



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

**DELIMITACIÓN DE ESPECIES EN EL GÉNERO *DICHROMANTHUS***  
**(ORCHIDACEAE, SPIRANTHINAE)**

**TESIS**

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

PRESENTA:  
**MIGUEL CASTAÑEDA-ZÁRATE**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
DR. JUAN FRANCISCO EFRAÍN DE LUNA GARCÍA  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



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.





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

**DELIMITACIÓN DE ESPECIES EN EL GÉNERO *DICHROMANTHUS***  
**(ORCHIDACEAE, SPIRANTHINAE)**

**TESIS**

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

PRESENTA:  
**MIGUEL CASTAÑEDA-ZÁRATE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**COMITÉ TUTOR: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**  
**DR. JUAN FRANCISCO EFRAÍN DE LUNA GARCÍA**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



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 25 de agosto de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CASTAÑEDA ZÁRATE MIGUEL** con número de cuenta **512012926** con la tesis titulada **"Delimitación de especies en el genero *Dichromanthus* (Orchidaceae: Spiranthinae)"**, realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**:

Presidente: DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES  
Vocal: DRA. PATRICIA DOLORES DAVILA ARANDA  
Secretario: DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO  
Suplente: DRA. JULIETA ALEJANDRA ROSELL GARCIA  
Suplente: DR. BRAULIO EDGAR HERRERA CABRERA

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2014.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar los estudios de posgrado en sus instalaciones y por los apoyos recibidos como parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca necesaria para la realización de los estudios de maestría. Esta beca se registró bajo el número de CVU: 412893.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez (Instituto de Biología, UNAM), Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado (Instituto de Biología, UNAM) y al Dr. Juan Francisco Efraín De Luna García (Instituto de Ecología, A.C.), por las sugerencias realizadas, a lo largo de la duración de la maestría, para la elaboración y mejora de esta investigación.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

### A los miembros del jurado:

Dr. Ángel Salvador Arias Montes (Instituto de Biología, UNAM), Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera (Colegio de Postgraduados, Campus Puebla), Dra. Julieta Alejandra Rosell García (Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, UNAM) y Dra. Patricia Dolores Dávila Aranda (Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM), por su apoyo y disposición para la revisión de este manuscrito, así como por sus comentarios, sugerencias y pláticas que tuvieron como fin enriquecerlo.

### Del Instituto de Biología-UNAM:

A la Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado por todos los consejos y el apoyo brindado antes de ingresar al posgrado y durante el estudio del mismo.

A María del Rosario García Peña por su ayuda durante la solicitud de ejemplares a los herbarios extranjeros y por responder a diferentes preguntas relacionadas con el manejo de dichos ejemplares.

A Angélica Hernández Guerrero por ofrecerme y brindarme siempre su apoyo, sacarme de apuros y compartir muchos momentos de alegría. Por todas esas pláticas y por esas noches de películas y series entretenidas.

A mis compañeros del B-201: Ana Gabriela Martínez Becerril, Carolina Granados Mendoza, Claudia Citlalli Gutiérrez Paredes, Claudia Lizbeth Montealegre Zúñiga, Coyolxauhqui Figueroa Batalla, Gabriela Micaela Cruz Lustre, Héctor Miguel Huerta Espinoza y Jesús Ricardo de Santiago Gómez, por sus recomendaciones, respuestas a múltiples dudas, por los picnis y pláticas divertidas. Também a Aline Do Vale (*sensu* Aline) pelas tardes de chupões, o Leonardo Ramos Seixas Guimarães e o Sérgio Akira Adachi, colegas brasileiros que chegaram para compartilhar seus conhecimentos e criar uma bonita amizade.

A Rosalinda Medina Lemos por su ayuda en la identificación de varios ejemplares de mis colectadas efectuadas, como pasatiempo, durante los viajes realizados a la zona de Tehuacán.

A Rocío Verónica González Vázquez por compartir sus conocimientos, inquietudes y por ayudarme a resolver dudas durante el entretenido proceso de titulación, además por los agradables momentos de café-chocolate y sobre todo por los frijoles.

A Rocío González Acosta, auxiliar del posgrado, por su amabilidad y enorme calidez. Por ayudarme con la serie de trámites para diferentes actividades como parte del posgrado.

A Guadalupe Gómez Gen y Verónica González Reyes, secretarias del Departamento de Botánica, por su amistad y disposición para ayudar.

A Claudia Lizeth Varela Vega por su amistad.

**Del Instituto de Ecología-UNAM:**

Al Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli por reclutarme desde Xalapa y sobre todo por su amistad, consejos, consideraciones y por brindarme la oportunidad de colaborar con él. Asimismo, a la Dra. Karina Boege Paré por permitirme colaborar durante la ejecución del proyecto de plantas invasoras.

A Blanca Mejía Alva, Fernanda Baena Díaz, Lislie Solis Montero, Luz Palestina Llamas Guzmán, Nora Villamil Buenrostro, Paula Sosenski Correa, Rubén Pérez Ishiwara, Sofía Ochoa López, Verónica Cepeda Cornejo, Violeta Méndez Solís y Xóchitl Damián Domínguez, por su amistad y por compartir momentos divertidos durante mi transitar por el Laboratorio de Interacción Planta-Animal.

A Sergio Enrique Ramos Castro por ser una gran persona con la cual he pasado momentos increíbles. Por ser mi orientador, consejero y por motivarme a alcanzar mis objetivos en miras de ser un buen investigador. Además por los conocimientos transmitidos y por llevarme de la mano al momento de incursionar en el uso del lenguaje R. En fin, por ser un amigo-hermano-colaborador...un ser humano sin igual.

**Del Herbario AMO:**

A Elizabeth Santiago Ayala, Luis Martín Sánchez Saldaña y Rolando Jiménez Machorro por su ayuda durante la consulta de material bibliográfico y ejemplares de herbario.

**A todas las personas que me ayudaron a resolver varias dudas sobre Morfometría Geométrica:**

Dra. Amelia Chemisquy (Instituto de Botánica Darwinion, CONICET), Lic. Anibal Lezcano (Unidades de Investigación de Biología y manejo de recursos acuáticos, CENPAT), Dr. Fernando Gaspar Dellatorre (Unidades de Investigación de Biología y manejo de recursos acuáticos, CENPAT), M. en C. Itzi Frago Martínez (Facultad de Ciencias, UNAM), Dr. Mirsha Quinto-Sánchez (Unidades de Investigación de Biología y Manejo de Recursos Acuáticos, CENPAT), Dr. Santiago Benitez-Vieyra (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, CONICET), Dr. Santiago Andrés Catalano (Universidad Nacional de Tucumán, CONICET), Dra. Zioneth Judith García Galeano (Universidade de São Paulo).



De **Xalapa:**

A Miriam Saray García Zamora y a Lorena Zamora Quiñones por su amistad, calidez y consejos. También por recibirme en su casa durante mis visitas al INECOL.

Del **Centro de Enseñanza de Lenguas Extranjeras-UNAM:**

A Leidy Aleen Erazo Ñañez, César Eduardo Gómez Cañedo, María Angélica Ruíz Salazar, Melisa Itzel Fabián Ríos y Karla Fernanda Aguirre Reyes, por su amistad y por compartir momentos divertidos mayormente durante las clases de portugués.

Del **Ballet Folklórico-UNAM:**

Abimael Ávila Torres, Alejandra Fabiola Rodríguez Sáyago, Agueda Abigail Domínguez Mateos, Ana Victoria Ramos Ruiseco, Alma Rosa Talavera Gómez, Bencar Valentín Guerrero, Beatriz De Luna Lozano, Carolina Sánchez Ríos, David Ricardo Rangel Géniz, Diana Laura Osnaya González, Diana Páramo Monjaras, Diana Yomalli Álvarez Esquivel, Enrique Ávila Torres, Héctor Gabriel García Mendoza, Jorge Alberto Martínez Reyna, Karla Guadalupe Márquez Gómez, Katia Xochipilzihuitl Garibay Zurita, Leonardo Zaid Martínez Quintero, Laura Lizbeth Lucio Leandro, María de Guadalupe Sánchez Estrada, Mariana Llamas Hernández, Mercedes Fragoso Martínez, Mónica Marina Gómez Melgarejo, Norma Martínez Mendoza, Sixto Sergio Guadarrama Landero y Tiaret Espino Hernández, a todos ellos por compartir conmigo su gusto, amor y pasión por el folklor mexicano.

A **los amigos que hice durante las clases del posgrado:**

Amaranta Ramírez Terrazo, Andrés Ramírez Ponce, Elkin Alexi Noguera Urbano, Geovanni Rodríguez Mirón, Griselda García Rivera, Carolina Guadalupe Piña Páez, Laura Alexandra Rengifo Correa, Leydis Murillo Ramos y Sara López Pérez.

A **los amigos que por casualidades de la vida logré conocer y crear una bonita amistad:**

Adriana Benítez Villaseñor, Ángel Gabriel Becerra Vázquez, Claudia Guillermina Moreno Mejía, Cristóbal Sánchez Sánchez, Edgard Amacosta Velasco, Erika Rosalba Olmedo Vicente, Eva María Piedra Malagón, Concepción Faviola Llamas Guzmán, Humberto Peraza Villarreal, Ilse Alejandra Carmona Reyes, Julieta Álvarez Manjarrez, Nidia Vargas Martínez, Silvia Guadalupe Zumaya Mendoza, Víctor José Trejo Meléndez y Yareli Joselin Cadena Rodríguez.

En fin, a **todas las personas y amistades que antes, durante y después de la maestría he logrado conocer y han hecho amena mi estancia en el Distrito Federal.**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Gerardo Castañeda Romero y Marilú Patricia Zárate Castillo, porque de ellos siempre he recibido amor, comprensión y apoyo.

A mis hermanos Gerardo Ángel, Jairo y Marilú, por su amistad y confianza.

Aunque no existe una forma precisa de agradecerles una vida de lucha, sacrificio y esfuerzos constantes, mi esfuerzo es inspirado en ustedes. Espero que este logro, NUESTRO logro, los motive y continúen alcanzando sus sueños.

“Only a thorough-going study of variation will lighten our darkness”

**Haldane, 1932.**

“Phenotypic variation is the raw material for natural selection,  
yet a century after Darwin, it is an almost unknown subject”

**Leigh Van Valen, 1974.**

"The fundamental observation of biology is morphology.  
Morphological data form the basis of virtually all systematics descriptions”

**MacLeod, 2002.**

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>I. Introducción</b> .....	3
<b>II. Objetivos</b> .....	7
<b>III. Antecedentes</b> .....	8
3.1 Reseña histórica del género <i>Dichromanthus</i> Garay, 1982.....	8
3.2 Morfometría .....	9
3.3 Morfometría tradicional.....	10
3.4 Morfometría geométrica .....	10
3.5 Estudios morfométricos en la familia Orchidaceae.....	12
<b>IV. Metodología</b> .....	15
4.1 Selección del material de estudio.....	14
4.1.1 Ejemplares de herbario.....	14
4.1.2 Ejemplares frescos.....	17
4.2 Recolección y preparación del material de estudio .....	18
4.3 Digitalización del material .....	19
4.4 Registro de coordenadas.....	20
4.5 Morfometría geométrica .....	22
4.6 Morfometría tradicional.....	22
4.7 Análisis estadístico .....	24
4.7.1 Morfometría geométrica .....	24
a) Análisis de Componentes Principales .....	24
b) Diferenciación de formas (Análisis de Variables Canónicas) .....	25
c) Análisis del tamaño .....	25
4.7.2 Morfometría tradicional .....	26
4.8 Reconstrucción filogenética.....	27
a) Filogenia morfométrica .....	27
b) Filogenia molecular.....	28
c) Filogenia combinada .....	29

<b>V. Resultados</b> .....	31
5.1 Morfometría geométrica de los rasgos florales de ejemplares de herbario .....	31
a) Análisis de la forma .....	31
b) Análisis del tamaño .....	38
5.2 Morfometría geométrica de los rasgos florales de ejemplares frescos .....	42
a) Análisis de la forma .....	42
b) Análisis del tamaño .....	46
5.3 Morfometría tradicional de los rasgos florales de ejemplares de herbario .....	50
5.4 Morfometría tradicional de los rasgos florales de ejemplares frescos .....	53
5.5 Comparación de tratamientos.....	55
a) Ejemplares de herbario .....	56
b) Ejemplares frescos .....	58
c) Ejemplares frescos vs. Ejemplares de herbario .....	58
5.6 Variación de caracteres cualitativos .....	60
5.7 Análisis filogenéticos.....	64
5.8 Mapeo de caracteres sobre el árbol más parsimonioso.....	65
<b>VI. Discusión</b> .....	69
6.1 Morfometría geométrica: Variación en la forma y tamaño.....	69
6.2 Morfometría tradicional.....	73
6.3 Cuantificación de la variación en la forma y tamaño .....	75
6.4 Variación en atributos cualitativos .....	77
6.5 La morfometría, una herramienta en taxonomía.....	79
6.6 Filogenia .....	81
<b>VII. Conclusiones</b> .....	83
<b>VIII. Literatura Citada</b> .....	84
<b>IX. Anexo</b> .....	95

## LISTA DE CUADROS

No.	Cuadro	Pág.
1	Relación de morfoespecies integradas de acuerdo a las propuestas de Salazar et al. (2011) y Szlachetko et al. (2005) con número de muestras de ejemplares de herbario.	17
2	Especies, localidades y número de ejemplares frescos incluidos en el estudio.	18
3	Longitudes generadas sobre las configuraciones a partir de las marcas y semimarcas.	24
4	Número de acceso de las secuencias obtenidas de GenBank.	29
5	Eventos de inserción-delección.	29
6	Eigenvalores de los primeros cinco componentes principales y la varianza explicada.	32
7	Parámetros de las tres variables canónicas generadas.	34
8	Matriz de clasificación correcta generada partir del análisis de variables canónicas.	35
9	Eigenvalores de los primeros cinco componentes principales y la varianza explicada.	45
10	Parámetros de las tres variables canónicas generadas.	46
11	Matriz de clasificación correcta generada partir del análisis de variables canónicas.	46
12	Análisis discriminante entre los ejemplares de las morfoespecies consideradas con base en caracteres morfométricos.	51
13	Matriz de clasificación correcta generada a partir del análisis clasificatorio discriminante para los ocho taxa considerados.	53
14	Distancias de Mahalanobis entre los centroides que mostraron diferencias estadísticamente significativas.	53
15	Análisis discriminante entre los ejemplares de los taxa considerados con base en caracteres morfométricos.	54
16	Matriz de clasificación correcta generada a partir del análisis clasificatorio discriminante.	55
17	Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el análisis canónico discriminante (CDA) en ejemplares de herbario.	57
18	Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA sobre los grupos definidos a partir de ejemplares de herbario.	57
19	Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el análisis canónico discriminante en ejemplares frescos.	58
20	Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA para <i>Dichromanthus aurantiacus</i> .	59
21	Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA para <i>Dichromanthus cinnabarinus</i> .	59
22	Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA para <i>Dichromanthus michuacanus</i>	60
23	Resumen de los estadísticos descriptivos para los caracteres morfológicos cuantitativos de <i>Dichromanthus aurantiacus</i> y <i>D. cinnabarinus</i> y <i>D. michuacanus</i>	61
24	Comparación de características entre las especies de <i>Dichromanthus</i> a partir de ejemplares de herbario.	62
25	Comparación de características entre las poblaciones de <i>Dichromanthus</i> estudiadas.	63
26	Características de las filogenias generadas con las diferentes fuentes de datos.	67



## LISTA DE FIGURAS

No.	Figura	Pág.
1	Inflorescencias de las especies de <i>Dichromanthus</i> y su género hermano <i>Deiregyne</i> .	6
2	Bráctea floral y flor de <i>Dichromanthus aurantiacus</i> disectadas, ejemplificando los elementos analizados.	19
3	Ubicación de las marcas y semimarcas registradas para recuperar la forma en las estructuras consideradas.	23
4	Distancias generadas a partir de las marcas y semimarcas registradas.	24
5	Proyección de los ejemplares en el plano de los dos primeros componentes principales.	33
6	Proyección en el plano definido por las variables canónicas 1 y 2 de los ejemplares de herbarioanalizados.	36
7	Cambios en la forma representados por la primera y segunda variable canónica con respecto a la forma consenso.	37
8	Forma promedio de las estructuras de las especies que mostraron diferencias.	38
9	Gráfica de cajas y alambres en donde se muestra la variabilidad existente en el tamaño del centroide de las cinco estructuras de las morfoespecies evaluadas.	41
10	Proyección de los ejemplares de las poblaciones de <i>Dichromanthus</i> en el plano de los dos primeros componentes principales.	44
11	Proyección en el plano definido por las variables canónicas 1 y 2 de los ejemplares frescos analizados.	47
12	Cambios en la forma representados por la primera y segunda variable canónica con respecto a la forma consenso.	48
13	Gráfica de cajas y alambres en donde se muestra la variabilidad existente en el tamaño del centroide de las cinco estructuras en las morfoespecies evaluadas.	49
14	Análisis Canónico Discriminante de las ocho morfoespecies incluidas en el análisis morfométrico.	52
15	Análisis Canónico Discriminante de las cuatro poblaciones de <i>Dichromanthus</i> incluidas en el análisis morfométrico.	55
16	Hipótesis filogenéticas generadas a partir del análisis de la forma y el tamaño.	64
17	Árbol más parsimonioso derivado del análisis de las regiones ITS y <i>trnL-trnF</i> .	65
18	Árbol más parsimonioso derivado del análisis combinado de datos morfométricos, morfológicos y moleculares.	65
19	Optimización de la configuración de las estructuras sobre el árbol del análisis combinado.	68

## RESUMEN

El género *Dichromanthus*, subtribu Spiranthinae (Orchidaceae) está ampliamente distribuido y presenta una gran variación morfológica. Esto ha originado problemas en el reconocimiento y delimitación de sus especies. En el presente trabajo se evaluaron y compararon diversas características morfológicas de la bráctea floral y cinco estructuras florales (ovario, sépalo dorsal, sépalo lateral, pétalo y labelo) en ejemplares de herbario y ejemplares frescos usando morfometría tradicional y geométrica para identificar las especies que integran el género. El análisis con morfometría tradicional y geométrica permitió diferenciar tres especies: *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*. El análisis de la forma de las cinco estructuras reveló diferencias estadísticamente significativas entre las especies. El análisis del tamaño geométrico identificó diferencias significativas pero sólo entre pares de especies. Mediante morfometría tradicional se encontraron siete atributos que expresan diferencias significativas principalmente para la bráctea floral y el sépalo lateral. Una vez seleccionados los caracteres útiles para identificar las especies, se analizaron por separado y en conjunto con secuencias de ADN para postular hipótesis filogenéticas a través de análisis de máxima parsimonia. El análisis combinado arrojó un solo árbol (L = 108.482; IC = 0.97; IR = 0.80), en el que *D. cinnabarinus*, especie tipo, divergió primero.

**Palabras clave:** *Dichromanthus*, filogenia, flores, morfometría geométrica, morfometría tradicional, Orchidaceae, sistemática.

## ABSTRACT

The genus *Dichromanthus*, subtribe Spiranthinae (Orchidaceae) is widespread and exhibits a remarkable morphological variation. This fact has made difficult the recognition of the species and its delimitation. In this work, a set of morphological traits such as the floral bract, ovary, dorsal sepal, lateral sepal, petal and lip from herbarium and fresh material were evaluated and compared using traditional and geometric morphometrics in order to delimit the species belonging to genus *Dichromanthus*. Using both techniques, the analyses identified three species: *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* and *D. michuacanus*. In addition, shape analysis using geometric morphometrics showed statistical differences among the species. Centroid size analyses showed statistical differences, but only among pairs of species. In addition, by means of traditional morphometrics, seven characteristics related to floral bract and lateral sepal were found to be statistically different. After the useful characters for identifying the species were selected, these were individually analyzed and in combination with DNA sequences to postulate phylogenetic hypothesis by maximum parsimony. The combined phylogenetic analysis resulted in only one most parsimonious tree (L= 108.482; IC= 0.97; IR= 0.80), in which *D. cinnabarinus* first diverged.

**Key words:** *Dichromanthus*, floral traits, geometric morphometrics Orchidaceae, phylogeny, systematics, traditional morphometrics.

## I. INTRODUCCIÓN

Incluida en la familia Orchidaceae, la subtribu Spiranthinae (subfamilia Orchidoideae) tiene aproximadamente 40 géneros que se distribuyen exclusivamente en los Neotrópicos, excepto por el género *Spiranthes*, el cual es cosmopolita (Salazar, 2003). Los miembros de Spiranthinae son generalmente terrestres o litofíticos, pero algunos crecen como epífitos. La subtribu difiere de otras fundamentalmente por presentar plantas que poseen raíces fasciculadas, flores resupinadas y labelo adherente a los lados de la columna, con glándulas nectaríferas cerca de la base (Salazar, 2003).

A nivel genérico, las orquídeas de ésta y otras subtribus han sido delimitadas principalmente a partir de caracteres florales y particularmente con base en el rostelo, que es la parte modificada no receptiva del ápice del carpelo medio, una porción de la cual se desarrolla el viscidio (Dressler, 1993). Desafortunadamente, el uso de esta estructura que aporta información limitada para clasificar más de 400 especies que conforman esta subtribu (Salazar, 2003), ha originado una serie de propuestas que difieren notablemente entre sí (Balogh, 1982; McVaugh, 1985; Rutkowski et al., 2008; Szlachetko, 1995; Szlachetko et al., 2005).

Dentro del conjunto de géneros que conforman la subtribu Spiranthinae, el género *Dichromanthus* que se distribuye en el sur de los Estados Unidos, México, Guatemala, El Salvador y Honduras, presenta plantas terrestres que se caracterizan por sus inflorescencias en racimo, generalmente glabras en la parte inferior y pubescentes en la parte superior, cuyas flores se encuentran parcialmente protegidas por brácteas florales prominentes densamente glandular-pubescentes (Salazar, 2003).

Hasta hace poco, *Dichromanthus* representaba uno de los géneros de Spiranthinae no bien definido en su taxonomía y por ello su delimitación presentó dificultades y propició el surgimiento de diferentes propuestas taxonómicas y nombres aplicados a sus especies. Algunas de estas propuestas las incluían en géneros como *Gyrostachys*, *Schiedeella*, *Spiranthes* y *Stenorrhynchos* entre otros. Sin embargo, Salazar y colaboradores (2011), desarrollaron un estudio para probar la monofilia de *Dichromanthus* en sentido amplio y *Stenorrhynchos* en sentido estricto, a fin de entender mejor las relaciones entre ellos. En este estudio se incluyeron 40 especies de la subtribu Spiranthinae, entre ellas las cuatro del género *Dichromanthus* reconocidas por dichos autores. A partir de las similitudes vegetativas, reproductivas y genéticas ellos concluyeron que el género es monofilético y ocupa una

posición dentro del clado *Spiranthes* y que tiene a *Deiregyne* como grupo hermano. Lo anterior contrasta con las propuestas previas que consideraban a *Dichromanthus* como monotípico (Szlachetko, 2005; Rutkowski et al., 2008). También a partir de este trabajo, se encontró que la delimitación tradicional de *Stenorrhynchos* resulta ser polifilética y que el género presenta una posición basal, mientras que *Dichromanthus* ocupa una posición derivada.

*Dichromanthus s.l.* se caracteriza también por presentar una posible sinapomorfía morfológica consistente en un nectario formado por un canal estrecho en la base del labelo, con una glándula nectarífera intramarginal irregularmente engrosada localizada a cada lado (Salazar et al., 2003, 2011). Asimismo, las especies que lo integran tienen flores tubulares, horizontales o ligeramente descendentes, con los pétalos adherentes a los tres sépalos que además tienen contacto con el labelo en su base. Las flores son de color blanco a amarillo limón con venas verde oscuro, rojo con anaranjado y anaranjado-amarillo (Salazar, 2003).

En contraste con el límite genérico así establecido, no son claros los límites entre las especies que lo constituyen. En la actualidad se cuenta con dos propuestas contrastantes de *Dichromanthus*. La primera es apoyada por Szlachetko (1994), Szlachetko et al. (2005) y Rutkowski et al. (2008), en la cual se mantiene al género como monoespecífico e incluye a las demás especies dentro de *Stenorrhynchos*. La segunda fue hecha por Salazar (2003), Salazar & García-Mendoza (2009) y Salazar et al. (2002), y adopta un concepto más amplio. Los simpatizantes de la primera propuesta, a partir de las diferencias en las longitudes de las estructuras florales, consideran a "*Stenorrhynchos*" *aurantiacus* (Lex.) Lindl. y a "*S.*" *pubens* (Rich. & Gal.) Schltr. dentro de lo que Salazar et al. (2011) consideran como *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas. Por otra parte, en la primera propuesta se aceptan y distinguen a "*Stenorrhynchos*" *michuacanum* (Lex.) Lindl., "*S.*" *vexillaris* (Szlach.) Szlach., Rutk. & Mytnik y "*S.*" *xoxonitla* S. Rosillo de V. ex. Szlach., Rutk. & Mytnik, basándose en las diferencias observadas en las longitudes del hipoquilo y epiquilo que son dos porciones en las que se puede dividir el labelo y en la pubescencia de las brácteas florales, principalmente. En cambio otros, incluyen estos tres taxa como *Dichromanthus michuacanus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas (Figuroa et al., 2012; Salazar, 2003; Salazar et al., 2003, 2011). El hallazgo reciente de *D. yucundaa* Salazar & García-Mend. (Salazar & García-Mendoza, 2009), agrega un nuevo taxon como parte del género (Figura 1). En ambas clasificaciones se respeta la especie tipo *Dichromanthus cinnabarinus*, pero Salazar et al. (2011) además distinguen las dos subespecies que Soto (2002) reconoció a partir de

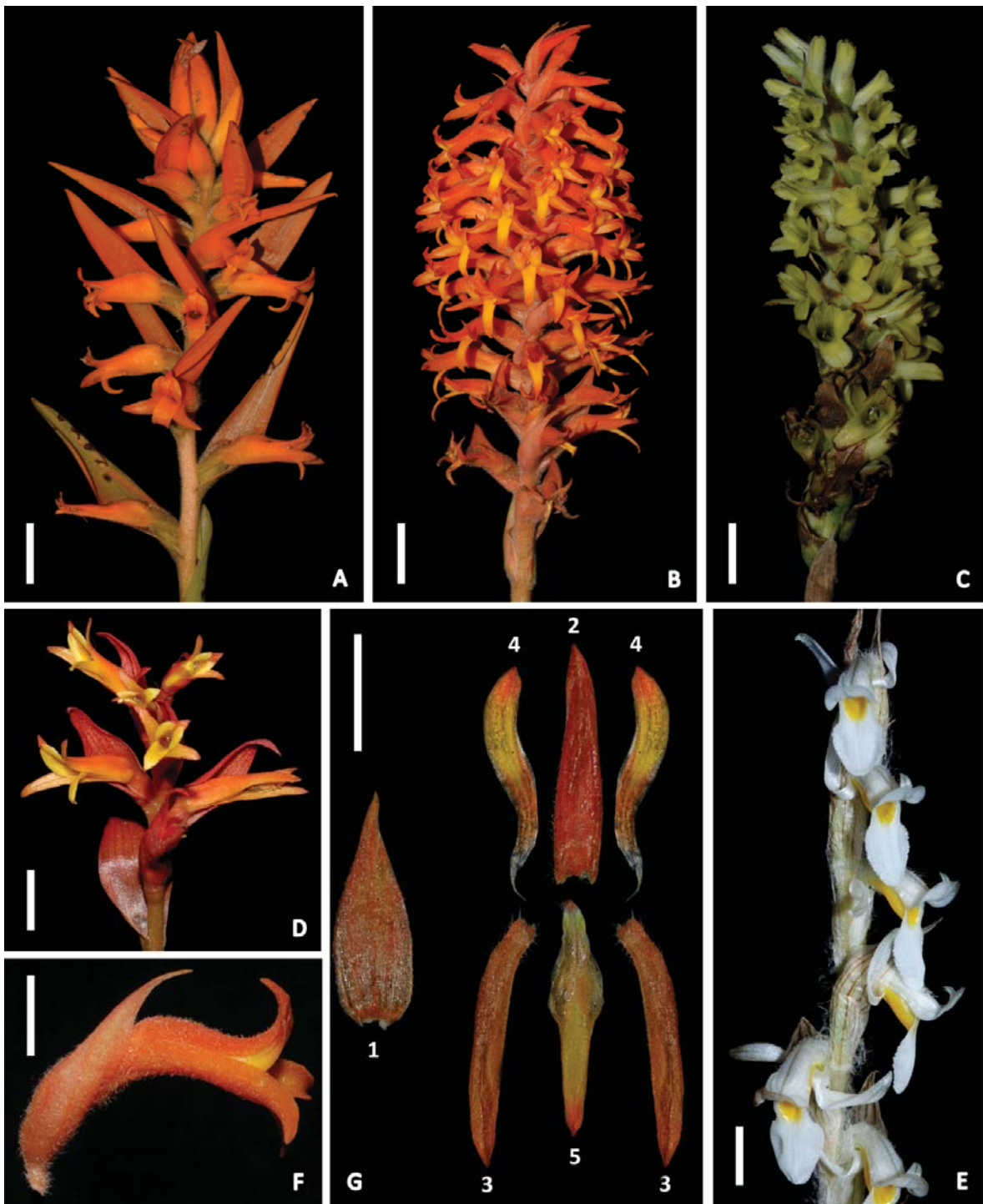
las diferencias en el tamaño de las plantas, inflorescencias y flores. Estas subespecies son *D. cinnabarinus* (Lex.) Garay subsp. *cinnabarinus* y *D. cinnabarinus* (Lex.) Garay subsp. *galeottianum* (Schltr.) Soto Arenas & Salazar.

Las clasificaciones antes mencionadas, indican discrepancias que lejos de facilitar la identificación de las especies complican el reconocimiento de las mismas. Si bien es cierto que las descripciones originales de estos taxa se basaron en una evaluación visual, también es cierto que en ningún caso se pusieron a prueba estadísticamente dichas diferencias y similitudes morfológicas, por lo que los límites propuestos entre cada especie no permiten su clara identificación.

La morfometría y los métodos estadísticos multivariados, de acuerdo a Pinheiro & de Barros (2007) , han sido aplicados previamente dentro de la familia Orchidaceae, para delimitar especies, reconocer el origen híbrido de algunos taxa y han permitido evaluar la variabilidad morfológica en poblaciones o combinar estos diferentes objetivos. Los métodos multivariados con frecuencia hacen posible el reconocimiento de importantes discontinuidades morfológicas y mejoran la selección de caracteres diagnósticos que son de mucha utilidad en taxonomía para la delimitación de los taxa y el entendimiento de sus relaciones filogenéticas (Chiron et al., 2010).

Este estudio investiga las diferencias entre las especies del género *Dichromanthus* mediante morfometría tradicional o clásica, conocida también como morfometría de distancias euclidianas y morfometría geométrica, así como mediante análisis multivariados aplicados a las estructuras florales. Se consideró la evaluación de caracteres florales debido a que en las claves de identificación, son las flores los elementos principalmente empleados para distinguir los taxa. Además, existen evidencias de que las características florales son menos variables que las vegetativas (p. ej.: Rosas-Guerrero et al., 2010; Pélabon et al., 2011, Pélabon et al., 2013). A partir de esto, se espera poder comprender mejor la identidad taxonómica de las especies y así contribuir a aclarar el número de especies que integran al género *Dichromanthus*.





**Figura 1.** Inflorescencias de las especies de *Dichromanthus* y su género hermano *Deiregyne*. A) *Dichromanthus aurantiacus* (Castañeda-Zárata & Ramos-Castro 561). B) *Dichromanthus cinnabarinus* (Castañeda-Zárata 722). C) *Dichromanthus michuacanus* (Castañeda-Zárata & Ramos-Castro 705). D) *Dichromanthus yucundaa* (García-Mendoza & Franco 8744). E) *Deiregyne eriophora* (Salazar et al. 8183). F) Flor tubular de *Dichromanthus cinnabarinus* (Castañeda-Zárata 722). G) Flor disectada de *Dichromanthus cinnabarinus* en donde se aprecian: 1) bráctea floral, 2) sépalo dorsal, 3) sépalos laterales, 4) pétalos y 5) labelo (Castañeda-Zárata 722). Escalas, 2 cm (A-C); 1 cm (D, E, G); 5 mm (F). Fotografías D y E de G. Salazar.

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Delimitar las especies del género *Dichromanthus*, utilizando métodos cuantitativos y repetibles, a partir del uso de morfometría tradicional y geométrica.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Describir la variación morfológica floral de las especies del género *Dichromanthus*, usando caracteres cuantitativos mediante morfometría tradicional y geométrica.
- Identificar caracteres cuantitativos (métricos) que puedan ser utilizados para diferenciar las especies del género *Dichromanthus*, mediante análisis multivariados.
- Explorar el potencial de los caracteres morfométricos para la reconstrucción filogenética en el género *Dichromanthus*, mediante su inclusión en análisis cladísticos.

### III. ANTECEDENTES

#### **3.1 Reseña histórica del género *Dichromanthus* Garay, 1982**

Juan Martínez de Lexarza, en su *Orchidianum Opusculum* (1824) dentro de la obra “*Novorum Vegetabilium Descriptiones*” realizada en colaboración con Pablo de La Llave, describió 50 especies de orquídeas, la mayoría procedentes de los alrededores de Morelia, Michoacán (antes Valladolid). El material tipo que respaldaba estas descripciones está perdido, por lo que la identificación de dichas especies, así como su situación nomenclatural han sido problemáticas. A pesar de lo anterior, el estatus de gran parte de estos taxa ha sido aclarado e incluso en varios casos se han designado neotipos (López-Ferrari & Espejo, 2000).

Entre las especies descritas en esta obra figuran *Neottia aurantiaca* Lex., *N. cinnabarina* Lex. y *N. michuacana* Lex., las cuales fueron transferidas a géneros como *Gyrostachys*, *Schiedeella*, *Spiranthes* y finalmente mantenidas en *Stenorrhynchos*. De las especies antes mencionadas resulta relevante *N. cinnabarina*, ya que Garay (1982) realizó la revisión de la subtribu *Spiranthinae* e identificó en esta especie ciertas características que fueron clave para proponer un género diferente a *Stenorrhynchos*.

Textualmente Garay (1982) indicó: “*Stenorrhynchos cinnabarinus*, planta mexicana común, es otro caso de observaciones erróneas. El género *Stenorrhynchos* siempre se ha caracterizado por su rostelo rígido terminado en punta. Sin embargo, *S. cinnabarinus* presenta un remanente rostelar suave, flexible, linear-oblongo y truncado. Este carácter particular, junto con otros criterios asociados, indican que *S. cinnabarinus* es completamente distinto de *Stenorrhynchos*”. Por lo anterior, Garay creó el género *Dichromanthus*, que de acuerdo a su etimología significa “flores con dos colores” (*di-* dos, *chroma*= color y *anthos*= flor), debido a que éstas presentan coloraciones rojas y amarillas.

Existe otro nombre publicado aplicable a este género, *Cutsis*, que se deriva de la palabra vernácula “*Cutsis*” y que fue propuesto paralelamente a *Dichromanthus*, por Balogh, Greenwood y González (Balogh & Greenwood, 1982). Sin embargo, el nombre dado por Garay tiene prioridad, ya que fue publicado un mes antes. Las características distintivas más notables del género son sus grandes hojas acintadas presentes durante la floración, el racimo denso con flores de dos distintos tonos, anaranjado y amarillo, la antera sagitada, el largo remanente del rostelo, obtuso en la punta

con una cavidad o bolsa y un polinario linear-oblongo, con un viscidio originado en una bolsa en el ápice del rostelo (Burns-Balogh, 1986).

La validez y los límites genéricos y específicos de los “cutsis” han sido debatidos por diversos autores durante cerca de 200 años. En la actualidad permanece cierta confusión y por ello se ha propuesto la existencia de especies distintas de *Dichromanthus*. Por lo anterior, se ha recomendado realizar trabajos para esclarecer el estatus taxonómico de las especies propuestas, las cuales muchas veces presentan diferencias que no son constantes (Szlachetko et al., 2005). De manera general, las descripciones de especies se realizan a partir de características morfológicas únicamente, lo cual no representa inconveniente alguno cuando las entidades poseen características cualitativas que permiten establecer claramente su distinción. Sin embargo, muchos de estos trabajos taxonómicos y comparaciones entre especies están basados en la evaluación visual subjetiva de similitudes y diferencias entre los taxa (Mutanen & Pretorius, 2007).

Si bien, en el caso de *Dichromanthus* existe variación en las estructuras florales y vegetativas entre las especies propuestas, quienes las han identificado no han empleado métodos objetivos que permitan reconocerlas de manera eficiente. Por fortuna existen métodos numéricos que resultan ser una herramienta útil en los estudios de taxonomía, principalmente para evaluar la variación morfológica (Volkova & Shipunov, 2007; De Luna & Gómez-Velasco, 2008; Kaplan & Marhold, 2012; Slovák, 2012). La ventaja de estos métodos es la forma objetiva de tratar los datos, sobre todo si muchas variables están involucradas (Manly, 1994).

### **3.2 Morfometría**

Tanto la clasificación taxonómica de los organismos como la comprensión de la diversidad biológica estuvieron basadas históricamente en la descripción de la morfología (Jensen, 2003). Sin embargo, a principios del siglo XX, la biología experimentó una transición desde un campo meramente descriptivo, en el que se consideraban principalmente caracteres cualitativos, hacia otro más cuantitativo. Igualmente el análisis de las formas biológicas sufrió una tendencia hacia la cuantificación en que su descripción se basa en variables definidas matemáticamente. A partir de entonces, los estudios morfológicos incluyeron datos cuantitativos para una o más variables medibles, que eran comparados entre grupos, pero el posterior desarrollo de métodos estadísticos aumentó la

eficacia de los métodos cuantitativos. A mediados del siglo XX la descripción cuantitativa de las formas se combinó con los análisis estadísticos que describían patrones de variación de la forma, entre y dentro de los grupos, con lo cual nació un nuevo campo en la morfometría (Adams et al., 2004). La cual puede definirse como el estudio cuantitativo de los patrones de covarianza de las formas biológicas con respecto a las forma. Ha sido usada ampliamente en diversas disciplinas (Bookstein, 1991), como la sistemática. El campo se ha desarrollado rápidamente en los últimos veinte años, hasta el punto en que ahora se hace la distinción entre la morfometría tradicional y la geométrica.

### **3.3 Morfometría tradicional**

A partir de su surgimiento, las técnicas de morfometría tradicional, basadas en la aplicación de métodos estadísticos multivariados sobre un conjunto de variables lineales (Rohlf & Marcus, 1993), han sido empleadas en gran número de trabajos biométricos con la finalidad de entender la taxonomía e historia de vida en plantas (p. ej.: Kazandjian, 2011; Ruíz et al., 2010; Sosa et al., 2012) y animales (p. ej.: Marugán-Lobón et al., 2011; Pérez, 2003).

El observar formas y registrar mediciones fue un esfuerzo para entender cómo las formas biológicas varían de una a otra, para establecer la correspondencia entre la forma y su función, así como para cuantificar la descripción de las características usadas en la identificación de las especies (Richtsmeier et al., 2002). En este sentido, la morfometría tradicional mide tamaño y forma que son combinados en un número y cada longitud es la magnitud de una dimensión, una medida de tamaño. Aunque los datos incluyen información acerca de la forma, ésta está contenida en las longitudes, por lo que es difícil separar información sobre la forma a partir del tamaño (Zelditch et al., 2004).

### **3.4 Morfometría geométrica**

Definida como la fusión de la geometría y la biología (Bookstein, 1982), la morfometría geométrica se ocupa del estudio de la forma y el tamaño algebraicamente separados en dos juegos de variables numéricas. Su mayor diferencia respecto de los métodos clásicos es la capacidad de analizar la forma de un objeto directamente, como un todo cohesivo, y no como una serie de mediciones

fragmentadas (Zelditch et al., 2004). La forma es concebida como los atributos de una configuración de coordenadas que resultan invariantes con respecto a los efectos de traslación, rotación y escala geométrica (Rohlf, 2000). Así, las variables morfométricas permiten la reconstrucción completa de la forma por separado de las variables que describen el tamaño (Zelditch et al., 2004).

La morfometría geométrica capta la mayor cantidad posible de información biológica en un menor número de variables tomadas sobre la estructura anatómica que se va a estudiar, lo cual resulta en un mayor poder estadístico para evaluar visual y analíticamente las diferencias de conformación de las estructuras biológicas (Rohlf & Marcus, 1993). La vía para capturar el tamaño y la forma de los objetos se logra mediante el uso de puntos morfométricos o landmarks (Webster & Sheets, 2010).

De acuerdo a Lawing & Polly (2009), en muchas investigaciones biológicas las preguntas a responder conciernen a la forma. Tales preguntas son dirigidas y respondidas con ayuda de pruebas estadísticas, las cuales a menudo requieren una representación cuantitativa del fenotipo que captura los atributos funcionales, genéticos o del desarrollo y que son biológicamente importantes para la hipótesis que se va a probar. Hay muchas aplicaciones taxonómicas de los métodos de morfometría geométrica, como son la identificación de especies crípticas y la asignación de individuos de identidad desconocida a su grupo o especie más probable. Sin embargo, la mayoría de ellos hasta el día de hoy han sido empleados con propósitos zoológicos o paleontológicos, mayormente enfocados a insectos (p. ej.: Gumiel et al., 2003; Matias et al., 2001; Páez-Colasante & Aldana, 2008; Soto-Vivas et al., 2011; Villegas et al., 2002), peces (p. ej.: Pardo et al., 2005; Whitenack & Gottfried, 2010) y mamíferos (p. ej.: Evin et al., 2008; Pérez, 2003). Por lo cual, hay muchos grupos que seguramente requieren tratamientos taxonómicos que utilicen la morfometría geométrica (Shipunov & Bateman, 2005), como en el caso de las plantas.

Aunque existen trabajos en donde se ha evaluado la forma de las semillas (Burger et al., 2011), flores (Savriama et al., 2012; Strelin et al., 2013; van der Niet, 2010) y hojas (p. ej.: Albarrán-Lara et al., 2010; Jensen, 1990; Jensen et al., 1993; Peñaloza-Ramírez et al., 2010; Souza et al., 2012; Viscosi & Cardini, 2011), se considera que la morfometría geométrica es un método prometedor debido a que muchas características botánicas de importancia taxonómica se ajustan y podrían ser resueltas con alguno de sus métodos. Sin embargo, aún son escasos los estudios realizados bajo este enfoque.



### 3.5 Estudios morfométricos en la familia Orchidaceae

Dada la gran diversidad de formas, así como las diferentes interacciones que presentan los integrantes de la familia Orchidaceae, la morfometría ha sido un importante auxiliar para explorar, comprender el desarrollo, diferenciación poblacional y sistemática del grupo. De hecho, existen varios trabajos en que se han empleado de manera conjunta la morfometría y los análisis multivariados para responder preguntas que consideran forma y tamaño, y que tienen implicaciones ecológicas y taxonómicas, principalmente.

En cuanto a morfometría tradicional se refiere, Peakall et al. (1997) realizaron un análisis morfométrico y genético a poblaciones de *Chiloglottis trapeziformis*, *C. valida* y al supuesto híbrido entre ambas (*Chiloglottis* × *pescottiana*). Basándose en siete características vegetativas y florales lograron confirmar el origen híbrido pues los análisis multivariados permitieron distinguir los tres taxa, resultado que coincidió con el estudio genético desarrollado posteriormente.

También han sido identificadas especies nuevas a partir del análisis morfométrico de estructuras vegetativas y florales. Tal es el caso de Palestina & Sosa (2002), quienes al estudiar la variación morfológica de *Bletia purpurea* a lo largo de su distribución geográfica, lograron identificar una nueva especie, *Bletia riparia*, mediante análisis univariados y multivariados de caracteres cuantitativos y cualitativos.

Con el fin de identificar los caracteres que permitieran distinguir diferentes grupos y poder así examinar su circunscripción, Goldman et al. (2004), llevaron a cabo un análisis morfométrico de dos diferentes subconjuntos de *Calopogon*, uno que consideró todas las especies reconocidas como parte del género y otro únicamente con *C. tuberosus*. Este estudio se basó en el análisis multivariado de cuarenta variables florales y vegetativas en plantas vivas. Se encontró que *C. barbatus*, *C. multiflorus*, *C. oklahomensis* y *C. pallidus* deben mantenerse como especies independientes, pero que en el caso de *C. tuberosus*, el reconocimiento de las variedades *latifolius* y *tuberosus* no presenta ningún fundamento, pues la variación observada se explica por la amplia distribución que presenta la especie.

Ponsie et al. (2009) estudiaron el complejo *Bonatea speciosa* con la finalidad de determinar si *B. antennifera*, *B. boltonii* y *B. speciosa* contaban con los caracteres diagnósticos para sugerirlas como especies diferentes o si debían ser consideradas variantes de *B. speciosa*. La variación morfológica en

los catorce caracteres medidos fue explorada con ayuda de análisis de componentes principales y análisis de conglomerados, para así identificar caracteres que pudieran ser utilizados para distinguir entre especies. Esto permitió reconocer tres especies distintas en lugar de una sola entidad.

Con el objetivo de investigar la variación morfológica en flores de *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis*, Salazar-Rojas et al. (2010), realizaron un estudio comparativo del labelo de ejemplares cultivados en jardines caseros en Chilapa, Guerrero. El estudio de esta estructura se fundamentó en que las estructuras reproductivas son menos susceptibles a la variación por efectos ambientales. Se concluyó que el uso de características morfométricas del labelo es útil pues permitió reconocer cuatro morfotipos mediante el uso de análisis multivariados.

Shipunov & Bateman (2005), al emplear técnicas morfométricas para evaluar la diversidad en la forma del labelo en flores de *Dactylorhiza*, encontraron concordancia significativa entre los resultados de morfometría geométrica y morfometría tradicional, así como con la distribución de ciertos marcadores moleculares de ADN nucleares. La forma del labelo de ciertos ejemplares de Rusia Central, que ocupan una posición intermedia entre *D. maculata* y *D. fuchsii*, apoyó el origen híbrido de las *Dactylorhiza* tetraploides del noroeste de Eurasia.

Chemisquy et al. (2009), consideraron la utilidad de los caracteres presentes en las semillas de orquídeas para clasificar y proponer filogenias a nivel supragenérico, estudiaron la morfología de las semillas de varias especies de la tribu Chloraeae mediante técnicas de morfometría tradicional y con herramientas de morfometría geométrica. Lo anterior permitió encontrar que sólo ciertos grupos eran discriminados mediante el uso de la forma; sin embargo, el tamaño de la semilla, expresada como tamaño del centroide resultó ser un carácter variable e informativo a nivel filogenético.

Para reconocer la variación en el tamaño y la forma de las especies que constituyen el género *Mokara*, el cual posee una notoria importancia económica, Dalayap et al. (2011) evaluaron las características cuantitativas y cualitativas de las estructuras florales en plantas vivas. Así describieron la variación de las estructuras y reconocieron cuatro variedades a partir de análisis de Fourier.

Un estudio de índole ecológico con *Geoblasta pennicillata*, orquídea sudamericana polinizada por pseudocopulación por machos de la avispa *Campsomeris bistrimacula*, tuvo por objetivo establecer si el labelo es objeto de selección natural mediado por la preferencia del polinizador (Benitez-Vieyra, 2009). Se encontró que las plantas que mostraban labelos más similares a la hembra

del polinizador no resultaron favorecidas, sino que la imitación exacta no es necesaria para atraer al polinizador.

Un estudio reciente en el que se emplearon técnicas de morfometría tradicional y geométrica, tuvo por objetivo evaluar si las diferencias interespecíficas en la forma del labelo de cuatro especies de *Cryptostylis* influyen en el éxito en el proceso de polinización. Este género es polinizado por los machos de la avispa *Lissopimpla excelsa*, quienes resultan atraídos por la esencia y color del labelo que se asemejan a los de las hembras. Por ello, se realizó un Análisis Elíptico de Fourier para comparar las formas de las flores y los polinizadores. Se halló que las flores de todas las especies son más grandes que el polinizador. Esto sugiere que actúa como un super-estímulo que permite a los polinizadores detectarlas de manera más eficiente (Gaskett, 2012).

Al tener este panorama, en el presente trabajo se pretendió analizar la variación existente en la bráctea floral y las estructuras florales de los integrantes del género *Dichromanthus*. Estos elementos fueron seleccionados, ya que son los primeramente referidos en las clasificaciones existentes y permiten la identificación de las especies. Además porque existe una discrepancia en el número de especies reconocidas por diferentes autores y porque no se cuenta con estudios morfométricos que documenten y analicen objetivamente esta variación. Por lo tanto, se propuso estudiar las estructuras florales de ejemplares de herbario que incluyen toda la distribución conocida del género y de estructuras florales en plantas vivas provenientes de poblaciones del centro del país (D.F., Estado de México e Hidalgo), basándose en técnicas de morfometría tradicional y geométrica.

Se esperaba que a partir del uso de técnicas morfométricas y análisis multivariados se pudiera confirmar la delimitación de las especies de *Dichromanthus*.

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Selección del material de estudio

#### 4.1.1 Ejemplares de herbario

Se revisó el material depositado en herbarios de instituciones nacionales: Herbario AMO (AMO), Instituto Politécnico Nacional (ENCB), Universidad Nacional Autónoma de México (FCME, IZTA y MEXU). También se consultó el material resguardado en colecciones extranjeras: Royal Botanic Gardens (K), Marie Selby Botanical Gardens (SEL), Field Museum of Natural History (F), Harvard University (AMES y GH), New York Botanical Garden (NY), Missouri Botanical Garden (MO) y Smithsonian Institution (US) (Thiers, 2014).

La identificación de cada ejemplar fue revisada e inicialmente se formaron conjuntos a partir de la evaluación visual de las diferencias fenotípicas presentes en los ejemplares. Estos conjuntos se denominaron morfoespecies y para fines prácticos se consideraron como conjuntos de ejemplares con características morfológicas similares que permiten su asignación a una especie en particular. El reconocimiento de morfoespecies atendió a las dos propuestas actuales de clasificación. En la primera, el género *Dichromanthus* está integrado por cinco taxa: *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus*, *D. cinnabarinus* subsp. *galeottianum*, *D. michuacanus* y *D. yucundaa* (Salazar & García-Mendoza, 2009; Salazar et al., 2011; Soto, 2002); mientras que en la segunda se reconocen seis taxa *Stenorhynchos aurantiacus* y *S. pubens*, *D. cinnabarinus*, *S. michuacanus*, *S. vexillaris* y *S. xoxonitla* (Szlachetko et al., 2005).

Los criterios para separar cada una de las morfoespecies fueron los siguientes: *D. aurantiacus* se diferencia de *S. pubens* por poseer brácteas florales más grandes que las flores. Estas brácteas florales son acuminadas y presentan pubescencia en la parte basal. En esta misma especie, *Dichromanthus aurantiacus*, los segmentos del perianto son tres veces más largos que el ovario y los sépalos son cinco veces más largos que anchos y tienen ápices acuminados. Por otra parte, *S. pubens* presenta brácteas florales de tamaño similar al de las flores. Sus brácteas son agudas y pubescentes a lo largo de toda la lámina. Los segmentos del perianto son alrededor de dos veces más largos que el ovario y los sépalos son cuatro veces más largos que anchos y presentan ápices obtusos a subobtusos (Szlachetko et al., 2005).

Dentro de *D. cinnabarinus*, la subespecie *cinnabarinus* puede ser reconocida por poseer plantas de hasta 1.20 m de alto y por presentar inflorescencias cilíndricas o cónicas. En contraste, la subespecie *galeottianum* presenta plantas de menor tamaño y sus inflorescencias son mayormente turbinadas, con sus flores orientadas principalmente hacia una sola dirección (Soto, 2002).

Dentro del grupo *D. michuacanus*, la especie reconocida como tal se distingue por poseer un labelo cuya lámina entera es más ancha hacia la base y gradualmente se atenúa en el ápice. Además sus brácteas florales son pubescentes especialmente en la base y son largamente acuminadas. En *S. vexillaris* el labelo presenta un escotamiento distintivo cerca de la mitad de la lámina, lo que permite distinguir que el hipoquilo y epiquilo son similares en largo y ancho. Al igual que en *D. michuacanus*, sus brácteas florales son pubescentes y largamente acuminadas. Por último, *S. xoxonitla* se caracteriza por tener labelo entero y las brácteas florales glabras (Szlachetko et al., 2005).

*Dichromanthus yucundaa* es similar a *D. cinnabarinus* pero se distingue de ésta porque la primera presenta plantas de 20-30 cm de alto, con inflorescencias glabras y brácteas florales de color rojo, glabras y con su superficie abaxial glauca (Salazar & García-Mendoza, 2009).

Una vez contruidos los grupos de especies, con poco más de ochocientos ejemplares de herbario montados, se seleccionaron aquellos que presentaron inflorescencias con las flores de la porción media en anthesis. Lo anterior debido a que en el estudio se planteó analizar características florales que únicamente pueden ser evaluadas en flores abiertas. Se acotó que, en todos los ejemplares a muestrear, las flores de la parte media de la inflorescencia serían las consideradas en el análisis morfométrico. Tras descartar los ejemplares que no presentaron flores en anthesis en la parte media o que ya presentaban frutos, se procedió a la revisión meticulosa de cada uno a fin de conocer si las flores estaban completas y si éstas podían ser colectadas sin dañar el resto del ejemplar. Esto es relevante porque generalmente en el proceso de montaje las plantas se fijan a la cartulina con ayuda de costuras o pegamento, lo cual muchas veces impide la toma de muestras de ejemplares con características deseables, es decir, con flores sin daño.

El único ejemplar existente de *D. yucundaa* fue descartado porque presentaba frutos en maduración y los segmentos del perianto considerados en el análisis morfométrico no podían ser analizados debido al cambio en la forma. Este cambio en la forma no es comparable con el resto de las flores.

La especie *Deiregyne eriophora* (Robins. & Greenm.) Garay fue incluida en este estudio como grupo de comparación, ya que el género *Deiregyne* es reconocido como género hermano de *Dichromanthus* (Salazar, 2003; Salazar et al., 2011). *Deiregyne eriophora* se distribuye en gran parte de la región geográfica donde se presenta el género *Dichromanthus* y es un elemento característico de sitios montañosos estacionalmente secos (Salazar, 2003).

Después de haber seleccionado los ejemplares de herbario útiles para el estudio, se observó que éstos cubren el área de distribución hasta hoy conocida del género, excepto los Estados Unidos. Por lo que se tuvieron muestras de México, Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua. Una lista de los ejemplares incluidos en el estudio se presenta en el Anexo I. El número de muestras no fue homogéneo debido a las observaciones anteriormente mencionadas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Relación de morfoespecies integradas de acuerdo a las propuestas de Salazar et al. (2011) y Szlachetko et al. (2005) con número de muestras de ejemplares de herbario.

<b>Salazar et al. (2011)*</b>	<b>Muestras</b>	<b>Szlachetko et al. (2005)</b>	<b>Muestras</b>
<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	109	<i>Stenorrhynchos aurantiacus</i>	61
		<i>Stenorrhynchos pubens</i>	48
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>cinnabarinus</i>	144		
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>galeottianum</i>	25	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	169
		<i>Stenorrhynchos michuacantum</i>	35
<i>Dichromanthus michuacantum</i>	51	<i>Stenorrhynchos vexillaris</i>	14
		<i>Stenorrhynchos xoxonitla</i>	2
<i>Dichromanthus yucundaa</i>	0	-	-
<i>Deiregyne eriophora</i>	15	<i>Oestlundorchis eriophora</i>	15
<b>Total</b>	<b>344</b>	<b>Total</b>	<b>344</b>

\* Incluida *D. cinnabarinus* subsp. *galeottianum* propuesta por Soto (2002).

#### 4.1.2 Ejemplares frescos

De manera adicional, se colectaron 126 flores de ejemplares de campo, de *D. aurantiacus* (51), *D. cinnabarinus* (33) y *D. michuacantum* (42). Éstas se analizaron morfológicamente para tener un referente sobre la variación dentro de las poblaciones. Las poblaciones contempladas en el estudio se localizan en el Distrito Federal, Estado de México e Hidalgo (Cuadro 2).



**Cuadro 2.** Especies, localidades y número de ejemplares frescos incluidos en el estudio.

Sitio	Localización	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	<i>Dichromanthus michuacanus</i>
REPSA*	Coyoacán, Distrito Federal.	35	33	-
Rancho Santa Elena	Huasca de Ocampo, Hidalgo.	16	-	-
Santa Inés	Texcoco, Estado de México.	-	-	42

\*REPSA: Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

Los números indican el tamaño de muestra obtenido en cada población.

Los ejemplares de *Dichromanthus aurantiacus* y *Dichromanthus cinnabarinus* recolectados en la REPSA se refirieron como *D. aurantiacus*-DF y *D. cinnabarinus*-DF respectivamente. Las muestras recolectadas en el Rancho Santa Elena, se abreviaron como *D. aurantiacus*-HGO, mientras que las muestreadas en la localidad de Santa Inés como *D. michuacanus*-EDOMEX.

#### 4.2 Caracteres cualitativos

A fin de tener un referente sobre la variación de los caracteres cualitativos tanto de las estructuras reproductivas como vegetativas, se obtuvo información existente en la literatura y se realizaron observaciones de los ejemplares de herbario y frescos. La identificación y reconocimiento de esta variación fue útil porque agrega información necesaria para la adecuada delimitación de las especies que integran al género. Además de los caracteres cualitativos, se conoció a partir de la información de las etiquetas que acompañan a cada ejemplar, la distribución geográfica de cada especie y aspectos sobre su hábitat, así como de su fenología.

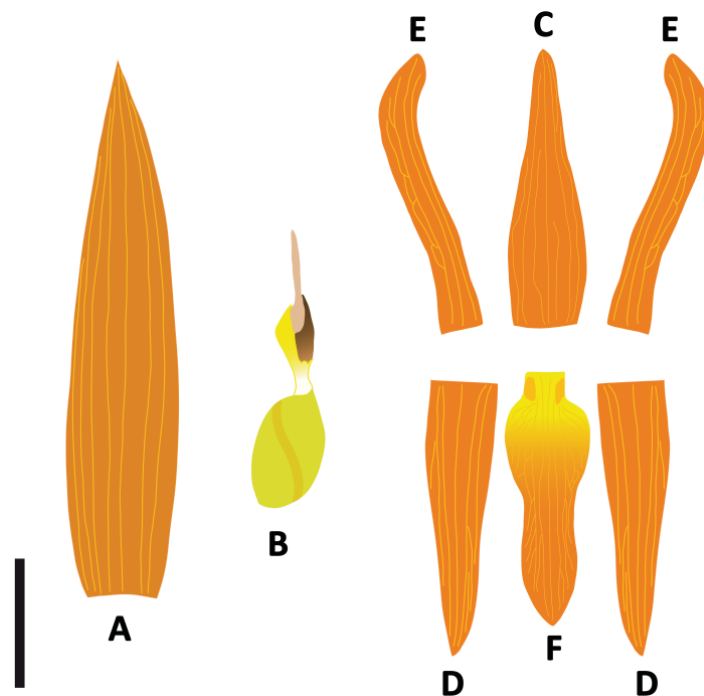
#### 4.2 Recolección y preparación del material de estudio

De cada ejemplar de herbario seleccionado se tomó una flor en antesis, del tercio medio de la inflorescencia, con la ayuda de pinzas y navajas, con la intención de evitar el maltrato del resto de flores. Se hizo una pequeña escisión en la base del ovario donde éste tiene contacto con el escape floral y así se separó la flor. Las flores fueron hervidas a fin de posibilitar su disección. Una vez que fueron rehidratadas, se mantuvieron en alcohol al 50% y 3% de glicerina con el fin de suavizar los

tejidos. En el caso de los ejemplares frescos la recolección de las muestras fue más sencilla. Las flores seleccionadas fueron tomadas con ayuda de pinzas y navaja. Las flores, después de ser separadas del escapo floral, se colocaron en alcohol al 50%.

Las flores y brácteas florales tanto rehidratadas como frescas fueron disectadas bajo un microscopio estereoscópico y posteriormente fueron montadas en tiras de cartulina libre de ácido con cinta invisible. El montaje facilitó su manejo al momento de tomar las fotografías que son la base para proceder al análisis de la forma mediante morfometría geométrica.

Las ocho estructuras consideradas se ilustran en la Figura 2. De éstas, siete son componentes de la flor (sépalos dorsal, sépalos laterales izquierdo y derecho, pétalos izquierdo y derecho, labelo y ovario) y la octava corresponde a la bráctea floral. Como los pétalos y sépalos laterales izquierdos y derechos son homólogos, se optó por emplear únicamente los izquierdos. A partir de este punto se hizo referencia a dichas estructuras como pétalo y sépalos lateral, respectivamente.



**Figura 2.** Bráctea floral y flor de *Dichromanthus aurantiacus* disectadas, ejemplificando los elementos analizados. A) Bráctea floral. B) Ovario. C) Sépalo dorsal. D) Sépalos laterales. E) Pétalos. F) Labelo. Barra= 1 cm.

### 4.3 Digitalización del material

Las partes florales montadas fueron digitalizadas, de manera separada, con el uso de una cámara digital Canon EOS DSLR. Todas las estructuras fueron fotografiadas con la cámara adaptada al tubo C de un microscopio estereoscópico Carl Zeiss SV 11. La bráctea floral fue digitalizada con la cámara montada en un soporte vertical del Foto-estudio Bencher. Para tener una referencia de tamaño se usó una regla milimétrica. Una vez capturadas las imágenes de cada estructura se procedió a registrar las coordenadas.

### 4.4 Registro de coordenadas

Tanto en la bráctea floral como en el sépalo dorsal, sépalo lateral, pétalo y el labelo se pueden reconocer únicamente tres marcas o landmarks, dos en la base y una en la parte apical de cada estructura; el resto consiste de un contorno curvilíneo.

A fin de recuperar la forma de cada estructura se localizaron semimarcas o semilandmarks, porque permiten recuperar información acerca de las características homólogas del contorno, que no son obtenidas con el uso exclusivo de landmarks (Zelditch *et al.*, 2004). Las semimarcas se identificaron en el contorno de cada estructura con ayuda de una plantilla conformada por dos peines mediante el programa MakeFan versión 6, 6<sup>th</sup> Beta (Sheets, 2004). Cada peine constó de 14 líneas, excepto en el labelo en donde se consideraron 20, con lo que se obtuvo una configuración de 27 puntos (24 semimarcas y tres marcas) y 39 puntos (36 semimarcas y tres marcas) respectivamente (Figura 3). Para el ovario se registraron dos landmarks, uno en la base y uno en el ápice, pues como parte del proceso de herborización, durante el prensado, se comprime esta estructura que presenta volumen y se deforma. Por ello, únicamente se empleó en el análisis de morfometría tradicional.

Es relevante mencionar que Szlachetko (1994) y Szlachetko *et al.* (2005) delimitan las especies del grupo *D. michuacanus* (*S. michuacantum*, *S. vexillaris* y *S. xoxonitla*) a partir de las diferencias en el largo y ancho de dos porciones que ellos reconocen en el labelo, es decir, hipoquilo y epiquilo. Sin embargo, el reconocimiento de estas dos porciones en muchos de los ejemplares identificados como parte del grupo *D. michuacanus* y el resto de las especies fue difícil de ubicar o prácticamente imposible, debido a que la lámina no siempre presenta lobulaciones evidentes que permitan delimitar

ambas partes. Como se busca que el método sea objetivo y en morfometría geométrica se requiere reconocer el mismo número de marcas en cada forma a analizar (Zelditch et al., 2004), se optó por no considerarlas y se analizó la forma del labelo como un todo con ayuda de semimarcas.

Las coordenadas “x, y” de las marcas y semimarcas se digitalizaron con el programa tpsDig versión 2.17 (Rohlf, 2013), tras la generación de un archivo con formato .tps, conformado por las imágenes de cada estructura, con el programa tps Utility versión 1.52 (Rohlf, 2012). La matriz con las coordenadas “x, y” se empleó para los análisis de morfometría geométrica y morfometría tradicional.

#### **4.5 Morfometría geométrica**

Las coordenadas de las diferentes estructuras fueron ajustadas por medio de la superposición Procrustes (Bookstein, 1991) a través del criterio de los cuadrados mínimos también llamado análisis Generalizado de Procrustes (Rohlf & Slice, 1990), con el programa CoordGen6 (Sheets, 2005a). Tras minimizar la rotación, traslación y escalamiento de las configuraciones, los contornos se alinearon en el programa SemiLand6 (Sheets, 2002).

Debido a que la simetría es una característica importante en las estructuras florales (Savriama *et al.*, 2012), ésta fue evaluada con ayuda del programa BigFix6 (Sheets, 2001). Las estructuras que presentaron simetría bilateral fueron la bráctea floral, el sépalo dorsal y el labelo, por ello una sola mitad fue empleada con la intención de reducir el número de variables y con ello los grados de libertad, es decir, para evitar incluir información redundante (Cardini & O'Higgins, 2004).

#### **4.6 Morfometría tradicional**

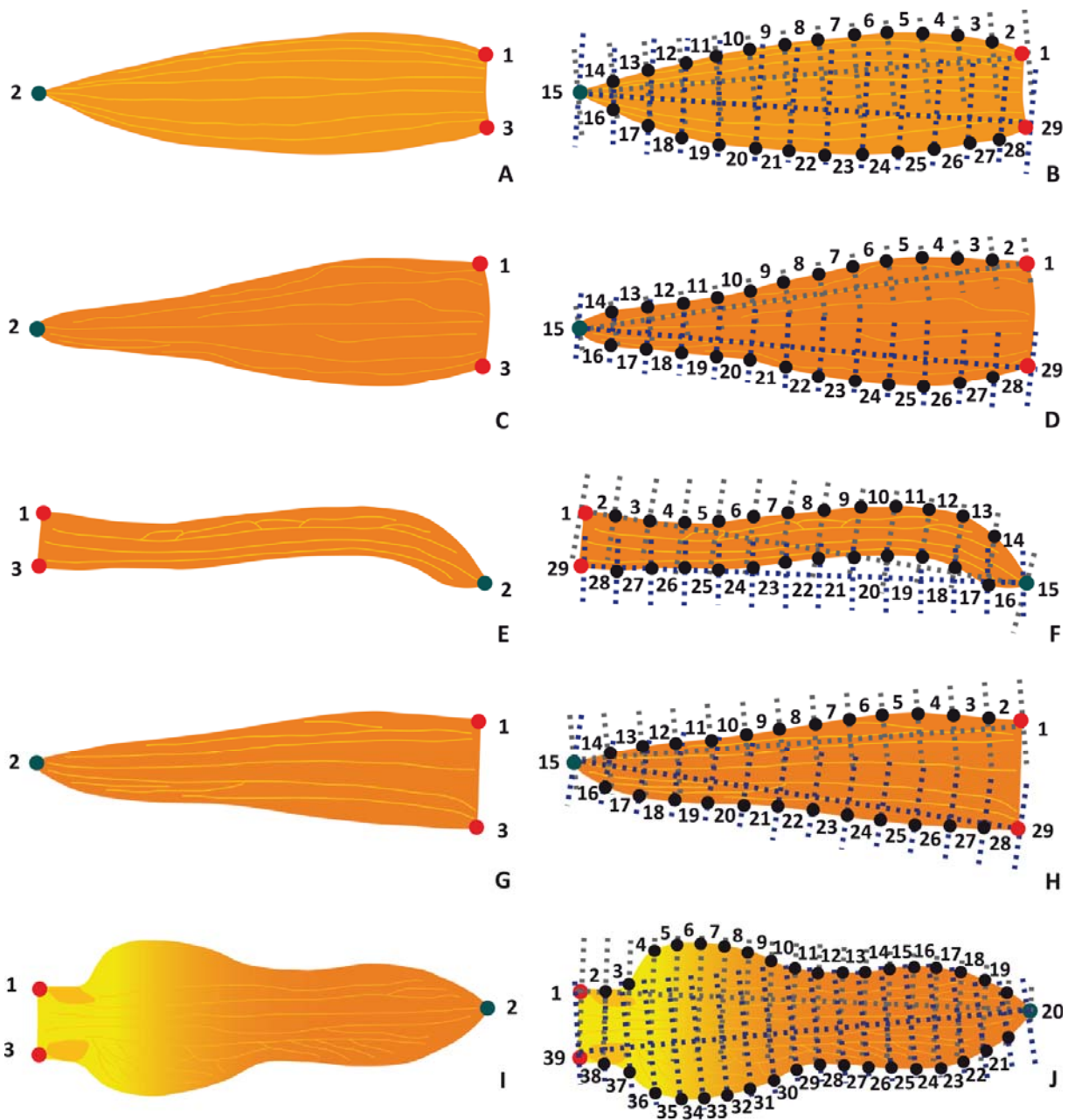
Después de revisar las descripciones y/o diagnosis proporcionadas por Soto (2002), Szlachetko (1994), Szlachetko et al. (2005) y Rutkowski et al. (2008) y establecer los caracteres que según esos autores permiten identificar cada taxón, se decidió realizar un análisis morfométrico tradicional basado en las longitudes obtenidas de dichos caracteres.

A partir de la configuración obtenida para los análisis de morfometría geométrica en las distintas estructuras, se procedió a recuperar las longitudes entre marcas con ayuda del programa TMorphGen6-Traditional Morphometrics Variables Generation Utility (Sheets, 2000). Se empleó este

programa porque permite generar distancias (longitudes) a partir de datos morfométricos basados en coordenadas (landmarks). Para esto, se empleó el archivo con las coordenadas sujetas previamente a superposición Procrustes y se generaron las longitudes. En todos los casos se consideraron las estructuras completas y no una sola mitad de éstas como en el protocolo de morfometría geométrica. En el Cuadro 3 se especifican las medidas consideradas para cada estructura y las marcas empleadas para recuperar las longitudes.

En el caso de la bráctea floral, labelo, pétalo, sépalo dorsal y sépalo lateral se recuperaron cinco longitudes, pero dos de éstas resultan redundantes pues se originan a cada lado de la base hacia el ápice de dichas estructuras (Figura 4). Para eliminar esta redundancia, se optó por promediar el valor de ambas longitudes y así se obtuvo un único valor correspondiente al largo, con lo que el número de medidas para las estructuras arriba mencionadas fue cuatro.

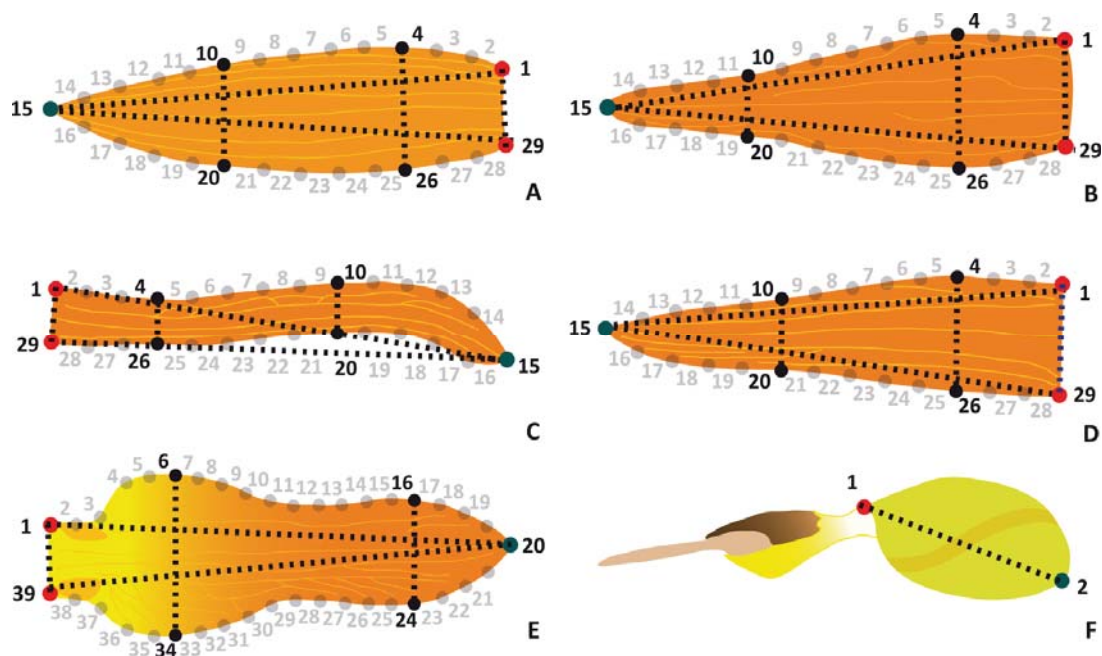
Por último, para el ovario se recuperó una distancia, considerada desde la base hasta el ápice del mismo (Figura 4F).



**Figura 3.** Ubicación de las marcas y semimarcas registradas para recuperar la forma en las estructuras consideradas. A, B) Bráctea floral. C, D) Sépalo dorsal. E, F) Pétalo. G, H) Sépalo lateral. I, J) Labelo. K, L) Ovario. Los círculos de color rojo y azul representan las marcas y los círculos negros las semimarcas.

**Cuadro 3.** Longitudes generadas sobre las configuraciones a partir de las marcas y semimarcas.

Estructura	Distancia (Longitud)	Marcas de apoyo
Bráctea floral	Largo	1-15 y 15-29
	Ancho base	1-29
	Ancho tercio basal	4-26
	Ancho tercio apical	10-20
Labelo	Largo	1-20 y 20-39
	Ancho base	1-39
	Ancho tercio basal	6-34
	Ancho tercio apical	16-24
Pétalo	Largo	1-15 y 15-29
	Ancho base	1-29
	Ancho tercio basal	4-26
	Ancho tercio apical	10-20
Sépalo dorsal	Largo	1-15 y 15-29
	Ancho base	1-29
	Ancho tercio basal	4-26
	Ancho tercio apical	10-20
Sépalo lateral	Largo	1-15 y 15-29
	Ancho base	1-29
	Ancho tercio basal	4-26
	Ancho tercio apical	10-20
Ovario	Largo	1-2



**Figura 4.** Distancias generadas a partir de las marcas y semimarcas registradas. A) Bráctea floral. B) Sépalo dorsal. C) Pétalo. D) Sépalo lateral. E) Labelo. F) Ovario. Los círculos de color rojo y azul representan las marcas y los círculos negros las semimarcas.

## 4.7 Análisis Estadístico

### 4.7.1 Morfometría geométrica

#### a) Análisis de Componentes Principales

La matriz de coordenadas superimpuestas y alineadas fue empleada en el programa PCAGen6 (Sheets, 2005c), para generar las deformaciones parciales (*Partial Warps*) y llevar a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA). Este análisis permitió identificar el número de componentes que contienen la mayor cantidad de información en cuanto a la variación de las estructuras. El PCA es una de las técnicas multivariadas más sencillas, cuyo objetivo es sintetizar la información al reducir la dimensionalidad de las variables, de modo que se pierda la menor cantidad de información posible y pueda describirse adecuadamente la variación de los datos (Manly, 2005). Los *scores* se usaron para graficar y etiquetar los ejemplares de cada especie de acuerdo a la propuesta de Szlachetko et al., 2005. Se empleó el programa R (R Core Team, 2013).

#### b) Diferenciación de formas (Análisis de Variables Canónicas)

Se realizó un Análisis de Variables Canónicas (CVA) con CVAGen6 (Sheets, 2005b). El CVA determina si los grupos definidos *a priori* pueden ser distinguidos estadísticamente basados en datos multivariados. El CVA permitió realizar una prueba de Lambda de Wilk basado en un análisis de varianza multivariado (MANOVA) para saber si existe igualdad o diferencia en la forma promedio de las estructuras florales entre los taxa. El estadístico Lambda de Wilks es usado para determinar qué tan diferentes estadísticamente son unas de otras las variables canónicas. Hallar que una o más variables canónicas son significativamente distintas indica que por lo menos alguno de los grupos puede ser distinguido por dichas variables (Webster & Sheets, 2010). De igual manera, los *scores* fueron empleados para graficar cada ejemplar considerado en el estudio. Lo anterior fue realizado en el programa R (R Core Team, 2013).

En morfometría tradicional cada variable de la función canónica puede descomponerse en cargas canónicas y éstas no pueden interpretarse como cambios en la forma. En cambio, en morfometría geométrica la configuración de las marcas no puede descomponerse, ya que por definición la forma es una característica de todas las variables de deformación relativa. Los cambios



en la forma son interpretados a través de rejillas de deformación (Zelditch *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2010). Las rejillas de deformación, conocidas también como placas finas de deformación, permitieron visualizar los cambios en la forma y fueron generadas en CVAGen6 (Sheets, 2005b). La forma promedio para cada estructura fue recuperada y el nombre aplicado a dichos contornos fue asignado con ayuda de la clasificación, para tipos de forma de estructuras planas, propuesta por Moreno (1984).

### **c) Análisis del tamaño**

El estimador de tamaño corresponde al tamaño del centroide (CS). El tamaño del centroide es definido como la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado, de un conjunto de landmarks al centroide que ellos definen (Zelditch *et al.*, 2004). El tamaño del centroide es utilizado en morfometría geométrica porque condensa toda la información del tamaño y en ausencia de alometría, no se correlaciona con ninguna variable de forma (Bookstein, 1986), cuando los landmarks están distribuidos alrededor de su media independiente y presentan pequeñas e iguales varianzas en cada punto y en cada dirección.

Para analizar el tamaño de las estructuras florales se compararon los valores del tamaño del centroide entre los diferentes taxa mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey. El análisis de varianza es una técnica que se usa para probar hipótesis acerca de las medias de diferentes tratamientos que se ensayan (Daniel, 1984).

De acuerdo a Montgomery (2003), la prueba de Tukey es la prueba más aplicada y preferida por los estadísticos, pues controla de mejor manera los dos errores ampliamente conocidos en la estadística ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Esta prueba permite hacer todas las posibles comparaciones de tratamientos de dos en dos.

Los valores del tamaño del centroide se emplearon como variables dependientes y los grupos *a priori* como variables independientes. Los análisis se llevaron a cabo para cada conjunto de datos, es decir, se analizaron los ejemplares de herbario y los frescos por separado y también de manera conjunta. Estos análisis se llevaron a cabo con el programa R (R Core Team, 2013).

#### 4.7.2 Morfometría tradicional

De acuerdo al Cuadro 3, el número de variables correspondientes a las longitudes obtenidas para cada estructura varió. Las 21 variables cuantitativas fueron empleadas para realizar un Análisis Canónico Discriminante (CDA), el cual fue seguido de un análisis discriminante clasificatorio con el propósito de corroborar que los individuos estaban correctamente asignados a las especies identificadas por el CDA (Marhold, 2011). El CDA permitió identificar el subconjunto de caracteres que separó a las especies (Manly, 1994). Los caracteres que presentaron los valores de carga más alta en las tres primeras funciones canónicas se les aplicó un ANOVA, seguido de un análisis de comparación de medias de Tukey para detectar las diferencias significativas entre los taxa. Los análisis se llevaron a cabo con el programa R (R Core Team, 2013).

#### 4.8 Reconstrucción filogenética

Tras realizar los análisis morfométricos de las estructuras florales de las siete morfoespecies identificadas, fue posible identificar únicamente tres especies como parte del género *Dichromanthus*. Con la finalidad de inferir las relaciones filogenéticas entre estas especies, se construyeron matrices de cuatro terminales, incluido el grupo externo, con información obtenida de diferentes fuentes. Los datos morfométricos de tamaño (tamaño del centroide) y forma (Coordenadas Procrustes), así como los moleculares fueron analizados por separado. Posteriormente, los diferentes conjuntos fueron reunidos en una matriz para efectuar un análisis combinado.

En todos los casos, la generación de la hipótesis filogenética bajo el método de Máxima Parsimonia se realizó con el programa TNT (Goloboff *et al.*, 2003, 2008). Se empleó el algoritmo de enumeración implícita para la búsqueda de las hipótesis más parsimoniosas. Para calcular la confiabilidad estadística de las ramas de los árboles, se aplicaron técnicas de remuestreo por bootstrapping (Felsenstein, 1985) y jackknifing (Farris *et al.*, 1996). Se generaron 1000 réplicas y búsquedas para cada técnica, también por enumeración implícita. En el caso del jackknifing se empleó un porcentaje de delección de 40%.

Los cambios en los atributos de la forma de todas las estructuras, fueron optimizados tras realizar el análisis combinado que incluyó los datos morfométricos, morfológicos y moleculares. El

método para la optimización de landmarks bidimensionales o tridimensionales se llevó a cabo directamente sobre el árbol y se basó en el uso de gradillas y su subsecuente refinamiento iterativo de los puntos iniciales estimados (Goloboff & Catalano, 2011). A continuación se especifica el conjunto de datos empleados para cada una de las filogenias generadas.

#### **a) Filogenia morfométrica**

Se realizaron análisis por separado para evaluar los datos correspondientes a la forma y el tamaño. En el primer caso, se emplearon las coordenadas Procrustes y para el segundo el tamaño del centroide y la longitud del ovario. Debido a que el tamaño del centroide resume el tamaño de las estructuras, se optó por emplear éste y no las longitudes que resultaron útiles en la separación de los taxa. Se consideraron como valores del tamaño del centroide y longitud del ovario, a los valores comprendidos en un intervalo entre la media menos la desviación estándar y la media más la desviación estándar ( $\bar{X} \pm \sigma$ ).

De acuerdo a Catalano et al. (2010), las variables de forma (landmarks alineados) fueron analizadas de manera individual con ayuda del script *LandschW.run* (Catalano, 2012), con el fin de conocer su utilidad para generar hipótesis filogenéticas. El método para usar los landmarks en el análisis filogenético se basa en encontrar, para cada landmark, la posición que minimiza la distancia entre el ancestro/descendiente de los puntos a lo largo del árbol (Catalano et al., 2010; Catalano & Goloboff, 2012). También se analizó la matriz combinada con las configuraciones de la bráctea floral, sépalo dorsal, pétalo, labelo, y sépalo lateral.

#### **b) Filogenia molecular**

Se incluyeron datos moleculares correspondientes a dos marcadores de ADN altamente variables: la región de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal nuclear (nrITS) y la región del plástido *trnL-trnF*, el cual incluye el intron de *trnL*, el espaciador intergenérico entre *trnL* y *trnF* y porciones cortas de los exones de las series *trnL* y *trnF*. Estas dos regiones han sido usadas de manera previa, ya sea solas o en combinación con otra u otras regiones del ADN para la reconstrucción filogenética de Spiranthinae (Salazar et al., 2003; Figueroa et al., 2008; Salazar et al., 2011).

Las secuencias fueron obtenidas de GenBank y corresponden a las generadas previamente por Salazar et al. (2011). Para estos análisis también se incluyó a *Deiregyne eriophora*, como grupo de comparación, para arraizar el cladograma (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Número de acceso de las secuencias obtenidas de GenBank.

<b>Especies</b>	<b>nrITS</b>	<b>trnL-trnF</b>
<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	FN996957	FN996971
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	FN996952	FN996964
<i>Dichromanthus michuacanus</i>	FN996955	FN996969
<i>Deiregyne eriophora</i>	FN641873	FN641885

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo a través de MAFFT Aligment versión 7 (Katoh & Standley, 2013) y posteriormente ésta se corroboró manualmente con ayuda del programa PhyDe v0.9971 (Phylogenetic Data Editor, Müller, 2010). Una vez editadas las secuencias de ambos marcadores fueron concatenadas en PhyDe.

Para maximizar la señal filogenética, las inserciones/deleciones en las matrices de nrITS y *trnL-trnF* fueron codificadas mediante el método de codificación simple de Simmons & Ochoterena (2000), con ayuda del programa SeqState v1.4.1 (Müller, 2005). Las inserciones/deleciones comúnmente abreviadas como “*indel*”, son un tipo de variación genética en la que una secuencia de nucleótidos específica está presente (inserción) o ausente (delección), y son el resultado de errores en la replicación de la información genética (Vandamme, 2009). Se presentaron diez eventos de inserción-delección y de éstos nueve resultaron ser autapomórficos y solo uno fue sinapomórfico (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Eventos de inserción-delección.

<b>Número de indel</b>	<b>Marcador</b>	<b>Posición</b>	<b>Carácter</b>
1	nrITS	12	Autapomorfía
2		199	Autapomorfía
3	<i>trnL-trnF</i>	762-770	Autapomorfía
4		763-770	Autapomorfía
5		765-770	Autapomorfía
6		771-776	Autapomorfía
7		993-999	Sinapomorfía
8		1110-1116	Autapomorfía
9		1350-1356	Autapomorfía
10		1490-1501	Autapomorfía

### **c) Filogenia combinada**

Los diferentes conjuntos de datos, morfométricos y moleculares, se conjuntaron para llevar a cabo un análisis combinado en TNT. La matriz combinada se analizó al emplear el script *Land\_searches.run* (Catalano, com. pers.), el cual permite hacer análisis combinando datos de landmarks (coordenadas) con otras fuentes de evidencia. Dicho script fue modificado para realizar 1000 réplicas y se especificaron un par de argumentos, el primero indica la precisión en la optimización de los landmarks y el segundo evalúa cada re-arreglo durante el TBR (intercambio de ramas por bisección-reconexión) considerando el mejor alineamiento (Catalano, 2012). El primer argumento se modificó a cuatro, lo que indica que el análisis fue riguroso y el segundo se mantuvo en uno, lo cual hace saber que hubo re-alineamiento. En este caso, cada réplica comienza a partir de un árbol de Wagner y es seguido por un TBR. Al final, sólo un árbol es guardado.

Después de obtener la filogenia con los datos combinados, los landmarks fueron optimizados directamente sobre el árbol generado, mediante el uso del algoritmo propuesto por Goloboff & Catalano (2011), el cual permite mapear los caracteres morfométricos para obtener ancestros más parsimoniosos.

## V. RESULTADOS

### 5. 1 Morfometría geométrica de los rasgos florales de ejemplares de herbario

#### a) Análisis de la forma

El análisis de componentes principales (PCA) permitió examinar la similitud de los ejemplares sin considerar su pertenencia a un grupo específico, es decir, se determinó de acuerdo a las distancias individuales producidas por los coeficientes de ordenación en cada componente principal resultante. El número de componentes principales (PC) y la variación que explica cada uno difirió en cada estructura, pero en general los primeros dos explican más del 60% de la variación (Cuadro 6). Asimismo, la posición de los ejemplares fue variable, pero para todas las estructuras se observó la presencia de al menos tres grupos. Estos grupos corresponden a los formados por: 1) *Dichromanthus aurantiacus* y *Stenorrhynchos pubens*, 2) *D. cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus* y *D. cinnabarinus* subsp. *galeottianum* y 3) *D. michuacanus*, *S. vexillaris* y *S. xoxonitla* (Figura 5). En algunos casos, dichos grupos fueron más evidentes que en otros.

Posterior al PCA se realizó un análisis de variables canónicas (CVA) de tipo discriminante y se obtuvo la proporción de especies re-clasificadas y análisis de varianza multivariado (MANOVA) por cada eje canónico. Para cada estructura evaluada se obtuvieron tres variables canónicas significativas (Cuadro 7). Estas tres variables permitieron identificar cuatro grupos integrados por: 1) *Dichromanthus aurantiacus* y *Stenorrhynchos pubens*, 2) *D. cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus* y *D. cinnabarinus* subsp. *galeottianum*, 3) *D. michuacanus*, *S. vexillaris* y *S. xoxonitla*, y 4) *Deiregyne eriophora*. La clasificación de las 344 muestras en los grupos *a priori* se basó en la morfología tradicional, mientras que su re-clasificación *a posteriori* se basó en las distancias de Mahalanobis de los individuos a las medias de los grupos definidos *a priori*. El porcentaje de reclasificación correcta osciló entre el 70 y 100 tanto para las especies de *Dichromanthus* como para el grupo de comparación, lo que indica una elevada confiabilidad para delimitar las especies que integran a *Dichromanthus* (Cuadro 8). Debido a que únicamente se reconocieron cuatro grupos, en la asignación *a posteriori* se hizo referencia a éstos como: 1) *Dichromanthus aurantiacus*, 2) *D. cinnabarinus*, 3) *D. michuacanus* y 4) *Deiregyne eriophora*. La separación y dispersión de los ejemplares de estos cuatro grupos de morfoespecies se proyectó en el espacio multifactorial (Figura 6). Para el caso del labelo,

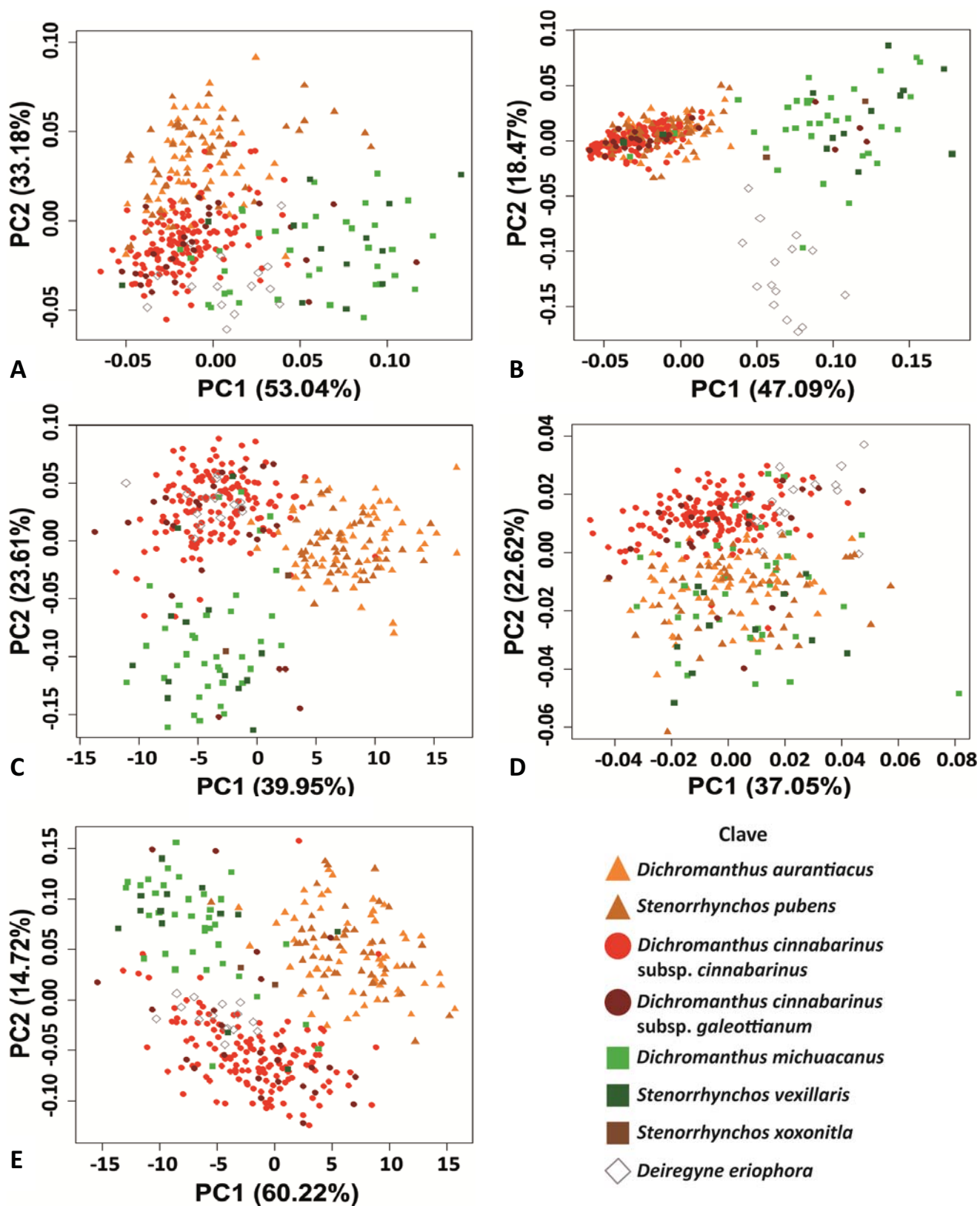
pétalo y sépalo lateral, dicha separación fue más evidente en comparación con la bráctea floral y el sépalo dorsal.

En todas las configuraciones, el uso de las gradillas de deformación permitió observar el desplazamiento de las variables con respecto a la configuración promedio (Figura 7). Los cambios en la forma pudieron ser observados claramente en los diagramas de formas promedio (Figura 8).

De acuerdo a los resultados que se presentaron con el PCA y principalmente con los observados con el CVA, se tiene que el análisis de la forma de las cinco estructuras: bráctea floral, labelo, pétalo, sépalo dorsal y sépalo lateral, permite el reconocimiento de tres especies como parte de *Dichromanthus*. Estas especies coinciden con las reconocidas por Salazar et al. (2011).

**Cuadro 6.** Eigenvalores de los primeros cinco componentes principales y la varianza explicada.

<b>Estructura</b>	<b>Componente principal</b>	<b>Eigenvalores</b>	<b>Varianza explicada</b>	<b>Porcentaje acumulativo</b>
Bráctea floral	1	$1.01 \times 10^{-7}$	0.5304	53.04
	2	$1.87 \times 10^{-7}$	0.3318	86.22
	3	$3.53 \times 10^{-7}$	0.0538	91.60
	4	$4.75 \times 10^{-7}$	0.0222	93.82
	5	$9.44 \times 10^{-7}$	0.0195	95.78
Labelo	1	$4.57 \times 10^{-7}$	0.4709	47.09
	2	$1.17 \times 10^{-6}$	0.1847	65.56
	3	$1.22 \times 10^{-6}$	0.1486	80.42
	4	$1.98 \times 10^{-6}$	0.0383	84.26
	5	$2.26 \times 10^{-6}$	0.0291	87.17
Pétalo	1	$2.19 \times 10^{-7}$	0.3995	39.95
	2	$3.37 \times 10^{-7}$	0.2360	63.56
	3	$3.93 \times 10^{-7}$	0.1545	79.01
	4	$5.29 \times 10^{-7}$	0.0616	85.17
	5	$7.26 \times 10^{-7}$	0.0412	89.29
Sépalo dorsal	1	$1.33 \times 10^{-7}$	0.3705	37.05
	2	$2.40 \times 10^{-7}$	0.2262	59.67
	3	$4.96 \times 10^{-7}$	0.1648	76.15
	4	$8.05 \times 10^{-7}$	0.0615	82.30
	5	$1.17 \times 10^{-6}$	0.0495	87.26
Sépalo lateral	1	$1.21 \times 10^{-7}$	0.6022	60.22
	2	$1.33 \times 10^{-7}$	0.1472	74.94
	3	$2.11 \times 10^{-7}$	0.0812	83.06
	4	$2.90 \times 10^{-7}$	0.0533	88.40
	5	$4.52 \times 10^{-7}$	0.0296	91.36



**Figura 5.** Proyección de los ejemplares en el plano de los dos primeros componentes principales. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral. Los números al interior de los paréntesis indican el porcentaje de variación explicada por cada componente principal (PC).

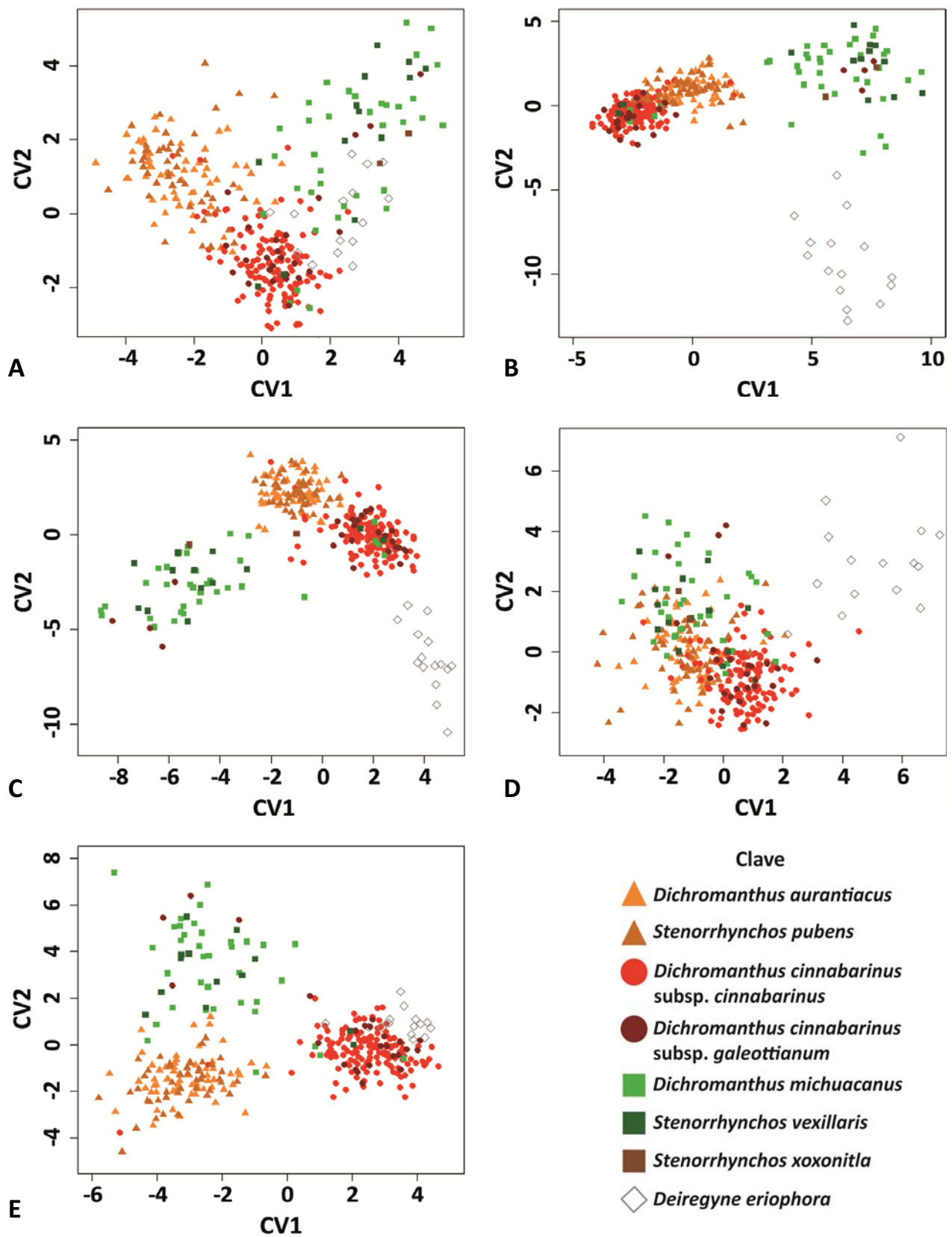


**Cuadro 7.** Parámetros de las tres variables canónicas generadas.

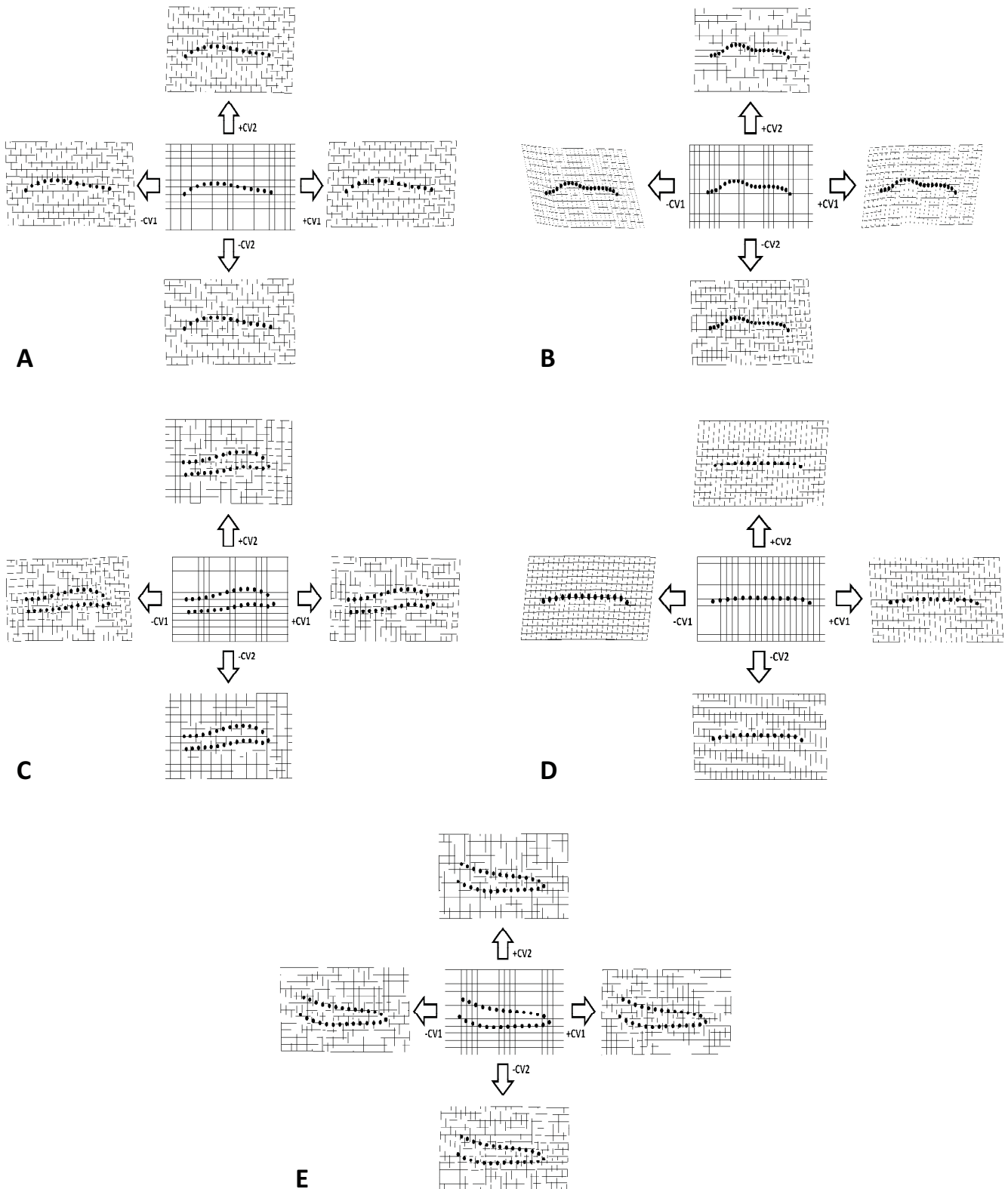
<b>Estructura</b>	<b>Variable canónica (CV)</b>	<b>Eigenvalores</b>	<b>Varianza explicada</b>	<b>Varianza acumulada (%)</b>	<b>R</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b><math>X^2</math></b>	<b>gl</b>	<b>P</b>
Bráctea floral	1	3.4100	57.9597	57.95	0.8793	0.0561	947.8904	72	<0.0001
	2	2.2158	37.6623	95.62	0.8300	0.2473	459.6984	46	<0.0001
	3	0.2575	4.3780	100.00	0.4525	0.7952	75.4010	22	<0.0001
Labelo	1	11.4711	63.9125	63.91	0.9590	0.0051	1702.0541	108	<0.0001
	2	4.7881	26.6683	90.58	0.9095	0.642	886.8872	70	<0.0001
	3	1.6911	9.4192	100.00	0.7927	0.3716	319.7604	34	<0.0001
Pétalo	1	7.1916	49.4466	49.44	0.9369	0.0058	1627.8236	150	<0.0001
	2	4.5650	31.3875	80.83	0.9057	0.0474	963.2393	98	<0.0001
	3	2.7875	19.1659	100.00	0.8578	0.2640	420.8219	48	<0.0001
Sépalo dorsal	1	2.0985	52.3125	52.31	0.8229	0.0871	802.8137	72	<0.0001
	2	1.3094	32.6420	84.95	0.7529	0.2700	430.7362	46	<0.0001
	3	0.6035	15.0453	100.00	0.6135	0.6236	155.3602	22	<0.0001
Sépalo lateral	1	7.8312	65.5550	65.55	0.9416	0.0129	1374.2193	150	<0.0001
	2	2.8223	23.6257	89.18	0.8592	0.1141	685.8780	98	<0.0001
	3	1.2924	10.8193	100.00	0.7508	0.4362	262.1652	48	<0.0001

**Cuadro 8.** Matriz de clasificación correcta generada partir del análisis de variables canónicas.

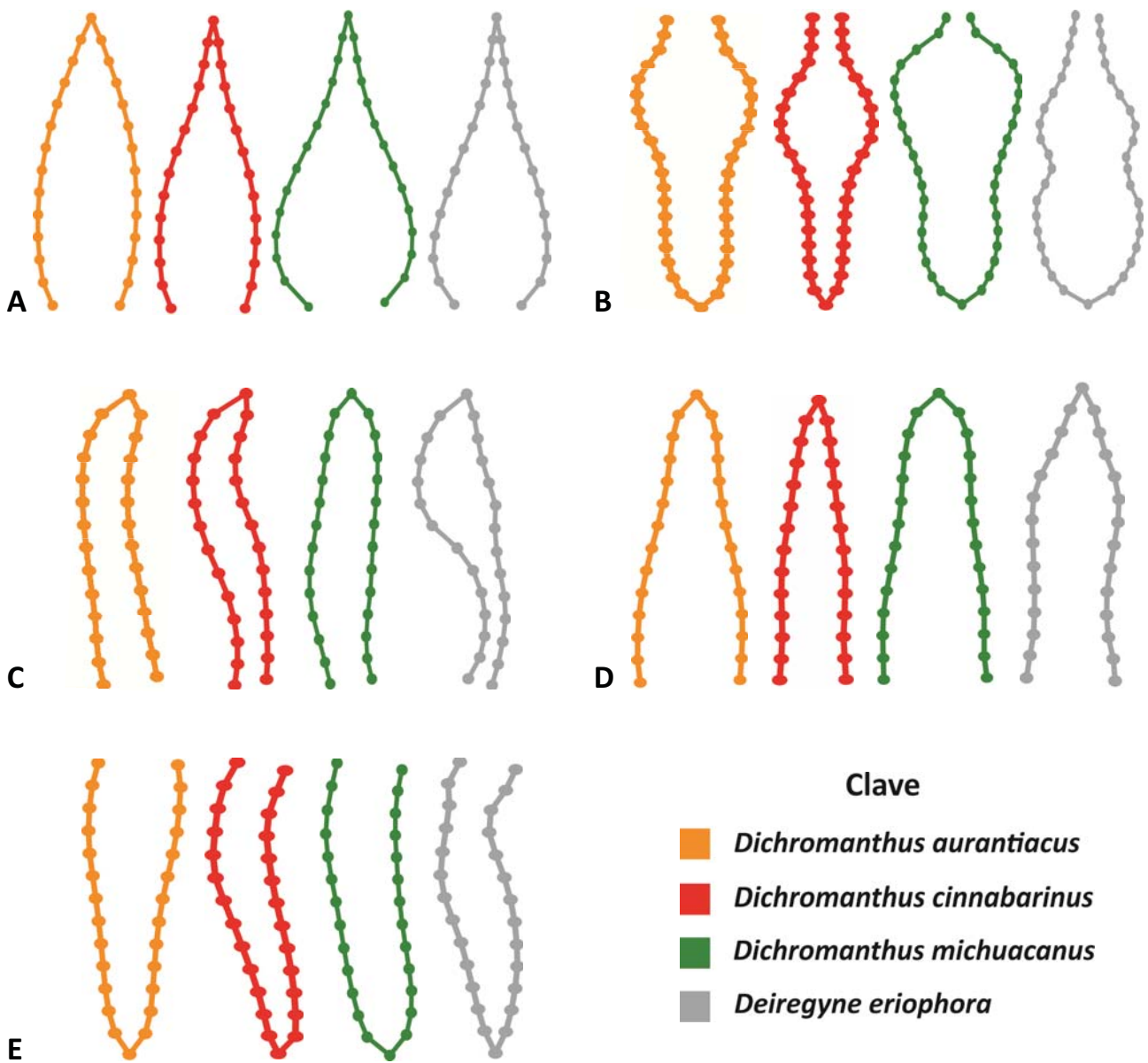
Estructura	Asignaciones <i>a priori</i>	Asignaciones <i>a posteriori</i>				Total	Clasificación correcta (%)
		<i>Da</i>	<i>Dc</i>	<i>Dm</i>	<i>De</i>		
Bráctea floral	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	99	7	1	2	109	90.82
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	6	156	1	6	169	92.30
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	2	2	36	11	51	70.58
	<i>Deiregyne eriophora</i>	0	2	0	13	15	86.66
Labelo	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	105	4	0	0	109	96.33
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	5	164	0	0	169	97.04
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	1	0	50	0	51	98.09
	<i>Deiregyne eriophora</i>	0	0	0	15	15	100
Pétalo	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	108	1	0	0	109	99.08
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	2	167	0	0	169	98.81
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	2	1	48	0	51	94.11
	<i>Deiregyne eriophora</i>	0	0	0	15	15	100
Sépalo dorsal	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	93	7	9	0	109	85.32
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	11	154	3	1	169	91.12
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	7	3	41	0	51	80.39
	<i>Deiregyne eriophora</i>	0	1	0	14	15	93.33
Sépalo lateral	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	108	0	1	0	109	99.08
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	1	166	0	2	169	98.22
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	3	0	48	0	51	94.11
	<i>Deiregyne eriophora</i>	0	1	0	14	15	93.33



**Figura 6.** Proyección en el plano definido por las variables canónicas 1 y 2 de los ejemplares de herbario analizados. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral.



**Figura 7.** Cambios en la forma representados por la primera y segunda variable canónica (CV1 y CV2) con respecto a la forma consenso. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral.



**Figura 8.** Forma promedio de las estructuras de las especies que mostraron diferencias. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral.

### b) Análisis del tamaño

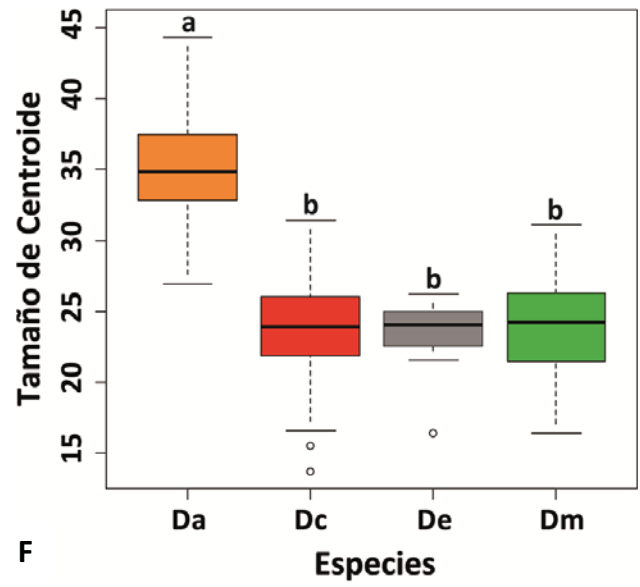
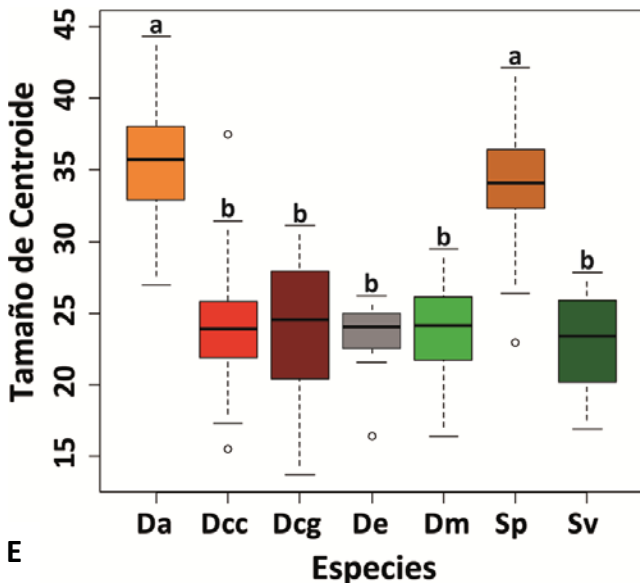
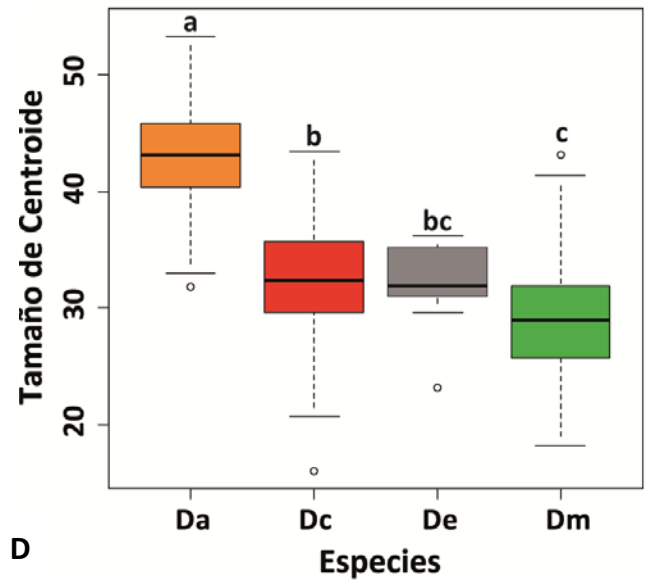
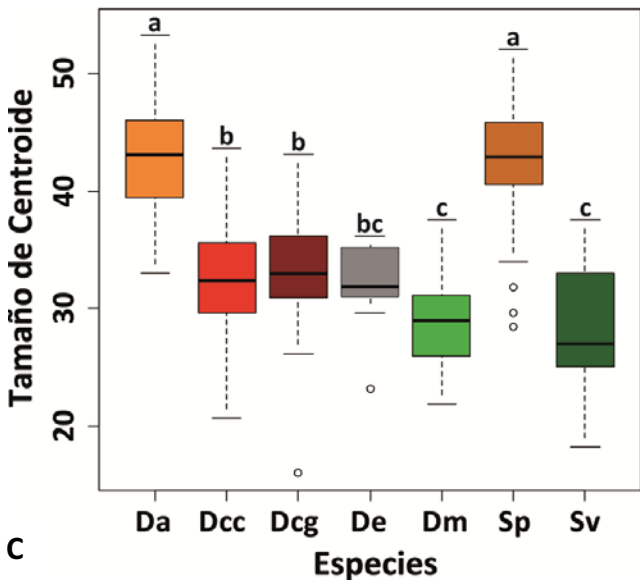
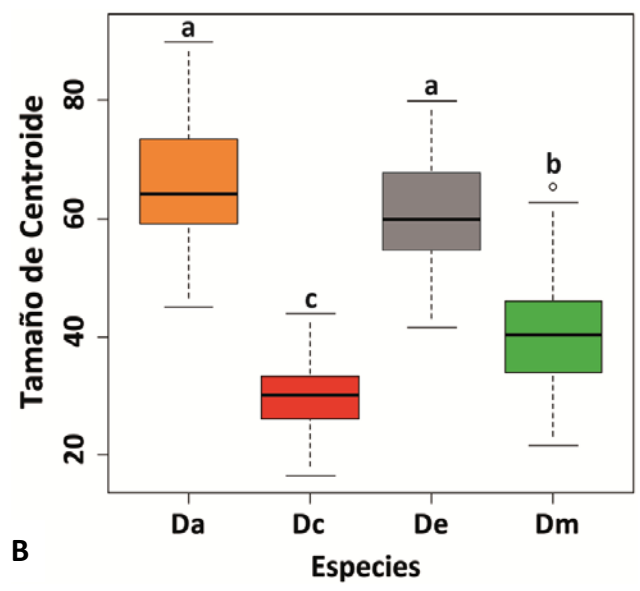
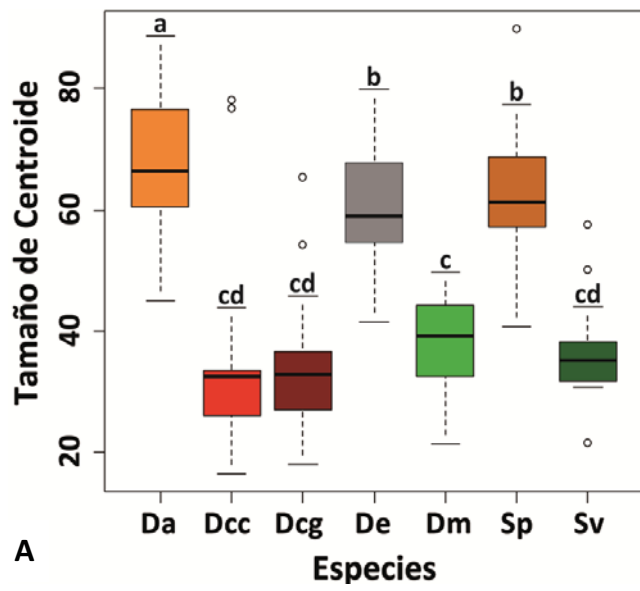
Al evaluar el tamaño del centroide (descriptor del tamaño), se consideraron inicialmente los ejemplares pertenecientes a *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus*, *D. cinnabarinus* subsp. *galeottianum*, *D. michuacanus*, *Stehorrhynchos pubens*, *S. vexillaris* y *Deiregyne eriophora*. No se consideró *Stenorrhynchos xoxonitla* porque únicamente se contó con dos ejemplares.

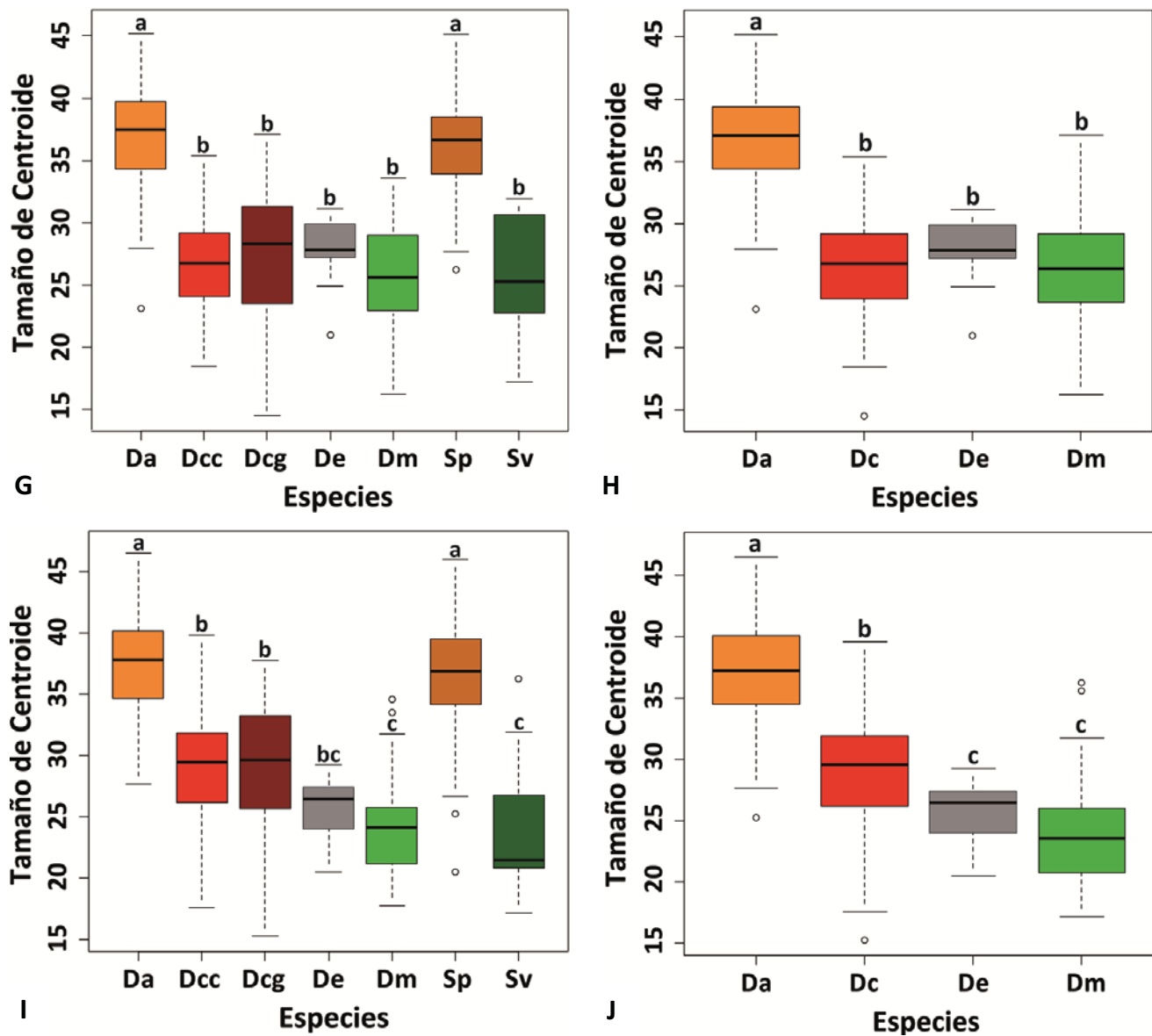
El análisis de varianza (ANOVA) aplicado al tamaño del centroide indicó la existencia de diferencias significativas para todas las estructuras: bráctea floral ( $F_{6,335} = 192.75$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 342$ ), labelo ( $F_{6,335} = 73.003$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 342$ ), pétalo ( $F_{6,335} = 128.05$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 342$ ), sépalo dorsal ( $F_{6,335} = 128.05$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 342$ ) y sépalo lateral ( $F_{6,335} = 65.566$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 342$ ). Por este motivo, fue necesario aplicar la prueba de Tukey y así conocer dónde radicaban dichas diferencias (Figura 9).

Aunque los patrones observados al analizar el tamaño del centroide no fueron del todo claros, debido al traslape de los valores en las siete morfoespecies, tanto el análisis del labelo como el sépalo lateral permitieron la identificación de tres grupos. Tras observar que en la mayoría de casos, las diferentes estructuras permitían identificar cuatro grupos, se decidió considerar únicamente tres especies como parte de *Dichromanthus* además del grupo de comparación. En este entendido, la muestra perteneciente a *Stenorrhynchos pubens* se integró a la de *Dichromanthus aurantiacus*, mientras que *Dichromanthus cinnabarinus* quedó integrada por los ejemplares de ambas subespecies. Por su parte *Dichromanthus michuacanus*, incluyó además la muestra de *Stenorrhynchos vexillaris* y *Stenorrhynchos xoxonitla*.

Al rehacer el análisis de varianza al tamaño del centroide de cada estructura, se detectaron diferencias significativas: bráctea floral ( $F_{3,340} = 511.42$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 344$ ), labelo ( $F_{3,340} = 162.46$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 344$ ), pétalo ( $F_{3,340} = 291.29$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 344$ ), sépalo dorsal ( $F_{3,340} = 167.86$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 344$ ) y sépalo lateral ( $F_{3,340} = 157.48$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 344$ ). La prueba de Tukey realizada posteriormente permitió observar cuales especies difirieron entre sí (Figura 9).

Los resultados arrojados al analizar el tamaño del centroide, considerando tanto siete como cuatro morfoespecies apoyan la clasificación de Salazar et al. (2011), pues tres de las cinco estructuras analizadas permitieron la identificación de tres especies pertenecientes a *Dichromanthus*. En este sentido, las diferencias entre los taxa pueden ser observadas fácilmente al analizar la bráctea floral, el labelo y el sépalo lateral.





**Figura 9.** Gráfica de cajas y alambres en donde se muestra la variabilidad existente en el tamaño del centroide de las cinco estructuras en las morfoespecies evaluadas. A, B) Bráctea floral. C, D) Labelo. E, F) Pétalo. G, H) Sepalo dorsal. I, J) Sépalo lateral. Letras diferentes indican diferencia significativa. Abreviaturas: Da= *Dichromanthus aurantiacus*, Dc = *Dichromanthus cinnabarinus*, Dcc= *Dichromanthus cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus*, Dcg= *Dichromanthus cinnabarinus* subsp. *galeottianum*, De= *Deiregyne eriophora*, Dm= *Dichromanthus michuacanus*, Sp= *Stenorrhynchos pubens*, Sv= *Stenorrhynchos vexillaris*.



## 5.2 Morfometría geométrica de los rasgos florales de ejemplares frescos

### a) Análisis de la forma

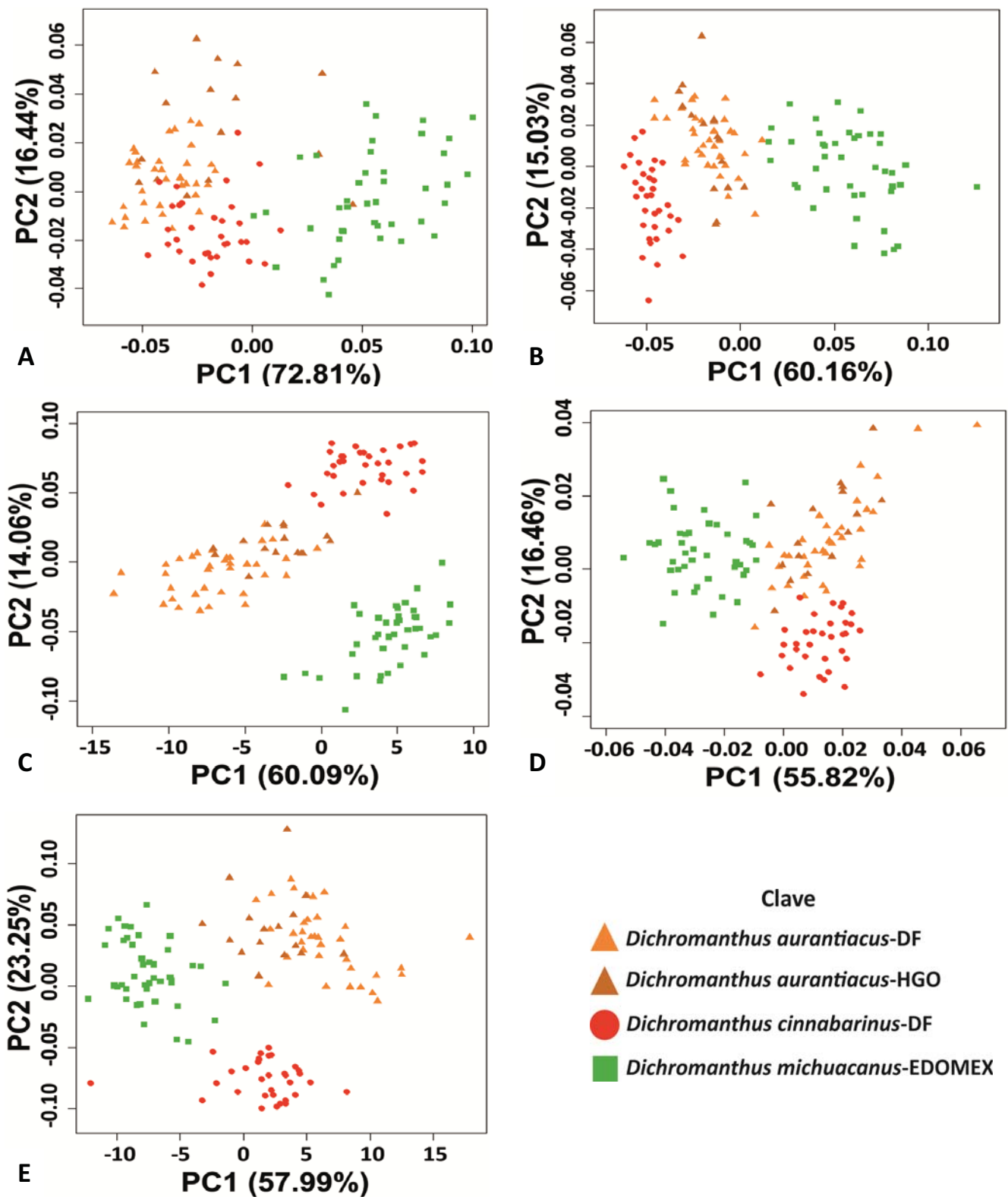
El análisis de componentes principales (PCA) aplicado a las coordenadas de los ejemplares muestreados en las cuatro poblaciones y que fueron sujetas previamente a la alineación, traslación y rotación, mostró diferentes resultados para cada una de las estructuras (Cuadro 9). La dispersión de los puntos correspondientes a cada ejemplar en el espacio del primero y segundo componente indica la existencia de tres grupos bien definidos (Figura 10). Estos grupos corresponden a: 1) *D. aurantiacus*-DF y *D. aurantiacus*-HGO, 2) *D. cinnabarinus*-DF y 3) *D. michuacanus*-EDOMEX.

Después del PCA, se llevó a cabo un análisis comparativo mediante un análisis de variables canónicas (CVA) a cada una de las cinco estructuras de los ejemplares muestreados en las poblaciones seleccionadas. En todos los casos, se generaron dos variables canónicas estadísticamente significativas (Cuadro 10). Debido a que no se pudo discriminar entre las plantas de *D. aurantiacus* provenientes de ambas poblaciones (*D. aurantiacus*-DF y *D. aurantiacus*-HGO), la reclasificación de los ejemplares atendió únicamente a tres grupos. Los grupos definidos fueron *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*. Los ejemplares reclasificados se agruparon con elevados porcentajes en los grupos previamente definidos (Cuadro 11). Al ser proyectados todos los ejemplares, en el espacio definido por la primera y segunda variable canónica, fue posible identificar tres grupos. Este patrón se observó con todas las estructuras (Figura 11).

Adjuntas al CVA, las gradillas finas de deformación indican la dirección del cambio en la forma de cada una de las estructuras, en los extremos de la primera y segunda variable canónica, con respecto a la forma consenso (Figura 12).

**Cuadro 9.** Eigenvalores de los primeros cinco componentes principales y la varianza explicada.

<b>Estructura</b>	<b>Componente principal</b>	<b>Eigenvalores</b>	<b>Varianza explicada</b>	<b>Porcentaje acumulativo</b>
Bráctea floral	1	4.94×10 <sup>-8</sup>	0.7281	72.81
	2	9.08×10 <sup>-8</sup>	0.1644	89.25
	3	1.43×10 <sup>-7</sup>	0.0472	93.98
	4	2.35×10 <sup>-7</sup>	0.0248	96.46
	5	4.61×10 <sup>-7</sup>	0.0120	97.66
Labelo	1	1.09×10 <sup>-7</sup>	0.6016	60.16
	2	1.34×10 <sup>-7</sup>	0.1502	75.18
	3	2.83×10 <sup>-7</sup>	0.0761	82.80
	4	3.56×10 <sup>-7</sup>	0.0571	88.51
	5	5.04×10 <sup>-7</sup>	0.0225	90.77
Pétalo	1	4.77×10 <sup>-8</sup>	0.6009	60.09
	2	5.78×10 <sup>-8</sup>	0.1406	74.15
	3	1.14×10 <sup>-7</sup>	0.1141	85.56
	4	1.53×10 <sup>-7</sup>	0.0534	90.90
	5	1.84×10 <sup>-7</sup>	0.0219	93.09
Sépalo dorsal	1	2.85×10 <sup>-8</sup>	0.5582	55.82
	2	6.08×10 <sup>-8</sup>	0.1645	72.27
	3	1.06×10 <sup>-7</sup>	0.1364	85.92
	4	2.16×10 <sup>-7</sup>	0.0343	89.36
	5	4.42×10 <sup>-7</sup>	0.0262	91.99
Sépalo lateral	1	1.37×10 <sup>-8</sup>	0.5799	57.99
	2	2.14×10 <sup>-8</sup>	0.2325	81.24
	3	3.16×10 <sup>-8</sup>	0.0691	88.15
	4	4.17×10 <sup>-8</sup>	0.0376	91.92
	5	5.46×10 <sup>-7</sup>	0.0204	93.96



**Figura 10.** Proyección de los ejemplares de las poblaciones de *Dichromanthus* en el plano de los dos primeros componentes principales. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral. Los números al interior de los paréntesis indican el porcentaje de variación explicada por cada componente principal (PC).

**Cuadro 10.** Parámetros de las tres variables canónicas generadas.

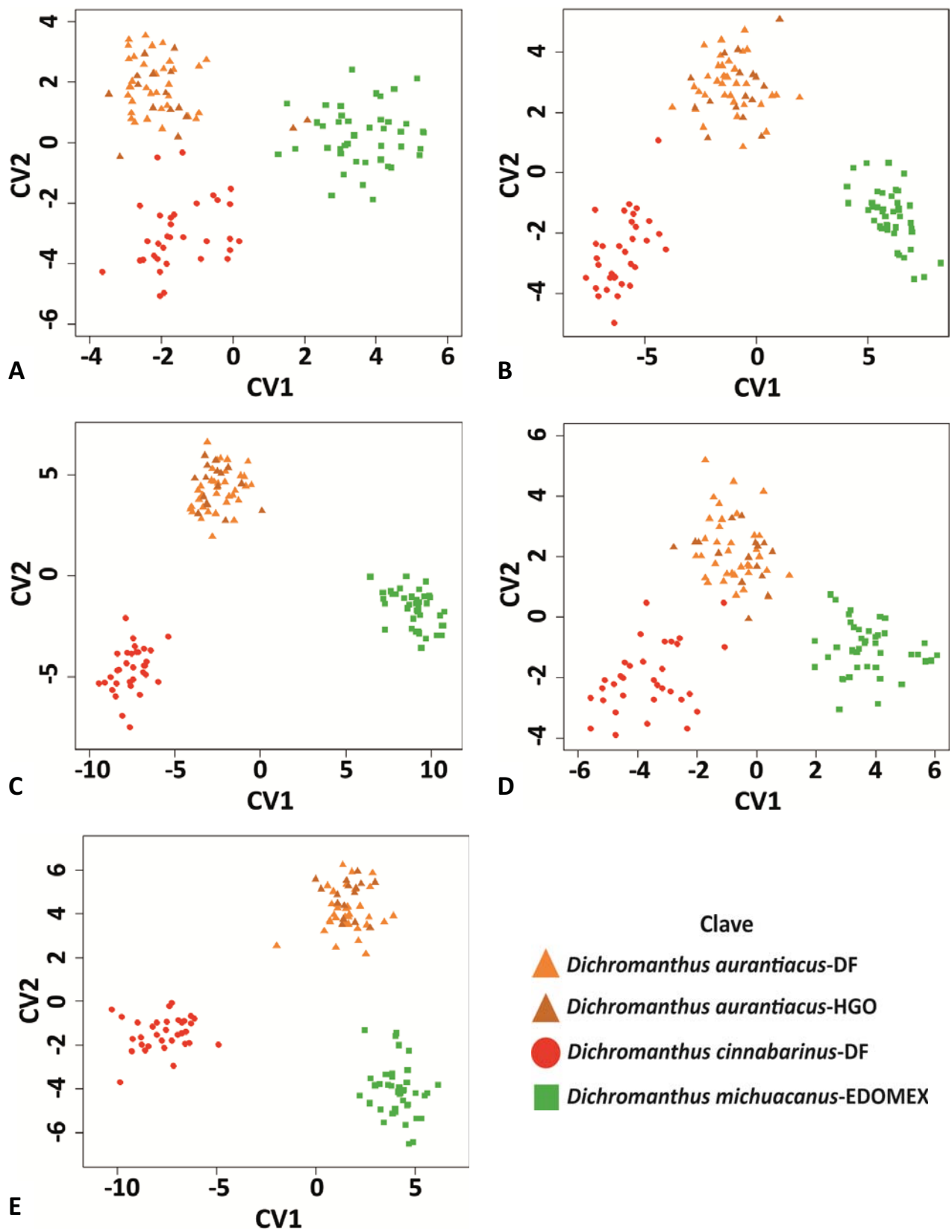
<b>Estructura</b>	<b>Variable canónica (CV)</b>	<b>Eigenvalores</b>	<b>Varianza explicada</b>	<b>Varianza acumulada (%)</b>	<b>R</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b><math>X^2</math></b>	<b>gl</b>	<b>P</b>
Bráctea floral	1	6.8522	64.1708	64.17	0.9341	0.0264	405.2791	48	<0.0001
	2	3.8258	35.8292	100.00	0.8903	0.2072	175.5003	23	<0.0001
Labelo	1	22.6344	79.2744	79.27	0.9786	0.0061	537.7089	72	<0.0001
	2	5.9175	20.7256	100.00	0.9249	0.1446	204.0437	35	<0.0001
Pétalo	1	45.5988	75.9609	75.96	0.9892	0.0014	647.9529	100	<0.0001
	2	14.4305	24.0391	100.00	0.9670	0.0648	269.5305	49	<0.0001
Sépalo dorsal	1	8.5583	71.2193	71.21	0.9462	0.0235	418.3750	48	<0.0001
	2	3.4585	28.7807	100.00	0.8807	0.2243	166.6729	23	<0.0001
Sépalo lateral	1	22.6730	61.8170	61.81	0.9786	0.0028	578.4613	100	<0.0001
	2	14.0046	38.1830	100.00	0.9661	0.0666	266.7735	49	<0.0001

**Cuadro 11.** Matriz de clasificación correcta generada partir del análisis de variables canónicas.

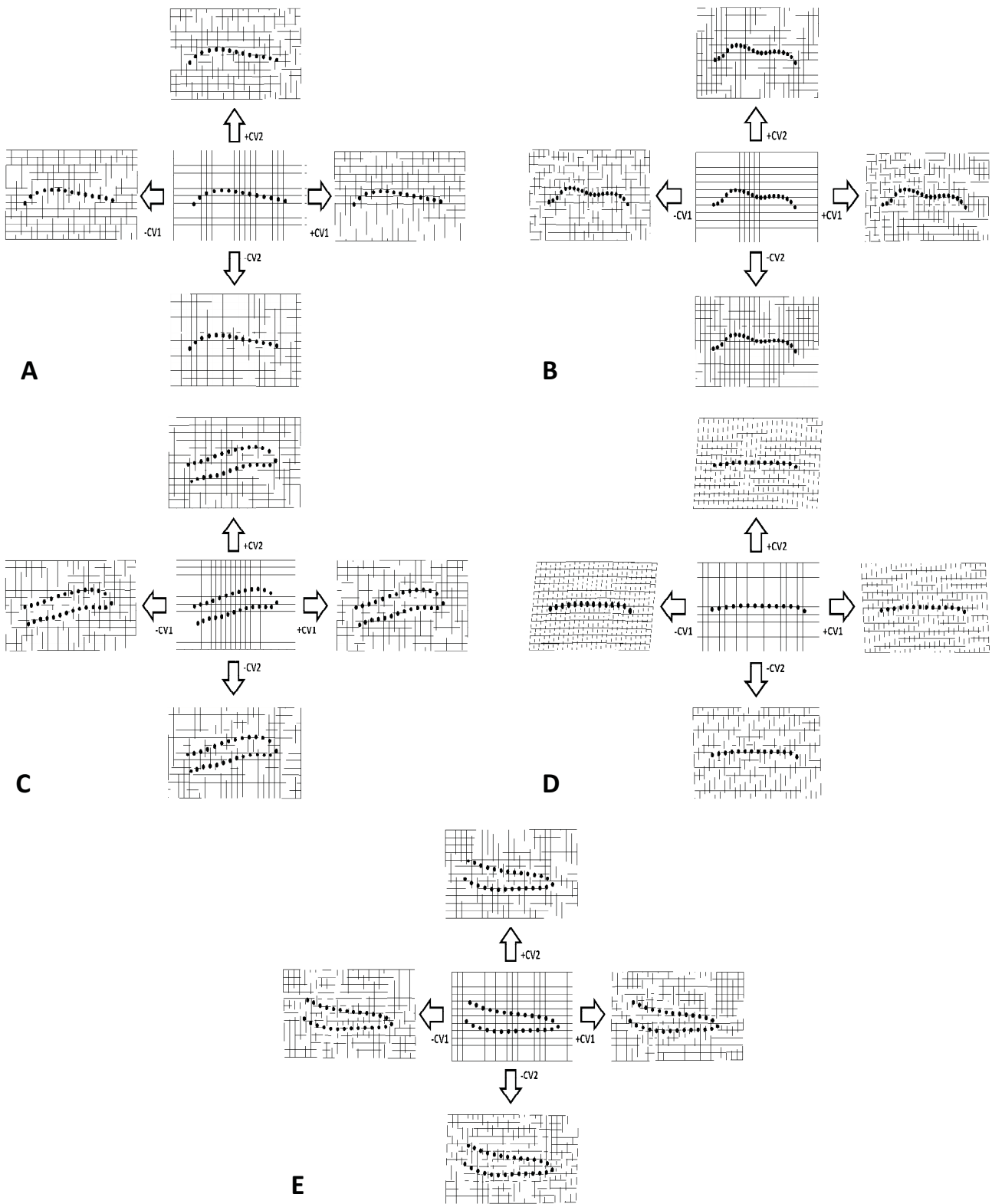
Estructura	Asignaciones <i>a priori</i>	Asignaciones <i>a posteriori</i>			Total	Clasificación correcta (%)
		<i>Da</i>	<i>Dc</i>	<i>Dm</i>		
Bráctea floral	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	49	0	2	51	96.07
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	2	31	0	33	93.93
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	0	0	42	42	100
Labelo	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	51	0	0	51	100
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	1	32	0	33	96.96
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	0	0	42	42	100
Pétalo	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	51	0	0	51	100
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	0	33	0	33	100
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	0	0	42	42	100
Sépalo dorsal	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	51	0	0	51	100
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	1	32	0	33	96.96
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	0	0	42	42	100
Sépalo lateral	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	51	0	0	51	100
	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	0	33	0	33	100
	<i>Dichromanthus michuacanus</i>	0	0	42	42	100

#### b) Análisis del tamaño

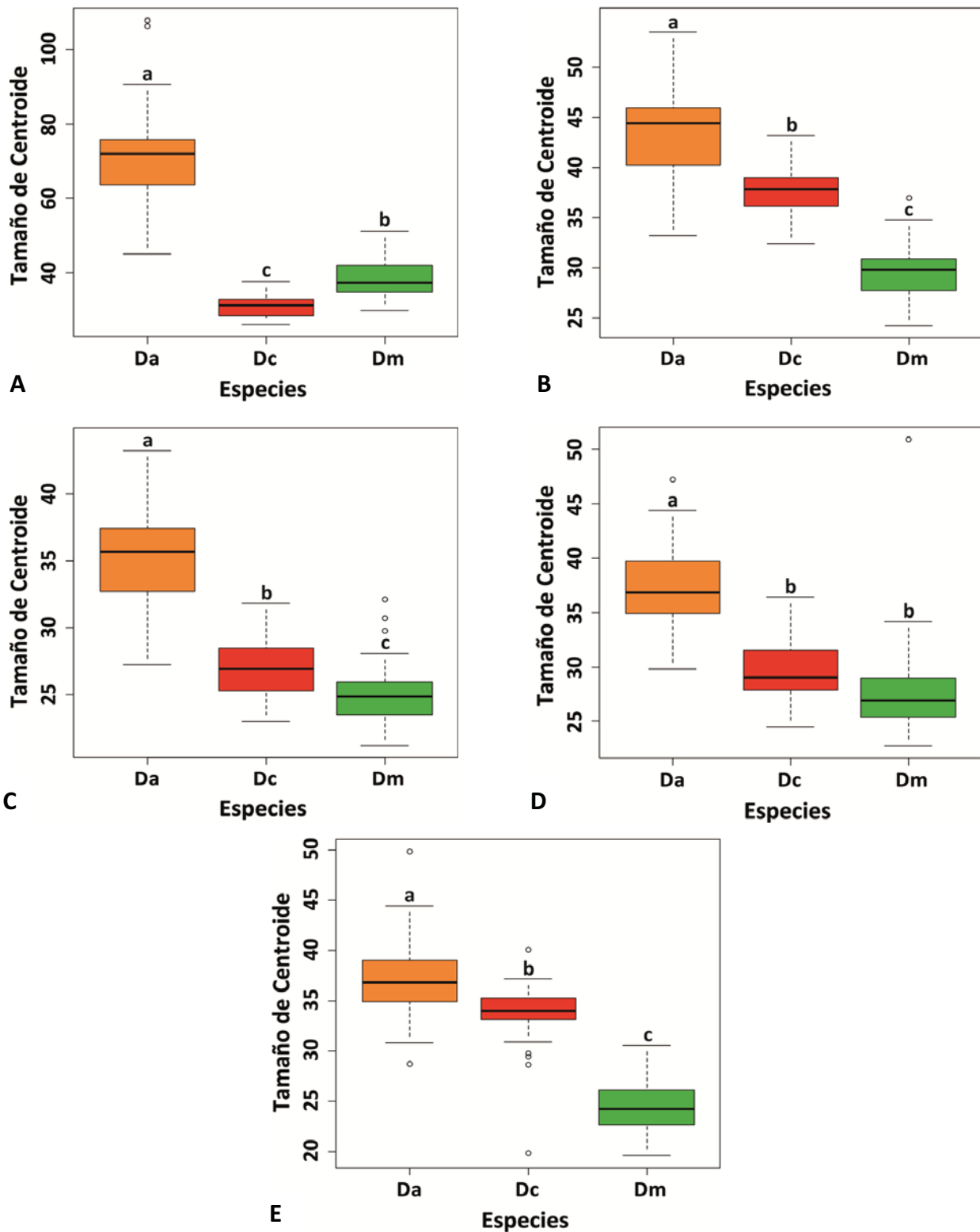
El análisis de varianza demostró que el tamaño del centroide de todas las estructuras presenta diferencias significativas entre los ejemplares de las poblaciones de *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*: bráctea ( $F_{2,123} = 297.49$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 126$ ), labelo ( $F_{2,123} = 200.1$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 126$ ), pétalo ( $F_{2,123} = 166.92$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 126$ ), sépalo dorsal ( $F_{2,123} = 86.693$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 126$ ) y sépalo lateral ( $F_{2,123} = 177.4$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 126$ ). La prueba de Tukey indicó que de manera general *D. aurantiacus* presenta estructuras con valores de tamaño del centroide más grandes en comparación con *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus* (Figura 13).



**Figura 11.** Proyección en el plano definido por las variables canónicas 1 y 2 de los ejemplares frescos analizados. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral.



**Figura 12.** Cambios en la forma representados por la primera y segunda variable canónica (CV1 y CV2) con respecto a la forma consenso. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sépalo dorsal. E) Sépalo lateral.



**Figura 13.** Gráfica de cajas y alambres en donde se muestra la variabilidad existente en el tamaño del centroide de las cinco estructuras en las morfoespecies evaluadas. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sepalo dorsal. E) Sépalo lateral. Letras diferentes indican diferencia significativa. Abreviaturas: Da= *Dichromanthus aurantiacus*, Dc= *Dichromanthus cinnabarinus* y Dm= *Dichromanthus michuacanus*.



### 5.3 Morfometría tradicional de los rasgos florales de ejemplares de herbario

Considerando un tamaño de muestra igual a 344 ejemplares de herbario distribuidos entre las ocho morfoespecies, se hizo un análisis canónico discriminante (CDA) en el cual tres funciones (variables) canónicas explicaron el 100% de la variación total. El Cuadro 12 muestra las nueve variables que presentaron la mayor contribución relativa y que ayudaron significativamente a la separación de grupos de morfoespecies ( $\lambda$  de Wilks  $F = 14.44$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 344$ ).

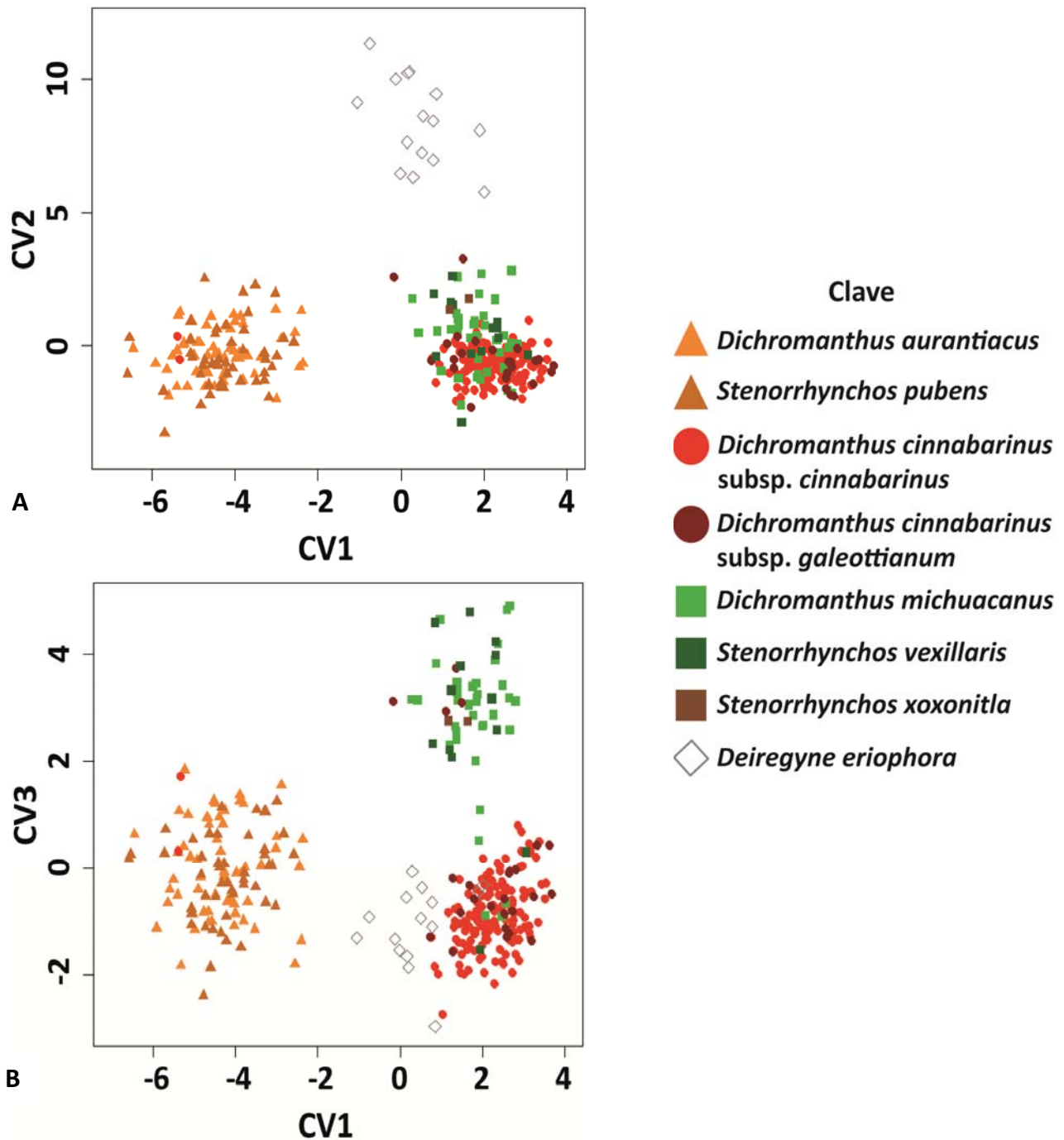
La representación gráfica de las tres primeras variables canónicas permitió verificar la definición de cuatro grupos de morfoespecies (Figura 14). La variable canónica 1 separó en el lado derecho de la gráfica a los individuos de ambas subespecies de *D. cinnabarinus* y a los ejemplares de *D. michuacanus* y *Stenorrhynchos vexillaris* y *S. xoxonitla*, mientras que del lado izquierdo se ubicaron los individuos pertenecientes a las morfoespecies *D. aurantiacus* y *S. pubens*. La variable canónica 2 permitió separar a los individuos de *Deiregyne eriophora*. Los individuos de las morfoespecies: *D. michuacanus*, *S. vexillaris* y *S. xoxonitla* se separaron notoriamente de la agrupación integrada por ambas subespecies de *D. cinnabarinus* con la variable canónica 3.

El CDA mostró que el grupo de comparación, *Deiregyne eriophora*, fue clasificado correctamente, así como los dos individuos de la morfoespecie *S. xoxonitla*. El resto de taxa aunque no mostraron una reclasificación perfecta, si presentaron porcentajes elevados de clasificación dentro de su grupo correspondiente (Cuadro 13). El cuadrado de las distancias de Mahalanobis entre los centroides de cada par de morfoespecies presentó diferencias significativas (Cuadro 14).

**Cuadro 12.** Análisis discriminante entre los ejemplares de las morfoespecies consideradas con base en caracteres morfométricos. Los caracteres con valores más altos se resaltan con \*\*.

<b>Variables</b>	<b>CV 1</b>	<b>CV 2</b>	<b>CV 3</b>
<b>Variación explicada (%)</b>	62.02	24.57	11.29
<b>Eigenvalor</b>	8.63	3.41	1.57
<b>Bráctea floral</b>			
Largo	-0.7645**	-0.0706	-0.1426
Ancho base	-0.4832	0.5230	0.5779
Ancho tercio basal	-0.1912	-1.1721**	0.4565
Ancho tercio apical	0.7066**	-0.8838	0.5120
<b>Labelo</b>			
Largo	0.4185	0.4732	-0.3863
Ancho base	0.4131	0.8796**	-0.6210
Ancho tercio basal	-0.1443	0.2710	-0.3657
Ancho tercio apical	0.5458	0.6973	-0.3371
<b>Pétalo</b>			
Largo	0.5118	0.9067**	-0.2194
Ancho base	0.3236	0.0662	0.5799
Ancho tercio basal	0.4438	0.0206	0.5702
Ancho tercio apical	0.4538	0.5815	1.0003**
<b>Sépalo Dorsal</b>			
Largo	0.6576	-0.2300	-0.3154
Ancho base	0.3329	0.0290	0.1115
Ancho tercio basal	0.2476	0.1299	-0.2269
Ancho tercio apical	-0.3524	0.0907	-0.6706
<b>Sépalo lateral</b>			
Largo	-0.7127**	0.3083	-0.0527
Ancho base	-1.0466**	-1.3524	-1.3548
Ancho tercio basal	1.0747**	0.4807	0.0385
Ancho tercio apical	0.5602	0.6857	0.1881
<b>Ovario</b>			
Largo	0.3962	0.5118	0.2870

CV= Variable canónica



**Figura 14.** Análisis Canónico Discriminante de las ocho morfoespecies incluidas en el análisis morfométrico. Ordenación de los individuos con base en: A) las dos primeras variables canónicas y B) la primera y tercera variable canónica.

**Cuadro 13.** Matriz de clasificación correcta generada a partir del análisis clasificatorio discriminante para los ocho taxa considerados.

<b>Asignaciones a priori</b>	<b>n</b>	<b>Asignaciones a posteriori</b>								<b>%</b>
		<i>Da</i>	<i>Dcc</i>	<i>Dcg</i>	<i>De</i>	<i>Dm</i>	<i>Sp</i>	<i>Sv</i>	<i>Sx</i>	
<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	61	44	0	0	0	0	17	0	0	72.13
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>cinnabarinus</i>	144	2	125	17	0	0	0	0	0	86.80
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>galeottianum</i>	25	0	13	8	0	0	0	3	1	32.00
<i>Deiregyne eriophora</i>	15	0	0	0	15	0	0	0	0	100.00
<i>Dichromanthus michuacanus</i>	35	0	2	0	0	26	0	6	1	74.28
<i>Stenorrhynchos pubens</i>	48	18	0	0	0	0	30	0	0	62.50
<i>Stenorrhynchos vexillaris</i>	14	0	2	0	0	2	0	10	0	71.42
<i>Stenorrhynchos xoxonitla</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2	100.00

%= Porcentaje de ejemplares clasificados correctamente.

**Cuadro 14.** Distancias de Mahalanobis entre los centroides que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ).

<b>Morfoespecies</b>	<b>Da</b>	<b>Dcc</b>	<b>Dcg</b>	<b>Dm</b>	<b>Sp</b>	<b>Sv</b>	<b>Sx</b>	<b>De</b>
<i>Dichromanthus aurantiacus</i> (Da)								
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>cinnabarinus</i> (Dcc)	25.78							
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>galeottianum</i> (Dcg)	22.36	0.37						
<i>Dichromanthus michuacanus</i> (Dm)	19.66	7.91	5.40					
<i>Stenorrhynchos pubens</i> (Sp)	0.83	22.59	19.30	16.09				
<i>Stenorrhynchos vexillaris</i> (Sv)	21.74	7.19	4.80	0.49	17.67			
<i>Stenorrhynchos xoxonitla</i> (Sx)	13.53	10.90	7.46	4.47	11.14	4.70		
<i>Deiregyne eriophora</i> (De)	24.32	21.29	18.36	17.22	24.85	19.03	8.76	

#### 5.4 Morfometría tradicional de los rasgos florales de ejemplares frescos

Las muestras de *D. aurantiacus* (DF e HGO, n= 51), *D. cinnabarinus*-DF (n= 33) y *D. michuacanus*-EDOMEX (n= 42) que fueron colectadas en poblaciones ubicadas en el valle de México, se emplearon para la obtención de varias distancias que sirvieron para hacer análisis estadísticos (análisis canónico discriminante y análisis discriminante clasificatorio). El análisis canónico discriminante, en dos variables canónicas, explicó el 100% de la variación total. Las variables que presentaron la mayor contribución relativa se presentan en el Cuadro 15. Dichas variables

permitieron separar a las tres especies ( $\lambda$  de Wilks F = 95.52, P < 0.0001, n = 126). En el análisis discriminante clasificatorio, todos los ejemplares fueron correctamente clasificados en sus respectivas especies (Cuadro 16).

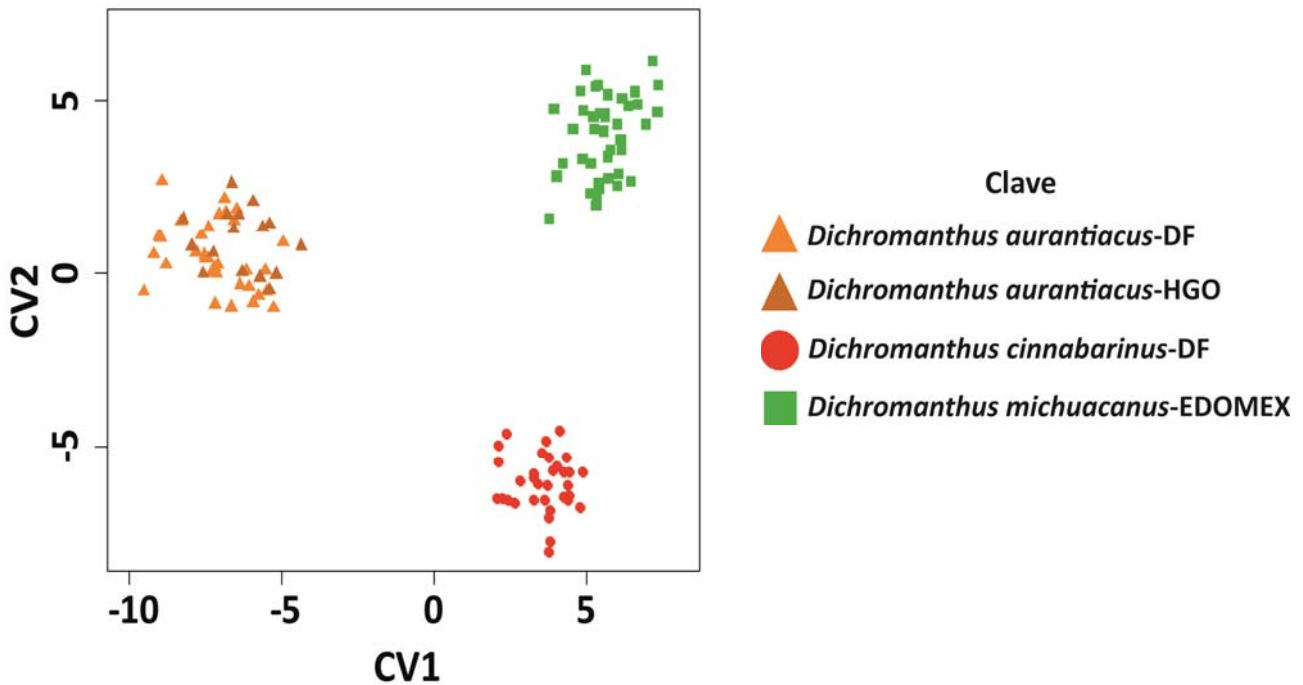
La variable canónica 1 separó del lado izquierdo a los individuos pertenecientes a ambas poblaciones de *D. aurantiacus*. Por su parte, la variable canónica 2 en la parte superior permitió separar los individuos de *D. michuacanus* mientras que en la parte inferior se agruparon los individuos de *D. cinnabarinus* (Figura 15).

**Cuadro 15.** Análisis discriminante entre los ejemplares de los taxa considerados con base en caracteres morfométricos. Los caracteres con valores más altos se resaltan con \*\*.

<b>Variables</b>	<b>CV 1</b>	<b>CV 2</b>
<b>Variación explicada (%)</b>	67.63	32.37
<b>Eigenvalor</b>	31.35	15.00
<b>Bráctea floral</b>		
Largo	-1.4414**	0.2846
Ancho base	0.7714	1.7040**
Ancho tercio basal	1.1301**	-0.6304
Ancho tercio apical	0.1394	-0.0269
<b>Labelo</b>		
Largo	0.7178	0.5707
Ancho base	-0.3845	-0.4134
Ancho tercio basal	0.2895	-0.6389
Ancho tercio apical	-0.6042	0.1690
<b>Pétalo</b>		
Largo	0.7936	0.2887
Ancho base	0.6608	0.1230
Ancho tercio basal	0.0608	0.5034
Ancho tercio apical	0.6749	-0.2592
<b>Sépalo Dorsal</b>		
Largo	-0.6029	0.4058
Ancho base	-0.4101	-0.4268
Ancho tercio basal	-0.2225	0.3228
Ancho tercio apical	0.3176	-0.5516
<b>Sépalo lateral</b>		
Largo	1.3284**	-0.0376
Ancho base	-0.5338	0.7196**
Ancho tercio basal	1.0444**	1.3443
Ancho tercio apical	0.5530	0.2455
<b>Ovario</b>		
Largo	-0.6263	1.0119**

**Cuadro 16.** Matriz de clasificación correcta generada a partir del análisis clasificatorio discriminante.

Asignaciones <i>a priori</i>	Asignaciones <i>a posteriori</i>		
	<i>Da</i>	<i>Dc</i>	<i>Dm</i>
<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	51	0	0
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	0	33	0
<i>Dichromanthus michuacanus</i>	0	0	42



**Figura 15.** Análisis Canónico Discriminante de las cuatro poblaciones de *Dichromanthus* incluidas en el análisis morfométrico.

### 5.5 Comparación entre ejemplares de herbario y frescos

Después de realizar el análisis canónico discriminante al conjunto de caracteres para ambos tratamientos (ejemplares de herbario y frescos), se eligieron siete variables que permitieron separar las morfoespecies, es decir, tres correspondientes a la bráctea floral (largo, ancho de la base y ancho del tercio basal), una al largo del ovario y tres al sépalo lateral (largo, ancho de la base y ancho del tercio basal). Los valores de cada una de estas variables fueron empleados para comparar sus medias mediante un ANOVA y en presencia de diferencias significativas se aplicó una prueba de Tukey para ver qué tratamientos (morfoespecies) diferían entre sí.

### a) Ejemplares de herbario

El análisis de varianza indicó la existencia de diferencias para los siete caracteres seleccionados ( $P < 0.0001$ ), pero sólo entre algunos pares de morfoespecies (Cuadro 17). A partir de lo observado fue posible reconocer tres especies como parte del género *Dichromanthus*, además del grupo de comparación *Deiregyne eriophora*.

De esta manera, la variación presente en la morfoespecie *Stenorrhynchos pubens* se agrupó con la observada en los ejemplares de *Dichromanthus aurantiacus*, pues aunque las variables correspondientes a la bráctea floral indican que existe diferencia significativa entre ambas morfoespecies, ésta es marginal. En cambio, el largo del ovario y las tres variables descriptoras del sépalo dorsal (largo, ancho de la base y ancho del tercio basal) no mostraron diferencias significativas. Lo anterior indica que sólo es posible reconocer a la morfoespecie *D. aurantiacus* y que las diferencias observadas entre ésta y *S. pubens*, son parte de su variación.

El segundo grupo de morfoespecies, *Dichromanthus cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus* y *Dichromanthus cinnabarinus* subsp. *galeottianum*, presentó diferencias significativas para cinco de las siete variables, pero se consideraron marginales. Estos resultados indican que no es posible discernir entre las dos subespecies, *cinnabarinus* y *galeottianum*.

En el caso de *Dichromanthus michuacanus* y *Stenorrhynchos vexillaris*, se presentó el mismo patrón que en los grupos de morfoespecies anteriores, lo que indicó el reconocimiento de una sola especie para este grupo que corresponde a *D. michuacanus*.

Como sólo fue posible reconocer tres entidades morfológicamente discretas como parte del género *Dichromanthus*, se realizaron nuevamente las pruebas pero esta vez se incluyeron también los dos ejemplares considerados como parte de la morfoespecie *Stenorrhynchos xoxonitla* y que corresponden como se observó anteriormente a *D. michuacanus*. El análisis de varianza detectó diferencia para los siete caracteres ( $P < 0.0001$ ), lo que permitió distinguir entre las tres especies del género en donde *D. aurantiacus*, de manera general, presentó longitudes mayores que *D. michuacanus* y ésta presentó, en la mayoría de los atributos considerados, longitudes superiores que *D. cinnabarinus* (Cuadro 18). Por su parte, *Deiregyne eriophora*, para las variables de la bráctea floral y el largo del ovario, presentó longitudes similares a las observadas en *Dichromanthus aurantiacus*, pero los caracteres que describen al sépalo lateral se fueron intermedios entre *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*.

**Cuadro 17.** Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el análisis canónico discriminante (CDA) en ejemplares de herbario. Letras diferentes indican grupos homogéneos de especies (Tukey,  $P < 0.0001$ ). Media  $\pm$  Error Estándar.

Variables (mm)	<i>Dichromanthus</i>				
	<i>Dichromanthus aurantiacus</i> (61)	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> subsp. <i>cinnabarinus</i> (144)	<i>Dichromanthus subsp. galeottianum</i> (25)	<i>Dichromanthus michuacanus</i> (35)	<i>Dichromanthus pubens</i> (48)
Largo de la bráctea floral	40.75 $\pm$ 0.83a	18.58 $\pm$ 0.38d	20.15 $\pm$ 0.23cd	22.25 $\pm$ 0.72c	36.86 $\pm$ 0.85b
Ancho de la base de la bráctea floral	8.44 $\pm$ 0.28a	4.11 $\pm$ 0.10d	4.50 $\pm$ 0.08cd	5.65 $\pm$ 0.27c	8.58 $\pm$ 0.37b
Ancho del tercio basal de la bráctea floral	12.33 $\pm$ 0.28a	5.40 $\pm$ 0.12d	6.64 $\pm$ 0.15cd	10.16 $\pm$ 0.37c	12.30 $\pm$ 0.41b
Largo del ovario	10.20 $\pm$ 0.24a	7.77 $\pm$ 0.15c	7.79 $\pm$ 0.07bc	6.92 $\pm$ 0.20c	10.44 $\pm$ 0.30a
Largo del sépalo lateral	23.19 $\pm$ 0.33a	18.21 $\pm$ 0.22b	18.15 $\pm$ 0.14b	14.67 $\pm$ 0.43c	22.63 $\pm$ 0.42a
Ancho de la base del sépalo lateral	4.62 $\pm$ 0.11a	1.95 $\pm$ 0.05d	2.09 $\pm$ 0.03cd	2.92 $\pm$ 0.12b	4.67 $\pm$ 0.14a
Ancho del tercio basal del sépalo lateral	5.23 $\pm$ 0.12a	2.12 $\pm$ 0.05c	2.35 $\pm$ 0.03c	3.11 $\pm$ 0.10b	5.18 $\pm$ 0.14a

Números dentro del paréntesis indican el tamaño de muestra.

**Cuadro 18.** Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA sobre los grupos definidos a partir de ejemplares de herbario. Letras diferentes indican grupos homogéneos de especies (Tukey,  $P < 0.0001$ ). Media  $\pm$  Error Estándar.

Variables (mm)	<i>Dichromanthus aurantiacus</i> (109)		<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> (169)		<i>Dichromanthus michuacanus</i> (51)		<i>Deiregyne eriophora</i> (15)	
	Largo de la bráctea floral	39.00 $\pm$ 0.62a	8.51 $\pm$ 0.23a	18.47 $\pm$ 0.29bc	4.08 $\pm$ 0.09bc	22.19 $\pm$ 0.09c	5.76 $\pm$ 0.03c	31.89 $\pm$ 2.92a
Ancho de la base de la bráctea floral	12.32 $\pm$ 0.24a	10.31 $\pm$ 0.19a	5.45 $\pm$ 0.13bc	7.73 $\pm$ 0.13b	10.22 $\pm$ 0.04c	7.05 $\pm$ 0.02b	12.17 $\pm$ 1.03a	8.06 $\pm$ 0.72a
Largo del ovario	22.94 $\pm$ 0.26a	4.64 $\pm$ 0.09a	18.13 $\pm$ 0.22b	1.92 $\pm$ 0.04b	14.80 $\pm$ 0.05c	2.82 $\pm$ 0.01c	14.93 $\pm$ 1.17c	2.16 $\pm$ 0.23b
Largo del sépalo lateral	5.21 $\pm$ 0.09a	2.14 $\pm$ 0.03b	3.10 $\pm$ 0.01c					

Números dentro del paréntesis indican el tamaño de muestra.



### b) Ejemplares frescos

Al aplicar un análisis de varianza a las siete variables seleccionadas ( $P < 0.0001$ ), se observó que los valores para cada uno de los atributos son más grandes en las poblaciones de *D. aurantiacus*, y que las muestras de la población de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), en el Distrito Federal, presentan longitudes mayores en comparación con aquellas provenientes del Rancho Santa Elena en Hidalgo. Por su parte, *Dichromanthus michuacanus* presenta valores más altos, para cinco de las siete variables, que *D. cinnabarinus* (Cuadro 19).

**Cuadro 19.** Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el análisis canónico discriminante en ejemplares frescos. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.0001$ ). Media  $\pm$  Error Estándar.

Variables (mm)	<i>Dichromanthus aurantiacus</i> -DF (35)	<i>Dichromanthus aurantiacus</i> -HGO (16)	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> -DF (33)	<i>Dichromanthus michuacanus</i> -EDOMEX (42)
Largo de la bráctea floral	44.76 $\pm$ 1.23a	39.69 $\pm$ 1.89b	18.92 $\pm$ 0.35c	22.07 $\pm$ 0.47d
Ancho de la base de la bráctea floral	7.30 $\pm$ 0.26a	7.56 $\pm$ 0.57b	3.55 $\pm$ 0.13c	5.49 $\pm$ 0.14d
Ancho del tercio basal de la bráctea floral	11.81 $\pm$ 0.27a	12.61 $\pm$ 0.53b	5.40 $\pm$ 0.10c	10.28 $\pm$ 0.25d
Largo del ovario	10.22 $\pm$ 0.28a	7.77 $\pm$ 0.27bc	8.08 $\pm$ 0.21b	6.95 $\pm$ 0.14c
Largo del sépalo lateral	23.69 $\pm$ 0.38a	20.87 $\pm$ 0.44b	20.93 $\pm$ 0.38b	14.83 $\pm$ 0.23c
Ancho de la base del sépalo lateral	5.25 $\pm$ 0.12a	4.99 $\pm$ 0.23a	2.70 $\pm$ 0.07b	2.95 $\pm$ 0.11b
Ancho del tercio basal del sépalo lateral	5.49 $\pm$ 0.08a	5.24 $\pm$ 0.17a	2.70 $\pm$ 0.05b	3.18 $\pm$ 0.05c

Números dentro del paréntesis indican el tamaño de muestra.

### c) Ejemplares frescos vs. ejemplares de herbario

El análisis de varianza hecho con los ejemplares de *D. aurantiacus* indicó diferencias para cinco de los siete caracteres y la prueba de Tukey detectó diferencias entre los tratamientos (Cuadro 20).

Para el caso de *D. cinnabarinus*, el ANOVA detectó diferencias significativas para las tres variables descriptoras del sépalo lateral, no así con las correspondientes a la bráctea floral y al ovario (Cuadro 21). Sin embargo, estas diferencias se consideraron marginales.

En el Cuadro 22, se observa que en todos los caracteres evaluados para *D. michuacanus*, las significancias de  $P$  fueron mayores a 0.05. Esto indica que los valores para los caracteres son iguales

en ambos tratamientos, es decir, no es posible diferenciar entre ejemplares de herbario y ejemplares frescos, pues ambos se comportan de la misma manera.

De acuerdo al patrón general observado en las variables de tamaño en cada una de las tres especies, se integraron los valores tanto de los ejemplares de herbario como del material fresco y se construyó el Cuadro 23. En éste, es posible observar la variación en el tamaño de las estructuras evaluadas mediante morfometría tradicional, así como el tamaño del centroide generado con morfometría geométrica.

**Cuadro 20.** Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA para *Dichromanthus aurantiacus*. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.01$ ).  
Media  $\pm$  Error Estándar.

Variables (mm)	Herbario (109)	REPSA (35)	Rancho Santa Elena (16)
Largo de la bráctea floral	39.00 $\pm$ 0.62a	44.76 $\pm$ 1.23b	39.69 $\pm$ 1.89a
Ancho de la base de la bráctea floral	8.51 $\pm$ 0.23a	7.30 $\pm$ 0.26b	7.56 $\pm$ 0.57a
Ancho del tercio basal de la bráctea floral	12.32 $\pm$ 0.24a	11.81 $\pm$ 0.27a	12.61 $\pm$ 0.53a
Largo del ovario	10.31 $\pm$ 0.19a	10.22 $\pm$ 0.28a	7.77 $\pm$ 0.27b
Largo del sépalo lateral	22.94 $\pm$ 0.26a	23.69 $\pm$ 0.38a	20.87 $\pm$ 0.44b
Ancho de la base del sépalo lateral	4.64 $\pm$ 0.09a	5.25 $\pm$ 0.12b	4.99 $\pm$ 0.23ab
Ancho del tercio basal del sépalo lateral	5.21 $\pm$ 0.09a	5.49 $\pm$ 0.08a	5.24 $\pm$ 0.17a

Números dentro del paréntesis indican el tamaño de muestra.

REPSA= Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

**Cuadro 21.** Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA para *Dichromanthus cinnabarinus*. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.0001$ ).  
Media  $\pm$  Error Estándar.

Variables (mm)	Herbario (169)	REPSA (33)
Largo de la bráctea floral	18.47 $\pm$ 0.29a	18.92 $\pm$ 0.35a
Ancho de la base de la bráctea floral	4.08 $\pm$ 0.09a	3.55 $\pm$ 0.13a
Ancho del tercio basal de la bráctea floral	5.45 $\pm$ 0.13a	5.40 $\pm$ 0.10a
Largo del ovario	7.73 $\pm$ 0.13a	8.08 $\pm$ 0.21a
Largo del sépalo lateral	18.13 $\pm$ 0.22a	20.93 $\pm$ 0.38b
Ancho de la base del sépalo lateral	1.92 $\pm$ 0.04a	2.70 $\pm$ 0.07b
Ancho del tercio basal del sépalo lateral	2.14 $\pm$ 0.03a	2.70 $\pm$ 0.05b

Números dentro del paréntesis indican el tamaño de muestra.

REPSA= Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

**Cuadro 22.** Diferencias significativas para siete caracteres cuantitativos identificados en el CDA para *Dichromanthus michuacanus*. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $P > 0.05$ ).  
Media  $\pm$  Error Estándar.

<b>Variables (mm)</b>	<b>Herbario (51)</b>	<b>Santa Inés (42)</b>
Largo de la bráctea floral	22.19 $\pm$ 0.09a	22.07 $\pm$ 0.47a
Ancho de la base de la bráctea floral	5.76 $\pm$ 0.03a	5.49 $\pm$ 0.14a
Ancho del tercio basal de la bráctea floral	10.22 $\pm$ 0.04a	10.28 $\pm$ 0.25a
Largo del ovario	7.05 $\pm$ 0.02a	6.95 $\pm$ 0.14a
Largo del sépalo lateral	14.80 $\pm$ 0.05a	14.83 $\pm$ 0.23a
Ancho de la base del sépalo lateral	2.82 $\pm$ 0.01a	2.95 $\pm$ 0.11a
Ancho del tercio basal del sépalo lateral	3.10 $\pm$ 0.01a	3.18 $\pm$ 0.05a

Números dentro del paréntesis indican el tamaño de muestra.

## 5.6 Variación de caracteres cualitativos

Una vez identificada y analizada la variación tanto en la forma como en el tamaño de la bráctea floral y de las estructuras florales, resultó necesario observar y describir cualitativamente la variación presente en los atributos florales y vegetativos. La evaluación de dichos atributos en los ejemplares de herbario para las tres especies reconocidas fue posible tras la observación de poco más de 800 especímenes (incluidos los 344 usados en el análisis morfométrico). Además de los ejemplares de herbario, la información se complementó con la observada en fotografías, ilustraciones y literatura (Cuadro 24). Para el caso de los ejemplares de las poblaciones silvestres muestreadas, se consideró únicamente lo observado en dichos ejemplares (Cuadro 25).

**Cuadro 23.** Resumen de los estadísticos descriptivos para los caracteres morfológicos cuantitativos de *Dichromanthus aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus* (Mínimo-) Media  $\pm$  Desviación Estándar (-Máximo). Medidas en mm.

<b>Estructura</b>	<b>Atributo</b>	<b><i>Dichromanthus aurantiacus</i></b>	<b><i>Dichromanthus cinnabarinus</i></b>	<b><i>Dichromanthus michuacanus</i></b>
<b>Bráctea floral</b>	Largo	(22.15-) 39.00 $\pm$ 6.54 (-54.70)	(9.54-) 18.58 $\pm$ 4.64 (-28.23)	(12.47-) 22.19 $\pm$ 4.78 (-33.60)
	Ancho base	(3.88-) 8.51 $\pm$ 2.41 (-14.79)	(3.35-) 4.11 $\pm$ 1.30 (-11.73)	(3.21-) 5.76 $\pm$ 1.69 (-10.11)
	Ancho tercio basal	(7.11-) 12.32 $\pm$ 2.54 (-21.49)	(3.39-) 5.40 $\pm$ 1.54 (-16.11)	(4.66-) 10.22 $\pm$ 2.45 (-14.30)
	Ancho tercio apical	(4.29-) 8.26 $\pm$ 1.77 (-13.05)	(2.04-) 3.18 $\pm$ 1.11 (-8.70)	(2.63-) 3.21 $\pm$ 0.92 (-4.96)
	Tamaño del centroide	(45.11-) 66.10 $\pm$ 9.94 (-89.78)	(16.57-) 30.14 $\pm$ 5.17 (-43.78)	(21.61-) 41.04 $\pm$ 8.60 (-65.41)
<b>Labelo</b>	Largo	(13.72-) 20.58 $\pm$ 3.66 (-31.86)	(10.58-) 14.58 $\pm$ 2.57 (-20.47)	(6.36-) 13.43 $\pm$ 3.13 (-19.05)
	Ancho base	(2.11-) 2.60 $\pm$ 0.61 (-4.38)	(3.59-) 4.11 $\pm$ 0.40 (-4.85)	(2.92-) 3.28 $\pm$ 0.53 (-5.30)
	Ancho tercio basal	(5.75-) 11.89 $\pm$ 1.89 (-16.51)	(3.84-) 4.50 $\pm$ 0.56 (-5.04)	(2.92-) 5.74 $\pm$ 1.41 (-9.53)
	Ancho tercio apical	(1.54-) 3.15 $\pm$ 0.79 (-5.36)	(3.10-) 3.79 $\pm$ 0.41 (-4.07)	(2.42-) 3.55 $\pm$ 1.05 (-6.39)
	Tamaño del centroide	(31.81-) 42.89 $\pm$ 4.32 (-53.26)	(20.75-) 32.67 $\pm$ 4.36 (-43.45)	(18.19-) 29.04 $\pm$ 4.80 (-43.15)
<b>Pétalo</b>	Largo	(14.10-) 21.90 $\pm$ 2.29 (-27.99)	(9.69-) 14.99 $\pm$ 2.08 (-23.40)	(9.97-) 14.52 $\pm$ 2.11 (-18.78)
	Ancho base	(1.54-) 2.97 $\pm$ 0.67 (-5.03)	(2.27-) 2.87 $\pm$ 0.38 (-3.05)	(1.08-) 2.07 $\pm$ 0.65 (-3.97)
	Ancho tercio basal	(1.76-) 2.79 $\pm$ 0.33 (-4.40)	(2.49-) 2.94 $\pm$ 0.38 (-3.52)	(1.35-) 2.64 $\pm$ 0.87 (-4.51)
	Ancho tercio apical	(2.11-) 2.53 $\pm$ 0.64 (-4.73)	(2.48-) 2.70 $\pm$ 0.40 (-3.58)	(1.52-) 2.62 $\pm$ 0.61 (-5.13)
	Tamaño del centroide	(26.92-) 35.18 $\pm$ 3.42 (-44.33)	(17.93-) 24.13 $\pm$ 2.92 (-31.46)	(16.42-) 23.92 $\pm$ 3.56 (-31.08)
<b>Sépalo dorsal</b>	Largo	(13.82-) 22.32 $\pm$ 2.54 (-27.75)	(11.47-) 16.74 $\pm$ 2.27 (-22.33)	(8.86-) 15.87 $\pm$ 2.71 (-20.74)
	Ancho base	(2.32-) 5.67 $\pm$ 1.52 (-9.12)	(3.07-) 3.59 $\pm$ 0.79 (-6.84)	(2.24-) 3.99 $\pm$ 1.38 (-7.70)
	Ancho tercio basal	(3.33-) 5.94 $\pm$ 1.11 (-8.44)	(3.41-) 3.26 $\pm$ 0.64 (-5.98)	(2.81-) 3.90 $\pm$ 1.03 (-6.68)
	Ancho tercio apical	(2.54-) 3.01 $\pm$ 0.59 (-4.35)	(3.37-) 3.96 $\pm$ 0.43 (-4.19)	(2.31-) 2.64 $\pm$ 0.61 (-4.57)
	Tamaño del centroide	(23.08-) 36.68 $\pm$ 3.86 (-45.18)	(18.41-) 27.16 $\pm$ 3.41 (-35.41)	(16.27-) 26.45 $\pm$ 4.31 (-35.14)
<b>Sépalo lateral</b>	Largo	(12.09-) 22.94 $\pm$ 2.75 (-29.08)	(10.83-) 18.21 $\pm$ 2.75 (-24.90)	(10.51-) 14.80 $\pm$ 2.84 (-21.88)
	Ancho base	(2.84-) 4.64 $\pm$ 0.94 (-6.97)	(11.16-) 1.95 $\pm$ 0.68 (-7.17)	(2.14-) 2.82 $\pm$ 0.76 (-4.72)
	Ancho tercio basal	(2.69-) 5.21 $\pm$ 0.98 (-8.31)	(2.03-) 2.12 $\pm$ 0.67 (-6.77)	(2.58-) 3.10 $\pm$ 0.64 (-4.46)
	Ancho tercio apical	(2.16-) 3.05 $\pm$ 0.60 (-4.64)	(1.23-) 1.61 $\pm$ 0.42 (-2.86)	(2.10-) 2.63 $\pm$ 0.65 (-5.49)
	Tamaño del centroide	(25.22-) 37.40 $\pm$ 3.89 (-46.48)	(17.58-) 29.38 $\pm$ 4.21 (-39.59)	(17.16-) 23.78 $\pm$ 4.18 (-36.27)
<b>Ovario</b>	Largo	(5.82-) 10.31 $\pm$ 3.97 (-15.43)	(5.29-) 8.77 $\pm$ 1.80 (-14.64)	(4.80-) 7.05 $\pm$ 1.30 (-10.63)

**Cuadro 24.** Comparación de caracteres entre las especies de *Dichromanthus* a partir de ejemplares de herbario.

Atributo/Especie	<i>Dichromanthus aurantiacus</i>	<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	<i>Dichromanthus michuacanus</i>
Altura* (cm)	22-120	15-100 (120)	12-47 (66)
Forma de las hojas	Elíptica	Lanceolada	Lanceolada
Disposición de las hojas	Caulinar	Caulinar o Rosulada	Caulinar o Rosulada
Color de las flores	Anaranjado	Sépalos amarillos o anaranjado-rojizos; pétalos y labelo amarillos con ápice rojizo	Blanco a amarillo limón con venas de color pardo o verde
Indumento floral	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes a glabros
Brácteas florales	Pubescentes, anaranjadas	Pubescentes, rojizas	Pubescentes a glabras, verdes pero marscentes en la antesis
Inflorescencia	Racimo laxo con 2-19 (29) flores	Racimo denso con 10-35 (75) flores	Racimo láxo con 6-30 (38) flores
Presencia de aroma	Ausente	Ausente	Presente
Tipo de vegetación en el que se presenta	Bosque de <i>Quercus</i> , bosque de coníferas, pastizal y matorral xerófilo	Bosque tropical caducifolio, bosque de <i>Quercus</i> , bosque de coníferas, pastizal y matorral xerófilo	Bosque tropical caducifolio, bosque de <i>Quercus</i> , bosque de coníferas, pastizal y matorral xerófilo
Distribución	México, Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua	México y Guatemala	Estados Unidos, México, Guatemala y Honduras

\* = Altura incluyendo la inflorescencia.

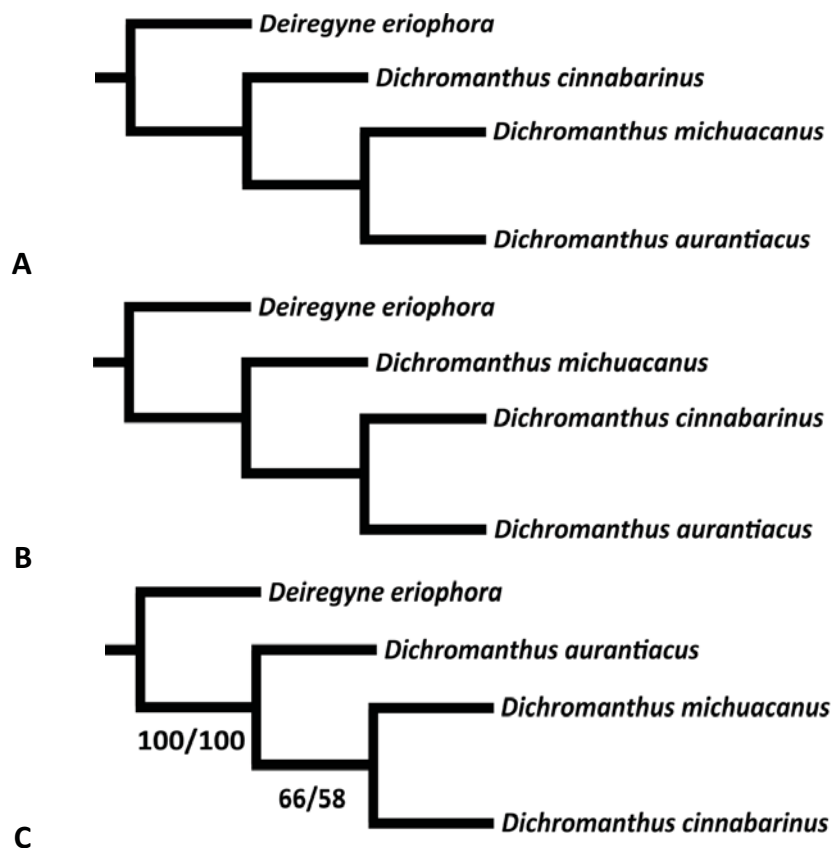
**Cuadro 25.** Comparación de caracteres entre las poblaciones de *Dichromanthus* estudiadas.

<b>Atributo/Especie</b>	<b><i>Dichromanthus aurantiacus</i>-DF</b>	<b><i>Dichromanthus aurantiacus</i>-HGO</b>	<b><i>Dichromanthus cinnabarinus</i>-DF</b>	<b><i>Dichromanthus michuacanus</i>-EDOMEX</b>
Altura* (cm)	63-138	58-104	15-120	12-48
Forma de las hojas	Elíptica	Elíptica	Lanceolada	Lanceolada
Disposición de las hojas	Caulinar	Caulinar	Caulinar o Rosulada	Caulinar o Rosulada
Color de las flores	Anaranjado	Anaranjado	Sépalos anaranjado-rojizos; pétalos y labelo amarillos con ápice rojizo	Blanco a amarillo limón con venas de color pardo o verde
Indumento floral	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes	Ovario y superficie abaxial de los sépalos pubescentes a glabros
Brácteas florales	Pubescentes, verde-anaranjadas	Pubescentes, verde-anaranjadas	Pubescentes, rojizas	Pubescentes, verdes pero marscentes en la antesis
Inflorescencia	Racimo laxo con 8-32 flores	Racimo laxo con 5-26 flores	Racimo denso con 15-75 flores	Racimo láxoo con 11-36 flores
Presencia de aroma	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
Tipo de vegetación en el que se presenta	Matorral xerófilo	Pastizal	Matorral xerófilo	Vegetación secundaria

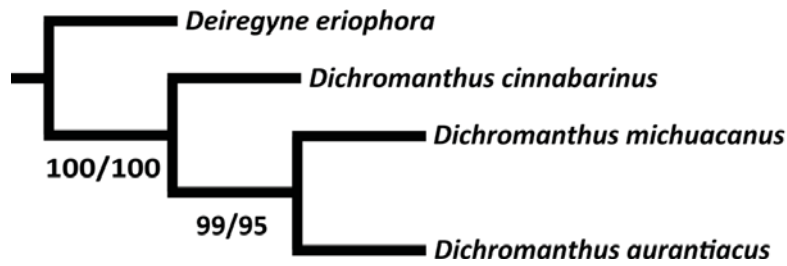
\* = Altura incluyendo la inflorescencia.

## 5.7 Análisis filogenéticos

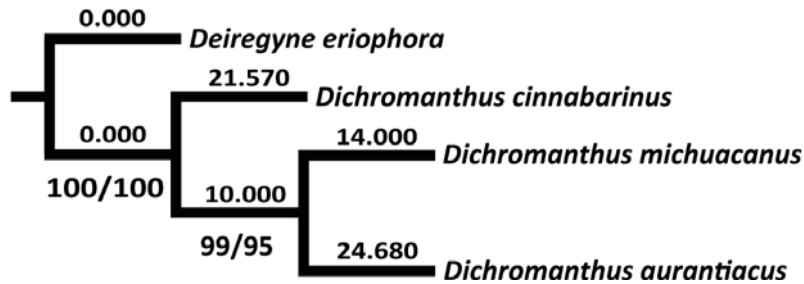
Los análisis filogenéticos incluyeron únicamente a las tres especies de *Dichromanthus* identificadas (*D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*) en la evaluación de la forma y tamaño. Tanto el análisis de las configuraciones (forma), como del tamaño y evidencia molecular, difirieron en términos de topología, grado de resolución y soporte, así como en la cantidad de homoplasia (Cuadro 26 y Figura 16, 17). Con el análisis combinado la topología recuperada fue coincidente con la observada al combinar las configuraciones de las cinco estructuras. Asimismo la topología recuperada también coincidió con los datos moleculares (Figura 18). En estos casos *D. cinnabarinus* divergió primero, seguida por *D. michuacanus* y *D. aurantiacus*.



**Figura 16.** Hipótesis filogenéticas generadas a partir del análisis de la forma y el tamaño. A) Topología recuperada al analizar por separado la bráctea floral, pétalo, sépalo dorsal, sépalo lateral y para el análisis combinado de las cinco estructuras incluido el labelo. B) Hipótesis recuperada tras analizar la configuración del labelo. C) Topología obtenida al analizar el tamaño. Los números bajo las ramas indican los valores de soporte bootstrap/jackknife, mientras que la ausencia de éstos indica valores inferiores a 50%.



**Figura 17.** Árbol más parsimonioso derivado del análisis de las regiones ITS y *trnL-trnF*. Los números bajo las ramas indican los soportes de grupos bootstrap/jackknife.



**Figura 18.** Árbol más parsimonioso derivado del análisis combinado de datos morfométricos, morfológicos y moleculares. Números sobre las ramas indican la longitud de las ramas. Los números bajo las ramas son los soportes de grupos bootstrap/jackknife.

## 5.8 Mapeo de caracteres sobre el árbol más parsimonioso

Las configuraciones x, y y de las cinco estructuras: bráctea floral, labelo, pétalo, sépalo dorsal y sépalo lateral, fueron optimizadas a partir del árbol más parsimonioso obtenido del análisis combinado (Figura 19). A continuación se indican los cambios de carácter para cada una.

En el caso de la configuración de la bráctea floral, se observa que está constituida por veintisiete marcas. El diagrama (Figura 19A) de las rejillas de deformación entre el nodo basal del género *Dichromanthus* y que representa la forma hipotética del ancestro, muestra desplazamientos (vectores de deformación) en los landmarks: 8 y 15-20. Entre el nodo *D. aurantiacus* y *D. michuacanus* se observan desplazamientos en los landmarks: 2-4, 8-12, 15, 18, 19 y 23-26. Por su parte, *D. cinnabarinus* presenta desplazamientos principalmente en la parte media (marcas: 2-6 y 21-27). Por otro lado, el nodo ancestral entre *D. michuacanus* y *D. aurantiacus* muestra desplazamientos en las marcas 1, 6-13 y 15-21. La forma de la bráctea floral en *D. michuacanus* muestra desplazamientos en las marcas: 1-7, 13-15 y 21-27. Por su parte, los cambios en la forma de *D. aurantiacus* se hacen presentes en los landmarks: 2-4, 8-13, 15-20 y 23-26.



En la Figura 19B se muestran los desplazamientos de las treinta y nueve marcas que recuperaron la forma del labelo, en los tres taxa considerados como parte del género *Dichromanthus*, en los cuales son evidentes los desplazamientos en las marcas 7-19 y 21-32 del ancestro hipotético. El clado en donde se ubica *D. cinnabarinus* reconstruyó una forma con vectores de deformación en los landmarks 1-19, 21-29 y 31-37. La configuración hipotética entre el nodo *D. michuacanus* y *D. aurantiacus* presentó desplazamiento en ocho marcas (2-6 y 35-37). La especie *D. michuacanus* presentó desplazamientos en las marcas: 1-19 y 21-39. En cambio, la forma del labelo en *D. aurantiacus* muestra desplazamientos en los landmarks: 1, 2, 11, 15-19, 22-27, 31, 38 y 39.

La Figura 19C indica que la forma hipotética del pétalo en *Dichromanthus* tiene desplazamiento en la mayor parte de la configuración, excepto por las marcas 2 y 14. El nodo *D. cinnabarinus* presenta vectores de deformación en las marcas: 1, 2, 13, 14 y 16-19. La forma recuperada entre *D. michuacanus*-*D. aurantiacus* se desplaza en las marcas: 2-6, 9-11 y 25-27. En este clado, la especie *D. michuacanus* exhibe desplazamiento en los landmarks: 2-9, 11-14, 16-24 y 27, mientras que *D. aurantiacus* muestra desplazamiento en las marcas: 8-10, 15, 17-23 y 26.

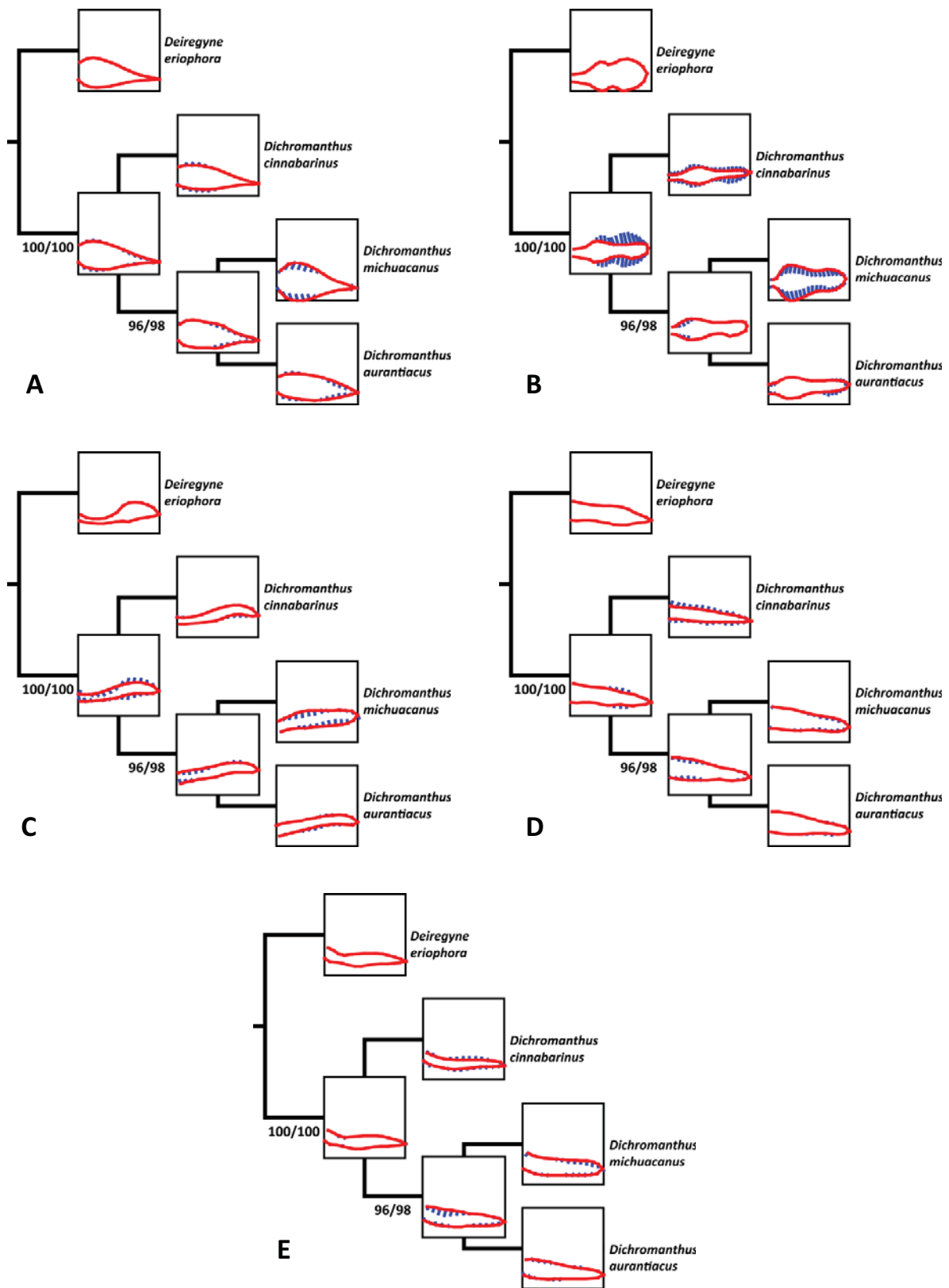
La configuración del sépalo dorsal en *Dichromanthus* muestra desplazamiento en las marcas: 7-10, 13 y 18-20 (Figura 19D). El sépalo dorsal en el nodo *D. cinnabarinus* posee vectores de deformación en las marcas: 1-13 y 15-27. El nodo integrado por *D. michuacanus*-*D. aurantiacus* presenta vectores de deformación en los landmarks: 1-6, 12, 13, 15, 16 y 22-27. En este nodo, la especie *D. michuacanus* se desplaza en las marcas: 1, 7-13, 15-20, 22, 23 y 27, en cambio *D. aurantiacus* presenta desplazamiento en las marcas: 10, 11, 17, 18, 20 y 21.

La forma del sépalo lateral, recuperada con 27 landmarks, se desplaza en cinco marcas (3, 4, 13, 14 y 24) del ancestro hipotético de *Dichromanthus* (Figura 19E). El clado formado por *D. cinnabarinus* muestra desplazamiento en las marcas: 1, 2, 5-11, 13-23, 25 y 27. La forma hipotética recuperada para el nodo formado por *D. michuacanus*-*D. aurantiacus* evidencia desplazamiento en las marcas: 1-8, 12, 13, 15-19 y 23-27. La forma de *D. michuacanus* muestra vectores de deformación en los landmarks: 1, 2, 6-20 y 23-25, mientras que los vectores de deformación en las marcas: 2-6, 9, 10 y 21-27 permitieron apreciar el cambio en la forma de *D. aurantiacus*.

**Cuadro 26.** Características de las filogenias generadas con las diferentes fuentes de datos. L = Longitud, CI = Índice de Consistencia, RI = Índice de Retención.

Análisis	Longitud de la matriz alineada	Número / % de caracteres variables		Número / % de caracteres informativos	L	CI	RI
		Número de sustituciones	Número de indels				
Configuración de la bráctea floral	1	-	1 / 100	1 / 100	1.226	0.99	0.99
Configuración del labelo	1	-	1 / 100	1 / 100	1.113	0.77	0.93
Configuración del pétalo	1	-	1 / 100	1 / 100	1.195	1	1
Configuración del sépalo dorsal	1	-	1 / 100	1 / 100	1.160	1	1
Configuración del sépalo lateral	1	-	1 / 100	1 / 100	1.153	1	1
Cinco configuraciones combinadas	5	-	5 / 100	5 / 100	6.175	0.94	0.98
Tamaño	6	-	6 / 100	6 / 100	39.510	1	1
Dos marcadores de ADN	1699	46	47 / 2.76	4 / 0.23	60	0.98	0.90
Cinco configuraciones, tamaño, y ambos marcadores de ADN combinados	1710	46	58 / 3.39	15 / 0.87	108.482	0.97	0.80

En todos los casos se recuperó un solo árbol más parsimonioso.



**Figura 19.** Optimización de la configuración de las estructuras sobre el árbol del análisis combinado. A) Bráctea floral. B) Labelo. C) Pétalo. D) Sepalo dorsal. E) Sépalo lateral. Los números bajo las ramas indican los soportes de grupos bootstrap/jackknife.

## VI. DISCUSIÓN

Al tener en cuenta que no existe un consenso con respecto al número de especies que integran al género *Dichromanthus*, se planteó el objetivo principal de contribuir a la delimitación de las especies que lo conforman a partir del uso de técnicas de morfometría tradicional y geométrica. Lo anterior bajo la hipótesis de que las especies que forman parte de dicho género, son morfológicamente variables pero pueden ser diferenciadas entre sí por una combinación única de caracteres. Por ello se esperaba que el análisis de la forma y el tamaño de las estructuras seleccionadas permitieran reconocer los límites entre las especies que han sido separadas mediante evaluación visual.

En este apartado se discute la utilidad de las herramientas morfométricas empleadas para delimitar las especies que integran al género *Dichromanthus*. En el Anexo II se presenta una clave de identificación que además de presentar las tres especies reconocidas en el presente trabajo incluye a *D. yucundaa*.

### **6.1 Morfometría geométrica: Variación en la forma y tamaño**

Para el caso de los ejemplares de herbario, el análisis de la forma, registró diferencias significativas que permitieron distinguir tres grupos de morfoespecies. Este patrón se repitió en todas las estructuras evaluadas. Sin embargo, el tamaño del centroide arrojó diferentes resultados en cuanto al número de especies reconocidas, pero de manera general *D. aurantiacus* presentó valores más altos en comparación con *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus* que poseen dimensiones similares. La variación observada ya había sido reportada en trabajos como los de McVaugh (1985) y Szlachetko et al. (2005) para las dimensiones totales de las estructuras. El patrón observado corresponde al grupo de especies del género *Dichromanthus* propuesto por Salazar et al. (2011): *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*. Éstas corresponden a las reconocidas desde 1824, mediante evaluación visual, por Lexarza en la obra de La Llave & Lexarza (1824) y autores posteriores (p. ej.: Peña, 2001; Salazar, 2003). Las poblaciones muestreadas también presentaron variación en la forma y tamaño de las diferentes estructuras.

En *Dichromanthus aurantiacus*, la forma lanceolada u ovado-lanceolada que según Szlachetko et al. (2005) presenta la bráctea floral y, en parte caracteriza a *Stenorrhynchos pubens* no resulta de utilidad para diferenciarla de *D. aurantiacus*. En cuanto al tamaño del centroide, el ANOVA detectó diferencia significativa entre *D. aurantiacus* y *S. pubens* pero ésta fue marginal, por lo que en realidad el tamaño de dicha estructura tampoco es útil para distinguir entre ellas. Por lo anterior, el no haber detectado diferencia en la forma ni en el tamaño de esta estructura indica que la forma lanceolada, ovado-lanceolada u oblongo lanceolada es parte de la variación de *D. aurantiacus*.

El labelo, en ambas morfoespecies no difirió y la forma pandurada con algunas variaciones en las proporciones del hipoquilo y epiquilo resultó ser parte de la variación. La variación que detectaron Szlachetko et al. (2005) y que les dio pauta para proponer a *S. pubens* como una especie diferente de *D. aurantiacus* resulta ser una arbitrariedad, ya que las características que en determinado momento permitirían separar ambas morfoespecies se hallaron en diferentes flores de una misma inflorescencia. El tamaño del centroide tampoco apoya la existencia de dos especies. En cuanto a los pétalos, no se detectaron diferencias entre la forma y el tamaño del centroide. Los pétalos con forma oblongo-oblancheolada o linear con el tercio apical espatulado y ápice agudo que según Szlachetko et al. (2005) permiten diferenciar a *D. aurantiacus* (*S. aurantiacus*) de *S. pubens* (por presentar segmentos con forma oblongo-oblancheolada pero ápice subobtusos), son en realidad parte de la variación presente en la especie que hasta este momento, no había sido evaluada objetivamente.

Por otro lado, en la evaluación de la configuración de los sépalos no se encontraron diferencias entre las formas de lámina oblongo-triangular a lanceolada, oblonga, ovada o linear-lanceolada y ápice agudo, subagudo o acuminado. El análisis discriminante en ambos casos no logró separar ambas especies, sino que todos los registros se agruparon sin un patrón bien definido en un mismo espacio. Sin embargo, la configuración del sépalo lateral discriminó de mejor manera entre *D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus*, a diferencia del sépalo dorsal.

En el caso de *Dichromanthus cinnabarinus*, el análisis de la forma y el tamaño en cada uno de los segmentos florales, así como de la bráctea floral, no detectó diferencias entre los ejemplares analizados y por ello no se reconocen las subespecies que en 2002 propuso Soto. Estas entidades que en determinado momento podrían diferenciarse mediante evaluación visual de una serie de atributos que consideran principalmente variables cualitativas, además del tamaño de las flores y sus componentes, no presentan apoyo al ser evaluadas con aproximaciones morfométricas. De manera

general, se puede decir que las estructuras de *D. cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus* presentan tamaños relativamente mayores que la subsp. *galeottianum*, pero estadísticamente estas diferencias no son significativas.

Por su parte, en *Dichromanthus michuacanus*, el análisis de las configuraciones para cada una de las estructuras reconoció un solo grupo que es muy variable. En el caso de la bráctea floral la forma es ovada o elíptico-ovada y largamente acuminada. En la revisión que llevaron a cabo Szlachetko y colaboradores (2005), se hace referencia a que el labelo es oblongo y presenta una constricción cerca de la mitad de la lámina y que ésta permite distinguir dos porciones llamadas hipoquilo y epiquilo. Sin embargo, no todos los ejemplares empleados en el presente estudio presentaron de manera evidente dicha discontinuidad en la lámina. La localización de dicha discontinuidad atiende a la presión que se ejerza sobre dicha estructura al momento de montarla y por lo tanto un mismo labelo puede presentar diferentes tamaños tanto en el hipoquilo como en el epiquilo. Por lo anterior, no se reconocieron dichas porciones porque se consideró que dicha división no es objetiva ni repetible.

Aunque no se analizaron el hipoquilo y epiquilo como módulos separados, se analizó la forma completa del labelo con ayuda de semimarcas, pero no se observaron diferencias entre las muestras consideradas. Los pétalos presentan una lámina falcada. Los sépalos son lanceolados. El tamaño del centroide en los distintos elementos se comportó de igual manera, es decir, *S. vexillaris* presenta en promedio estructuras más pequeñas que *D. michuacanus*, pero estadísticamente estas diferencias no son significativas, por lo que únicamente se pudo reconocer una especie.

En 1994, Szlachetko propuso la subespecie *Stenorrhynchos michuacanus* (Lex.) Lindl. subsp. *vexillaris* Szlach., pues consideró que el tamaño tanto del hipoquilo como epiquilo diferían de manera considerable de los previamente observados en *S. michuacanus*. En este trabajo dijo que: “*la nueva subespecie difiere de la subespecie tipo de Stenorrhynchos michuacanus por la forma del labelo, el cual está bruscamente constreñido justo abajo en la parte media, con el epiquilo usualmente más largo que el hipoquilo*”. Posteriormente Rutkowski et al. (2004), la elevaron a categoría de especie por considerar que los ejemplares con la característica anteriormente mencionada eran evidencia suficiente para diferenciarla de *Dichromanthus (Stenorrhynchos) michuacanus*. En 2005, en la obra “Contributions to the taxonomic revision of subtribus Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Orchidaceae) in Mesoamerica and The Antilles”, Szlachetko y colaboradores presentaron una clave dicotómica donde separaron a *S. vexillaris* de *S. michuacanus* y *S. xoxonitla*,

que considera principalmente el tamaño en las porciones del labelo. Al algunos ejemplares empleados por dichos autores en esta investigación, se pudo observar que un mismo ejemplar podía ser incluido dentro de una especie diferente a la que ellos consideraron.

Lo anterior indica que existe un total desacuerdo entre las propuestas de estos autores y que en realidad no evaluaron objetivamente las similitudes y diferencias presentes en estas morfoespecies. Esto evidencia que muchos trabajos taxonómicos y comparaciones entre especies se siguen basando en la evaluación visual subjetiva de las diferencias y similitudes entre taxa (Mutanen & Pretorius, 2007). Esto en ningún caso representa la mejor opción para el estudio de especies que son muy variables o son consideradas parte de un complejo. Dichas especies ya conocidas, al ser estudiadas meramente a través de la evaluación visual, generalmente son divididas en dos o más especies morfológicamente similares que para ser identificadas “correctamente” requieren ser evaluadas por la persona que las describió, lo cual es impráctico y carece de carácter científico.

Desafortunadamente, muchas nuevas especies están siendo descritas como resultado de la reevaluación de especies ya conocidas, que son divididas en dos o más especies morfológicamente similares, a menudo sin apoyo estadístico y lejos de solucionar un problema originan otro. Para evitar esto, Carstens *et al.* (2013) sugieren la aplicación de un amplio número de análisis a los datos para delimitar especies y así tomar decisiones que sean congruentes con los resultados observados, con lo cual se evitaría delimitar entidades que no representan linajes evolutivos. Entre estas recomendaciones se encuentra la morfometría, específicamente la geométrica.

En este entendido, las especies propuestas por Szlachetko (1994), Szlachetko *et al.* (2005) y Rutkowski *et al.* (2008), como parte del género *Stenorhynchos* (*S. pubens*, *S. vexillaris* y *S. xoxonitla*) no reciben apoyo alguno de los análisis efectuados en este estudio para reconocerse como entidades diferentes a las previamente identificadas por Lexarza en el trabajo de La Llave & Lexarza (1824). Además, la forma y tamaño que presentan las estructuras florales y bráctea floral de *D. cinnabarinus* no permiten reconocer subespecies como lo propuso Soto (2002).

La variación observada en los caracteres reproductivos para cada una de las especies reconocidas como parte de *Dichromanthus* ha sido ampliamente reconocida en diferentes grupos de plantas. En algunos casos esta variación está evidenciada en poblaciones que presentan una amplia distribución geográfica y que ocupan territorios discontinuos a manera de mosaicos (Domínguez *et al.*, 1998; Turchetto *et al.*, 2014), como en el caso de las poblaciones estudiadas de *D. aurantiacus*, *D.*

*cinnabarinus* y *D. michuacanus*. También es sabido que especies distribuidas a lo largo de gradientes geográficos y ecológicos frecuentemente muestran variaciones morfológicas graduales (Worley et al.; 2001; Silva-Montellano & Eguiarte, 2003). Sin embargo, en algunos casos el gradiente altitudinal, así como el de precipitación y temperatura están correlacionados con el tamaño de las flores (Hodgins & Barrett, 2008). A pesar de todo esto, la alta uniformidad en la morfometría floral sugiere fuerte coadaptación entre el tamaño de los órganos florales y los agentes polinizadores (Ushimaru et al., 2003).

Lo anterior, indica que los caracteres reproductivos generalmente muestran cierto grado de variación morfológica, como parte de la variabilidad genética de cada especie y que sobre ésta actúa la selección natural como fuerza principal de especiación (Fairbairn & Reeve, 2001; Conner, 2006; Mazer & Damuth, 2001 a y b). Además que entre los caracteres morfológicos reproductivos, las dimensiones florales son las que mayor variación exhiben, por lo que las flores con la misma organización estructural pueden diferir en varios órdenes de magnitud de tamaño (Olmedo, 2013; Rosas-Guerrero et al., 2010). Actualmente es sabido que esta variación identificada como plasticidad adaptativa favorece el éxito reproductivo (Zhao et al., 2010).

Es muy probable que la variación observada en los integrantes de *Dichromanthus* atienda a la plasticidad, pues es reconocido que este concepto incluye virtualmente todas las características morfológicas, de comportamiento, fisiológicas, reproductivas y también todos los factores ambientales tanto bióticos como abióticos (Sultan & Stearns, 2005). De hecho, esta propiedad fundamental de los organismos ha sido identificada en integrantes de la familia Orchidaceae (p. ej.: Bateman & Rudall, 2006; Borba et al., 2002; Kennedy & Watson, 2010; Palestina & Sosa, 2002; Pinheiro & de Barros, 2007; Ponsie et al., 2009; Ramos-Castro et al., 2013; Rakosy et al., 2013; Salazar-Rojas et al., 2010).

## **6.2 Morfometría tradicional**

El análisis de morfometría tradicional de las diferentes variables consideradas para cada una de las estructuras mostró que el género *Dichromanthus* está integrado por tres especies: *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*. Estas especies pueden distinguirse con 21 medidas relacionadas con la longitud de la bráctea floral, sépalos, pétalos, labelo y ovario (Cuadro 3). Sin



embargo, se debe poner atención principalmente en siete que resultaron útiles para distinguirlas y que corresponden a la bráctea floral (largo, ancho de la base, ancho del tercio basal), sépalo lateral (largo, ancho y ancho del tercio basal) y largo del ovario.

En el caso de la bráctea floral, las medidas pueden obtenerse rápidamente porque esta estructura puede desprenderse con relativa facilidad sin la necesidad de hacer disecciones bajo el microscopio. Es por ello que se sugiere su uso en la determinación práctica de las especies. De acuerdo a Salazar (2003), debido a su amplia distribución y requerimientos ecológicos similares, estas taxa en muchos sitios resultan ser simpátricos, como por ejemplo en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (Salazar, 2009) y aunque presentan diferencias morfológicas muy evidentes, las medidas podrán complementar los caracteres usados en la clave de determinación, cuando las características méristicas de otros atributos y de coloración no sean del todo claras. Esto procede, al menos, con *D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus* que presentan una coloración similar, florecen durante el verano-otoño, por lo que presentan un traslapamiento parcial. Ante esta posibilidad y de manera adicional para comparar las diferencias en tamaño de cada especie, en el Cuadro 23 se resumen las medidas lineales consideradas para cada una de las estructuras.

En cuanto al sépalo lateral, la medición de las variables que permiten distinguir entre especies no resulta del todo tan sencilla de obtener porque éste se encuentra ligeramente fusionado tanto al sépalo dorsal como a los pétalos. Sin embargo, si existe incertidumbre en cuanto a la determinación de algún ejemplar, se hace necesaria la disección de las flores para poder observar estos atributos merísticos.

Además de las estructuras que resultaron de utilidad para distinguir merísticamente entre las especies de *Dichromanthus*, es importante hacer mención acerca del uso y utilidad del labelo. Este punto es importante porque según Szlachetko et al. (2005), al menos *S. vexillaris* y *S. xoxonitla* se diferencian de *Stenorhynchos* (= *Dichromanthus*) *michuacanus* por diferencias en el labelo. Sin embargo, ninguna de las características evaluadas como parte del labelo fueron importantes en el análisis discriminante a diferencia de otros estudios, en donde la forma y/o tamaño del labelo son relevantes en la identificación de especies (Shipunov & Bateman, 2005) y porque actúa como atrayente primario y sitio de aterrizaje para el polinizador (Benitez-Vieyra et al., 2009; Gaskett, 2012). Esto indica que en realidad el labelo es muy variable y que el reconocimiento de más de una especie

en este grupo no tiene fundamentos. Por lo tanto, todos los ejemplares corresponden a *D. michuacanus*.

Los resultados observados indican que las especies que han sido incluídas en *Dichromanthus* por Salazar y colaboradores (Salazar, 2003; Salazar & García Mendoza, 2009; Salazar & Ballesteros-Barrera, 2010; Salazar et al., 2011) son entidades taxonómicas diferenciadas morfológicamente y que atienden a un sistema de clasificación más objetivo que el proporcionado por otros autores (Rutkowski et al., 2008; Szlachetko, 1994; Szlachetko et al., 2005).

### 6.3 Cuantificación de la variación en la forma y tamaño

Los estudios taxonómicos de cualquier grupo de plantas pueden comprender dos partes, la descriptiva y la filogenética. El trabajo que desarrollan los taxónomos es esencial para la conservación de la biodiversidad y para estimar cuántas especies aún faltan por ser descubiertas (Solow & Smith, 2005). Sin embargo, muchos de ellos no están bien “entrenados” o no reciben el entrenamiento necesario para el estudio de la biodiversidad y únicamente reconocen especies nuevas directamente en campo y no a través del uso de ejemplares preservados en museos (Drew, 2011). En cambio, otros emplean “incorrectamente” los ejemplares de herbario y describen muchas especies a partir de las variaciones observadas en los atributos que ellos piensan o asumen son importantes.

*Dichromanthus* es un ejemplo claro en donde la descripción de especies nuevas indica que el uso de técnicas inadecuadas para el estudio de la variación, durante la preparación de monografías o trabajos descriptivos de la biodiversidad, ha llevado a describir innecesariamente el número de taxa para el género. Una de las razones por la cual existe esta diferencia en los tratamientos generados es debido a la naturaleza subjetiva del proceso del estudio y a los diferentes conceptos de especie adoptados por los taxónomos (Henderson, 2005).

En el presente estudio, la variación morfológica del género fue estudiada mayormente en ejemplares de herbario que cubren la distribución conocida para *Dichromanthus*, pero también fue evaluada a nivel poblacional, para al menos una población de cada una de las tres especies reconocidas. El análisis de la forma mediante morfometría geométrica y del tamaño con morfometría tradicional para ambos tratamientos, ejemplares de herbario y frescos, arrojó básicamente el mismo resultado. Al parecer, el cambio en el tamaño de la bráctea floral y segmentos florales en las especies

de *Dichromanthus*, no implica la pérdida de información que pueda en determinado momento, ser interpretada como concluyente para la descripción de nuevas especies. Esto al considerar que estadísticamente hay apoyo para el reconocimiento de únicamente tres especies y no hubo diferencias significativas entre los ejemplares frescos y los preservados en herbarios.

El desarrollo de las flores requiere una considerable cantidad de agua, pues el mayor cambio en el tamaño de los pétalos, y demás segmentos florales, a partir del botón floral involucra una expansión celular hídrica (Galen, 2000). Por ello, la reducción en el tamaño de las estructuras se adjudica a la pérdida de agua en los tejidos y es por esto que se debe tener en cuenta que pueden presentarse también cambios en la forma. Esto mismo ha sido observado entre ejemplares frescos y ejemplares preservados en alcohol de *Platanthera* (Bateman et al., 2012). Es posible que a diferencia de otros géneros de orquídeas que presentan segmentos florales carnosos (p. ej.: *Angraecum*, *Chysis*, *Stanhopea*), *Dichromanthus* no presente grandes cambios pues posee segmentos poco engrosados y la pérdida de agua por ende es menor. En todo caso, la pérdida de agua por el proceso de herborización de los ejemplares es de cierta manera suplida al rehidratar las flores.

El uso de ejemplares de herbario parte de reunir todos los ejemplares posibles, a partir de tantos herbarios como sea posible, como fuente primaria para el material de estudio (Henderson, 2005) y es considerada como la etapa inicial en la producción de una revisión monográfica. De hecho, el uso de ejemplares de herbario sobre poblaciones de ejemplares frescos se justifica por la conveniencia de que existe material disponible para ser estudiado y porque representa un menor costo para el muestreo.

En este sentido, el uso de las técnicas adecuadas para la delimitación de especies resulta más relevante que la procedencia de los ejemplares, es decir, si provienen de colecciones científicas o si son colectados directamente en campo y son analizados cuando aún conservan todas sus características tanto cuantitativas como cualitativas.

Aunque la variación morfológica asociada con la preservación de ejemplares ha sido raramente reportada, el uso de material vegetal resguardado en herbarios sigue siendo vital en el trabajo taxonómico (Corney et al., 2012). Lo cierto es que, los procesos de preparación y preservación de los ejemplares así como las condiciones de observación pueden afectar la correcta evaluación de los estados de carácter (Baylac et al., 2003). No obstante, este recurso aunque presenta modificaciones, por el proceso de herborización, en el tamaño y forma de sus estructuras y carece de

características principalmente cualitativas, sigue siendo de gran utilidad para el estudio de la biodiversidad, ya que nos da un panorama sobre la variación que presentan las especies.

Sin embargo, es sabido que las características florales varían pues representan un compromiso adaptativo para la selección causado por los polinizadores y agentes externos (Lázaro & Totland, 2014; Strauss & Whittall, 2006). De hecho, dentro de los agentes externos se han identificado numerosos mecanismos a través de los cuales la adaptación floral puede verse forzada, es decir, de desarrollo, bioquímicos y moleculares, pero sobre todo el papel de los agentes ecológicos, bióticos y abióticos. Algunos caracteres como el color de los pétalos, el tamaño y despliegue floral, forma de la flor, composición del néctar, fenología floral, y sistema reproductivos, han evolucionado inicialmente en respuesta a la selección de los polinizadores, pero también están bajo una fuerte selección por parte de otros miembros de la comunidad (Herrera, 1993), por lo que indiscutiblemente tienden a variar. La variación observada en los caracteres florales de las tres especies de *Dichromanthus* es ejemplo del polimorfismo floral identificado como la variación en la forma, tamaño, esencia y color, lo cual es un fenómeno común en las angiospermas (De Jager & Ellis, 2014). Esta variación incluso si es pequeña representa la materia prima sobre la cual la selección natural puede magnificar y eventualmente resultar en la diversificación vegetal (Herrera, 2005).

#### **6.4 Variación en atributos cualitativos**

Estudios comparativos entre los caracteres florales y vegetativos de diferentes grupos de plantas indican que los primeros están más integrados y por lo tanto son menos variables que los segundos (p. ej.: Herrera, 2001; Pélabon et al., 2013). Sin embargo, otros muestran que las características florales responden a la variación ambiental, algunas veces de manera muy marcada (p. ej. Armbruster et al., 1999; Brock & Weining, 2007).

El examen detallado de ejemplares de herbario y ejemplares frescos revelaron una considerable variación en los caracteres que generalmente son empleados para identificar las especies de *Dichromanthus* (Cuadro 24, 25). Sin embargo, la mayoría de los atributos permanecieron constantes y sólo algunos como la altura, presencia de pubescencia, disposición de las hojas, orientación de las flores y su coloración presentaron variación. Por ello es necesario enfocarse más en dichos atributos, pues el reconocimiento de las especies que integran el género se ha basado

mayormente en caracteres tanto morfológicos reproductivos como vegetativos al igual que en la mayoría de plantas (Perrie & Brownsey, 2005).

La altura es una característica muy variable dentro del género; sin embargo, de las tres especies identificadas, *D. aurantiacus* al igual que *D. cinnabarinus* presentan plantas de hasta 1.20 m, que resultan ser más altas que las de *D. michuacanus* pues llegan a alcanzar alturas de poco más de la mitad que las anteriores. La disposición de las hojas en *D. aurantiacus* es caulinar, pero en *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*, ésta puede ser basal o a lo largo del tallo.

En todos los casos, la inflorescencia es racemosa y presenta numerosas flores. *Dichromanthus aurantiacus* y *D. michuacanus* presentan menor cantidad de flores que *D. cinnabarinus*. Además, las flores se encuentran dispuestas helicoidalmente a lo largo del raquis por lo que apuntan en todas direcciones. Sin embargo, algunos ejemplares de *D. cinnabarinus* presentan sus flores dispuestas mayormente hacia una sola dirección. En cuanto a la coloración, *D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus* presentan flores con segmentos amarillo-anaranjados a rojizos, mientras que *D. michuacanus* presenta flores de color crema, amarillo o verde. En las primeras, la bráctea tiende a ser anaranjada o rojiza mientras que en la segunda es verde y marcescente.

La presencia de pubescencia tanto en la inflorescencia como en los segmentos florales (ovario y sépalos) y la bráctea floral es un carácter constante en *D. aurantiacus* y *D. cinnabarinus*. Sin embargo, la densidad de los tricomas que aunque no fue evaluada, si presenta variación pues ésta puede ser escasa o abundante en la inflorescencia. Mientras que la presencia de vellosidades en el ovario generalmente es mayor en comparación con la bráctea floral y los sépalos. En estos últimos, la pubescencia se observó mayormente en la base pero también puede presentarse en el margen o a lo largo de la lámina. En el caso de *D. michuacanus*, el patrón es similar al observado con las especies antes mencionadas, pero algunos ejemplares son glabros.

La variación observada en ejemplares de herbario y ejemplares frescos que fueron incluidos en este trabajo sugiere que, dado que éstos crecen en ambientes diferentes, han tenido que adaptarse a factores ecológicos contrastantes y esto se ve reflejado en sus atributos morfológicos (Körner, 2003; Molina-Montenegro & Cavieres, 2010). De acuerdo a Cavieres (2000), algunos de los atributos morfológicos que son rápidamente detectados por su variación y que se presentaron en *Dichromanthus* son: el área foliar, la altura del individuo y la densidad de pubescencia. Sin embargo,

estos atributos deben ser estudiados bajo otras aproximaciones a fin de tener un mejor entendimiento sobre su variación y funcionalidad en las especies de *Dichromanthus*.

Las variaciones observadas llevaron en determinado momento a proponer distintas especies y subespecies a partir de algunas ya existentes dentro de *Dichromanthus* (Rutkowski et al., 2008; Soto, 2002; Szlachetko et al., 2005), pero actualmente existe suficiente evidencia de que la variación geográfica, de los agentes selectivos bióticos y abióticos, tiene un profundo efecto en la manera en que evolucionan las plantas, particularmente en características reproductivas (Thompson, 2005). Esta variación que hasta ahora no había sido evaluada, propició que Soto (2002), Szlachetko et al. (2005) y Rutkowski et al. (2008) determinaran y aceptaran la existencia de varias especies como parte del género *Dichromanthus* (*Stenorrhynchos*) en México. Sin embargo, los ejemplares de *Dichromanthus* incluidos en el presente estudio y que fueron inicialmente identificados como *D. cinnabarinus* subsp. *galeottianum*, *S. pubens* y *S. vexillaris*-*S. xoxonitla*, no pueden ser considerados como entidades diferentes de *D. cinnabarinus*, *D. aurantiacus* y *D. michuacanus* respectivamente. Esto debido a que las características que las definen no se encuentran representadas en poblaciones, sino en pocos ejemplares aislados entre sí.

## 6.5 La morfometría, una herramienta en taxonomía

La ciencia es intrínsecamente una actividad de autocorrección que se basa en evidencia verificable (Tomlinson & Quinn, 2013). La identificación y delimitación de especies, a partir de diferentes técnicas y herramientas, es de importancia fundamental dentro del campo de la biología, biogeografía, ecología y conservación (Duminil et al., 2012). Sin embargo, las interpretaciones equivocadas durante su progreso hacia un entendimiento más completo pueden ser resultado de errores de medición, observación y análisis o de ignorar información ya existente que puede contradecir conclusiones generadas en un estudio incompleto (Tomlinson & Quinn, 2013). Estos errores generalmente llevan a establecer límites tan artificiales que generan una estimación errónea de la biodiversidad (Strelin et al., 2013).

Además de la evaluación visual, que resulta muchas veces ser subjetiva para la descripción de especies, ya que no considera características métricas (Mutanen & Pretorius, 2007), la morfología ha sido empleada para describir estructuras como tejidos, células, órganos, dimensiones, formas,

relaciones entre ellos, etcétera (Toro et al, 2010). Este es el caso del género *Dichromanthus*, en el cual el estudio de sus especies durante mucho tiempo se ha enfocado mayormente en la descripción de caracteres cualitativos, más no merísticos. Sin embargo, ninguna de estas aproximaciones permite analizar cuantitativamente los caracteres que son detalladamente descritos.

Por otro lado, la medición de distancias ha sido usada en estudios descriptivos que evalúen los patrones de variación morfológica. Este enfoque que incluye variables merísticas lineares o angulares y el análisis estadístico de éstas, es llamado morfometría tradicional (Adams et al., 2004). Los análisis multivariados empleados bajo esta aproximación son una herramienta poderosa que permite valorar el patrón de variación a un nivel específico o infraespecífico (Marhold, 2011). En este sentido, la elección de algún método o enfoque en particular depende de los datos a ser usados, la hipótesis a ser probada y las preguntas a ser contestadas.

Los atributos en *Dichromanthus* correspondientes al tamaño fueron analizados y se observaron diferencias significativas para la mayoría de ellos. Los diferentes individuos de una misma especie presentaron variación en su morfología y esta variación permitió saber que las estructuras florales y bráctea floral en *D. aurantiacus* son significativamente más grandes que las de *D. cinnabarinus* y *D. michuacanus*.

En contraste con la aproximación tradicional, la morfometría geométrica captura y preserva la geometría de la forma como un todo cohesivo más que como un conjunto de medidas fragmentadas, con lo que se permite la reconstrucción completa de la forma (Conesa et al., 2012). Con esta aproximación, el tamaño es recuperado como un único valor denominado tamaño del centroide, el cual es un parámetro del tamaño isométrico (Baylac et al., 2003). Tanto la forma como el tamaño pueden ser analizados mediante análisis multivariados y permiten el reconocimiento de entidades taxonómicas. Además, una característica importante es que tanto las variables de tamaño como de forma pueden ser empleadas para generar hipótesis filogenéticas y los cambios en la forma pueden ser mapeados en el árbol filogenético. Esto se llevó a cabo con *Dichromanthus* y se obtuvo una topología similar a la generada con información molecular (Salazar et al., 2011).

Como puede observarse, el empleo de la morfometría es muy importante para estudiar la variación. Aunque las aproximaciones con morfometría tradicional y geométrica son diferentes, ambas arrojaron resultados similares. Sin embargo, como el objetivo del presente estudio fue delimitar las especies del género *Dichromanthus*, se recomienda el empleo de morfometría

tradicional antes que las técnicas de morfometría geométrica pues no se requiere o no es necesaria la preparación del material a analizar ni su digitalización, es decir, por practicidad y rapidez resulta más conveniente su uso.

Tras haber identificado tres especies como parte de *Dichromanthus* y reconocer que éstas son morfológicamente muy diferentes entre sí, se sugiere tener bien claras las características que las hacen distintivas a fin de identificarlas mediante la evaluación visual, es decir, sin la necesidad de recurrir a la medición de sus atributos (Figura 1, Anexo II).

## 6.6 Filogenia

A partir del análisis de características vegetativas, reproductivas, ecogeográficas y genéticas de las cuatro especies reconocidas por Salazar y colaboradores (Salazar, 2003; Salazar & García-Mendoza, 2009) como parte del género *Dichromanthus*, Salazar et al. (2011) concluyen que éste es monofilético y tiene como grupo hermano a *Deiregyne*.

En el presente estudio, los cladogramas construidos a partir de los caracteres morfológicos investigados mostraron diferente resolución y valores de apoyo. Estos árboles no fueron construidos con el objetivo de probar la monofilia del género, sino con el fin de explorar su utilidad para conocer las relaciones filogenéticas entre las especies. Los árboles filogenéticos generados con datos morfométricos y moleculares presentan diferencias topológicas. Sin embargo, las topologías obtenidas resultan congruentes con los resultados de Salazar et al. (2011), quienes al incluir diferentes representantes de la subtribu *Spiranthinae*, entre los que se encuentran las cuatro especies reconocidas por dichos autores como parte de *Dichromanthus*, éstas se agruparon como grupo hermano del género *Deiregyne*. Si se considera el análisis combinado, la especie *D. cinnabarinus* divergió primeramente y recibe un fuerte apoyo bootstrap/jackknife (100/100). Por otro lado, *D. aurantiacus* se recuperó como hermano de *D. michuacanus* con valores de soporte altos (Bootstrap= 96, Jackknife= 98). Este resultado es consistente con el obtenido por Salazar et al. (2011), pues *D. cinnabarinus* se recuperó como hermano de un clado en el cual *D. aurantiacus* es hermano de *D. yucundaa* y *D. michuacanus*; sin embargo esta asociación mostró valores de soporte inferiores a 50. Por lo que la relación entre estas especies no está claramente resuelta.



Estos resultados sugieren que hubo un cambio de polinizadores, pues es sabido que *Deiregyne* es polinizado por abejorros (Salazar, 2003), mientras que las especies de *Dichromanthus* que poseen flores anaranjadas o rojizas son polinizadas por colibríes, por lo que se sugiere que *D. michuacanus* al poseer flores de color blanco o amarillo-verdoso y polinización por abejorros, presentó un cambio secundario en este rasgo.

El uso de datos morfométricos en estudios filogenéticos ha sido controversial (Zelditch et al., 2004), pues la diferencia en la forma está determinada a partir de los cambios en la posición relativa de cada landmark (Adams et al., 2004). Sin embargo, el método propuesto por Catalano et al. (2010) establece configuraciones de landmarks ancestrales al minimizar las diferencias en la posición a lo largo del árbol. Por lo que el uso de configuraciones se recomienda para generar hipótesis filogenéticas.

Aunque en *Dichromanthus*, el empleo de las Coordenadas Procrustes no arrojó resultados congruentes para todas las estructuras, tanto la bráctea floral como el pétalo, el sépalo dorsal y lateral, parecen tener una señal filogenética, pues recuperaron la misma topología que al analizarse las cinco estructuras en conjunto y además coinciden con los resultados obtenidos por Salazar et al. (2011) a partir de datos moleculares. El análisis de la configuración del labelo así como el análisis del tamaño recuperaron relaciones diferentes, lo cual podría significar que la cantidad de variables empleadas no es suficiente. Sin embargo, para todos los casos los valores de apoyo son bajos.

Finalmente, tanto las configuraciones como el tamaño empleados fueron de utilidad para la generación de hipótesis filogenéticas, algo ocurrido de manera similar al emplear la forma de la semilla en la tribu Chloraeae (Chemisquy et al., 2009). Los resultados observados coinciden con lo reportado por Salazar et al. (2011), ya que en este estudio también se resolvieron las relaciones entre las especies.

## VII. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis morfométrico de la bráctea floral y las estructuras florales mediante técnicas de morfometría tradicional y morfometría geométrica en la identificación de caracteres diagnósticos que contribuyen a la sistemática de las especies del género *Dichromanthus*, se concluye que:

- La morfometría tanto tradicional como geométrica resultan ser herramientas útiles y complementarias en el análisis y descripción de la variación tanto en la forma como en el tamaño de la bráctea floral, pétalos, sépalos y labelo de las especies de *Dichromanthus*.
- Con las aproximaciones de morfometría geométrica todos los segmentos florales y la bráctea floral son estadísticamente útiles para identificar las especies que forman parte de *Dichromanthus*; sin embargo, es preferible y resulta más adecuado emplear ya sea el labelo, pétalo o sépalo lateral en la identificación de ejemplares en el caso de tener dificultades para asignar alguno de ellos a su respectiva especie. En cambio, se sugiere usar la bráctea floral o el sépalo lateral para la identificación mediante técnicas de morfometría tradicional.
- El uso de marcadores morfológicos (configuraciones) y/o moleculares resuelven las relaciones filogenéticas entre las especies de *Dichromanthus*.
- El género *Dichromanthus* está conformado por cuatro especies que son morfológicamente distintas y diagnosticables. Dichas entidades son: *D. aurantiacus*, *D. cinnabarinus*, *D. michuacanus* y *D. yucundaa* (taxón no incluido en el estudio pero que cuenta con una serie de características que permiten su distinción de entre el resto de especies).

## VIII. LITERATURA CITADA

- Adams, D., Rohlf, F. & Slice, D. 2004.** Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Albarrán-Lara, A., Mendoza-Cuenca, L., Valencia-Avalos, S., González-Rodríguez, A. & Oyama, K. 2010.** Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico. *International Journal of Plant Sciences* 171: 310-322.
- Armbruster, W., Di Stilio, V., Tuxill, J., Flores, T. & Runk, J. 1999.** Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine neotropical plants: a reevaluation of Berg’s correlation-pleiades concept. *American Journal of Botany* 86: 39-55.
- Balogh, P. 1982.** Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119-1132.
- Balogh, P. & Greenwood, E. 1982.** *Cutsis* Balogh, Greenwood and Gonzales, a new genus from México. *Phytologia* 51: 297-298.
- Bateman, R. & Rudall, P. 2006.** Evolutionary and morphometric implications of morphological variation among flowers within an inflorescence: A case-study using European orchids. *Annals of Botany* 98: 975-993.
- Bateman, R., James, K. & Rudall, P. 2012.** Contrast in levels of morphological versus molecular divergence between closely related Eurasian species of *Platanthera* (Orchidaceae) suggests recent evolution with a strong allometric. *Botanical Society of the British Isles* 2: 110-148.
- Baylac, M., Villemant, C. & Simbolotti, G. 2003.** Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of Linnean Society* 80: 89-98.
- Benitez-Vieyra, S., Medina, A. & Cocucci, A. 2009.** Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 2354-2362.
- Bookstein, F. 1982.** Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 451-470.
- Bookstein, F. 1986.** Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science* 1: 181-242.
- Bookstein, F. 1991.** *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology.* Cambridge: Cambridge University Press, 456 p.
- Borba, E., Shepherd, G., van den Berg, C. & Semir, J. 2002.** Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* 90: 219-230.

- Brock, M. & Weining, C. 2007.** Plasticity and environment-specific covariances: an investigation of floral-vegetative and within flower correlations. *Evolution* 61: 2913-2924.
- Burger, P., Terral, J., Ruas, M., Ivorra, S. & Picq, S. 2011.** Assessing past agrobiodiversity of *Prunus avium* L. (Rosaceae): a morphometric approach focussed on the stones from the archaeological site Hôtel-Dieu (16th century, Tours, France). *Vegetation History and Archaeobotany* 20: 447-458.
- Burns-Balogh, P. 1986.** Sinopsis de la tribu Spiranthinae en México. *Orquídea (Méx.)* 10: 47-96.
- Cardini, A. & O'Higgins, P. 2004.** Patterns of morphological evolution in *Marmota* (Rodentia, Sciuridae): geometric morphometrics of the cranium in the context of marmot phylogeny, ecology and conservation. *Biological Journal of Linnean Society* 82: 385-407.
- Carstens, B., Pelletier, T., Reid, N. & Satler, J. 2013.** How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22: 4369:4383.
- Catalano, S. & Goloboff, P. 2012.** Simultaneously mapping and superimposing landmark configurations with parsimony as optimality criterion. *Systematic Biology* 61: 392-400.
- Catalano, S., Goloboff, P. & Giannini, N. 2010.** Phylogenetic morphometrics (I): the use of landmark data in a phylogenetic framework. *Cladistics* 26: 539-549.
- Catalano, S. 2012.** Script LandschW.run. Consultado: 12/08/2013. Disponible en: <http://tnt.insectmuseum.org/images/f/f3/LandschW.run>
- Cavieres, L. 2000.** Variación morfológica de *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (Hydrophyllaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en Chile central. *Gayana Botánica* 57: 89-96.
- Chemisquy, M., Prevosti, F. & Morrone, O. 2009.** Seed morphology in the tribe Chloraeae (Orchidaceae): combining traditional and geometric morphometrics. *Botanical Journal of Linnean Society* 160: 171-183.
- Chiron, G., Guignard, G. & Barale, G. 2010.** Contribution of morphometry to the taxonomy of *Baptistonia* Barb. Rodr. (Orchidaceae). *Candollea* 65: 45-62.
- Conesa, M., Mus, M. & Roselló, J. 2012.** Leaf shape variation in taxonomic boundaries in two sympatric rupicolous species of *Helichrysum* (Asteraceae: Gnaphalieae), assessed by linear measurements and geometric morphometry. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 498-513.
- Conner, J. 2006.** Ecological genetics of floral evolution. En: Harder, L. & Barrett, S. (eds.). *Ecology and Evolution of flowers*. Oxford University Press Inc., New York. pp. 260-277.
- Corney, D., Clark, J. Tang, L. & Wilkin, P. 2012.** Automatic extraction of leaf characters from herbarium specimens. *Taxon* 61: 231-244.

- Dalayap, R., Torres, M. & Demayo, C. 2011.** Landmark and outline methods in describing petal, sepal and labellum shapes of the flower of Mokara orchid varieties. *International Journal of Agriculture & Biology* 13: 652-658.
- Daniel, W. 1984.** *Bioestadística*. Limusa, México D.F. 485 p.
- De Jager, M. & Ellis, A. 2014.** Floral polymorphism and the fitness implications of attracting pollinating and florivorous insects. *Annals of Botany* 113: 213-222.
- De Luna, E. & Gómez-Velasco, G. 2008.** Morphometrics and the identification of *Braunia andrieuxii* and *B. secunda* (Hedwigiaceae, Bryopsida). *Systematic Botany* 33: 219-228.
- Domínguez, C., Eguiarte, L., Núñez-Farfán, J. & Dirzo, R. 1998.** Flower morphometry of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae): geographical variation in Mexican populations. *American Journal of Botany* 85: 637-643.
- Dressler, R. 1993.** *Phylogeny and classification of orchid family*. Portland: Dioscorides Press. 314 pp.
- Drew, L. 2011.** Are we losing the science of taxonomy? *BioScience* 61: 942-946.
- Duminil, J., Kenfack, D., Viscosi, V., Grumiau, L. & Hardy, O. 2012.** Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 275-285.
- Evin, A., Baylac, M., Ruedi, M., Mucedda, M. & Pons, J. 2008.** Taxonomy, skull diversity and evolution in a species complex of *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae): a geometric morphometric appraisal. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 529-538.
- Fairbairn, D. & Reeve, J. 2001.** Natural selection. En: Fox, C., Roff, D. & Fairbairn, D. (eds.). *Evolutionary Ecology, Concepts and cases studies*. Oxford University. United States of America. pp. 29-43.
- Farris, J., Albert, V., Källersjö, M., Lipscomb, D., & Kluge, A. 1996.** Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Figuroa, C., Salazar, G., Terrazas, T. & Dávila, P. 2012.** Estructura y desarrollo del ginostemio en *Dichromanthus michuacanus* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 73-82.
- Figuroa, C., Salazar, G., Zavaleta, A. & Engleman, M. 2008.** Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 10: 509-520.
- Galen, C. 2000.** High and dry: drought stress, sex allocation trade-offs, and selection on flower size in the alpine wildflower *Polemonium viscosum*. *American Naturalist* 156: 72-83.

- Garay, L. 1982.** A generic revision of the Spiranthinae. Botanical Museum Leaflets (Harvard University) 28: 277-425.
- Gaskett, A. 2012.** Floral shape mimicry and variation in sexually deceptive orchids with a shared pollinator. Botanical Journal of the Linnean Society 106: 469-481.
- Goldman, D., van den Berg, C. & Griffith, M. 2004.** Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R.Br. (Orchidaceae). Plant Systematics and Evolution 247: 37-60.
- Goloboff, P., Farris, J. & Nixon, K. 2003.** TNT.: Tree Analysis Using New Technology. Program and documentation available at [www.zmuh.dk/public/phylogeny](http://www.zmuh.dk/public/phylogeny).
- Goloboff, P., Farris, J. & Nixon, K. 2008.** TNT, a free program for phylogenetic analysis. Cladistics 24: 774-786.
- Goloboff, P. & Catalano, S. 2011.** Phylogenetic morphometrics (II): algorithms for landmark optimization. Cladistics 27: 42-51.
- Gumiel, M., Catalá, S., Noireau, F., Rojas de Arias, A., García, A. & Dujardin, J. 2003.** Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). Systematic Entomology 28: 173-179.
- Henderson, A. 2005.** The methods of herbarium taxonomy. Systematic Botany 30: 456-469.
- Herrera, C. 1993.** Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawkmoth-pollinated violet. Ecological Monographs 63: 251-275.
- Herrera, J. 2001.** The variability of organs differentially involved in pollination, and correlations of traits in Genisteae (Leguminosae : Papilionoideae). Annals of Botany 88: 1027-1037.
- Herrera, J. 2005.** Flower size variation in *Rosmarinus officinalis*: Individuals, populations and habitats. Annals of Botany 95: 431-437.
- Hodgins, K.A. & S.C.H. Barrett. 2008.** Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. American Journal of Botany 95: 185-195.
- Jensen, R. J. 1990.** Detecting shape variation in oak leaf morphology: A comparison of rotational-fit methods. American Journal of Botany 77: 1279-1293.
- Jensen, R., Hokanson, S., Isebrands, J. & Hancock, J. 1993.** Morphometric variation in oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: evidence of hybridization between *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalis* (Fagaceae). American Journal of Botany 80: 1358-1366.
- Jensen R. 2003.** The conundrum of morphometrics. Taxon 52: 663-671.
- Kaplan, Z. & Marhold, K. 2012.** Multivariate morphometric analysis of the *Potamogeton compressus* group (Potamogetonaceae). Botanical Journal of Linnean Society 170: 112-130.
- Katoh, K. & Standley, D. 2013.** MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772-780.

- Kazandjian, A. 2011.** A morphometric analysis of *Struthanthus phillyreoides* and *S. dichotrianthus* (Loranthaceae) suggests these represent one single variable species. *Journal of the Torrey Botanical Society* 138: 1-15.
- Kennedy, A. & Watson, L. 2010.** Species delimitations and phylogenetic relationships within the fully myco-heterotrophic *Hexalectris* (Orchidaceae). *Systematic Botany* 35: 64-76.
- Körner, C. 2003.** *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*. 2nd edition. Springer. Berlin. 344 pp.
- La Llave, P. & Lexarza, J. 1824.** *Novorum Vegetabilium Descriptions 2: Orchidianum Opusculum*. México. 43 p.
- Lawing, A. & Polly, P. 2009.** Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology* 280:1-7.
- Lázaro, A. & Totland, Ø. 2014.** The influence of floral symmetry, dependence on pollinators and pollination generalization on flower size variation. *Annals of Botany*, doi:10.1093/aob/mcu083.
- López-Ferrari, A. & Espejo, A. 2000.** Nuevas combinaciones en monocotiledóneas mexicanas III (Orchidaceae, Poaceae). *Acta Botánica Mexicana* 51: 61-70.
- Manly, B. 2005.** *Multivariate Statistical Methods, A primer*. 3<sup>rd</sup> ed. Chapman & Hall/CRC, 215 p.
- Marhold, K. 2011.** Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraespecific levels. En: Stuessy T. F. & Lack. H. W. (eds.). *Monographic Plant Systematics: Fundamental Assessment of Plant Biodiversity*. Regnum Vegetabile. International Association for Plant Taxonomy, Institute of Botany, University of Vienna, Rennweg 14, A-1030, Viena, Austria.
- Marugán-Lobón, J., Chiappe, L., Ji, S., Zhou, Z., Chunling, G., Hu, D. & Meng, Q. 2011.** Quantitative patterns of morphological variation in the appendicular skeleton of the Early Cretaceous bird *Confuciusornis*. *Journal of Systematic Palaeontology* 9: 91-101.
- Matias, A., de la Riva, J., Torres, M. & Dujardin, J. 2001.** *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 947-950.
- Mazer, S. & Damuth, J. 2001a.** Nature and causes of variation. En: Fox, C., Roff, D. & Fairbairn, D. (eds.). *Evolutionary Ecology, Concepts and cases studies*. Oxford University. United States of America. pp. 3-15.
- Mazer, S. & Damuth, J. 2001b.** Evolutionary significance of variation. En: Fox, C., Roff, D. & Fairbairn, D. (eds.). *Evolutionary Ecology, Concepts and cases studies*. Oxford University. United States of America. pp. 16-43.
- Molina-Montenegro, M. & Cavieres, L. 2010.** Variación altitudinal de los atributos morfo-fisiológicos en dos especies de plantas alto-andinas y sus implicancias contra la fotoinhibición. *Gayana Botánica* 67: 1-11.

- McVaugh, R. 1985.** Orchidaceae. In Anderson WR, ed., *Flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of Western Mexico* vol. 16. Ann Arbor: The University of Michigan Press, 1-363.
- Moreno, N. 1984.** Glosario Botánico Ilustrado. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Compañía Editorial Continental. México. 300 p.
- Montgomery, D. 2003.** Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley, México D.F. 686 p.
- Müller, K. 2005.** SeqState-primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4: 65-69.
- Müller, K., Quandt, D., Müller, J., Neinhuis, C. 2010.** PhyDe: Phylogenetic Data Editor v0.9971. Disponible en: <http://www.phyde.de>
- Mutanen, M. & Pretorius, E. 2007.** Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology* 32: 371-386.
- Olmedo, E. 2013.** Genética cuantitativa de la variación inter e intrapoblacional en caracteres florales de *Datura stramonium*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Evolutiva), Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 61 pp.
- Páez-Colasante, X. & Aldana, E. 2008.** Morfometría geométrica del borde borial y del collar de huevos de cinco especies del género *Rhodnius* Stal (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *EntomoBrasilis*, 1 (3): 57-61.
- Palestina, R. & Sosa, V. 2002.** Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. *Brittonia* 54: 99-111.
- Pardo, R., Scott, S. & Vila, I. 2005.** Análisis de formas en especies chilenas del género *Trichomycterus* (Osteichthyes: Siluriformes) utilizando morfometría geométrica. *Gayana* 69: 180-183.
- Peakall, R., Bower, C., Logan, A. & Nicol, H. 1997.** Confirmation of the hybrid origin of *Chiloglottis* × *prescottiana* (Orchidaceae: Diurideae). 1. Genetic and morphometric evidence. *Australian Journal of Botany* 45: 839-855.
- Pélabon, C., Armbruster, W. & Hansen, T. 2011.** Experimental evidence for the Berg hypothesis: vegetative traits are more sensitive than pollination traits to environmental variation. *Functional Ecology* 25: 245-257.
- Pélabon, C., Osler, N., Diekmann, M. & Graae, B. 2013.** Decoupled phenotypic variation between floral and vegetative traits: distinguishing between developmental and environmental correlations. *Annals of Botany* 111: 935-944.
- Peña, M. 2001.** Orchidaceae. En: Calderón, G. y Rzedowski, J. (eds.). *Flora fanerogámica del Valle de México*, 2ª. ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán. pp. 1266-1297.



- Peñaloza-Ramírez, J., González-Rodríguez, A., Mendoza-Cuenca, L., Caron, H., Kremer, A. & Oyama, K. 2010.** Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of Botany* 105: 389-399.
- Perrie, L. & Brownsey, P. 2005.** Genetic variation is not concordant with morphological variation in the fern *Asplenium hookerianum* sensu lato (Aspleniaceae). *American Journal of Botany* 92: 1559-1564.
- Pérez, S. 2003.** Morfometría de poblaciones humanas prehistóricas: Una comparación de técnicas tradicionales y geométricas. *Intersecciones en Antropología* 4: 121-129.
- Pinheiro, F. & de Barros, F. 2007.** Morphometric analysis of in southeastern Brazil *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 25: 129-136
- Ponsie, M., Johnson, S. & Edwards, T. 2009.** A morphometric analysis of *Bonatea speciosa* complex (Orchidaceae) and its implications for species boundaries. *Nordic Journal of Botany* 27: 166-177.
- R Core Team, 2013.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramos-Castro, S., Romero, J., Castañeda-Zárate, M., Pérez-Ishiwara, R. & Fornoni, J. 2013.** Reproductive ecology of *Habenaria novemfida* (Orchidaceae) in Central Mexico. En: 31<sup>st</sup> New Phytologist Symposium: Orchid symbioses: models for evolutionary ecology. Rende, Italia.
- Rakosy, D., Städler, Y., Weber, E., Ayasse, M. & Paulus, H. 2013.** Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation in Aegean *Ophrys* species. En: 31<sup>st</sup> New Phytologist Symposium: Orchid symbioses: models for evolutionary ecology. Rende, Italia.
- Richtsmeier, J., de Leon, V. & Lele, S. 2002.** The promise of Geometric Morphometrics. 2002. *Yearbook of Physical Anthropology* 45: 63-91.
- Rohlf, F. 2000.** On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* (n.s.) 11: 9-25.
- Rohlf, F. 2012.** tps Utility program. Version 1.52. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New-York.
- Rohlf, F. 2013.** tpsDiG. Version 2.17. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New-York .
- Rohlf, F. & Marcus, L. 1993.** A revolution in morphometricis. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 129-132.
- Rohlf, F. & Slice, D. 1990.** Extensions of the procrustes method for the optimal surimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39:40-59.
- Rosas-Guerrero, V., Quesada, M., Armbruster, W., Pérez-Barrales, R. & Smith, S. 2010.** Influence of pollination specialization and breeding system on floral integration and phenotypic variation in *Ipomoea*. *Evolution* 65: 350-364.

- Ruíz, E., Balboa, K., Negritto, M., Baeza, C., Fuentes, G. & Briceño, V. 2010.** Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (Alstroemeriaceae), endémica de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 605-616.
- Rutkowski, P., Mytnik, J. & Szlachetko, D. 2004.** New taxa and new combinations in Mesoamerican Stenorrhynchidinae (Orchidaceae, Spirantheae). *Annales Botanici Fennici* 41: 486-487.
- Rutkowski, P., Szlachetko, D. & Górnjak, M. 2008.** Phylogeny and taxonomy of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Spirantheae, Orchidaceae) in Central and South America. Gdansk: Uniwersytet Gdański.
- Rzedowski, J., 2006.** 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Salazar, G. 2003.** Spiranthinae. In *Genera Orchidacearum*, vol. 3: Orchidoideae part 2, A. Vanilloideae, Pridgeon M., Cribb P. J., Chase M. W. and Rasmussen F. N. (eds.). Oxford University Press, Oxford. p. 164-278.
- Salazar, G. 2009.** Orquídeas. En: Lot, A. & Cano, Z. (eds.). *Biodiversidad del Ecosistema Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México. p. 153–169.
- Salazar, G. & Ballesteros-Barrera, C. 2010.** *Sotoa*, a new genus of Spiranthinae (Orchidaceae) from Mexico and the southern United States. *Lankesteriana* 9: 491-504.
- Salazar, G., Cabrera, L. & Figueroa, C. 2011.** Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 1-18.
- Salazar, G., Chase, M. & Soto, M. 2002.** Galeottiellinae, a new subtribe and other nomenclatural changes in Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Lindleyana* 17: 172-176.
- Salazar, G., Chase, M., Soto, M. & Ingrouille, M. 2003.** Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): Evidence from plastid and nuclear DNA. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
- Salazar, G. & Dressler, R. 2011.** The leaves go it right again: DNA phylogenetic supports a sister-group relation between *Eurystyles* and *Lankesterella* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Lankesteriana* 11: 337-347.
- Salazar, G., García-Mendoza, A. 2009.** A new species of *Dichromanthus* (Orchidaceae, Spiranthinae) from Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 23-28.
- Salazar-Rojas, V., Herrera-Cabrera, B., Soto-Arenas, M. & Castillo-González, F. 2010.** Morphological variation in *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis* Soto-Arenas Orchidaceae in traditional home gardens of Chilapa, Guerrero, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 543-552.

- Savriama, Y., Gómez, J., Perfectti, F. & Klingenberg, C. 2012.** Geometric morphometrics of corolla shape: dissecting components of symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytologist* 196: 945-954.
- Sheets, H. 2000.** TMorphGen6c. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sheets, H. 2001.** BigFix6. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sheets, H. 2002.** SemiLand6. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sheets, H. 2004.** IMP: Integrated Morphometrics Package. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sheets, H. 2005a.** CoordGen6: Coordinate Generation program for calculating shape coordinates. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sheets, H. 2005b.** CVAGen6: Canonical Variates Analysis program for the analysis of shape, based on partial warps scores. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sheets, H. 2005c.** PCAGen6: Principal Component Analysis program for the analysis of shape. Canisius College. N.Y. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Shipunov, A. & Bateman, R. 2005.** Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 1-12.
- Silva-Montellano, A. & Eguiarte, L. 2003.** Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitor, and fecundity. *American Journal of Botany* 90: 377-387.
- Simmons, M. & Ochoterena, H. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369-381.
- Slovák, M., Kučera, J., Marhold, K. & Zozomová-Lihová, J. 2012.** The morphological and genetic variation in polymorphic species *Picris hieracioides* (Compositae, Lactucaceae) in Europe strongly contrast with traditional taxonomical concepts. *Systematic Botany* 37: 258-278.
- Solow, A. & Smith, W. 2005.** On estimating the number of species from the discovery record. *Proceedings of The Royal Society B* 272: 285-287.
- Sosa, M., Panseri, A. & Dematteis, M. 2012.** Morphometric analysis of *Stemodia hyptoides* and *S. stricta* (Plantaginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1315-1323.
- Soto, M. 2002.** *Dichromanthus cinnabarinus* subsp. *cinnabarinus*. En: Hágsater, E., Soto, M. A. (eds.). *Icones Orchidacearum: orchids of Mexico, parts 2-3*. Mexico City: Instituto Chinoín, A. C. pp. 548.
- Soto-Vivas, A., Liria, J. & De Luna, E. 2011.** Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 27: 87-102.

- Souza, M., Moreira, I. & Joseph, S. 2012.** Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Montrichardia linifera* (Araceae) populations from the Rio Parnaíba Delta, north-east Brazil. *Botanical Journal of Linnean Society* 170: 554-572.
- Strauss, S. & Whittall, J. 2006.** Non-pollinator agents of selection on floral traits. En: Harder, L. & Barrett (eds.). *Ecology and Evolution of flowers*. Oxford University Press Inc., New York. 120-138 pp.
- Strelin, M., Cosacov, A., Diller, M. & Sérsic, A. 2013.** Study of polymorphism of the Patagonian *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae) using decision tree and sequential covering rule induction. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 487-500.
- Sultan, S. & Stearns, S. 2005.** Environmentally contingent variation: Phenotypic plasticity and norms of reaction. En: Hallgrímsson, B. & Hall, B. (eds.). *Variation, a central concept in Biology*. Elsevier Inc. E.U.A. p. 303-332.
- Szlachetko, D. 1994.** Studies on the Spiranthinae (Orchidaceae). I. Miscellanea. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 39: 417-438.
- Szlachetko, D. 1995.** Systema Orchidaliaum. *Fragmenta Floristica et Geobotanica (Supplement)* 3: 1-152.
- Szlachetko, D., Rutkowski, P. & Mytnik, J. 2005.** Contributions to the taxonomic revision of subtribus Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Orchidaceae) in Mesoamerica and The Antilles. *Polish Botanical Studies* 20: 3-387.
- Thiers, B. 2014.** Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>
- Thompson, J. 2005.** *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford.
- Tomlinson, B. & Quinn, C. 2013.** Palms do not undergo secondary stem lengthening: A response to Renninger and Phillips (*American Journal of Botany* 99: 607-613). *American Journal of Botany* 100: 461-464.
- Toro, M., Manríquez, G. & Suazo, I. 2010.** Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de a morfometría descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology* 28: 977-990.
- Turchetto, C., Segatto, A., Telles, M., Diniz-Filho, J. & Freitas, L. 2014.** Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: A comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16: 75-82.
- Ushimaru, A., T. Itagaki & H. Ishii. 2003.** Variation in floral organ size depends on function: a test with *Commelina communis*, an andromonoecious species. *Evolutionary Ecology Research* 5: 615-622.
- Vandamme, A. 2009.** Basic concepts of molecular evolution. En: Lemey, P., Salemi M. & Vandamme, A. (eds.). *The phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press. Nueva York, E.U.A. pp 3-30.

- van der Niet, T., Zollikofer, C., Ponce de León, M., Johnson, S. & Linder, P. 2010.** Tree-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation. *Trends in Plants Science* 15: 423-426.
- Villegas, J., Feliciangeli, M. & Dujardin, J. 2002.** Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infection, Genetics and Evolution* 2: 121–128.
- Viscosi, V. & Cardini, A. 2011.** Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: A simplified protocol for beginners. *Plos One* 6: e25630.
- Volkova, P. & Shipunov, A. 2007.** Morphological variation of *Nymphaea* (Nymphaeaceae) in European Russia. *Nordic Journal of Botany* 25: 329-338.
- Webster, M. & Sheets, H. 2010.** A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. En: Alroy J. & Hunt, G. (eds.). *Quantitative methods in Paleobiology*. Paleontological Society short course. *The Paleontological Society Papers* 16: 163-168.
- Whitenack, L. & Gottfried, M. 2010.** A morphometric approach for addressing tooth-based species delimitation in fossil mako sharks, *Isurus* (Elasmobranchi: Lamniformes). *Journal of Vertebrate of Paleontology* 30: 17-25.
- Worley, A., Baker, A., Thompson, J. & Barret, S. 2000.** Floral display in *Narcissus*: Variation in flower size and number at the species, population, and individual levels. *International Journal of Plant Sciences* 161: 69-79.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, H. & Fink, W. 2004.** *Geometric morphometrics for biologists: A primer*. Elsevier Academic Press. 444 p.
- Zhao, Z., Du, G. & Huang, S. 2010.** The effect of flower position on variation and covariation in floral traits in a wild hermaphrodite plant. *BMC Plant Biology* 10: 91.

## ANEXO I

### Ejemplares empleados en este estudio

Los nombres de los colectores así como los acrónimos de los herbarios resaltados en negritas, hacen referencia a los ejemplares de herbario consultados por Szlachetko et al. (2005) en su trabajo titulado: “Contributions to the taxonomic revision of subtribus Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Orchidaceae) in Mesoamerica and The Antilles”.

#### *Dichromathus aurantiacus:*

##### **México:**

**Chiapas:** Breedlove 11277 (F); Jiménez & Soto 720a y b (AMO); Kaplan 60 (F); Matuda 1639 (MEXU).

**Chihuahua:** Basurto et al. 18330 (MEXU); Ceja et al. 1699 (AMO); Espejo et al. 5821 (AMO); **Gentry 2531** (MEXU); Laferrière 825 (MEXU); Le Sueur 249 (F); Spellenberg et al. 9325 (MEXU).

**Colima:** Goldsmith 56 (F, MO).

**Distrito Federal:** Balls & Gornlay B5604 (K); Gold 606 (MEXU); Jiménez 725 (AMO); **Matuda 19155** (F); Panti 590 (MEXU); Torres 1048 (FCME); Ventura 1820 (AMO); **Williams et al. 14881** (SEL).

**Durango:** Bates et al. 1517 (NY); Breedlove & Anderson 63143 (MEXU); **Chase 83197** (AMO, SEL); Reveal & Hess 3067 (MEXU, MO); Soto 9887 (AMO).

**Estado de México:** Álvarez 1 (IZTA); Espejo 858 (AMO); Hágsater s/n (AMO); **Hinton 1240** (K); Matuda 21838 (MEXU); Nava 153 (AMO); **Pringle 4280** (MEXU), **13214** (K); Reveal & Hess 3067 (MO); Roe & Roe 1843 (F).

**Guanajuato:** Carranza et al. 4327 (MEXU); Ventura & López 9558 (AMO).

**Guerrero:** Boege 2371 (MEXU); Castillo et al. 122 (FCME); Cruz & García 224 (MEXU); Durán & García 224 (FCME); González et al. 105 (FCME), 154 (FCME); Hinton 14425 (NY); Lorea 1673a y b (AMO), 2139 (FCME); Salazar 1628 (AMO); Velázquez 676 (FCME), 1491 (FCME); **Walker 700024** (K).

**Hidalgo:** Lyonnet 102 (MEXU); Rzedowski 33829 (AMO, MEXU).

**Jalisco:** Flores & Calónico 4741 (MEXU); **Pringle 4525** (MEXU); Rosillo s/n a y b (AMO); Reyna 463 (AMO); Wilbur & Wilbur 1774, 1809 (F).

**Michoacán:** Escobedo 1585a y b (AMO); Huerta 599 (AMO); Steinmann 4642 (MEXU); Zamudio 6699 (AMO); Zamudio & Grimaldo 6666 (AMO).

**Morelos:** Boyd 98 (F); García-Cruz 847 (AMO), 879 (AMO); García-Cruz & Jiménez 893 (AMO); 919 (AMO); **Iltis et al. 75 (F)**; Lundell & Lundell 12329 (MO); Lyonnet 500800035 (MEXU); Sánchez et al 483 (AMO); **Sawyer 520 (SEL)**; Straw & Gregory 1061 (MEXU).

**Nayarit:** Feddema 652 (F); McVaugh 16407 (MEXU); **McVaugh 16409 (NY)**.

**Oaxaca:** Campos 4654 (MEXU); García-Cruz et al. 641a y b (AMO); Greenwood & Suárez, 1147a y b (AMO); Espejo & López 3906 (AMO); **Hammel & Merello 15544 (MO)**; Ramírez & Ramírez 359 (MEXU); Sousa et al. 5991 (MEXU); Zárata 244 (MEXU).

**Puebla:** Guízar 1418 (MEXU).

**Sinaloa:** Gentry 6183 (MO).

**Tamaulipas:** Dressler 1966 (MO).

**Tlaxcala:** Balls & Gonrly 4879 (K).

**Zacatecas:** **Balogh & Graham 723 (K)**.

#### **El Salvador:**

**Morazán:** Pank & Bou 949 (SEL).

#### **Guatemala:**

**Alta Verapaz:** **Hamer A7 (SEL)**.

#### **Honduras:**

**Francisco Morazán:** Linares 5484 (MEXU); **Molina 412a (MEXU)**; Molina 412b (MEXU); Valerio 3162 (F);

Sin localidad precisa: **Skinner s/n (K)**.

#### **Nicaragua:**

**Esteli:** **Stevens & Krukoff 3293 (SEL)**.

**Nueva Segovia:** Neill 2182 (MO).

***Dichromanthus cinnabarinus:***

**México:**

**Chiapas:** Breedlove 11761 (F, MEXU), Breedlove 11772 (F); Breedlove 27084 (MEXU, SEL); **Breedlove & Raven 13290 (F)**; Cabrera 135 (AMO, MEXU); Ceja et al. 1345 (AMO); Cruden 1216 (AMES, MEXU); Espejo et al. 2051 (MEXU); Espinosa & López 259 (MEXU); Gómez-Pompa 2582 (MEXU); Méndez 9167 (MEXU); Ramírez et al. 225 (MEXU); Santíz 1057 (MEXU). Soto et al. 1670 (AMO); Webster et al. 12895a y b (MEXU); Webster et al. 12979 (MEXU).

**Chihuahua:** García & Nagel 1530 (AMES); Hewitt 115 (GH); Pennell 13802 (MEXU, GH); Wilkinson s/n (F, US);

**Coahuila:** Lyonnet 420900002 (MEXU); **Palmer 370 (F)**; **Pringle 632 (F)**, s/n (MEXU, NY); **Muller 3054 (AMES)**; Reveal et al. 2576 (US); Villarreal & Carranza 4042 (MEXU).

**Distrito Federal:** Contreras & Salazar 2221 (AMO); Diego 180 (MEXU); García 1670 (MEXU); Lyonnet 296 (MEXU); Miranda 720 (MEXU); Nagel, 1190 (GH); Orcutt s/n (F); Sánchez & J. L. C. 74 (FCME); Salazar 8193 (MEXU); Sawyer 545 (F); White 49 (F).

**Estado de México:** Asteinza & Rey s/n (MEXU); Batalla 53 (MEXU); Bonfil 1040 (MEXU); Contreras 77 (IZTA); Figueroa s/n (MEXU); Flores & Riveros 130 (AMO); García s/n (MEXU); Gold 145 (MEXU); Gold & Eheberle s/n (MEXU); Guízar et al. 649a (IZTA); **Nagel 1389 (MEXU)**; Nava 215 (AMO); Romero-Rojas 236a (IZTA); Ventura 76 (NY).

**Guerrero:** Calónico 1250 (MEXU), 10780 (FCME), 10850 (FCME); Calzada & Toledo 16220 (AMO, FCME); Campos 676 (FCME); E & A 19 (FCME); Fonseca & C. (FCME); Gual & Villegas 327 (FCME); Miranda 66 (FCME); Moreno 871 (MEXU); Nava 217 (FCME); Salazar 989 (AMO); 991 (FCME); Soto & Román 9833 (MEXU); Tejero-Diez 3442 (IZTA); Vargas 91 (FCME); Webster et al. 17M861 (AMES).

**Hidalgo:** Edwards 806 (F); **Pringle 7963 (F, MO)**, **11187 (US, GH)**.

**Jalisco:** Flores 2541 (MO); **Gonzalez & Rosillo s/n (AMO)**.

**Michoacán:** Cornejo et al. 2244 (MEXU); Escobedo 1131 (MEXU), 2153a y b (AMO); Zamudio 4418 (AMO), 4445 (AMO, MEXU).

**Morelos:** Olgún et al. 17M695 (AMES).

**Nuevo León:** **Meyer & Rogers 2649 (MO)**; Mueller & Mueller 2 (F); **Taylor 53 (MO)**.



**Oaxaca:** Aquino 199 (MEXU); Calzada 21296 (MEXU); Calzada 20251 (MEXU); Campos & Cortés 2179 (MEXU); Conzatti 6904 (SEL); Conzatti & González 446 (AMES); Cruz 144 (MEXU); Espejo & López 3891 (AMO); **Gándara & Conzatti 4981** (MEXU); Hernández 467 (MEXU); Hernández & Domínguez 114 (MEXU); **Kenoyer 545 (F)**; Nava et al. 1529 (MEXU); Pastrana s/n (AMO); Reyes & Reyes 498 (MEXU); Salas et al. 1236 (MEXU); Salinas & Juárez 7047 (MEXU); Schultes & Reko 397 (K); **Smith 797** (AMO, F); Sousa et al. 5796 (MEXU); Téllez & Solís 272 (MEXU); Téllez et al. 6047 (MEXU); Tenorio 7109 (MEXU); Tenorio et al. 20559 (MEXU); Torres 280 (MEXU); Torres et al. 6975 (NY); **Vázquez & Conzatti 1997a y b** (MEXU); Velasco et al. 884 (MEXU); Wallace et al 477 (MEXU); Zamudio & Pérez 9171 (AMO, MEXU).

**Puebla:** Arséne 503 (US); Arséne 7075 (US); Balogh & Graham 723 (US); Boege 194 (MEXU); Figueroa 325 (MEXU); Guarneros et al. 556 (MEXU); López & Espejo 973 (AMO); Martínez 446 (MEXU); Miranda 2446 (MEXU); Rose et al. 10135 (US); Salazar 8094 (MEXU); Salinas 7514 (MEXU); Salinas et al. 5798 (MEXU); Sousa et al. 5751 (MEXU); Sousa et al. 8192 (MEXU); Tlapa & Ubierna 838 (MEXU); Valiente et al. 1037a (MEXU).

**Querétaro:** Argüelles 1925 (MEXU).

**San Luis Potosí:** Breedlove & Anderson 63285 (MEXU); Espejo et al. 1740 (AMO); Pérez 3214 (MEXU).

**Tamaulipas:** Hernández 82 (MEXU); Stanford 875 (NY).

**Veracruz:** Balogh & Graham 759 (US); Figueroa 315 (MEXU); Jones & Jones 5366 (NY).

**Guatemala:**

**Baja Verapaz:** Harmon & Dwyer 4355 (MO); **Molina & Molina: 27800 (F)**.

**Huehuetenango:** Johnston 1383 (US); **Molina & Molina 26549 (F)**; **Williams et al. 21859 (F)**.

***Dichromanthus michuacanus:***

**México:**

**Chiapas:** Greenwood & Brenan 583 (AMO); Matuda 1639 (K); Spellenberg et al. 10077 (MEXU).

**Chihuahua:** Laferrière 2096 (MEXU); **Pringle 1372** (MEXU).

**Distrito Federal:** Castañeda-Zárate & Ramos-Castro 619 (MEXU).

**Durango:** **Gentry 6976 (F)**; González 5651 (MEXU).

**Guerrero:** Boege 1588 (MEXU); Figueroa 263 (MEXU); Hinton 14773 (MO); Miranda 120B (FCME); Salazar et al. 7397 (MEXU).

**Hidalgo:** Steyermark 52279 (F).

**Jalisco:** Rosillo 92, 100, 123, 124 (AMO).

**Estado de México:** Hinton et al. 1240 (K); Matuda et al. 38204 (MEXU); Omaña s/n (FCME); Rzedowski 37631 (MEXU).

**Michoacán:** Hinton 13484 (GH, K).

**Morelos:** Nagel 1253387 (F).

**Oaxaca:** Cruz 2251 (ENCB); Greenwood 312a y b (AMO), 632 (AMO); Greenwood & Suárez 1248 (AMO); Hunn 573 (MEXU); Martorell et al. 256 (MEXU); Pollard 1490 (MEXU); Reyes 1054 (MEXU); Salas 7376 (MEXU); Salazar et al. 6583 (MEXU); Salazar et al. 8415 (MEXU); Saynes & Sánchez 3958 (MEXU); Tenorio 18239 (MEXU); Tenorio & Kelly 21564 (MEXU); Tenorio et al. 7977 (MEXU).

**Puebla:** Boege 2969 (MEXU); Hno. Antonio s/n (MEXU); Lyonnet 1156 (MEXU); Martínez 129, 521, 565 (MEXU).

**Veracruz:** Galeotti 5110 (K).

**Sin localidad precisa:** González s/n (AMO).

***Deiregyne eriphora:***

**México:**

**Distrito Federal:** García & Nagel 2287 (MEXU).

**Guerrero:** Steinmann & Ramírez 5766 (MEXU).

**Michoacán:** Medina 2865 (MEXU); Salazar et al. 8138 (MEXU).

**Morelos:** Williams 3838 (MEXU).

**Oaxaca:** Figueroa & Guzmán 452 (MEXU); Salas 2071 (MEXU); Salas et al. 5846 (MEXU); Salazar et al. 7566, 7569 (MEXU); Salazar et al. 6907 (MEXU); Saynes 1123 (MEXU).

**Veracruz:** Ventura 5202, 15990, 18381 (MEXU).

## ANEXO II

### Clave para la identificación de las especies de *Dichromanthus*

1. Flores anaranjadas, amarillo-rojizas, sin aroma ..... 2
1. Flores blancas, crema, verde-amarillento, aromáticas, brácteas florales glabras a densamente pubescentes, marscentes, de hasta 3.5 cm de largo, sépalos de 1-2 cm de largo, ligeramente recurvados. Remanente rostelar aguzado ..... ***D. michuacanus***
2. Flores amarillas o anaranjado-rojizas, segmentos pubescentes, de ligero a fuertemente recurvados. Remanente rostelar subtruncado ..... ***D. cinnabarinus***
2. Flores anaranjadas, segmentos ligeramente recurvados. Remanente rostelar aguzado ..... 3
3. Brácteas florales de color anaranjado o amarillo-anaranjado, de hasta 5.5 cm de largo, con escasa a abundante pubescencia, sépalos de 1-3 cm de largo ..... ***D. aurantiacus***
3. Brácteas florales de color rojo, de 2.5-4.5 cm de largo, glabras, sépalos de 2-2.5 cm de largo ..... ***D. yucundaa***