhynchos glicensteinii</i> Christenson		Salazar 7532	Salazar 6090 (MEXU) AJ539505	AJ544487

Appendix 2. Morphological characters analyzed.

1. Root shape: cylindrical (0); fusiform (1)
2. Leaves at blooming time: present (0); absent (1)
3. Leaves distribution: along the stem (0); arranged in a basal rosette (1)
4. Leaf base: attenuate towards the base (0); distinctly petiolate (1)
5. Consistency of floral bracts during anthesis: herbaceous (0); scarious (1)
6. Lateral sepal union: free (0); partially connate (1)
7. Adherence of petals to the dorsal sepal: absent (0); present (1)
8. Connate sepals "sepaline cup": absent (0); present (1)
9. Adherence of the labellum margins to the sides of the column: absent (0); present (1)
10. Shape of the basal nectary: round cavity (0); narrow channel (1); internal in decurrent part fused to ovary (2); distinct spur (3); open nectary (4)
11. Nectar glands: adnate at labellum base (0); free (1)
12. Labellum outline: pandurate (0); suborbicular (1); calceolate (2)
13. Column foot: absent (0); <1/2 of the column length (1); >1/2 of the column length (2)
14. Position of stigmatic receptive surface: ventral (0); apical (1)
15. Rostellum remnant: absent (0); truncate (1); apiculate (2); pointed (3); tubular (4); tridentate (5)
16. Rostellum remnant consistency: membranaceous (0); stiff (1); freshy (2)
17. Rostellum: tegular (0); hamular (1);
18. Viscidium shape: rounded (0); ovoid (1); subulate (2); cuneate (3)
19. Pollinia adhesion to the viscidium: dorsal (0); lateral (1); ventral (2)
20. Viscidium rupture zone: transverse (0); ventral (1); sheath (2); pouch (3)
21. Viscidium position on the pollinarium: apical (0); center (1)
22. Pollination syndrome: melittophilous (0); lepidopterophilous (1); ornithophilous (2)
23. Pollinium aggregation: mealy (0); brittle (1)
24. Pseudolabellum: absent (0); present (1)

25. Flower orientation: resupinate (0); not resupinate (1)
26. Channel on ventral surface of viscidium: absent (0); present (1)
27. Origin of receptive stigmatic area: portions of all three carpelar apices (0); proximal part of median carpel apex only (1)
28. Organogenesis order: dorsal sepal before anther (0); dorsal sepal after anther (1)
29. Vascular bundles in rostellum: absent (0); present (1)
30. Staminodia primordia apparent during organogenesis: present all development (0); always absent (1)

Appendix 3. Coded morphological data matrix for Spiranthinae and two species of Cranichideae. Character numbers refer to those listed in Appendix 3.

Character	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Specie																														
<i>Aulosepalum pyramidale</i>	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	-	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
<i>Cyclopogon luteoalbus</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	2	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>Deiregyne albovaginata</i>	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	5	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	1	0	0/1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	3	1	0	2	0	2	0	2	1	0	0	0	1	1	1	1
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	1	0	0/1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	4	0	0	2	0	3	0	2	1	0	0	0	1	1	0	1
<i>Dichromanthus michuacanus</i>	1	0	0/1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	3	1	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
<i>Kionophyton sawyeri</i>	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	?	0	1
<i>Mesadenus lucayanus</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
<i>Ponthieva racemosa</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	1	1	2	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>Prescottia plantaginea</i>	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	2	1	0	0	-	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
<i>Sacoila lanceolata</i>	1	1	1	0	0	1	1	0	1	3	0	0	2	0	3	1	0	2	0	2	0	2	1	0	0	0	0	?	1	1
<i>Sarcoglottis assurgens</i>	1	1	1	0	0	1	1	0	1	2	1	0	2	0	1	2	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	?	0	1
<i>Sarcoglottis schaffneri</i>	1	1	1	0	0	1	1	0	1	2	1	0	2	0	1	2	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	?	0	1
<i>Stenorrhynchos glicensteinii</i>	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	3	1	0	2	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1

? = Unknown character state; - = not applicable.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Orchidaceae es una de las familias más estudiadas del reino vegetal, pero también de las más grandes y desafortunadamente aun posee un gran número de especies de las que no conocemos ni siquiera los aspectos más esenciales de su biología, tales como el número cromosómico, su anatomía, el ADN, la biología reproductiva, fitoquímica o el desarrollo floral.

Existe una tendencia hacia la generalización de la información anatómica y ontogenética, con base en unos pocos artículos que suelen contener algunos representantes de diferentes niveles taxonómicos; sin embargo, esta extrapolación no siempre es adecuada, debido a que la variación morfológica es enorme. Obviamente aún queda mucho por desentrañar acerca de la morfología y ontogenia de las orquídeas y este trabajo es una muestra de ello. El análisis minucioso de la organogénesis inicial y del ginostemio en Spiranthinae reveló caracteres que fueron probados y evaluados de forma explícita y que podrán ser analizados posteriormente conforme se genere nueva información.

La necesidad de fundamentar bases para el estudio del desarrollo de las orquídeas de la subtribu Spiranthinae queda parcialmente satisfecha con esta incursión con algunos representantes de los principales clados de la subtribu y a la vez, evidencia que carecemos de estudios suficientes para completar el entendimiento de la evolución morfológica de las flores de estas orquídeas.

La importancia de los estudios del desarrollo se ha acrecentado a partir del surgimiento del análisis de expresión de genes, ya que es esencial entender los

aspectos básicos para posteriormente localizar los genes que regulan el desarrollo de los diferentes órganos. Hasta ahora los estudios del perianto de las orquídeas han permitido hipotetizar un modelo distinto del básico ABC²¹, en el cual interviene al menos un clado extra de genes homeóticos que al interactuar con los otros tres clados regulan el desarrollo del labelo (Mondragón-Palomino y Theißen, 2009). Será interesante comprender qué genes regulan el desarrollo del ginostemio y aquellos que regulan la identidad celular del rostelo.

Se requiere un constante esfuerzo para acumular mayor cantidad de datos del desarrollo con el fin de comprender mejor si existen diferentes rutas ontogenéticas y a su vez como estas han influido en la evolución de la morfología floral en Spiranthinae y otros grupos de orquídeas.

²¹ El modelo ABC intenta explicar desde la perspectiva de la genética molecular y del desarrollo la base biológica de la ontogenia floral, se planteó con base en la especie de crucífera *Arabidopsis thaliana*. El modelo ABC consiste en que los sépalos se caracterizan por la expresión de genes A exclusivamente; en los pétalos, en cambio, se coexpresan los genes A y B; en los estambres, los genes de función B y C establecen su identidad; y en los carpelos, únicamente se requiere de la actividad de genes de función C.

9. CONCLUSIONES GENERALES

La organogénesis en Spiranthinae se da por dos órdenes diferentes de iniciación de sus órganos. En éste trabajo se presenta el primer registro en Spiranthinae de que la antera se desarrolla previamente al sépalo dorsal. Esta condición representa una sinapomorfia para el clado *Spiranthes* (*Aulosepalum pyramidale*, *Mesadenus lucayanus*, *Kionophyton sawyeri*, *Deiregyne albovaginata* y *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*).

Varios de los caracteres morfológicos encontrados en esta investigación son variables en el grupo, como la zona de ruptura del rostelo, la forma del remanente rostelar y la constitución del estigma. Sin embargo, se necesita un muestreo mayor de especies para comprender como se distribuyen tales caracteres en Spiranthinae y aclarar qué estado de carácter es plesiomórfico y cuáles son novedades evolutivas.

Los estudios morfológicos minuciosos en combinación con la filogenia generada a partir de los caracteres moleculares, reflejaron la naturaleza homoplásica de varios de los caracteres morfológicos utilizados previamente en la clasificación de Spiranthinae (e.g. rostelo).

Los estudios ontogenéticos comparativos fueron útiles para comprender mejor el origen de las estructuras florales de Spiranthinae y servirán como base para posteriores estudios del desarrollo floral en éste y otros grupos relacionados.

10. LITERATURA GENERAL CITADA

- AMES, O. 1922. New or noteworthy orchids from different parts of the world. *Orchidaceae* 7:88–140.
- D. S. CORRELL. 1952. Orchids of Guatemala. *Fieldiana (Botany)* 26:1–727.
- BENTHAM, G. 1881. Notes on Orchideae. *Journal of the Linnean Society (Botany)* 18: 281-260.
- BORBA, E. L., G. A. SALAZAR, S. MAZZONI-VIVEIROS Y J.A.N. BATISTA. En prensa. Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister-group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- BURNS-BALOGH, P. 1986. A synopsis of the Mexican Spiranthinae. *Orquídea* 10: 47–96.
- 1988. Monografía del género *Deiregyne* Schlechter (Orchidaceae). *Orquídea* 11: 202–232.
- H. ROBINSON. 1983. Evolution and phylogeny of the *Pelexia* alliance (Orchidaceae, Spiranthoideae: Spiranthinae). *Systematic Botany* 8: 263–268.
- V. A. FUNK. 1986. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae. Smithsonian Contributions to Botany 61. Smithsonian institution, Washington DC. USA. 79 pp.
- H. ROBINSON Y M. S. FOSTER. 1985. The capitates-flowered epiphytic Spiranthinae (Orchidaceae) and a new genus from Paraguay. *Brittonia* 37: 154–162.
- CAMERON, K. M., M. W. CHASE, W. M. WHITTEN, P. J. KORES, D. C. JARRELL, V. A. ALBERT, T. YUKANA, H. G. HILLS Y D. S. GOLDMAN. 1999. A phylogenetic

analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208–224.

— 2007. Molecular phylogenetics of Orchidaceae: the first decade of DNA sequencing. In: K. M. Cameron, J. Arditti y T. Kull. pp. 163–200. *Orchid biology: Reviews and perspectives*, IX, eds. New York: New York Botanical Garden Press.

CHASE, M. W., H. KURZWEIL, P. LINDER, Y P. CRIBB. 2001. Phylogenetics of Orchidoideae. In A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, y F. N. Rasmussen eds. pp. 7–9. *Genera Orchidacearum*, vol. 2, Orchidoideae part 1, Oxford University Press. Oxford, UK.

CORRELL, D. S. 1950. Native orchids of North America north of Mexico. Stanford University Press, Stanford, California, USA.

ESAU, K. 1987. Anatomía de las plantas con semilla. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. 512 pp.

FRANCO PINHEIRO MOREIRA A. S. Y DOS SANTOS ISAIAS R. M. 2008. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 83-93.

HÁGSATER, E., M. A. SOTO, G. A. SALAZAR, R. M. JIMÉNEZ, M. R. LÓPEZ Y R. L. DRESSLER. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México, DF. 304 pp.

HENNING, W. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA.

- KORES, P. J., K. M. CAMERON, M. MOLVRAY Y M. W. CHASE. 1997. The phylogenetic relationships of Orchidoideae and Spiranthoideae (Orchidaceae) as inferred from *rbcL* plastid sequences. *Lindleyana* 12: 1–11.
- P. H. WESTON, M. MOLVRAY Y M. W. CHASE. 2000. Phylogenetic relationships within the Diurideae (Orchidaceae): inferences from plastid *matK* DNA sequences. In K. L. Wilson and D. A. Morrison (eds.). pp. 449–456. *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Collingwood, Australia.
- M. MOLVRAY, P. H. WESTON, S. D. HOPPER, A. P. BROWN, K. M. CAMERON Y M. W. CHASE. 2001. A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany* 88: 1903–1914.
- LINDLEY, J. 1840. The genera and species of orchidaceous plants. Tribe VI. Neottieae, 441-524. J. Ridgway, London, UK.
- LUER, C. A. 1975. The native orchids of the United States and Canada, excluding Florida. New York Botanical Garden. New York, USA.
- MONDRAGÓN-PALOMINO, M. Y G. THEIßEN. 2009. “Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes”. *Annals of Botany* 104:583-94.
- PFITZER, E. 1887. Entwurf einer natürlichen Anordnung der Orchideen. Carl Winter’s Universitätsbuchhandlung, Heidelberg, Germany.
- SALAZAR G. A. Y A. GARCÍA-MENDOZA. 2009. A new species of *Dichromanthus* (Orchidaceae, Spiranthinae) from Oaxaca, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 23–28.

- 2009. DNA, morphology and systematic of *Galeoglossum* (Orchidaceae, Cranichidinae). In A. M. Pridgeon y J. P. Suárez. pp. 161–172. Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja.
- SARMIENTO, F. M. Y G. ROMERO. 2000. Orquídeas Mexicanas. Banco Nacional de Obras y Servicios Públicos- Miguel Ángel Porrúa. México. 148 pp.
- SINCLAIR, E. A., M. PÉREZ-LOSADA Y K. A. CRANDALL. 2005. Molecular phylogenetics for conservation biology. In J. L. Gittleman y A. Purvis, eds. pp. 19–56. Phylogeny and Conservation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- SZLACHETKO, D. L. 1991. *Oestlundorchis* (Orchidaceae, Spiranthinae), a new orchid genus from Mesoamerica. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 36: 23–31.
- R. GONZÁLEZ–TAMAYO. 1996. *Diskyphogyne* (Spiranthinae), a new orchid genus from South America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41: 493–495.
- WILLIAMS, L. O. 1951. The Orchidaceae of Mexico. *Ceiba* 2:1–321.