



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**SISTEMÁTICA**

**FILOGENIA Y EVOLUCIÓN EN EL CLADO MEXICANO DE**

***Malaxis* (ORCHIDACEAE)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA GABRIELA MARTINEZ BECERRIL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Gerardo A. Salazar Chávez**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: Dr. Manuel Feria Ortiz**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA, UNAM  
**Dr. A. Rodolfo Solano Gómez**  
CIIDIR OAXACA, IPN

**MÉXICO, Cd. Mx. abril de 2017**



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**

**FILOGENIA Y EVOLUCIÓN EN EL CLADO MEXICANO DE**

***Malaxis* (ORCHIDACEAE)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA GABRIELA MARTINEZ BECERRIL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Gerardo A. Salazar Chávez**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Manuel Feria Ortiz**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**ZARAGOZA, UNAM**  
**Dr. A. Rodolfo Solano Gómez**  
**CIIDIR OAXACA, IPN**

Ciudad de México, abril de 2017

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de enero de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MARTÍNEZ BECERRIL ANA GABRIELA** con número de cuenta **303286383** con la tesis titulada "**Filogenia y evolución en el clado mexicano de *Malaxis* (Orchidaceae)**"; realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**:

Presidente: DR. ELOY SOLANO CAMACHO  
Vocal: DRA. ALEJANDRA VASCO GUTIÉRREZ  
Secretario: DR. MANUEL FERRA ORTÍZ  
Suplente: DRA. ALEJANDRINA GRACIELA ÁVILA ORTÍZ  
Suplente: DR. ANICETO RODOLFO SOLANO GÓMEZ

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de marzo de 2017.

*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 de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Programa de apoyos PAEP por las facilidades para llevar a cabo actividades académicas dentro y fuera de México.

A mi tutor, el Dr. Gerardo A. Salazar Chávez, por la dirección de esta tesis. Por facilitarme el material de su colección personal de plantas, secuencias de ADN, bases de datos y bibliografía.

Al comité titorial: Dr. Manuel Feria y Dr. Rodolfo Solano por su confianza y apoyo. Por las sugerencias hechas para el enriquecimiento del trabajo.

## Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biología (IBUNAM), por la excelencia en la calidad académica que me han brindado desde que formo parte de sus filas universitarias.

A los miembros del jurado por la revisión de la tesis y por los acertados comentarios hechos para mejorar el escrito.

Al personal del herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología (AMO) por la disposición y amabilidad brindada para consultar su herbario y bases de datos. Al biólogo Rolando Jiménez por permitir la reproducción de una de sus ilustraciones.

Debo reconocer con profundo agradecimiento a la Dra. Alejandra Vasco, en extremo bondadosa conmigo. Por su tiempo, confianza, amistad y sonrisa. Por leer el escrito y ayudarme a volverlo presentable. ¡Por todo, gracias!

A mis queridos amigos mexico-brasileños: Miguel Castañeda, Gabriela Cruz, Claudia Montealegre, Aline do Vale, Sérgio Adachi y Leonardo Guimarães por hacer tan divertidos mis días, por su compañía, apoyo moral, clases de “portuñol”, buenos momentos, deliciosa comida y todas las experiencias que compartimos.

A la Dra. Carolina Granados y demás compañeros del lab B-201 por el apoyo técnico y por hacer mi estancia en el IB amena y feliz, por todo el café y los buenos momentos.

A Mauricio Cisternas y Tania Hernández por alentarme a concluir este trabajo, por contagiarme de su entusiasmo científico y de su carácter firme. Gracias por sus consejos y los ratos agradables que pasamos en la Ciudad de México.

A mis amigos: Julieta Álvarez, Adriana Benítez, Andrés Arguelles, Rodolfo Ángeles y José Carlos Monroy. Sin duda todo es muy divertido a su lado.

A las Doctoras Laura Calvillo e Ivalú Cacho por su gran confianza.

Este trabajo se integra de un poco de todos.

¡Gracias!

# Dedicatoria

Esta tesis fue realizada y escrita durante el tiempo en que mi pequeña semilla creció y creció, resignada a mi itinerante presencia. A ella, Sophia Qanil con todo mi amor y un poco de remordimiento.

A mi madre, guerrera bondadosa de fortaleza inquebrantable e inteligencia admirable.

A mi padre quien me ha enseñado a tomar cada obstáculo como una potencial fuente de impulso.

A mi gran familia, porque esto es el resultado de su infinito amor y apoyo incondicional.

Abuelos, tíos, primos y sobrinos, todos han sido promotores de este logro.

A mi hermana de vida: Libertad, quien con su canto ha sabido acompañar mi melodía.

Encontrando siempre la nota adecuada en el tiempo preciso.

A la memoria de mis guardianes: Ana, Ángel, José, Isabel, Dany y Juan a quienes extraño tanto y de quienes sigo aprendiendo a pesar de la diferencia espacio-temporal que nos separa.



# Contenido

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. OBJETIVOS .....	7
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	8
3.1. Selección de taxones .....	8
3.2. Revisión bibliográfica, de herbarios y trabajo de gabinete.....	8
3.3. Extracción de ADN .....	10
3.4. Selección de marcadores moleculares.....	10
3.5. Amplificación.....	11
3.6. Secuenciación .....	13
3.7. Edición y alineamiento de secuencias.....	13
3.8. Obtención y codificación de caracteres morfológicos.....	14
3.9. Análisis filogenéticos .....	17
3.10. Reconstrucción de estados ancestrales de los caracteres morfológicos .....	18
3.11. Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA) .....	19
IV. RESULTADOS.....	201
4.1. Inferencia filogenética .....	21
4.1.1. Análisis de datos morfológicos .....	21
4.1.2. Análisis de datos moleculares .....	27
4.1.3. Análisis combinado de datos morfológicos y moleculares.....	31
4.1.4. Reconstrucción de estados ancestrales .....	34
4.2. Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA).....	39
V. Discusión.....	41
5.1. Los caracteres morfológicos en la reconstrucción filogenética de <i>Malaxis</i> .....	41
5.2. Relaciones filogenéticas dentro de <i>Malaxis</i> y la ubicación del “clado mexicano” .....	47
5.3. Implicaciones taxonómicas .....	49
5.4. Aproximación a la historia biogeográfica .....	50
VI. Conclusiones.....	52
VII. Literatura citada .....	54

APÉNDICE I ..... 63  
APÉNDICE II ..... 67

## Figuras

Figura 1. Relaciones filogenéticas en Malaxideae inferidas a partir del análisis de la región molecular ITS y el gen <i>matK</i> . Modificado de Radins <i>et. al.</i> , (2014). .....	5
Figura 2. Clasificación de áreas introducidas en RASP de acuerdo a la distribución de las especies con base en las regiones biogeográficas del mundo propuestas por Udvardy (1975) (Modificado).....	20
Figura 3. Morfología de <i>Malaxis javesiae</i> (Rchfb. f.) Ames.....	23
Figura 4. Diversidad morfológica del género <i>Malaxis</i> .....	24
Figura 5. Árbol de consenso estricto de los diez árboles más parsimoniosos ( AMP's) registrados en el análisis de máxima parsimonia de los caracteres morfológicos, .....	26
Figura 6. A. Uno de los AMP's inferido por máxima parsimonia (MP) a partir del análisis de la matriz concatenada de ADN con los marcadores ITS y <i>matK</i> .....	29
Figura 7. Inferencia filogenética de <i>Malaxis</i> utilizando máxima verosimilitud (ML) para los dos marcadores (ITS y <i>matK</i> ) .....	30
Figura 8. Figura 8. Uno de los AMP's obtenido del análisis de MP de la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos.....	32
Figura 9. Comparación de las topologías de los árboles de consenso estricto obtenidos de los análisis de MP para el conjunto de datos moleculares (A) y para la matriz de datos moleculares y morfológicos (B).....	33
Figura 10. . Inferencia filogenética de <i>Malaxis</i> utilizando máxima verosimilitud (ML) para los dos marcadores (ITS y <i>matK</i> ) y los datos morfológicos. A. Topología mostrando las longitudes de ramas. B, Cladograma con los valores de soporte bootstrap para cada uno de los nodos.....	35

Figura 11. Reconstrucción de caracteres ancestrales sobre el árbol de ML del análisis combinado de datos moleculares y morfológicos para el tipo de hábito (A), presencia de foveas en el labelo (B) y forma y tipo del corno (C y D). ..... 36

Figura 12. Reconstrucción de caracteres ancestrales sobre el árbol de ML del análisis combinado de datos moleculares y morfológicos para el número de hojas (A), forma del ápice del labelo (B) y la disposición de las flores sobre el raquis de la inflorescencia (C). ..... 37

Figura 13. Distribución de los cambios de estado de los caracteres morfológicos seleccionados ..... 38

Figura 14. Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA) por medio de RASP ..... 40

## Cuadros

**Cuadro1.** Lista de herbarios examinados con sus respectivos acrónimos e instituciones responsables ..... 9

**Cuadro2.** Lista de recursos electrónicos consultados ..... 9

**Cuadro3.** Reactivos y cantidades utilizados en la amplificación del ADN de la región ITS. .... 12

**Cuadro4.** Reactivos y cantidades utilizadas en la amplificación del ADN de las región *matK*. .. 12

**Cuadro5.** Combinaciones de primers utilizadas ..... 13

**Cuadro6.** Datos moleculares por marcador y matriz concatenada..... 27

## RESUMEN

El género *Malaxis* es un grupo de orquídeas de amplia diversidad en el Neotrópico. México es considerado un centro de diversidad del género. La taxonomía de *Malaxis* no ha sido revisada detalladamente y tampoco se ha explorado explícitamente la importancia de los caracteres morfológicos en un contexto filogenético. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue analizar filogenéticamente caracteres morfológicos y moleculares de *Malaxis*, conocer su importancia sistemática, además de postular posibles rutas evolutivas para los caracteres morfológicos. Con base en el árbol filogenético resultante se realizó una reconstrucción de estados ancestrales y un análisis biogeográfico con énfasis en *Malaxis sensu stricto* (s.s.), en particular de sus representantes mexicanos. De las 120 especies que componen el género, se incluyeron 47 en este análisis. Como grupos externos se emplearon otros linajes de Malaxideae incluyendo *Liparis*, *Oberonia* y *Tamayorkis*. Para el estudio filogenético se utilizó evidencia molecular (regiones ITS y *matK*) y morfológica (13 caracteres) las cuales se analizaron en forma separada y combinada. Los datos se evaluaron mediante máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML), encontrando que el género *Malaxis* s.s. según la propuesta de Radins, así como el clado mexicano de *Malaxis*, son grupos monofiléticos. Las topologías obtenidas a partir de los análisis moleculares y combinados no difieren significativamente. Sin embargo, la inferida a partir de caracteres morfológicos no resolvió las relaciones entre los taxones. La reconstrucción de los estados morfológicos ancestrales se llevó a cabo sobre el árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir del análisis de la matriz combinada de datos morfológicos y moleculares. Los resultados reflejan la aparición múltiple de la mayoría de los atributos analizados, lo que sugiere niveles elevados de homoplasia. No obstante, se registraron atributos como el tipo la y forma del cormo y la presencia de foveas en el labelo que representan sinapomorfias para algunos clados dentro del género. El análisis biogeográfico indica que el ancestro de *Malaxis* s.s. estuvo restringido al Neotrópico .

**Palabras clave:** clado mexicano, evolución morfológica, filogenia, *Malaxis*, Neotrópico, reconstrucción de áreas ancestrales.

## ABSTRACT

The genus *Malaxis* is an orchid group with ample diversity in the Neotropics. Mexico is considered an important diversity spot of the genus. The taxonomy of *Malaxis* has not been extensively reviewed and the importance of morphological characters in a phylogenetic context has not been explicitly explored. In this context, the main objective of this work was to include and analyze phylogenetically morphological and molecular characters of *Malaxis* to better understand the systematic importance of them, and to postulate possible evolutionary paths for the morphological characters. Based on the resulting phylogenetic tree, a reconstruction of ancestral states and a biogeographic analysis with emphasis on the genus *Malaxis sensu stricto* (s.s.), particularly of its Mexican representatives was carried out. Out of the 120 species that the genus has, 47 were included in this analysis. Other lineages of Malaxideae were used as outgroups, such as *Liparis*, *Oberonia*, and *Tamayorkis*. For the phylogenetic study molecular (ITS and *matK* regions) and morphological evidence (13 characters) was used and analyzed separately and combined. The data were evaluated by maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML), finding that the genus *Malaxis* s.s. according to the proposal of Radins et al. (2014), as well as the Mexican clade of *Malaxis*, are monophyletic groups. The obtained topologies from the molecular and combined analyzes do not differ significantly. However, the inference from morphological characters did not resolve the relationships among taxa. The reconstruction of ancestral morphological states was carried out on the maximum likelihood tree obtained from the analysis of the combined matrix of morphological and molecular data. The results reflect the multiple appearances of most of the attributes analyzed, suggesting high levels of homoplasy. However, we found attributes such as the type and shape of the corm and the presence of foveas in the lip that represent synapomorphies for some clades within the genus. The biogeographic analysis indicates that the ancestor of *Malaxis* s.s. was restricted to the Neotropics.

**Key words:** ancestral areas reconstruction, *Malaxis*, mexican clade, morphological evolution, Neotropic, phylogeny.

# I. INTRODUCCIÓN

El género *Malaxis* fue descrito en 1788 por Daniel Solander en "*Nova Genera et Species Plantarum seu Prodromus*" de Olof Schwartz, en donde también se incluyó la descripción de dos especies jamaquinas: *Malaxis spicata* Sw. y *M. umbelliflora* Sw. La primera fue designada como el tipo nomenclatural del género por Britton y Brown (1913).

*Malaxis* fue revisado por Ridley (1888), quien reconoció ocho secciones de acuerdo con la distribución geográfica de las especies, seis de ellas en el Viejo Mundo, una de África y la otra para Asia. Otros trabajos han contribuido al estudio taxonómico de *Malaxis*. Por ejemplo, Nuttall (1818), con base en la forma del labelo, dividió *Malaxis* en dos secciones: *Microstylis* y *Malaxis*. Todas las plantas con labelo cóncavo fueron ubicadas en la sección *Microstylis*, misma que fue elevada al rango genérico por Eaton (1822), mientras que algunos representantes de la sección nominal se reorganizaron en diferentes géneros como *Liparis* Rich. y *Hammarbya* Kuntze. Pfitzer (1887) reconoció a *Malaxis* y *Microstylis* como géneros independientes y los colocó en la subtribu Liparidinae junto con *Calypso* Salisb, *Corallorrhiza* Gagn., *Liparis* Rich. y *Oberonia* Lindl. Esta última propuesta fue retomada y seguida por Schlechter (1911) quien además, transfirió *Corallorrhiza* y *Calypso* para la subtribu Corallorrhizinae.

Dressler y Dodson (1960) consideraron a *Malaxis* y *Microstylis* como sinónimos y colocaron a *Malaxis* dentro de la tribu Malaxideae, la cual fue reconocida como miembro de la subfamilia Epidendroideae Lindl. Esta posición de *Malaxis* en el sistema de clasificación de orquídeas se ha mantenido constante hasta nuestros días. No obstante, la circunscripción del género ha cambiado sustancialmente, sobre todo en la última década como resultado del primer análisis filogenético molecular de la tribu Malaxideae (Cameron, 2005). En este análisis, empleó el espaciador interno transcrito del ADN ribosomal (ITS, por sus siglas en inglés) y del gen del cloroplasto (*matK*), mostró que según las propuestas anteriores, *Malaxis* es polifilético. Sin embargo, a pesar de que el estudio se basó en el entendimiento de las relaciones filogenéticas de un pequeño grupo de especies y las muestras incluidas son principalmente representantes del Viejo Mundo, a partir de estos resultados, han surgido diferentes propuestas que buscan esclarecer los límites de *Malaxis* para comprobar su monofilia. Algunas de ellas han segregado a *Malaxis* en grupos menos inclusivos como *Tamayorkis* Szlach., *Kornasia* Szlach., *Lisowskia* Szlach., *Oberonioides* Szlach., *Microstylis*

(Nutt.) Eaton, *Seidenfia* Szlach., *Saurolophorkis* Marg. & Szlach., *Pseudoliparis* Finet emend. Szlach. & Marg, *Glossochilopsis* Szlach., *Dienia* Lindl., *Seidenforchis* Marg. y *Crepidium* Blume & Szlach., (Radins, 2014), y aunque estas propuestas no han sido evaluadas filogenéticamente, muestran congruencia con los resultados del análisis molecular llevado a cabo por Chen *et. al.* (2009) y Radins *et. al.* (2014).

Margónska *et al.* (2012) dividieron *Malaxis* en secciones, subsecciones. Su obra incluyó un análisis filogenético de ITS además de análisis fenéticos. Sin embargo, la circunscripción del género que sugieren está basada exclusivamente en evidencia morfológica (p. ej. el tipo de inflorescencia) nunca antes puesto a prueba a través de un análisis filogenético para conocer su valor taxonómico y la cual difiere substancialmente de los resultados obtenidos de análisis moleculares, incluso del análisis molecular que los autores presentan en la misma obra.

Radins *et al.* (2014) analizaron la posición filogenética de una especie nueva de *Malaxis* probablemente endémica de Argentina y Uruguay y demostraron que los representantes americanos de *Malaxis* conforman un grupo monofilético y dado que la especie tipo del género (*Malaxis spicata*) queda dentro del linaje de especies del Nuevo Mundo, los autores proponen que *Malaxis sensu stricto* (s.s.) debe incluir únicamente las especies del continente Americano. Con base en esta propuesta, *Malaxis* s.s. estaría integrado por aproximadamente 120 especies, distribuidas en tres linajes principales. El primero agrupa especies consideradas por algunos autores como Eaton (1822), Pfitzer (1888), Szlachetko y Margónska (2006) y Margónska *et. al.*(2012) como un género independiente (*Microstylis*). El segundo grupo lo constituyen mayoritariamente especies con distribución en territorio mexicano, en lo subsecuente denominado como “clado mexicano”, y el tercer grupo incluye especies con distribución principalmente en Sudamérica (“clado sudamericano”) Figura 1.

Para México se conocen aproximadamente 60 especies de *Malaxis* (Soto-Arenas, 2007; Carnevalli & Noguera, 2008). Debido a la gran diversidad específica que presenta, México es considerado centro de diversificación del género (Soto *et al.*, 2007; Carnevalli, 2008). No obstante, los problemas taxonómicos en la delimitación interespecífica que presentan los *Malaxis* mexicanos y el linaje en general, son sorprendentes (Carnevalli & Noguera, 2008), debido a la segregación del género en complejos de especies con base en la evaluación visual y subjetiva de similitudes y diferencias morfológicas entre taxones (Mutanen & Pretorius, 2007). Por lo tanto, los complejos creados por afinidad fenotípica como los sugeridos por Margónska



*et. al.*, (2012), han agrupado taxones sin relación filogenética. Con base en lo anterior, es probable que algunas propuestas de especies nuevas sean sinónimos debido a la falta de información actualizada y la utilización de claves taxonómicas erróneas. Sin embargo, no existen análisis moleculares que comprueben lo anterior.

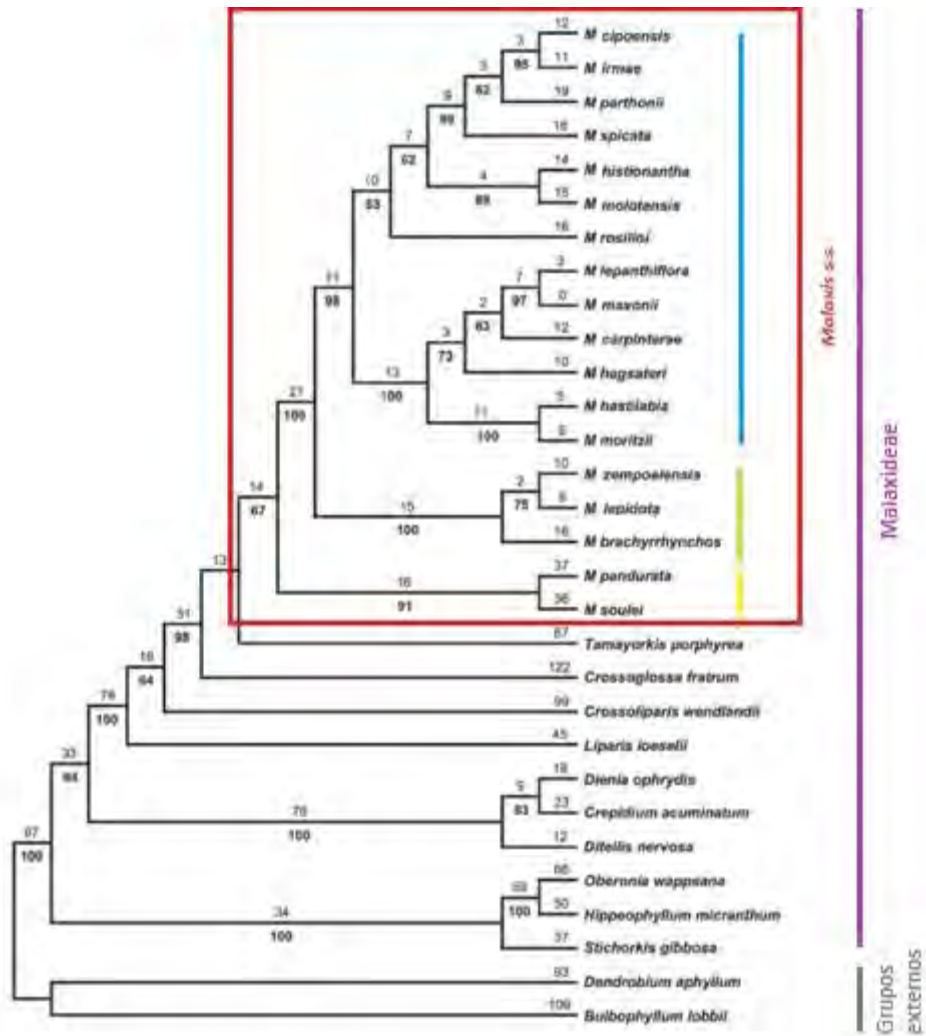


Figura 1. Relaciones filogenéticas en Malaxideae inferidas a partir del análisis de la región molecular ITS y del gen *matk*. El cuadro rojo indica la circunscripción del género *Malaxis sensu stricto*. La barra amarilla indica los representantes del “clado *Microstylis*”, la verde señala el “clado mexicano” y la azul corresponde al “clado sudamericano”. Modificado de Radins *et. al.*, (2014).

El presente estudio explora por primera vez la utilidad taxonómica de caracteres morfológicas en un contexto filogenético de manera individual y en conjunto con datos moleculares de representantes de *Malaxis* con la finalidad de: poner a prueba la monofilia del género y del grupo de especies mexicanas, discutir la importancia de la morfología en la inferencia de las relaciones filogenéticas dentro del género y proponer hipótesis acerca de la evolución de los caracteres morfológicos en el linaje.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Poner a prueba la monofilia del género *Malaxis* s.s. y evaluar la posición y monofilia del clado mexicano para analizar las relaciones filogenéticas de las especies que lo integran usando marcadores moleculares ribosomales (ITS), de plastidios (*matK*) y características morfológicas.

### Objetivos particulares

1. Incrementar el tamaño de muestra de las especies que constituyen el clado mexicano de *Malaxis* y llevar a cabo un análisis filogenético molecular y morfológico
2. Explorar la evolución de algunos atributos morfológicos mediante la reconstrucción de estados ancestrales en la hipótesis filogenética obtenida.
3. Establecer una hipótesis biogeográfica para el género *Malaxis* s.s.

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Selección de taxones

En el Apéndice I se enlistan las especies incluidas en los grupos interno y externos para los análisis moleculares, morfológico, combinado y biogeográfico; las cuales fueron seleccionadas de acuerdo con el material disponible en las bases de datos y en la colección personal del Dr. Gerardo Salazar Chávez. El grupo interno estuvo conformado por 47 especies, algunas de las cuales se emplearon en el análisis filogenético de Radins *et al.* (2014). Además, se adicionaron taxones de las lista de especies de Soto-Arenas *et al.* (2007) y algunos ejemplares recolectados recientemente por distintos colegas. Los grupos externos se seleccionaron por su cercanía filogenética con el grupo de interés tomando como referencia las propuestas filogenéticas de Cameron (2005) y Radins *et al.* (2014) así como la circunscripción del género *Malaxis* sugerida por Szlachetko y Margónska (2006). Además se incluyeron representantes de Malaxideae de los siguientes géneros: *Crepidium*, *Crossoglossa*, *Crossoliparis*, *Dendrobium*, *Dienia*, *Diteilis*, *Liparis*, *Oberonia*, *Tamayorkis* y *Stichorkis*. Finalmente, como grupo externo funcional se empleó una especie de *Bulbophyllum*. En total se analizaron 64 especies y 12 géneros.

### 3.2. Revisión bibliográfica, de herbarios y trabajo de gabinete

Se revisó la literatura del género, incluyendo estudios taxonómicos, filogenéticos, descripciones originales, tratamientos florísticos y monografías. Se consultaron las bases de datos y ejemplares depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU), herbario AMO, así como las imágenes digitales y bases de datos de distintos herbarios internacionales y diferentes instituciones (Cuadros 1 y 2). Con la información recopilada se elaboró una base de datos con los siguientes campos: nombre de la especie, categoría, país, estado, localidad, latitud, longitud, sinónimos, basónimo, revista y año de publicación, localidad del tipo nomenclatural, colector, número y año de colecta, herbario y tipo de vegetación.

**Cuadro1. Lista de herbarios con sus respectivos acrónimos e instituciones responsables, donde se examinaron ejemplares de *Malaxis***

HERBARIOS	
Acrónimo	Institución
<b>MEXU</b>	Herbario Nacional de México
<b>AMO</b>	Herbario AMO
<b>NY</b>	New York Botanical Garden Virtual Herbarium. <a href="http://sciweb.nybg.org/">http://sciweb.nybg.org/</a>
<b>RENZ</b>	Herbarium Jany Renz at the Swiss Orchid Foundation. <a href="https://orchid.unibas.ch">https://orchid.unibas.ch</a>
<b>JBL</b>	Herbario del Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica. <a href="http://www.jbl.ucr.ac.cr">http://www.jbl.ucr.ac.cr</a>
<b>ARIZ</b>	University of Arizona Herbarium <a href="http://db.herbarium.arizona.edu/collections/harvestparams">http://db.herbarium.arizona.edu/collections/harvestparams</a>
<b>HVC</b>	Herbario Virtual de Conabio. <a href="http://www.conabio.gob.mx">http://www.conabio.gob.mx</a>

**Cuadro2. Lista de recursos electrónicos consultados**

BASES DE DATOS E IMÁGENES DIGITALES Y OTROS RECURSOS ELECTRÓNICOS	
<b>Tropicos</b>	Flora de Nicaragua. <a href="http://www.tropicos.org">http://www.tropicos.org</a> Flora of North America. <a href="http://www.efloras.org">http://www.efloras.org</a> Flora of China. <a href="http://www.efloras.org">http://www.efloras.org</a> Digital Flora of Taiwan. <a href="http://www.efloras.org">http://www.efloras.org</a> Flora de Pakistan . <a href="http://www.tropicos.org">http://www.tropicos.org</a>
<b>UNIBIO</b>	Unidad Informática para la Biodiversidad del Instituto de Biología, UNAM <a href="http://unibio.unam.mx">http://unibio.unam.mx</a>
<b>EPIDENDRA</b>	The Global Orchid Taxonomic Network. <a href="http://www.epidendra.org/">http://www.epidendra.org/</a>
<b>US</b>	The United States National Herbarium. Smithsonian National Museum of Natural History. Botany Collection <a href="http://collections.nmnh.si.edu/search/botany/">http://collections.nmnh.si.edu/search/botany/</a>
<b>MO</b>	World Flora Online. Missouri Botanical Garden. <a href="http://www.missouribotanicalgarden.org">http://www.missouribotanicalgarden.org</a>
<b>JSTOR</b>	Global Plants. <a href="http://plants.jstor.org">plants.jstor.org</a>
	Wild Orchids of Europe. <a href="http://www.orchidwire.com">http://www.orchidwire.com</a>

### 3.3. Extracción de ADN

El ADN fue extraído de tejido fresco o herborizado utilizando una modificación del procedimiento descrito en Doyle y Doyle (1987). Las muestras se congelaron previamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  al menos por una hora y posteriormente fueron molidas en un tubo de disrupción con un balón metálico en un disruptor de tejidos (“Tissuelyser LT, QIAGEN”) durante dos intervalos de 2 min a 50 oscilaciones por segundo. Las muestras molidas se centrifugaron durante 1 min a 13 000 revoluciones por min. A cada tubo se le agregaron 500  $\mu\text{l}$  del tampón de CTAB caliente y se incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Durante ese tiempo los tubos se invirtieron varias veces para mezclar las muestras. La extracción se realizó con 500  $\mu\text{l}$  de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) mezclando en el tubo y dejando escapar el gas. En seguida, los tubos fueron colocados en el agitador ( $\leq 80$  oscilaciones por min). El extracto se centrifugó a 9,000 revoluciones por min durante 10 min y la fase acuosa clara (superior) fue transferida a un tubo Eppendorf limpio y etiquetado previamente, cuidando de no transferir sólidos ni la fase aceitosa. El ADN se precipitó adicionando 2/3 del volumen obtenido de etanol o isopropanol absoluto (para el material de herbario) previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se mezcló invirtiendo suavemente el tubo hasta observar un enturbiamiento blanquecino. El extracto se dejó reposar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, para muestras de herbario hasta el día siguiente. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 13 000 revoluciones por min durante 5 min y se descartó el líquido. El precipitado fue lavado con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y centrifugado a 13 000 revoluciones por minuto durante 3 min. Nuevamente se descartó el alcohol cuidando de no perder el precipitado y éste se secó en la centrifuga de vacío durante 4 min. El precipitado seco se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de buffer Tris-EDTA, o en agua inyectable mezclando con golpecitos del dedo y centrifugando brevemente a continuación. Para comprobar la presencia de ADN, se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa teñido con Gel Red.

### 3.4. Selección de marcadores moleculares

Los marcadores moleculares que se eligieron fueron: ITS del núcleo y *matK* del cloroplasto. La región de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal nuclear (ITS) incluye el gen altamente conservado 5.8s y dos espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2, los cuales corresponden a sitios no codificantes del ADN ribosomal del núcleo. Por las características que presenta (evolución rápida, miles de copias que se

repiten en el genoma, longitud moderada de 700 pares de bases aproximadamente, está rodeada por regiones altamente conservadas como los genes 18S, y 26S), es una región relativamente fácil de detectar, amplificar y secuenciar ya que se pueden utilizar primers universales. Lo anterior permite que se utilice como estimador filogenético en la comparación a nivel de géneros cercanamente relacionados y entre especies (Baldwin *et al.*, 1995; Soltis y Soltis, 1998). El gen *matK* codifica para una proteína madurasa involucrada en la eliminación de los intrones del tipo II de los transcritos del ARN y está inmerso en el intrón del gen que codifica para el ARN de transferencia (tARN) de la lisina (Soltis *et al.*, 1998). Tiene una longitud aproximada de 1550 pares de bases y es fácilmente amplificado utilizando las regiones altamente conservadas que lo flanquean (*trnK* y los genes *rps16* y *psbA*). El gen *matK* ha sido ampliamente utilizado en estudios filogenéticos para analizar las relaciones intergenéricas e interespecíficas de diversas angiospermas debido a que posee una de las tasas evolutivas más altas entre los genes del genoma del cloroplasto (Soltis y Soltis, 1998).

Ambas regiones han sido utilizadas en trabajos sobre inferencia filogenética a distintos niveles taxonómicos en orquídeas y dentro de la tribu Malaxideae (Salazar *et al.*, 2003; Cameron, 2005; Salazar y Dressler, 2011; Batista *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2014)

### 3.5. Amplificación

Para amplificar las regiones de ADN se efectuaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). El protocolo y programa seguidos fue una modificación del descrito en Salazar *et al.* (2003). El volumen de las reacciones que se llevaron a cabo fue de 25 µl. Los reactivos y cantidades utilizadas para cada muestra, se enlistan en los cuadros 3 y 4. Para el marcador ITS, los primers empleados fueron ITS5 (forward) e ITS4 (reverse), el programa que se aplicó consistió en una fase inicial de desnaturalización a 94°C por 2.5 min y 32 ciclos, cada uno con una etapa de desnaturalización a 94°C por 1 minuto; seguido de una etapa de hibridación de 1 min a 52°C, una de elongación de 1:30 min. a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Para *matK* se emplearon los primers externos -19F y 2R bajo las siguientes condiciones: una fase inicial de desnaturalización a 94°C por 2.0 min y 32 ciclos cada uno con una etapa de desnaturalización a 94°C por 1 min; seguido de una etapa de hibridación de 1 min a 52°C y una de elongación de 1 min. a 52°C; con una extensión a 72° durante 2 min que se incrementó 8 segundos en cada

ciclo, con una extensión final de 7 min a 72°C (Cuadro4). Los productos de PCR fueron visualizados por medio del gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red. Al evaluar los productos de PCR en el gel de agarosa, las muestras que carecían de bandas o en las que se mostraban débiles en la región correspondiente al gen *matK*, se reamplificaron utilizando combinaciones de los primers 19F, -556R; 1326R, -458F y 1309F, 2R (Molvray *et al.*, 2009) (Cuadro5).

**Cuadro3. Reactivos y cantidades utilizados en la amplificación del ADN de la región ITS.**

Reactivo	Cantidad
<b>Volumen de ADN</b>	0.3-0.5 µl*
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18.625 µl
<b>10×</b>	2.5 µl
<b>BSA</b>	1 µl
<b>Dntp</b>	0.5 µl
<b>Primer F</b>	0.25 µl
<b>Primer R</b>	0.25 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0.5 µl
<b>DMSO</b>	0.5 µl

\*dependiendo de la especie

**Cuadro4. Reactivos y cantidades utilizadas en la amplificación del ADN de las región *matK*.**

Reactivo	Cantidad
<b>Volumen de ADN</b>	0.3-0.5 µl*
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18.325 µl*
<b>10×</b>	2.5 µl
<b>BSA</b>	1 µl
<b>Dntp</b>	0.5 µl
<b>Primer F</b>	0.25 µl
<b>Primer R</b>	0.25 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0.5 µl
<b>DMSO</b>	0.5 µl

\*dependiendo de la especie



**Cuadro5. Combinaciones de primers utilizadas**

Región	Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS	ITS5 (F)	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et. al.</i> , 1990
	ITS4 R)	TCCTCCCGTTATTGATATGC	White <i>et. al.</i> , 1990
<i>matK</i>	-19F	CGTTCTGACCATATTGCACTAG	Molvray <i>et al.</i> (2000)
	2R	AACTAGTCGGATGGAGTAG	Steele & Vilgalys (1994)
	1326F	TCTAGCACACGAAAGTCGAAG	Cuénoud <i>et al.</i> (2002)
	-556R	GAAGRAACATCTTTKATCCA	Molvray <i>et al.</i> (2000)
	-458R	CTACTAATACCCYATCCCATC	Molvray <i>et al.</i> (2000)

### 3.6. Secuenciación

Algunos de los productos obtenidos de las PCR's, se mandaron secuenciar al High Throughput Genomics Canter, en Seattle, W.A., USA y otros se secuenciaron en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM. La preparación para el envío consistió en colocar 10 µl (por primer) del producto de PCR sin purificar en placas de 96 pozos con una placa adicional donde se colocan los primers. Se generaron 22 secuencias nuevas a partir de las muestras de tejido de 14 especies de *Malaxis* y una de *Tamayorkis*. El resto de las secuencias fueron proporcionadas por el Dr. Gerardo Salazar o bajadas de GenBank (Ápéndice I).

### 3.7. Edición y alineamiento de secuencias

Los cromatogramas generados por el secuenciador se editaron en el programa Sequencher 4.10.1 (Genes Code Corp.). El alineamiento se realizó por separado para cada marcador con la versión en línea del programa MAFFT versión 7 (Kato & Standley, 2013). Los alineamientos resultantes fueron ajustados manualmente con el programa PhyDE-1 (Phylogenetic Data Editor).

### 3.8. Obtención y codificación de caracteres morfológicos.

A partir de la observación de ejemplares de herbario, flores preservadas en formaldehído-ácido acético-agua (FAA) o alcohol con glicerina (7:3), fotografías y literatura, se obtuvieron datos morfológicos vegetativos y reproductivos que se emplearon como caracteres cualitativos. De las características observadas algunas son utilizadas en la taxonomía de *Malaxis* (e.g. el número de hojas, el tipo de inflorescencia y la presencia o ausencia de foveas en el labelo). Caracteres muy variables como la forma del labelo, el color del mismo y en general caracteres cuantitativos, no se incluyeron en los análisis por la dificultad que representa codificar los datos debido a la plasticidad fenotípica de las especies y a que el número de ejemplares consultados por taxón no fue el mismo y en algunos casos sólo se contaba con una descripción o dibujo.

Los caracteres se codificaron como binarios o multiestado y para aquellos que no pudieron ser determinados por falta de datos, se utilizó el símbolo “?” que se interpreta como un dato faltante. En los casos donde los datos eran inaplicables se codificó utilizando un guión (-). Para los análisis filogenéticos con máxima verosimilitud (ML), las especies que presentaron más de un estado para el mismo carácter (especies polimórficas), se codificó únicamente el estado predominante debido a que RaxML (Silvestro y Michalak, 2011) el software que se empleó para los análisis de ML, no permite la incorporación de polimorfismos. La matriz se muestra en el Apéndice II.

A continuación se describen cada uno de los caracteres morfológicos utilizados en el análisis:

**1. Hábito (0=terrestre, 1= epífito; 2=paludícola).** La mayoría de las especies del género son de hábito terrestre, algunas son epífitas y sólo dos especies: *Malaxis zempoalensis* y *M. irmae*, son paludícolas.

**2.- Corno: (0= hipógeo; 1= epígeo).** En la mayoría de las especies el corno es hipogeo, pocos taxones como *M. moritzii* y *M. rolandoana* presentan corno epígeo.

**3.- Forma del corno (0= ovoide; 1= fusiforme; 3= cilíndrico).** La forma ovoide de esta estructura se mantiene constante entre los taxones que presentan un corno hipógeo. En especies con el corno epígeo como *M. histionantha*, éste es generalmente fusiforme. Los tallos cilíndricos corresponden a las especies de los grupos externos.

**4.- Número de hojas (0= una; 1= dos sin traslape de la base foliar; 2= dos con traslape de la base foliar; 3= más de dos con traslape en las bases; 4= más de dos en posición dística).** Las plantas producen una o dos hojas generalmente excepto *M. spicata* y *M. irmae* que pueden tener tres o hasta cinco. Las bases de las láminas foliares en algunas especies están muy próximas de manera que sus bases se superponen, mientras que en otras se encuentran separadas por varios centímetros.

**5.- Número de venas conspicuas en la lámina (0= lámina con varias nervaduras conspicuas en el envés, 1= lámina con una sola nervadura conspicua en el envés).** La venación principal consiste en una sola nervadura central o varias nervaduras paralelas. La disposición de éstos haces a lo largo de la hoja es constante entre los integrantes de *Malaxis*. Todas de las especies presentan una sola vena principal en el envés.

**6.- Márgen foliar (0= entero; 1= ondulado).** El márgen de la lámina en la mayoría de las especies es entero. En menor proporción, se presenta ondulado como en *M. rosei* y *M. velazquezii*.

**7.- Tamaño relativo del peciolo (0= peciolo más corto que la lámina; 1= peciolo del mismo tamaño o más largo que la lámina).**

Cuando el peciolo de las hojas es tan largo o mide más que el largo de la lámina foliar, éstas últimas se extienden en la posición media o por encima de la mitad de la altura de la planta. Si el peciolo es más corto que la lámina, ésta se encuentra cerca de la base de la planta y por lo tanto del substrato.

**8.- Apariencia de la inflorescencia respecto a la disposición de las flores sobre el raquis (0=racimo corimbiforme; 1= racimo 2= racimo espiguiforme; 3= flor solitaria).**

Todas las especies de *Malaxis* presentan inflorescencias racemosas. No obstante, debido al grado de elongación del raquis y el tamaño del pedicelo de las flores, existen variaciones. En las especies con pedicelos reducidos como *M. streptopetala*, las flores aparentan ser sésiles y el racimo parece una espiga (racimo espiguiforme). En las especies con flores evidentemente pediceladas, se forman racimos laxos (como en *M. maianthemifolia*) y racimos compactos con apariencia de corimbos (racimo corimbiformes) como en *M. moritzii*. La etapa de desarrollo de la inflorescencia es importante debido a

que en inflorescencias jóvenes las flores generalmente se encuentran agrupadas en el ápice de la inflorescencia y conforme la planta crece el raquis se elonga y las flores se separan. Por lo tanto, es común registrar dos tipos de inflorescencias en la misma especie si no se observan inflorescencias maduras.

**9.- Forma del ápice del labelo (0=agudo; 1=trilobado; 2=acuminado; 3=apiculado; 4= mucronado; 5=emarginado; 6= redondeado).** La variedad de formas de labelo que presentan las especies del género *Malaxis* es muy amplia. El ápice de esta estructura es particularmente diverso. Los labelos enteros, es decir, que no presentaron divisiones en el ápice se separaron en: redondeados; agudos cuando terminan en ángulo agudo o en punta; acuminados, cuando la punta del ápice es muy alargada y mucronado, cuando el ápice termina con una punta pequeña y bien definida Para los ápices que presentaron divisiones se emplearon los siguientes calificativos: trilobado, ápices divididos en tres lóbulos; apiculado, cuando el lóbulo medio presenta punta pequeña y corta; emarginado, cuando presenta una hendidura o muesca poco profunda.

**10.- Aurículas en la base del labelo (0= inconspicuas; 1=redondas; 2=agudas; 3= uncinadas).** Las aurículas son pequeños lóbulos que se sitúan a los lados de la base del labelo. En algunos linajes se encuentran reducidas de manera casi vestigial, en otros como *M. hastilabia* están bien desarrolladas y son conspicuas.

**11.- Color de sépalos y pétalos (0= verde; 1=morado-rojizo; 2= anaranjado; 3= amarillo; 4= lila).** El color de las flores en Malaxideae es predominantemente verde en diferentes tonalidades. Pocas especies presentan colores púrpuras o rojizos. La coloración del perianto en muchas ocasiones está relacionada con la edad de las flores ya que entre más viejas sean, el color se modifica a tonos amarillentos o verdes pálidos.

**12.-Tipo de margen en el labelo (0= entero; 1= crenulado; 2= ciliado; 3= eroso; 4= verrucoso).** Dentro de la diversidad morfológica del labelo de los *Malaxis*, se encuentra la variación en su margen. Puede ser entero; crenulado cuando presenta pequeños dientes redondeados; ciliado cuando muestra pelos pequeños y delgados o eroso si se observan dientes de apariencia sinuosa.

**13.- Fóveas en el labelo (0=ausentes; 1=presentes).** Las fóveas son pequeñas cavidades que se encuentran principalmente hacia la base del labelo. Este atributo ha sido importante en la distinción de especies ya que no todas lo presentan. Se

ha sugerido que estas cavidades sirven como probables receptáculos de néctar (Kite & Salazar, 2008).

### 3.9. Análisis filogenéticos

Se elaboró una matriz para cada conjunto de datos (morfológicos, región ITS y región *matK*) y se analizaron de manera independiente. Además se elaboró una matriz concatenada con los dos marcadores empleados y una combinada de datos morfológicos y moleculares. En todos los casos, se utilizaron las mismas terminales. Como grupo externo se utilizó *Bullbophyllum lobbii*.

Los análisis filogenéticos moleculares se llevaron a cabo utilizando el conjunto de datos de los dos marcadores (ITS y *matK*) de manera concatenada ya que estudios previos para Malaxideae (Cameron *et. al.*, 1999, 2005; Radins *et. al.*, 2014) han demostrado que existe mayor resolución filogenética con la matriz concatenada de diferentes marcadores. Además, se incluyeron caracteres morfológicos en la reconstrucción filogenética pues se ha demostrado que los caracteres estructurales (morfológicos y/o anatómicos) son valiosos para la reconstrucción de la historia evolutiva en diversos grupos vegetales (Freudenstein & Rasmussen, 1999; Scotland *et. al.*, 2003; Wiens, 2004). En este sentido, se elaboró una matriz combinada con los datos moleculares y morfológicos pues se ha sugerido que con los resultados obtenidos al hacer una combinación de matrices, se pueden explicar mejor debido a que caracteres homoplásicos en los análisis parciales se corroboran como sinapomorfías en los análisis combinados (Nixon y Carpenter 1996).

Para cada conjunto de datos se obtuvieron las topologías correspondientes a los diferentes enfoques filogenéticos: Máxima parsimonia (MP) y Máxima verosimilitud (ML) con la finalidad de obtener de cada análisis la resolución correspondiente y comparar los resultados. El análisis de MP, se realizó con el programa TNT (Goloboff, 2003; Goloboff *et. al.*, 2008). Como estrategia de búsqueda, se eligió la de “Nueva tecnología” (Goloboff, 1999) con 1000 réplicas y una retención máxima de 1200 árboles. Todos los caracteres se trataron como no ordenados y se les otorgó el mismo peso. El soporte interno de las ramas se evaluó con un análisis de bootstrapp (Felsenstein, 1985) de 1000 réplicas. Los árboles obtenidos se editaron con FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009). Además, se calcularon el índice de consistencia (IC) y el índice de retención (IR).

Para los análisis de reconstrucción filogenética paramétrica como lo es máxima verosimilitud (ML), fue necesario obtener el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a los datos moleculares (Posada y Crandall, 2001) por lo que se realizó una prueba bajo el criterio de Akaike (AIC) en el programa jModelTest 2.1.1 (Darriba *et al.* 2012). De acuerdo con los resultados de esta prueba se seleccionó el modelo GTR+I+G para los datos moleculares, el cual permite una proporción de sitios invariables y variación en la tasa de sustitución entre los sitios bajo una distribución gamma (Brown y Lemmon, 2007; Stamatakis, 2006). Con el modelo evolutivo elegido se realizó la búsqueda de ML por medio de la interfaz gráfica de RAxML versión 1.3 (Silvestro y Michalak, 2011) con 1000 réplicas de bootstrap y dos particiones en la matriz molecular correspondientes a los marcadores ITS y *matK*. La matriz combinada se analizó con la opción MULTIGAMMAI que permite una distribución gamma para la tasa de variación de los sitios y la proporción de sitios invariantes, asignando el modelo MK1 a la partición de datos morfológicos y el modelo GTR a los moleculares. El modelo MK considera igualmente probables las transiciones entre todos los estados de carácter y se ha sugerido para el análisis de datos morfológicos ya que es una generalización del modelo Jukes- Cantor (Lewis, 2001).

### **3.10. Reconstrucción de estados ancestrales de los caracteres morfológicos**

Se trazó la evolución de algunos caracteres morfológicos sobre la filogenia obtenida del análisis de ML de la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos por ser considerada la hipótesis filogenética más robusta en comparación con las hipótesis obtenidas a partir de los demás conjuntos de datos, ya que presentó valores de soporte más elevados, además, hoy día el análisis filogenético combinado es uno de los métodos más utilizados para inferir los posibles patrones de evolución o reconstrucción de estados ancestrales de caracteres morfológicos.

Se utilizó el programa Mesquite versión 2.75 (Maddison y Maddison, 2011) y se empleó el criterio de máxima parsimonia para la reconstrucción ya que algunos autores que han adoptado éste método para inferir los posibles patrones de evolución de caracteres morfológicos (García-Cruz y Sosa 2005, Figueroa *et al.* 2008, Cervantes 2009 sugieren que el uso de la parsimonia en la reconstrucción de estados de caracteres ancestrales en un árbol filogenético reduce la obtención los resultados ambiguos comparado con el método de ML (Schäffer *et al.* 2010).

Debido a que en algunos casos los estados de carácter fueron muy variables entre las especies, por ejemplo, la forma del labelo; y en otros casos fueron invariables para todos los taxones, como el tamaño relativo del peciolo, se seleccionaron únicamente siete caracteres que representan la plasticidad fenotípica de *Malaxis* y aquellos que potencialmente pueden aportar información taxonómica para el género. En este sentido, las características morfológicas analizadas fueron: hábito, tipo de corno, forma del corno, número de hojas, disposición de las flores sobre el eje de la inflorescencia, forma del ápice del labelo y presencia de foveas en el mismo.

### **3. 11. Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA)**

Se llevó a cabo un análisis de reconstrucción de áreas ancestrales (RAA) por medio del programa RASP v.1.1 (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies; Yu *et al.*, 2011). Para colocar las distribuciones de cada especie en el análisis, se consideraron cinco áreas donde ocurre el género en sentido amplio y los grupos externos. Para ello se hizo una modificación de las ocho regiones biogeográficas propuestas por Udvardy (1975) y basadas en los estudios y clasificaciones de Sclater (1858) y Wallace (1876). La modificación consistió en la extensión hacia el norte del área correspondiente al Neotrópico. Lo anterior, con la finalidad de no partir en dos unidades biogeográficas los principales sistemas montañosos de México como las sierras Madre Oriental y Occidental. De esta manera, la clasificación incluyó las siguientes zonas: A) Neártica (América del norte desde el norte de California y norte de Florida, hasta el extremo norte del continente), B) Neotropical (continente americano desde el sur de los Estados Unidos, incluyendo Florida, Luisiana, Misisipi, Alabama, Georgia, Texas, Nuevo México y Arizona hasta Tierra de Fuego, Argentina), C) Paleártica (Europa, gran parte de Asia al norte del Himalaya, norte de África y las zonas norte y central de la Península Arábiga), D) Oriental (La India, Sur de China, Camboya, Vietnam, Laos, Corea e islas adyacentes) y E) Australiana (Australia, Nueva Guinea, Nueva Zelanda y otras islas del Sudeste asiático al sur de la línea de Wallace (Figura 2). Se empleó una regionalización amplia ya que no existe información geográfica disponible para todas las especies. Además, los patrones de regionalización existentes que operan adecuadamente en vertebrados, no son fácilmente aplicables a plantas.

Se introdujo al programa la topología obtenida del análisis de ML de los datos moleculares y morfológicos y se realizó el análisis con un número máximo de áreas igual a cinco, el cual se restringió para cada nodo siendo éste un punto fundamental para observar un escenario en donde se encuentre un ancestro probablemente de distribución amplia (presente en las cinco áreas), de esta manera se toma considera el potencial de dispersión de las especies. Además, se discriminaron los intervalos ancestrales inverosímiles, donde se excluyen las áreas disyuntas (e.g. AE), favoreciendo de esta manera los eventos de vicarianza sobre los de dispersión, suponiendo que el ancestro se hubiera distribuido en un área geográfica continua, que pudo haber sido fracturada por barreras físicas y que la distribución actual de las especies se debe a ello más que a las capacidades de dispersión. Se corrió el análisis con los parámetros predeterminado que ofrece el software.

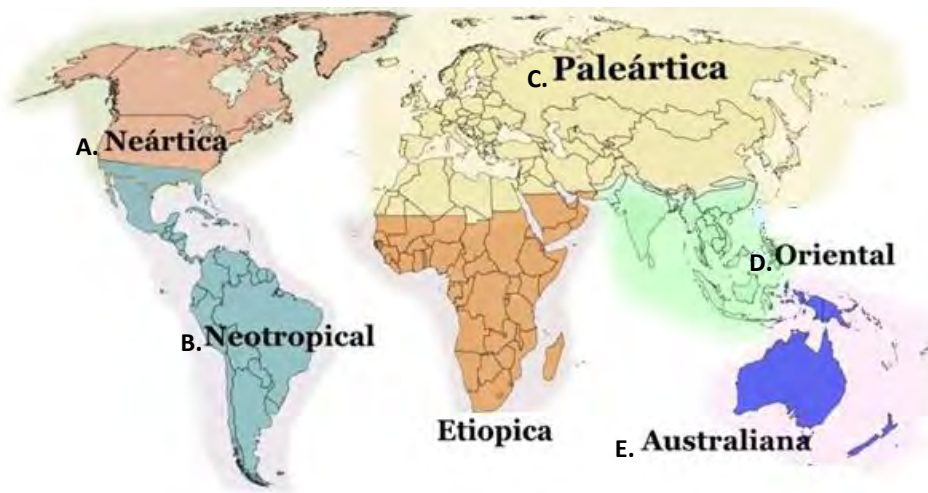


Figura 2. Clasificación de áreas introducidas en RASP de acuerdo a las distribuciones de las especies tomando como referencia las regiones biogeográficas del mundo propuestas en Udvardy (1975) (Modificado).



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Inferencia filogenética

#### 4.1.1. Análisis de datos morfológicos

##### Descripción morfológica de *Malaxis*

El género comprende plantas herbáceas predominantemente terrestres con escasos representantes epífitos o paludícolas. Las raíces son blanquecinas y contienen pelos radicales (Sathiyadash *et al.* 2012). El tallo es un cormo y puede ubicarse debajo de la superficie (hipógeo) o sobre la superficie (epígeo). Los cormos hipógeos generalmente son pequeños, ovoides y de color blanco, los cormos epígeos son fusiformes y verdes. El peciolo hacia la base suele ser erecto, alargado y tubular por lo que a menudo se confunde con un tallo. Las hojas son membranáceas y bifaciales. El tamaño y forma de las láminas foliares varía ampliamente, pueden ser elípticas, oblongas o lanceoladas con los márgenes lisos u ondulados. Por lo general las plantas producen una o dos hojas. Este número, regularmente es constante aunque en ocasiones hay excepciones, como en *Malaxis irmae* (González-Tamayo, 2002; Radins *et al.*, 2014, Fig.2). Todas las especies de *Malaxis* tienen flores pediceladas dispuestas en inflorescencias racemosas terminales con brácteas persistentes triangulares a lanceoladas. Existen variaciones notables en la apariencia de la inflorescencia respecto a la disposición de las flores sobre el raquis, lo cual está determinado por el largo del pedicelo o la edad de la inflorescencia. Por ejemplo, en especies con pedicelos reducidos como *M. carnosa* y *M. soulei*, las flores parecen ser sésiles y el racimo tiene la apariencia de una espiga (racimo espiguiforme; Fig. 3F y 3G respectivamente). Las especies con flores evidentemente pediceladas pueden separarse en dos grupos dependiendo de la longitud del raquis. Cuando el raquis se encuentra reducido y las flores se compactan hacia el ápice, generalmente en inflorescencias jóvenes, las flores aparentan disponerse en un corimbo (racimo corimbiforme) como en *M. brachyrrhynchos* (Rchb. f.) Ames (Fig. 3H). Sin embargo, en algunas especies esta apariencia cambia conforme la inflorescencia crece y el raquis se alarga. Cuando esto ocurre, las flores se disponen sobre todo el eje como en *M. unifolia* Michx. y *M. lepanthiflora* (Schltr.) Ames, y la inflorescencia es un racimo (Fig. 3A y 3I respectivamente). Como se mencionó antes, puede haber variación en función de la

etapa de desarrollo de la inflorescencia. En las inflorescencias jóvenes las flores comienzan a abrir antes de que haya alargamiento del raquis y conforme el raquis crece, las flores se separan (Fig. 3D). Por lo tanto, es común registrar diferentes estados de carácter en la misma especie (Fig. 3J). De esta manera, la segregación del género en dos secciones y dos subsecciones (*Umbellulate–Malaxis* y *Malaxis–Pedillea* respectivamente) sugerida por Margónska *et al.* (2012) y basada en las características morfológicas de la inflorescencia, agrupa especies lejanamente emparentadas como *M. spicata* y *M. lepidota* y separa especies que difícilmente se pueden distinguir como *M. urbana* y *M. ochreatea* las cuales son ecológica y morfológicamente similares (Radins *et al.*, 2014).

La morfología floral a simple vista es relativamente constante en forma y tamaño dentro del género. En general las flores de *Malaxis* son diminutas, miden entre 3 y 20 mm del sépalo dorsal y los laterales (Fig. 2B, 2D y 2G). Pueden ser resupinadas o hiper resupinadas (Ames, 1938). Coloreadas en distintas tonalidades de verde (Salazar y Soto, 1990). El sépalo dorsal está libre. Los sépalos laterales pueden estar parcialmente connados (Espejo, *et al.*, 1998; González-Tamayo, 2002). El labelo por lo regular es de color más intenso que el resto del perianto, es carnosos, lobado o auriculado en la base (Fig. 2H) (Dressler, 1981; Atwood, 1986; Chase *et al.*, 2003; Pridgeon, 2005; Novoa, 2005). En algunos representantes se encuentra una cavidad en la base del labelo (Greenwood y González-Tamayo, 1981; Szlachetko y Margonòska 2006; Kite y Salazar, 2008). El ginostemio es pequeño, compacto, con una antera dorsal erecta firmemente unida a la columna y con polinios desnudos, es decir, desprovistos de estructuras accesorias como caudículas y viscidio (Fig. 2E, 2F, 2J) (Szlachetko y Kolanowska, 2013).

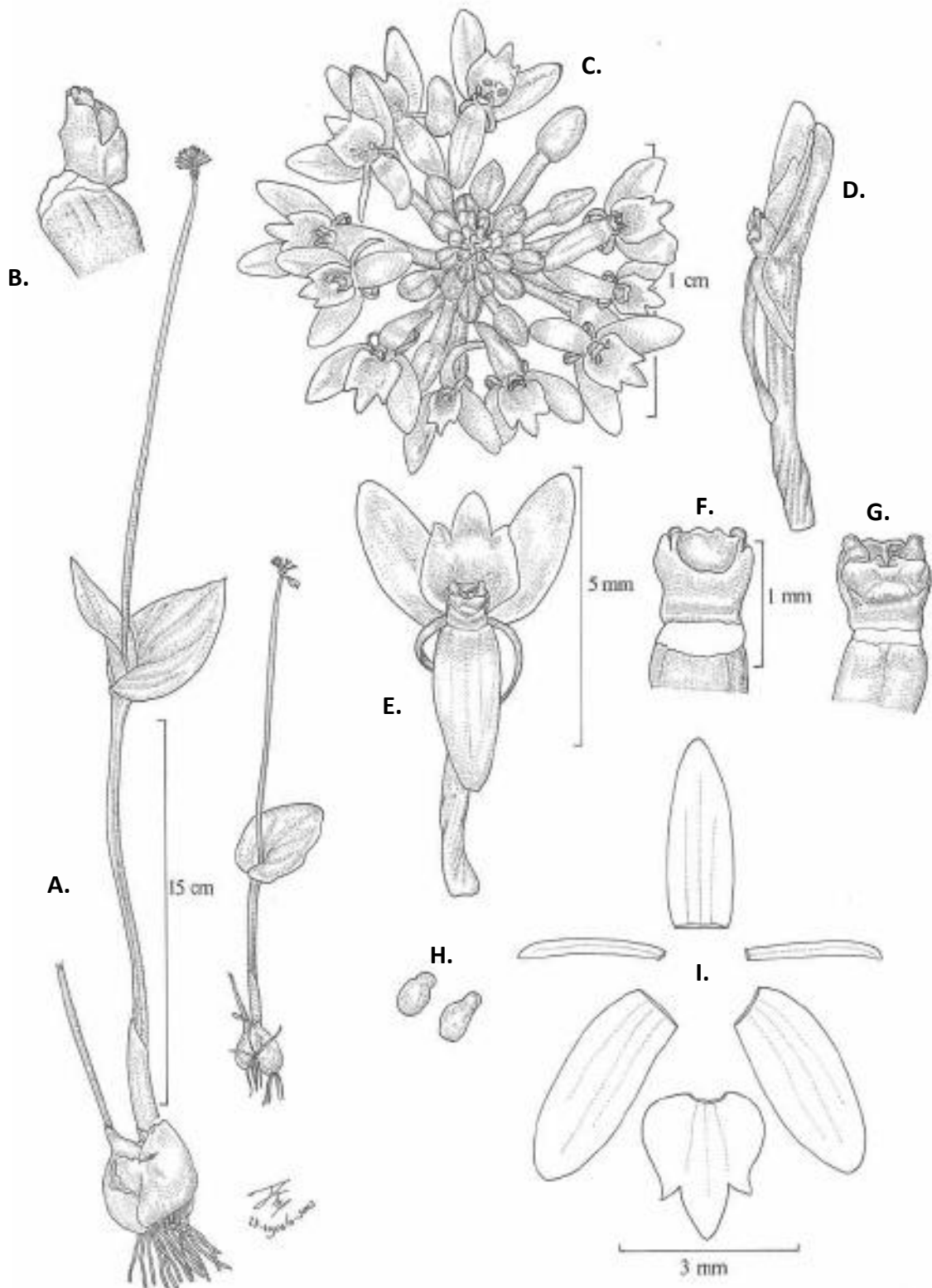


Figura 3. Morfología de *Malaxis javesiae* (Rchfb. f.) Ames. A. Planta en floración. B. Columna en vista lateral. C. Inflorescencia. D. Flor en vista lateral. E. Flor en vista frontal. F. Columna en vista posterior. G. Columna vista frontal. H. Polinios I. Disección de la flor. Dibujo de Rolando Jiménez. Reproducido de *Icones Orchidacearum* 10, 2008.



Figura 4. Diversidad morfológica del género *Malaxis*. A) Hoja única de *M. unifolia*. B y D) Dos hojas subopuestas e inflorescencia en *M. massonii* C) Hábito paludícola y más de dos hojas en *M. irmae*. E) Inflorescencia racimo-corimbosa en *M. corymbosa*. F) Inflorescencia de *M. carnosae* G) Inflorescencia racimo-espigada de *M. soulei*. H) Inflorescencia de *M. brachyrrhynchos*. I) Inflorescencia de *M. lepanthiflora*. J) Inflorescencia de *M. andicola*. K) *M. aff. termensis*. Fotografías: (A) Missouri Botanical Garden. (B y D) F. Areces. (C) J.A.N. Batista. (E) Anónimo (F) Luis Mincitar. (G) Brad Wilson. (H) Edouar Faria. (I) Sune Holt. (J) Asociación Quindiana de Orquideología. (K) F. Rizo-Patrón.

Debido a que los caracteres morfológicos han recibido particular atención de los taxónomos, se han elaborado clasificaciones que incluyen grupos morfológicos difíciles de estudiar, los cuales están más relacionados por eventos de convergencia o paralelismos que con su historia evolutiva por lo que estas clasificaciones suelen ser artificiales. Por lo anterior, en este trabajo se elaboró una matriz de datos morfológicos que comprendió 13 caracteres vegetativos y reproductivos variables. El análisis de parsimonia encontró 10 árboles más parsimoniosos (AMP's) con una longitud de 104 pasos, índice de consistencia (IC) de 0.31 e índice de retención (IR) de 0.71. En el consenso estricto de todos los cladogramas (Fig. 5) no se recupera la monofilia del género y los clados presentan valores bajos de bootstrap. Únicamente el clado formado por dos especies del grupo externo (*Crepidium acuminatum* y *Diteillis nervosa*) muestra un valor de apoyo superior a 40.

En la topología se muestran además distintas politomías y el “clado mexicano” de *Malaxis* es como parafilético. Únicamente parte de las especies incluidas en el denominado “clado *Microstylis*” *sensu* Radins *et. al* (2014), se agruparon formando un clado monofilético con soporte menor a 50%. No obstante, las relaciones dentro de éste no están resueltas.

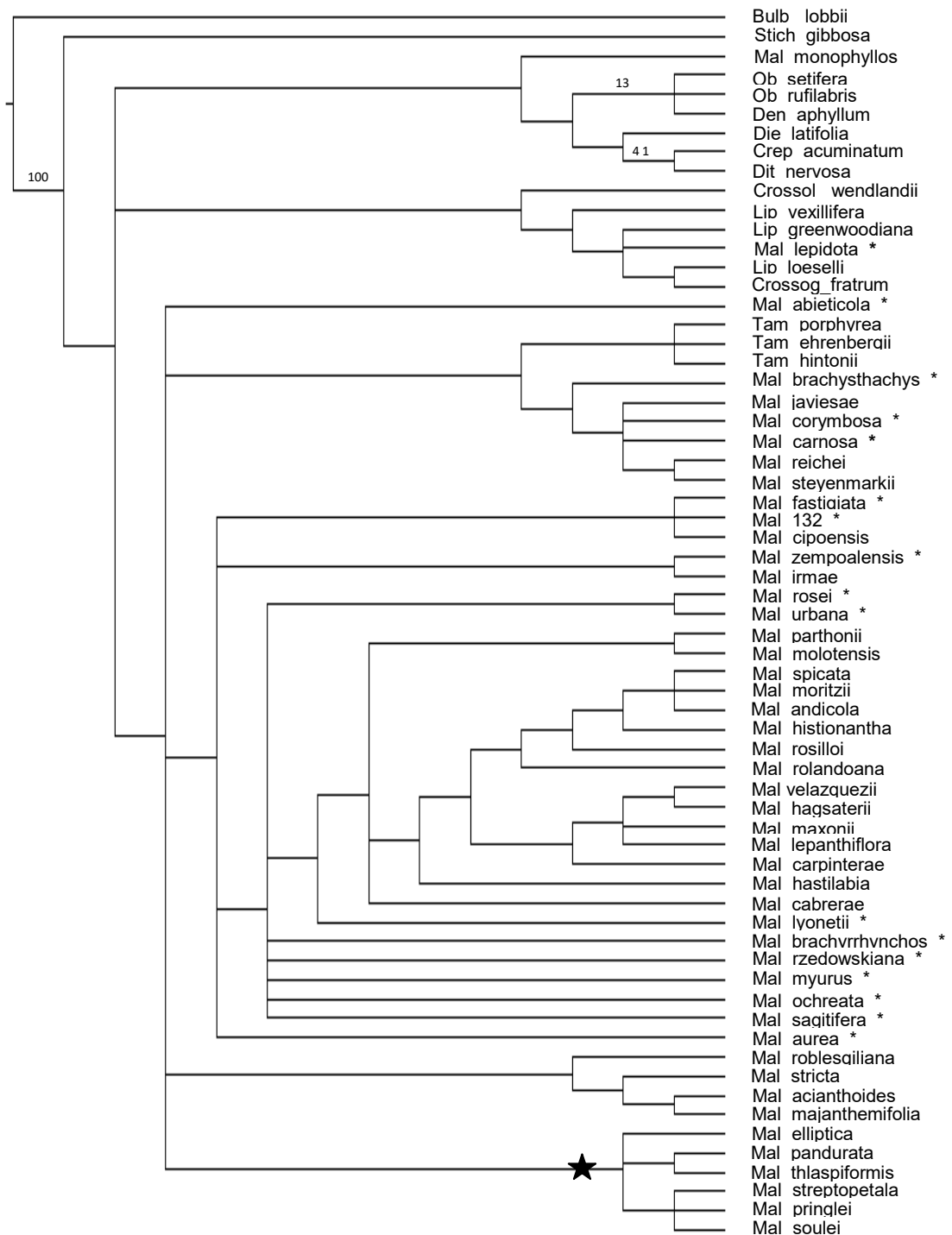


Figura 5. Árbol de consenso estricto de los diez AMP's encontrados en el análisis de parsimonia de los caracteres morfológicos, los números en las ramas indican valores de bootstrap > 10 ★ = "clado *Microstylis*". El (\*) muestran las especies del "clado mexicano".

#### 4.1.2. Análisis de datos moleculares

Se incluyeron 64 especies, 47 pertenecientes al grupo en estudio y el resto corresponden a distintos géneros de la tribu Epidendroideae. En la Cuadro6, se muestran las características de la matriz y de los marcadores.

En el análisis de parsimonia de la matriz concatenada de los dos marcadores se obtuvieron cuatro árboles igualmente parsimoniosos con 2267 pasos (IC= 0.586: IR=0.771). En general, las ramas presentan valores de soporte elevados (BS >50). Los árboles difieren entre sí principalmente en la posición de los grupos más cercanos a *Malaxis s.s. como Tamayorkis, Crossoglossa y Crossoliparis*, sin embargo, el género *Malaxis* y el clado mexicano de este género, se recuperan como grupos naturales aunque con soporte de bootstrap menor a 50% (Fig. 6). Las especies que se encuentran cercanas a la raíz del árbol representan linajes de divergencia temprana dentro de la tribu Malaxideae principalmente del Viejo Mundo como *Stichorkis y Oberonia* (Radins *et. al.*, 2014). En el árbol de consenso estricto los clados con soporte menor a 50% colapsaron (Fig. 9A).

Cuadro6. Datos moleculares por marcador y matriz concatenada

Datos moleculares	Número de taxones	Longitud del alineamiento (pdb)	Caracteres informativos
ITS	63	742	361
<i>MatK</i>	61	1420	1160
Concatenada	64	2162	1560

En la selección del modelo para el análisis paramétrico, se obtuvieron 10 modelos dentro del intervalo del 95% de confianza. Se eligió GTR+I+G ya que se ha observado que el uso de este modelo tiene ventajas sobre otros modelos al otorgar mejores puntuaciones de verosimilitud en matrices con particiones o concatenadas, además, es el

modelo más común para análisis de ADN (Brown y Lemmon, 2007; Stamatakis, 2006). La figura 7 muestra el árbol obtenido en el análisis de ML (lnL=-14497.55) para el mismo conjunto de datos. En general, las relaciones filogenéticas resultantes del análisis de la matriz concatenada (marcadores ITS y *matK*) con máxima parsimonia (MP) y con máxima verosimilitud (ML) coinciden. No obstante, la topología obtenida con ML presentó valores de soporte bootstrap mayores en contraste con los obtenidos en el análisis de parsimonia.

*Crossoliparis wendlandii* se ubicó como especie hermana de un gran clado que incluye las especies de *Malaxis* s.s, *Tamayorkis*, *Crossoglossa* y los representantes neotropicales de *Liapris*, con porcentaje bootstrap <50 (Fig. 7). El género *Tamayorkis* es hermano de *Malaxis*. El “clado *Microstylis*” recibió un soporte fuerte (BS=99 y 99 para MP y ML respectivamente), igual que el “clado sudamericano” de *Malaxis*, (BS=97 y 93 MP y ML). Este último corresponde al clado hermano de las especies mexicanas mismo que presentó apoyo bootstrap menor a 50% con ambos enfoques. Dentro del “clado mexicano” la posición de *M. aurea*, *M. carnososa* y *M. rosei* fue variable.



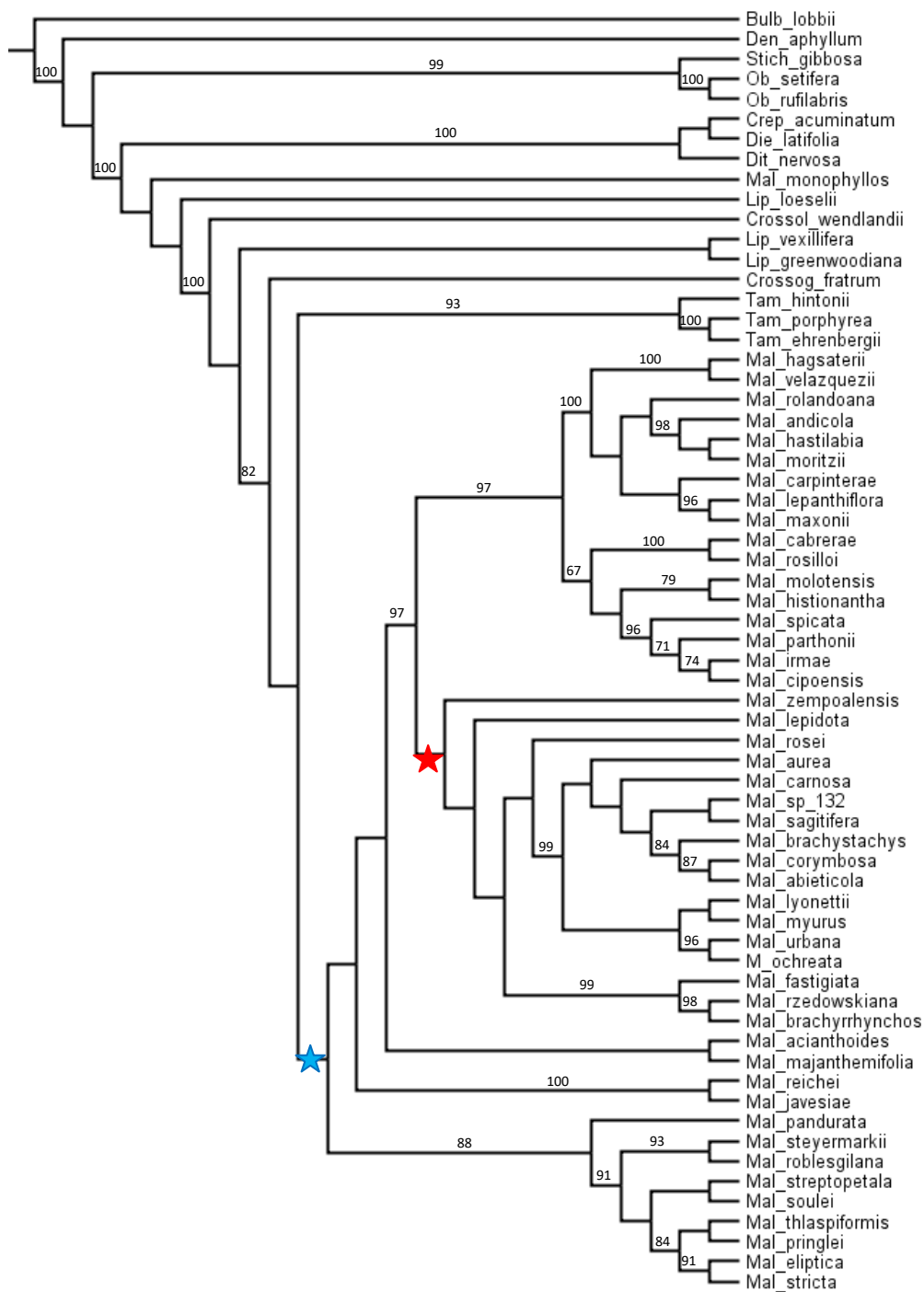
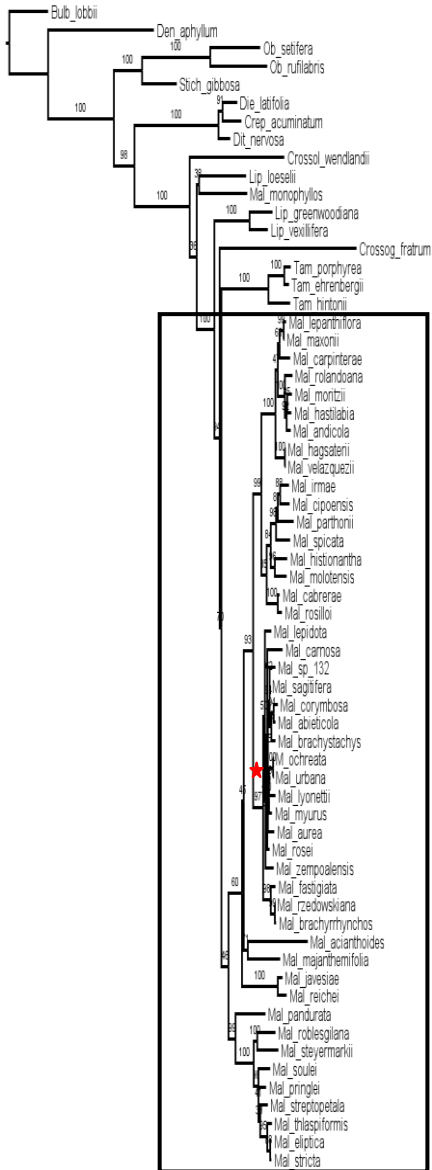


Figura 6. A. Uno de los AMP's inferido por máxima parsimonia (MP) a partir del análisis de la matriz concatenada de ADN los marcadores ITS y *matk*. Los valores asociados a los nodos son valores de apoyo bootstrap. B) Árbol de consenso estricto de los ocho árboles obtenidos en el análisis de MP. ★ = *Malaxis sensu stricto*. ★ = "clado mexicano B. Árbol de consenso estricto.

A.



B.

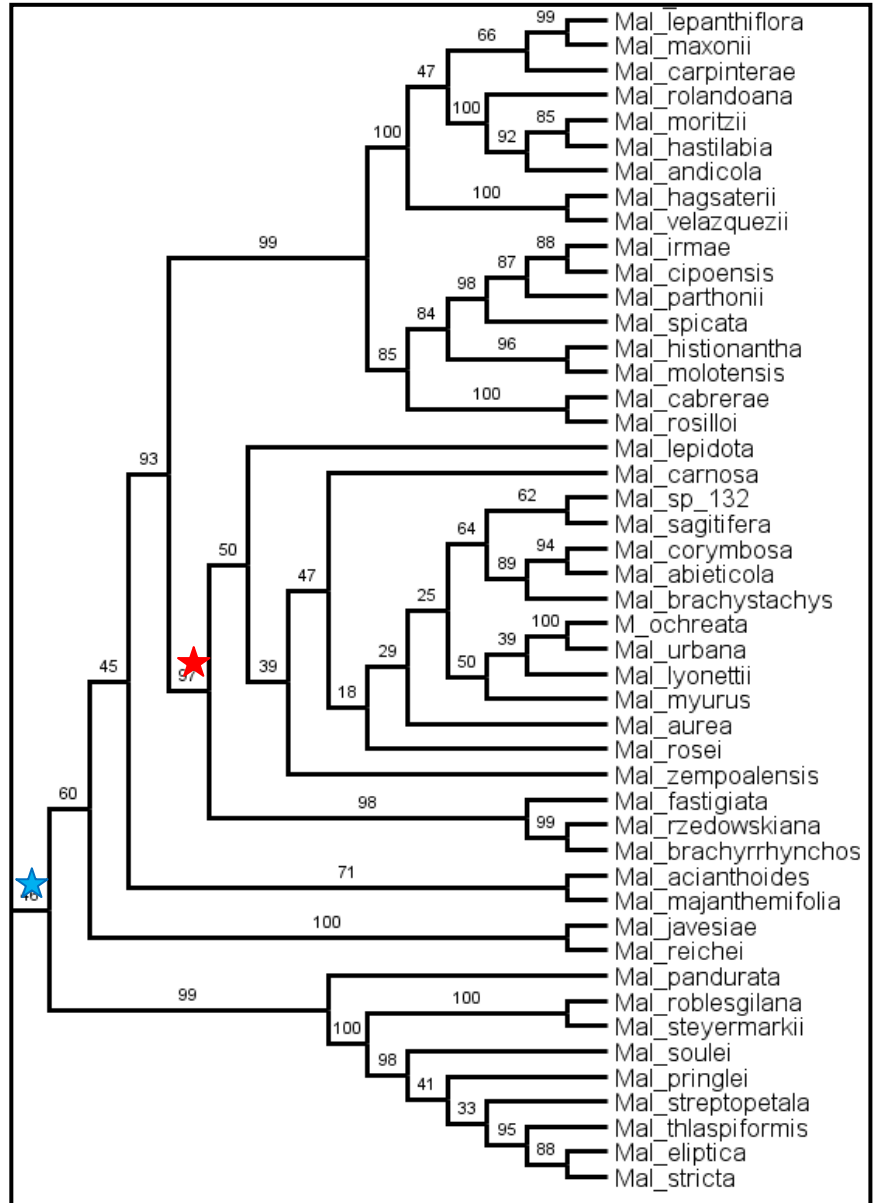


Figura 7. Inferencia Filogenética de *Malaxis* utilizando máxima verosimilitud (ML) para los dos marcadores (ITS y *matk*). (A) Topología mostrando las longitudes de ramas. (B) Cladograma con los valores de soporte bootstrap para cada uno de los nodos. ★ = *Malaxis sensu stricto* ★ = "clado mexicano"

#### 4.1.3. Análisis combinado de datos morfológicos y moleculares.

La matriz combinada de los dos marcadores moleculares y los caracteres estructurales incluyó 2175 caracteres. Los resultados de los análisis para esta matriz tanto con MP como con ML, arrojaron resultados similares entre sí y similares a los obtenidos con el conjunto de datos moleculares exclusivamente (Figs.6, 7, 8 y 10). Sin embargo, debido a que los valores de apoyo para las ramas son ligeramente mayores en el análisis de ML de la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos, la descripción más detallada que sigue a continuación se hizo con base en esta topología (Fig. 10). Se señalarán los casos donde se presenten diferencias contrastantes entre las topologías de MP y ML. Cabe mencionar que la búsqueda heurística del árbol más parsimonioso encontró 16 árboles con una longitud de 2283 pasos (IC=0.58; IR=0.77). El árbol de consenso estricto se muestra en la figura 10B.

Se recupera un gran clado de linajes neotropicales en donde se incluye *Malaxis* s.s. y géneros afines como *Crossoglossa*, *Crossoliparis*, *Liparis* y *Tamayorkis* (BS=100). *Crossoliparis wendlandii* es el grupo hermano del resto de linajes neotropicales pero con bajo apoyo (BS= 47; Fig. 10). La posición de *Malaxis monophyllos* y *Liparis loeselli* difiere entre métodos. Con los resultados de MP ambas especies se mantienen como linajes separados y fuera del clado de especies neotropicales mientras que con ML este arreglo no existe y los taxones se agrupan como hermanos a la vez que se incluyen en el clado neotropical. En ambos casos el soporte es menor a 50%.

Con la evidencia empleada, *Tamayorkis* es monofilético (BS= 93%) y se resuelve como el género hermano de *Malaxis* s.s., el cual también se recupera como un grupo natural aunque con bajo apoyo (BS=48%). No se encontraron sinapomorfias morfológicas para *Malaxis* s.s.

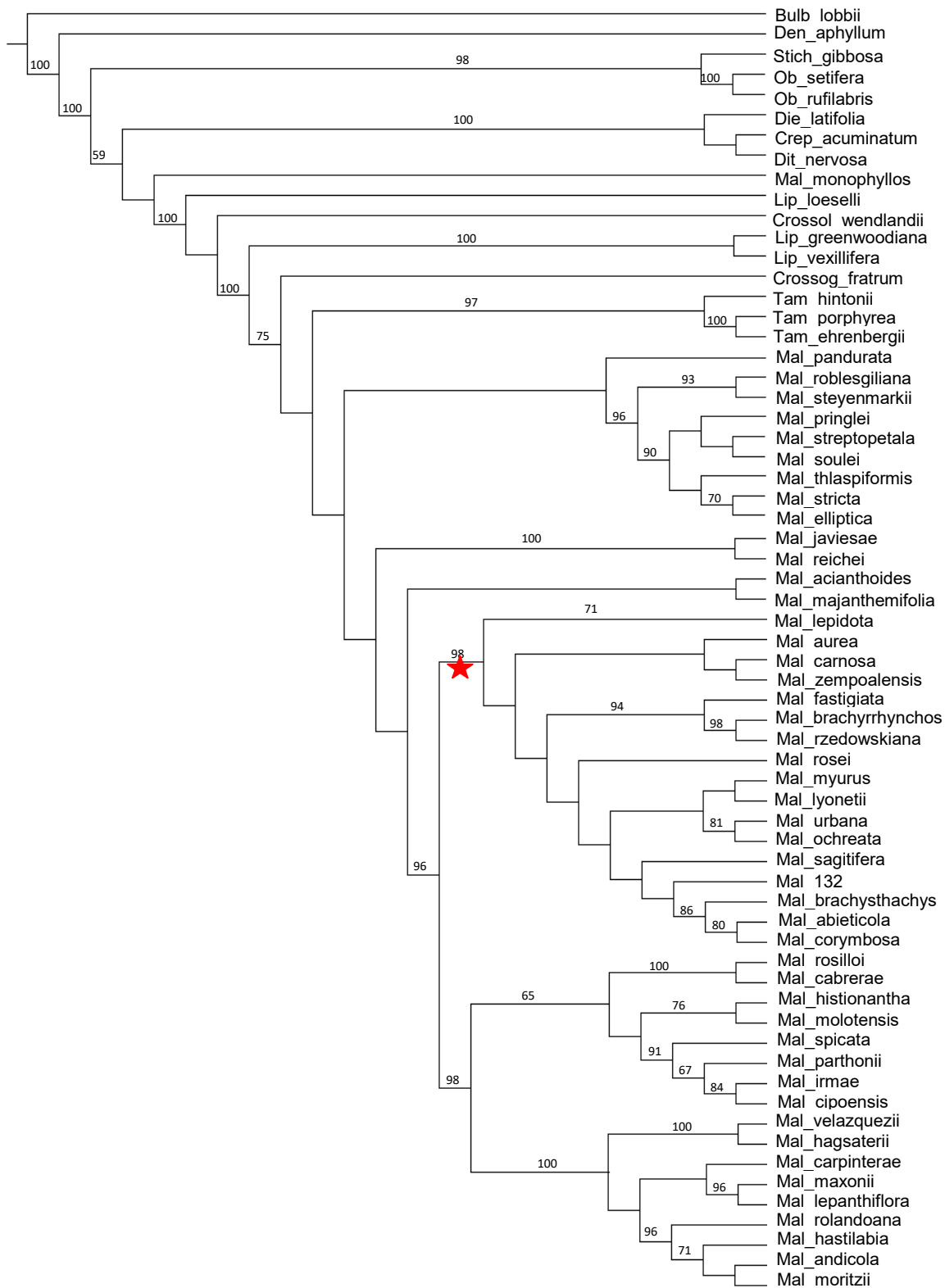


Figura 8. Uno de los AMP's obtenido del análisis de MP de la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos. Los valores sobre las ramas indican el valor de apoyo bootsrap. ★ = "clado mexicano"

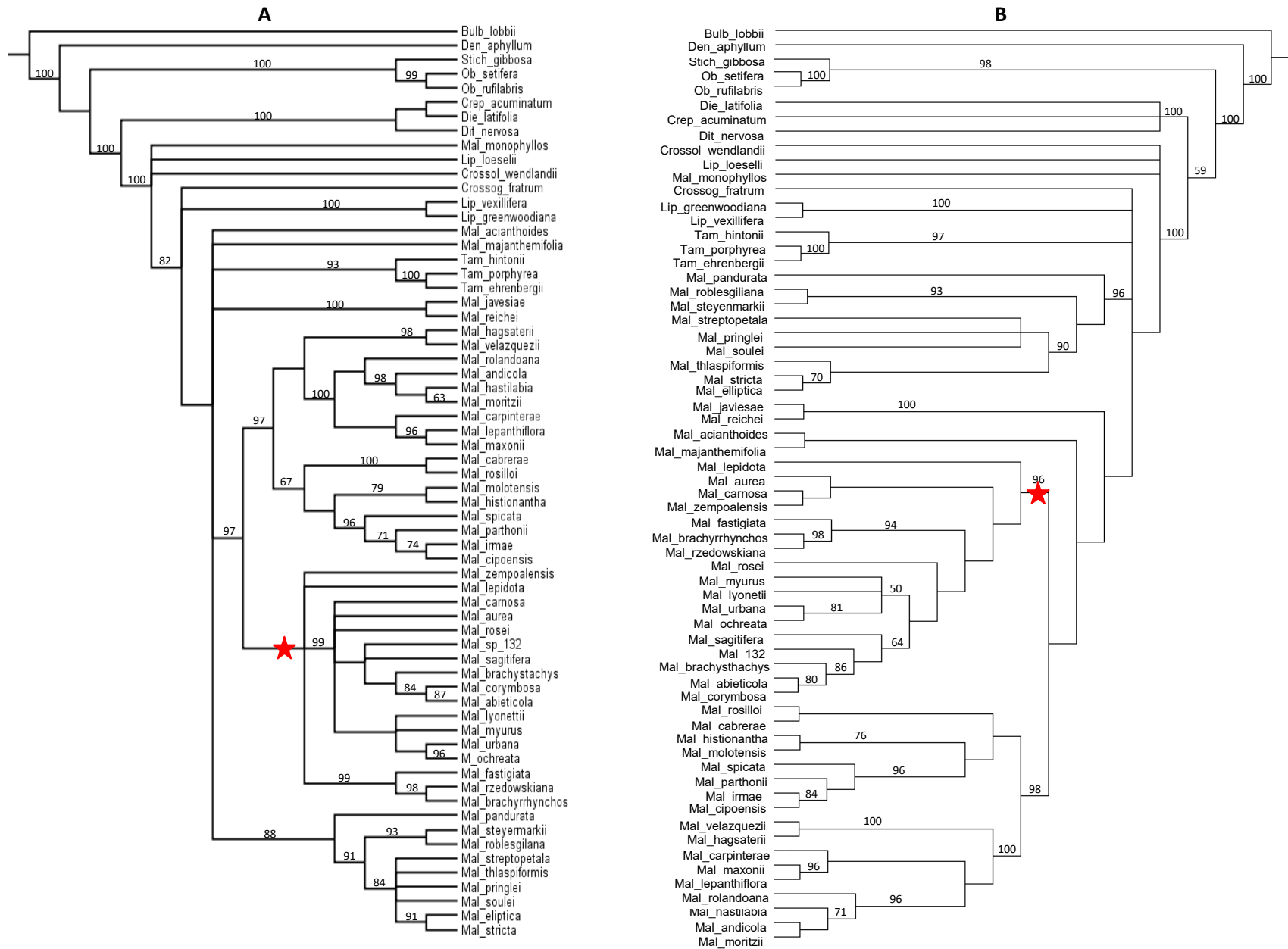


Figura 9. Comparación de las topologías de los árboles de consenso estricto obtenidos de los análisis de MP para el conjunto de datos moleculares (A) y para la matriz de datos moleculares y morfológicos (B) ★ = “clado mexicano”

En el árbol, *Malaxis* s.s. está conformado por dos clados fuertemente apoyados. El clado I (BS=99%) incluye especies que comparten aunque no de manera exclusiva características morfológicas como la presencia de una sola hoja, polinios unidos en un solo viscidio, columna alargada e inflorescencias en racimos espiguiformes (la última característica excepto en *M. elliptica* y *M. thaspiformis*). El clado IV (BS=93%) contiene una mayor diversidad de especies. No presenta sinapomorfías morfológicas y se divide en dos subgrupos. El primero, denominado clado IVA que corresponde al “clado mexicano de *Malaxis*” y grupo focal de este estudio (BS=96%) se recupera como monofilético con apoyo menor a 50% a *M. aurea*, *M. zempoalensis* y *M. lepidota* como especies hermanas en orden sucesivo de dos clados menos inclusivos: el clado IVA1 compuesto por *M. fastigiata*–(*M. brachyrrhynchos*–*M. rzedowskana*) y el clado IVA2 que contiene entre otras, dos especies inéditas: *M. sagitifera* y *M. sp.132*, ambas con distribución en la Sierra Madre Oriental (Fig. 10). El clado IVB o “clado sudamericano” (BS=99%) es el segundo subgrupo y está integrado por especies con distribución principal en países sudamericanos. Los caracteres que distinguen a estos taxones son sus cormos epigeos y fusiformes. Entre los taxones que incluye este grupo se encuentra la especie tipo del género: *Malaxis spicata*.

De acuerdo con la topología, las relaciones dentro del género y particularmente dentro del clado mexicano quedan completamente resueltas aunque con bajo soporte en algunos casos. Cuatro especies: *M. acianthoides*–*M. maianthemofolia* (BS=69%) y *M. reichei*–*M. javiesae* (BS=100%) quedan excluidas de los clados principales de *Malaxis* s.s.

#### 4.1.4. Reconstrucción de estados ancestrales

La reconstrucción de estados ancestrales de las características morfológicas se presenta en las figuras 11 y 12 sobre la topología de ML obtenida a partir de la matriz combinada de datos morfológicos y moleculares. Los atributos que presentaron un origen común dentro del linaje fueron: el hábito terrestre, la forma fusiforme, la condición epigea del cormo y la presencia de foveas en la base del labelo. La figura 13 muestra la distribución de los cambios de carácter seleccionados y las posibles vías de evolución se detallan más adelante.

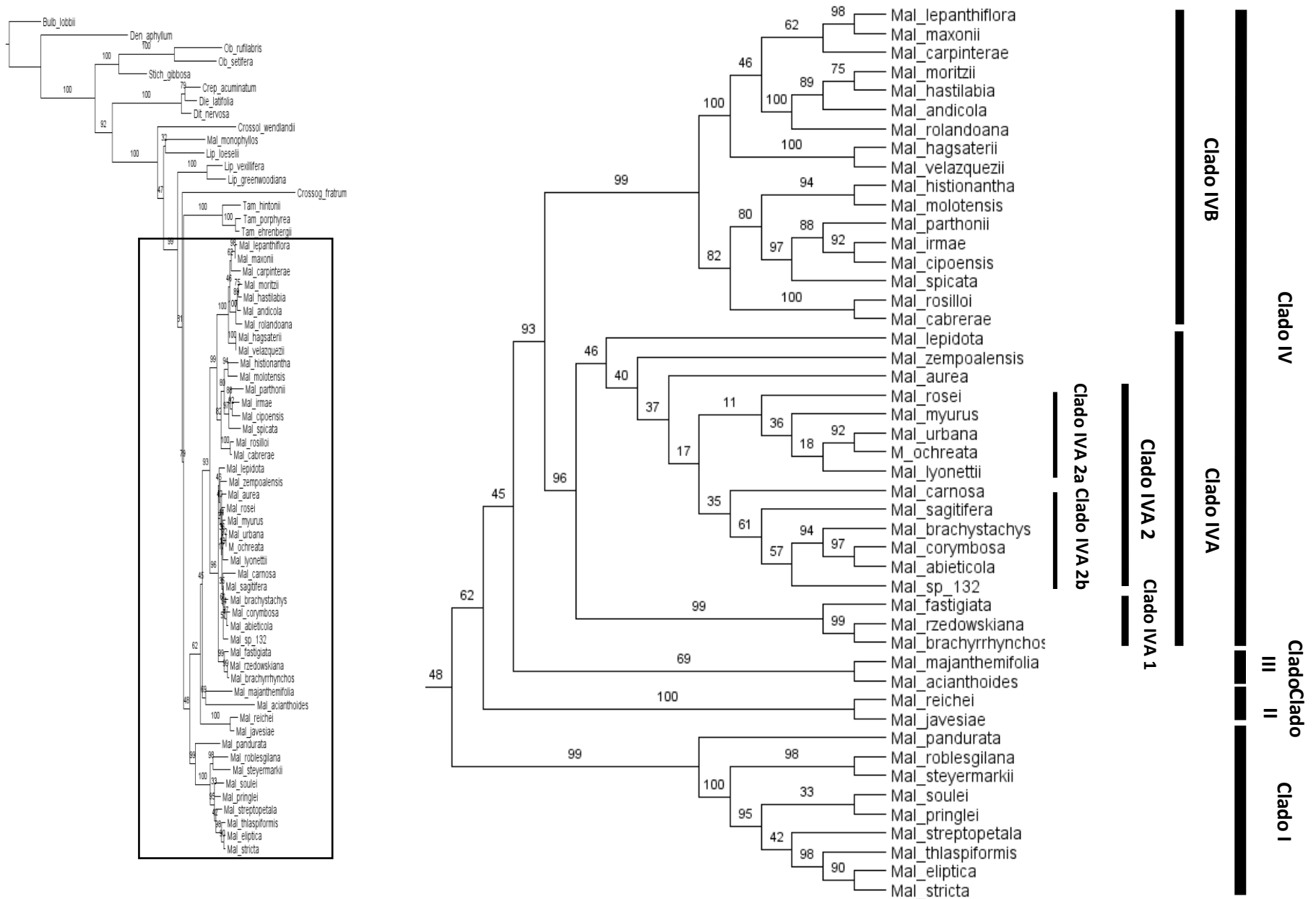


Figura 10. . Inferencia Filogenética de *Malaxis* utilizando máxima verosimilitud (ML) para los dos marcadores (ITS y matk) y los datos morfológicos. A. Topología mostrando las longitudes de ramas. B, Cladograma con los valores de soporte bootstrap para cada uno de los nodos.

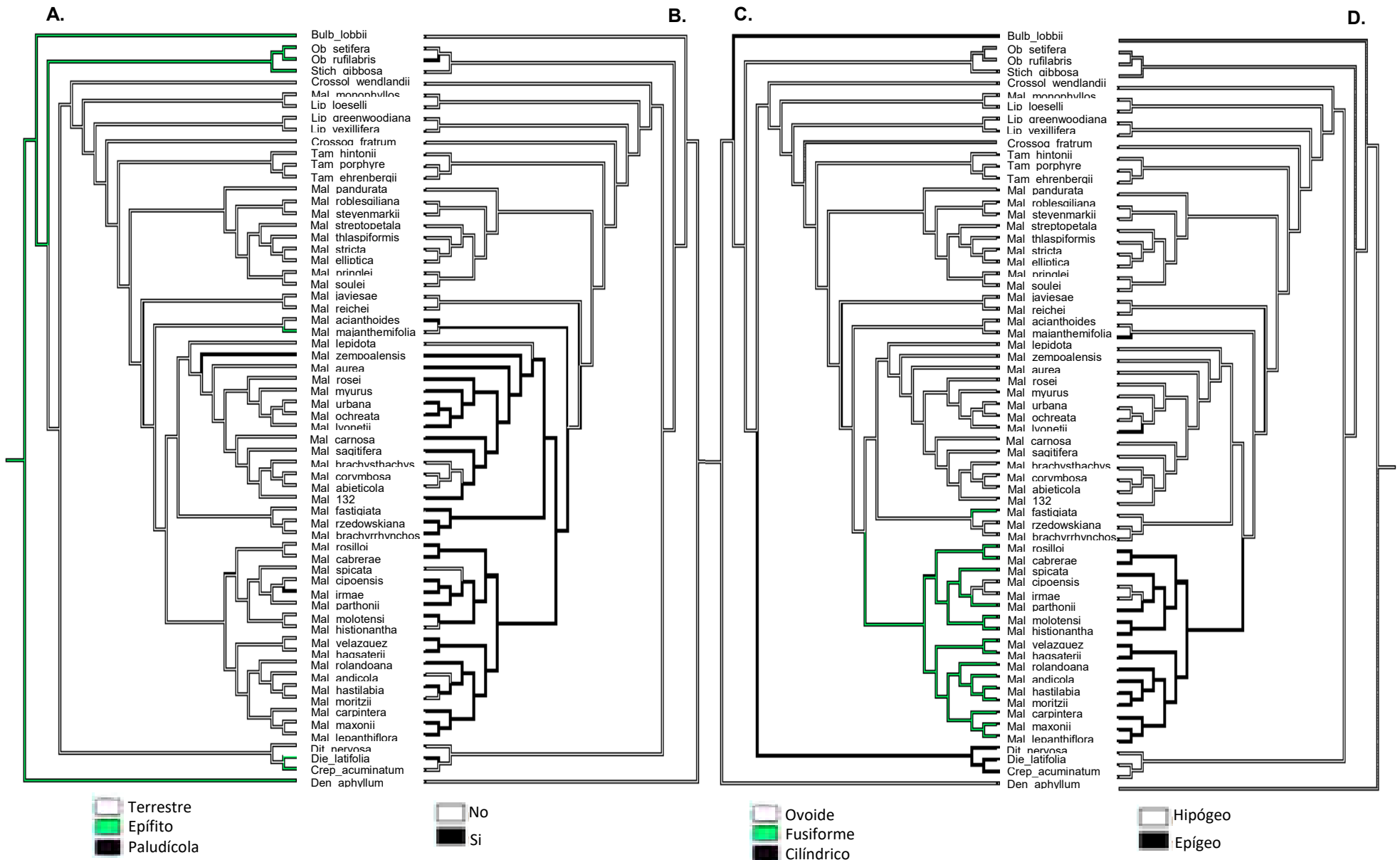


Figura 11. . Reconstrucción de caracteres ancestrales sobre el árbol de ML del análisis combinado de datos moleculares y morfológicos para: A. el tipo de hábito, B. presencia de foveas en el labelo, C. forma del coromo y D. tipo del coromo.



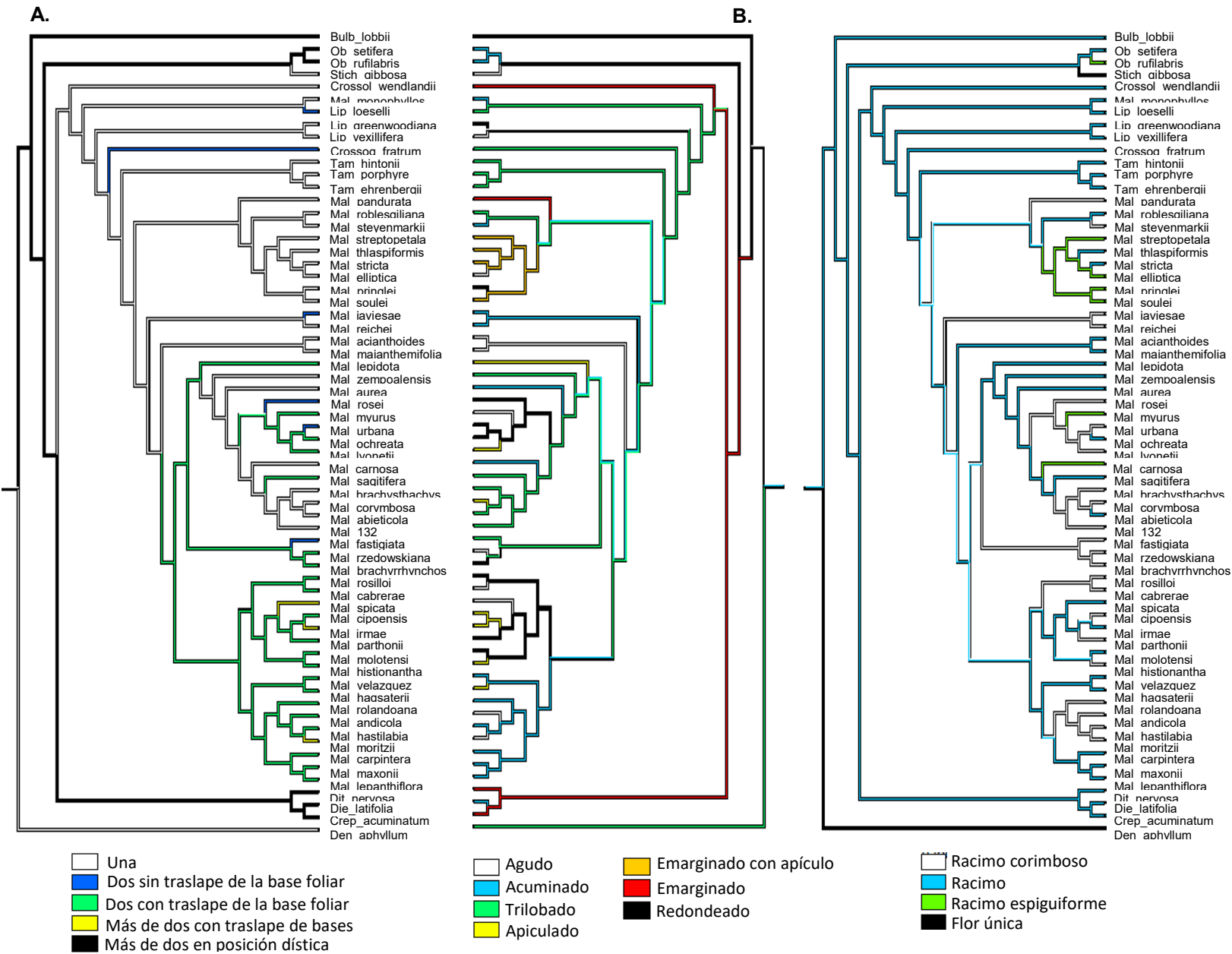


Figura 12. Reconstrucción de caracteres ancestrales sobre el árbol de ML del análisis combinado de datos moleculares y morfológicos par : A. el número de hojas, B. forma del ápice del labelo y C. el acomodo de las flores sobre el raquis de la inflorescencia.

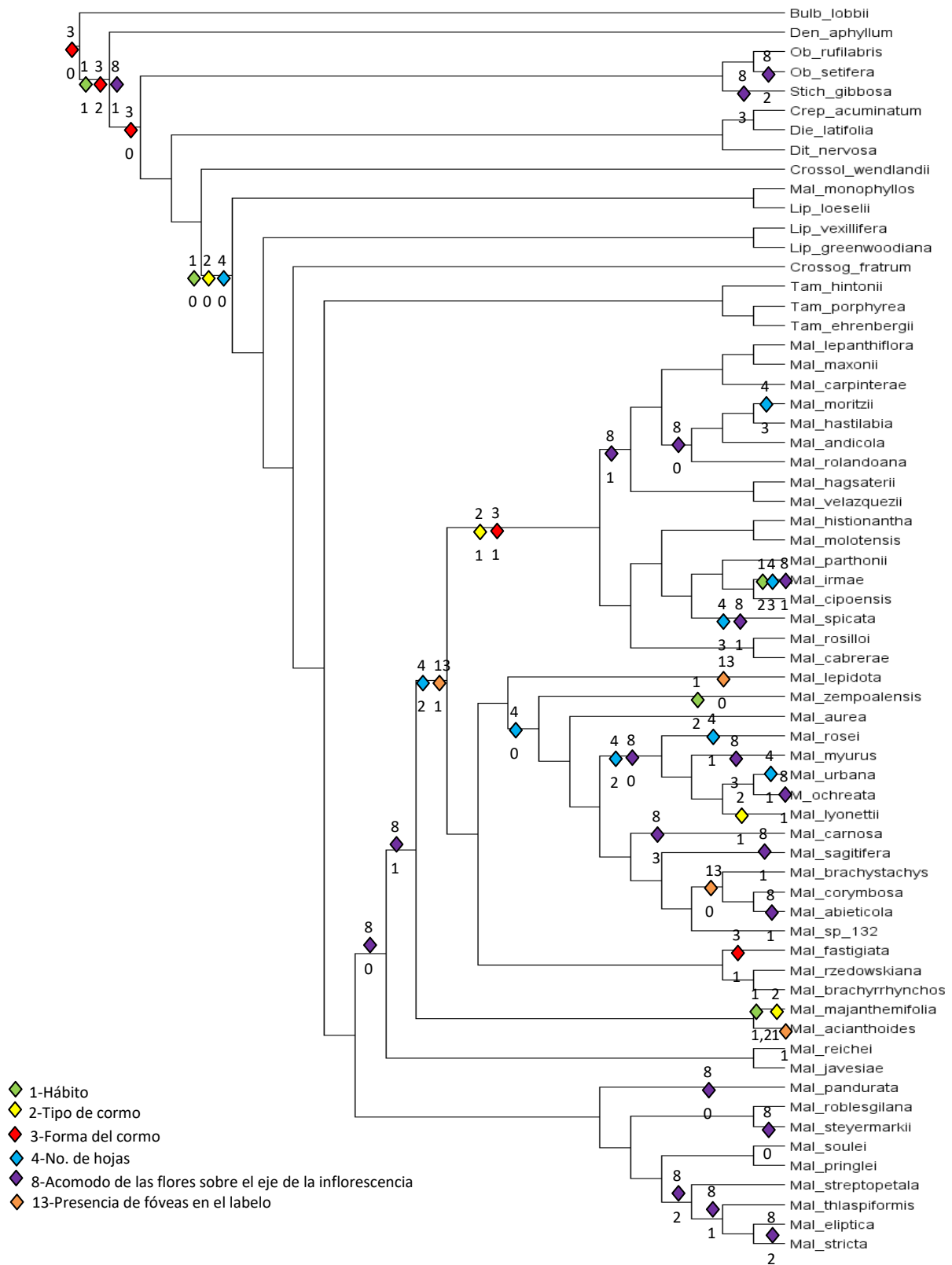


Figura 13. Distribución de los cambios de estado de los caracteres morfológicos seleccionados y optimizados previamente en el árbol de la figura 10 generado del análisis combinado de datos moleculares y morfológicos incluidos en este trabajo

## 4.2. Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA)

El análisis de reconstrucción de áreas ancestrales se aplicó sobre la filogenia completa resultante del análisis de la matriz combinada de datos de ADN y morfológicos bajo el criterio de ML. El método de Dispersión-Vicarianza recuperó en la mayoría de los nodos de la topología sólo un área óptima. El área ancestral de distribución para el género *Malaxis* s.s. refiere un ancestro abarcando el área correspondiente al Neotrópico (zona B). Los linajes neotropicales como *Crossoliparis*, *Crossoglosa*, *Tamayorkis* y *Malaxis* derivan de un ancestro con distribución amplia dentro del continente Americano que probablemente abarcó la zonas Neártica y Neotropical (zonas A y B respectivamente). Para los nodos más externos se estimó el área ancestral en la zona oriental (D) la cual muestra al menos dos eventos de dispersión. El primero hacia la zona E correspondiente al continente Australiano y la segunda hacia el área C la cual representa el Paleártico. De esta manera, se puede inferir que la invasión de las especies al continente Americano pudo haberse dado a partir de los ancestros con distribución en la región Paleártica (Fig. 14).

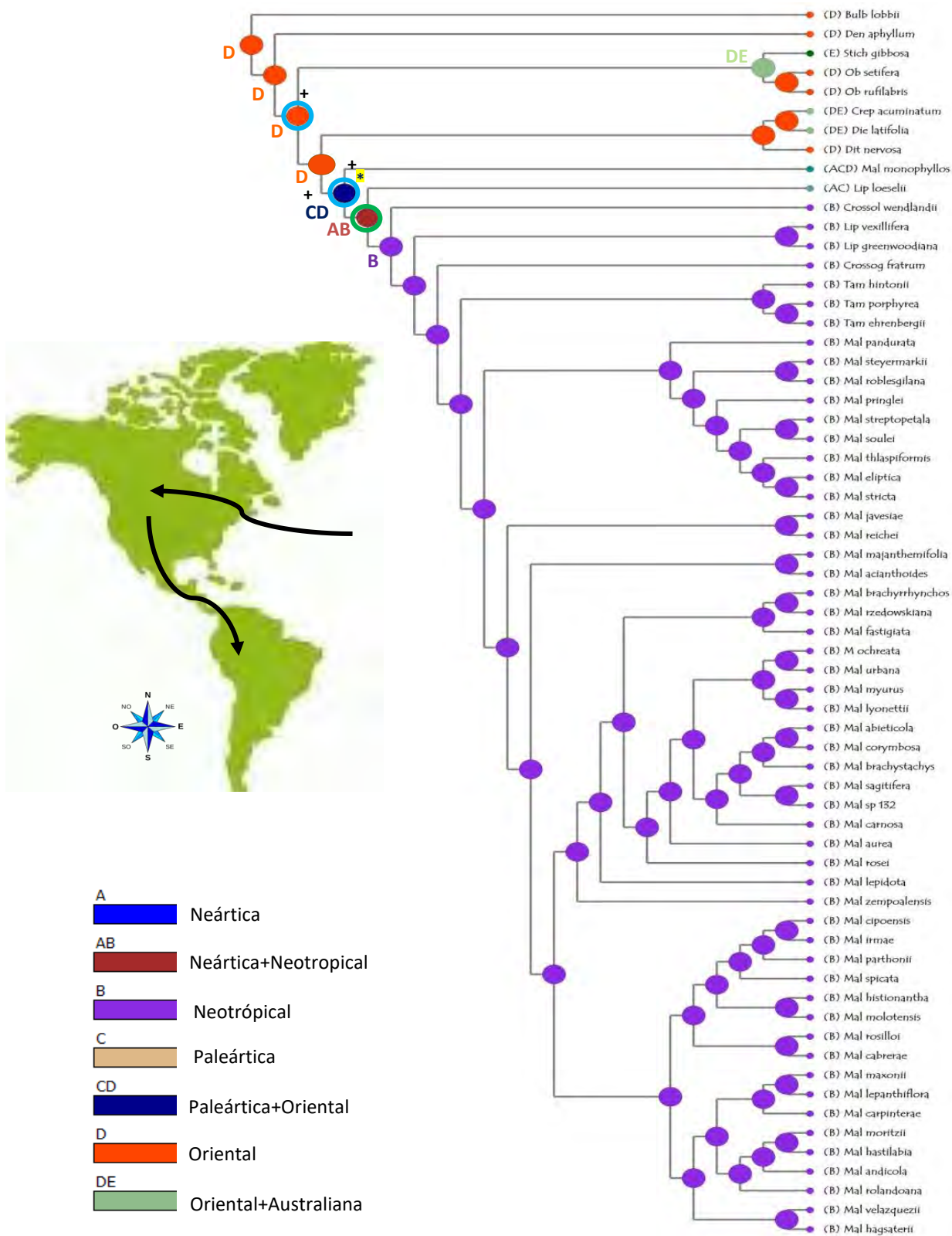


Figura 14. Reconstrucción de áreas ancestrales (RAA) por medio de RASP, con un número máximo de cinco. Los círculos en color azul y el signos de + representan eventos de Dispersión. Los círculos de color verde aluden eventos de Vicarianza y el \* hace referencia a una estimación de áreas ambigua.

## V. Discusión

### 5.1. Los caracteres morfológicos en la reconstrucción filogenética de *Malaxis*

Si bien los caracteres morfológicos pueden ser útiles para el reconocimiento de linajes en niveles taxonómicos altos (Freudenstein y Rasmussen, 1999), para *Malaxis* no son suficientes en la construcción de hipótesis filogenéticas ya que gracias a los actuales análisis moleculares se ha identificado la antes no detectada evolución homoplásica de los atributos morfológicos, (Pridgeon y Chase, 1995; Padial *et al.*, 2010; Schäffer *et al.*, 2010),

La delimitación del género *Malaxis* y la de sus especies no ha sido clara a lo largo de su historia ya que su taxonomía se ha basado principalmente en diferencias morfológicas entre especies y a pesar de que han sido varios los esfuerzos realizados para aclarar sus relaciones filogenéticas (e.g. Dressler y Dodson, 1960; Cameron, 2005; Margónska *et al.*, 2012), hasta la fecha no existen resultados satisfactorios debido a que sólo algunos atributos como el tamaño del ginostemio y la posición de la antera han permitido la separación de linajes dentro del género (Freudenstein *et al.*, 2002).

El trabajo de Margónska *et al.* (2012) constituye la revisión taxonómica más reciente no sólo de *Malaxis* sino de toda la tribu Malaxideae y en él, los autores sugieren un reacomodo sustancial entre las especies del género y discuten brevemente sobre la delimitación específica de sus integrantes. Sin embargo, sus resultados no son del todo convincentes ya que su propuesta está basada en características morfológicas de las plantas como el número de hojas y el tipo de inflorescencia, sus postulados contradicen muchas de las hipótesis filogenéticas moleculares. Incluso la que ellos desarrollan en esta publicación, de la cual no realizan ninguna discusión. Por lo tanto, siguiendo la propuesta filogenética con base en caracteres morfológicos sugerida por Margónska y colaboradores (2012), encontramos relaciones de parentesco artificiales.

Por lo anterior, la hipótesis filogenética obtenida con la evidencia morfológica en este trabajo, difiere parcialmente con lo que sugieren autores como Szlachetko y Margónska (2006), Margónska *et al.* (2012) y Szlachetko *et al.* (2008) si bien existen características morfológicas que permiten la distinción entre linajes como en el “caldo *Microstylis*”, con los datos morfológicos no se resolvieron las relaciones evolutivas entre

especies ni se recuperó la monofilia del género. Lo anterior señala que existen pocas sinapomorfias morfológicas y confirma un alto nivel de homoplasia debido a la amplia diversidad estructural de las plantas. En este sentido, los caracteres morfológicos empleados tradicionalmente en la taxonomía del grupo no son informativos por sí solos. Además, el uso limitado de los atributos morfológicos conlleva a una taxonomía poco estable y poco predictiva que convierte el estudio sistemático de *Malaxis* en un trabajo desafiante y de difícil interpretación (Cameron, 2005; Cribb, 2005; González-Tamayo, 2002).

Por otro lado, los resultados de esta investigación muestran que al combinar los datos morfológicos y moleculares, los grupos principales obtenidos son consistentes con el estudio realizado por Radins *et. al.* (2014) donde únicamente se incluyen datos de ADN. Los tres grupos principales dentro de *Malaxis* propuestos por los autores citados, se mantienen en este análisis a pesar de que se adicionaron datos morfológicos y se aumentó el número de taxones. Al comparar las relaciones filogenéticas de los tres clados obtenidos tanto en el presente trabajo como en el estudio de Radins *et al.* (2104), se observan algunas diferencias que atienden principalmente al pequeño muestreo ya que entre sus objetivos no se encontraba resolver la filogenia de *Malaxis* sino señalar las relaciones de parentesco más cercanas a *Malaxis irmae*, una especie nueva sudamericana de hábito paludícola.

También, en el presente estudio se registró que utilizando la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos se incrementa ligeramente el valor de soporte en algunas ramas de la topología, esto sugiere que la posible homoplasia de los caracteres estructurales constituyen sinapomorfias a algún nivel. Por ejemplo, dos de los tres clados principales dentro de *Malaxis* están apoyados por al menos una característica morfológica.

Respecto a las variaciones que se observaron en los caracteres morfológicos de *Malaxis*, pudieran, ser convergencias que responden a presiones ecológicas como resultado de la distribución y hábitat de las especies. Estas características pudieron haber llevado a que en el transcurso de su evolución, las especies no relacionadas, desarrollaran de manera independiente caracteres similares que les permitieron adaptarse al medio donde actualmente prosperan. Por ejemplo, el estado ancestral para la característica: tipo de hábito en *Malaxis*, es terrestre, igual que en la familia Orchidaceae y en el orden Asparagales (Neyland y Urbastch, 1995), mientras que para la tribu

Malaxideae el estado ancestral es epífita. Cameron (2002) sugirió que el cambio en el tipo de hábito de terrestre a epífita fue uno de los factores clave en la diversificación de la familia Orchidaceae. No obstante, en *Malaxis*, la reversión al estado plesiomórfico (terrestre) a partir de la condición epífita, parece ser uno de los detonantes de su alta diversidad. Lo anterior ha sido señalado también para géneros como *Oeceoclades*, *Eulophia* y *Corallorhizinae* (Atwood, 1986). Por otro lado, se observó que el hábito paludícola de *Malaxis irmae* y *M. zempoalensis*, evolucionó a partir de la condición terrestre y constituye una homoplasia que surgió de manera independiente en ambas especies (Fig. 11A). Mientras tanto, *M. majanthemifolia* es el único taxón con registro de individuos terrestres y epífitos. No obstante, las observaciones de plantas epífitas de esta especie son escasas y que es probable que éstos se deban a confusiones más que a la existencia de individuos que habiten en los árboles, pues es común observar organismos de diferentes especies terrestres, incluidas algunas orquídeas, en las bifurcaciones de los troncos, en donde se acumula una gran cantidad de sustrato.

En cuanto al tipo y la forma del cormo, ambos atributos se encuentran fuertemente correlacionados y resultaron caracteres potencialmente informativos para la sistemática del grupo. La reconstrucción de sus estados de carácter indica que el ancestral fue el cormo hipógeo y que los fusiformes son derivados de la condición ovoide. Los cormos hipógeos, son siempre ovoides mientras que los epígeos son siempre fusiformes (Fig. 12B). Por lo tanto, los cormos epígeos y fusiformes son derivados y además representan sinapomorfias para el “clado sudamericano” de *Malaxis* (excepto en *M. irmae* y *M. cipoensis*) y se desarrollaron independientemente en *M. majanthemifolia* y *M. lyonetti* (Fig. 12B). González-Tamayo (2002) resaltó que la mayoría de las especies sudamericanas de *Malaxis* muestran cormos expuestos sobre la superficie y los resultados de este trabajo confirman su propuesta ya que la mayoría de especies con distribución sudamericana presentan este tipo de cormos.

La función principal de los cormos es almacenar agua y tanto su forma externa como su estructura interna se encuentran relacionadas con el hábito y el ambiente donde se desarrollan y pueden considerarse como una adaptación (Bell, 1993). Por ejemplo, se ha sugerido que las plantas con cormos epígeos tienden a ser más eficientes en los procesos de reproducción vegetativa bajo presiones selectivas estrictas (Strasburger; 1994). En las especies estudiadas, se observó que los cormos expuestos y alargados distinguen a las especies que prosperan en bosques nublados con elevada humedad en

contraste con el hábitat principal de muchas de las especies con cormos subterráneos las cuales están asociadas a bosques templados de pino-encino y a zonas anegadas.

Si bien no se ha cuantificado el éxito reproductivo de las plantas con cormos epígeos sobre las que presentan cormos hipógeos, los epígeos pueden considerarse una innovación morfológica que ha permitido a los *Malaxis* explorar nuevos nichos ecológicos en el clado sudamericano dentro de la filogenia del género.

El tipo de inflorescencia, representa un atributo tradicionalmente importante en la taxonomía del género y se han hecho muchos intentos para su sistematización. Sin embargo, existe una enorme variabilidad y muchas formas intermedias que obedecen a convergencias adaptativas que dificultan la correcta interpretación de los patrones de construcción de la estructura. Hasta el momento la evolución y clasificación de las inflorescencias ha sido bastante artificial ya que se basa en criterios y patrones establecidos más que en observaciones científicas (Rickett, 1944). En los *Malaxis*, ha sido común la creación de complejos de especies basados en este atributo (Carnevali, 2008). No obstante, Salazar (Salazar com. pers.) señala que el único tipo de inflorescencia presente en *Malaxis* es el racimo y que el resto de formas corresponden a variaciones asociadas al tamaño de los pedicelos o la edad de las plantas. Con base en lo anterior, en este trabajo se utilizaron tres estados de carácter para este atributo: racimo, racimo espigado y racimo corimboso. En la reconstrucción del estado ancestral sobre la filogenia molecular, no se pudo inferir la condición plesiomórfica. No obstante, a pesar de que resulta complicado y muy aventurado proponer hipótesis sobre la evolución de este carácter debido a la ambigüedad de los resultados en la reconstrucción de estados, es parsimonioso suponer que el ancestro inmediato de *Malaxis* presentaba inflorescencias en racimos y que a partir de éstas evolucionaron los racimos espigados por la reducción de los pedicelos y los racimos corimbosos por la compactación o reducción del raquis. Estudios de ontogenia de inflorescencias en especies del género *Malaxis* podrían ayudar a probar esta hipótesis. Algo similar se ha observado en *Arecaceae* (Uhl y Moore, 1973; Uhl, 1976) y algunas dicotiledóneas, donde la reducción o la pérdida de caracteres florales se han propuesto como características derivadas y que sin duda responden a las presiones que ejercen los polinizadores y la relación planta-polinizador en el caso de las orquídeas es muy estrecha por lo que la mayoría de las formas caprichosas de estas plantas, está determinada en gran medida por sus polinizadores.



Si bien todas las estructuras florales son de vital importancia en el proceso de la polinización, el papel del labelo en la atracción e interacción de las orquídeas con los polinizadores es imprescindible (Kocyan y Endress, 2001; Endress, 2001). Además, el labelo está considerado la estructura floral decisiva en la identidad de las especies, por lo que características como su disposición, forma, longitud, concavidad, forma de la base y ápice, tipo de margen y presencia de aurículas y foveas han sido apoyos importantes en la toma de decisiones taxonómicas (González-Tamayo, 2002). No obstante, la mayoría de las observaciones sobre su morfología están determinadas por los criterios de cada investigador debido a que no existen protocolos generales para la descripción detallada de los caracteres de manera que su interpretación es subjetiva (Espejo, *et al.*, 1998).

En *Malaxis*, la morfología del labelo es muy variable, por lo tanto, el desarrollo de características similares en linajes lejanamente relacionados puede ser resultado de una evolución convergente que dificulta el estudio de las estructuras reproductivas o florales (González-Tamayo, 2002). Dentro de las características del labelo analizadas en este trabajo, la presencia de foveas o cavidades en su base constituye una sinapomorfía para el “clado IV”. La reconstrucción infiere que la presencia de foveas es la condición derivada (Fig 11B). Debido a lo anterior, se observan distintos eventos de reversión (Fig. 11B).

De acuerdo con González-Tamayo (2002) la presencia de cavidades en el labelo es un carácter importante en la delimitación de especies. No obstante, los resultados de este trabajo sólo demuestran que este estado de carácter permite la separación de dos grandes linajes de *Malaxis* (Clado I y II), los cuales concuerdan tentativamente con los grupos sugeridos por Nuttall (1818), quien con base en la forma del labelo sugirió la separación del género en dos secciones, “sección *Microstylis*” donde incluyó los taxones con labelos cóncavos y que corresponde al clado que lleva el mismo nombre sugerido por Radins (2014) y que en esta investigación corresponde al denominado “clado I o clado *Microstylis*” el cual se distingue por la ausencia de foveas entre sus integrantes.

La función de las foveas del labelo aun es desconocida. Se ha sugerido que al menos en algunas especies funcionan como receptáculos de néctar (Kite y Salazar, 2008). Sin embargo, no existen estudios que indiquen la producción de “recompensas florales” y/o las interacciones biológicas que existen entre los *Malaxis* y sus polinizadores.

Por otro lado, las características de la hoja han sido importantes en la delimitación de grupos en la tribu Malaxideae (Cameron, 2005). De manera particular, en *Malaxis*, el

número de hojas es un atributo tradicionalmente empleado en su taxonomía, pues constituyen el punto de partida de muchas de las claves de identificación (González-Tamayo *et. al.*, 2007; Carnevalli, 2008). Los resultados sugieren que el número de hojas aporta información taxonómica para separar los dos clados principales dentro de *Malaxis*. En este sentido, la presencia de una hoja representa una sinapomorfía para el “clado I” o “clado *Microstylis*” (Fig. 12A) aunque no es una característica exclusiva de este grupo ya que el mismo estado de carácter se encuentra en especies de diferentes clados.

De acuerdo con la optimización del carácter número de hojas, la presencia de una hoja es el estado ancestral a partir de la cual se deriva la presencia de dos (o más) hojas. La condición derivada es homoplásica pues aparece varias veces en el árbol. (Fig.12A). Los resultados descartan el supuesto de que el ancestro de los *Malaxis* era bifoliolaado y que fue sugerido por Greenwood y González-Tamayo (1983) quienes argumentaban lo anterior apoyándose en la idea de que debido a que la mayoría de las especies presentaban dos hojas era de esperarse que el ancestro también tuviera dos hojas. Sin embargo, estas propuestas carecen de información filogenética objetiva. El aumento en el número de hojas se da por un proceso morfogenético relacionado directamente con la radiación solar, ya que ésta juega un papel importante en el desarrollo de las estructuras vegetativas en las plantas. Supervivencia crecimiento y reproducción son aspectos a los que una morfología vegetal debe responder, y entre los principales factores ambientales que influye en la composición vegetativa en cuanto al número y tamaño de las hojas, se encuentran la cantidad de agua disponible y la incidencia de luz solar (Marler y Clemente, 2006). Lo anterior muestra que hay una fuerte interacción entre procesos morfogenéticos y la resolución de problemas funcionales determinados por las condiciones ambientales, por ejemplo los relacionados con la fotosíntesis, que no necesariamente pueden ser explicados mediante la justificación de una única función sino que más bien sugieren que durante su evolución, las plantas encuentran soluciones que involucran la integración de varias funciones que concurren en una misma estructura, en este caso, el incremento del número de hojas (Niklas, 1988).

## 5.2. Relaciones filogenéticas dentro de *Malaxis* y la ubicación del “clado mexicano”

La discusión de las relaciones filogenéticas de *Malaxis* se hará con base en el árbol obtenido del análisis de la matriz combinada de los datos moleculares y morfológicos con el enfoque de máxima verosimilitud por la hipótesis filogenética más robusta pues los valores obtenidos de apoyo bootstrap en ramas fueron más elevados (fig. 10).

La topología muestra al género *Malaxis* como un grupo natural sólo si se excluyen las especies del Viejo Mundo; recupera los mismos clados propuestos por Radins *et. al.*, (2014) y las relaciones filogenéticas entre las especies de *Malaxis* quedan resueltas. Esto indica que el uso de diferentes fuentes de datos favorecen la reconstrucción filogenética del grupo. No obstante, no se registraron sinapomorfias que definan el género, por lo es posible que no existan características morfológicas únicas para este grupo. De acuerdo con los resultados, *Malaxis* s.s queda integrado por los clados referidos aquí como: “clado I”, “clado II”, “clado III” y clado “IV”. Los taxones *M. reichei* y *M. javesiae* conforman el clado II, mientras que *M. acianthoides* y *M. majanthemifolia* definen el clado III. A pesar de que no se encontraron sinapomorfias morfológicas que determinen la exclusión de estos taxones de los clados con mayor número de especies (I y IV), las cuatro especies muestran similitud fenotípica entre alianzas. Margónska *et. al.* (2012) sugirió que *Malaxis reichei* y *M. javesiae* sean sinónimos debido a la falta de caracteres diagnósticos que permitan diferenciarlas, sin embargo, los resultados de la inferencia molecular de este trabajo respaldan la hipótesis de considerarlos taxones independientes y deja abierto el supuesto de que existan otros tipos de caracteres (p. ej. anatómicos o ecológicos) además de los moleculares que apoyen su separación. Por su parte, *M. acianthoides* y *M. majanthemifolia*, se distinguen del resto de los *Malaxis* por la forma acorazonada de su hoja y su talla pequeña. La ornamentación del labelo es fundamental para la determinación específica entre estos dos taxones pues el labelo de *M. acianthoides* presenta margen ciliado y foveas en la base mientras que en *M. majantheifolia* el labelo carece de foveas y el margen es entero.

A continuación se discuten los clados I y IV con mayor detalle pues incluyen un mayor número de especies.

**Clado I** (Fig. 10): Este grupo corresponde al denominado “clado *Microstylis*” por Radins *et. al.* (2014) y está integrado por especies como *Malaxis pandurata*, *M. steyenmarkii*, *M. soulei*, *M. pringlei* y *M. stricta*. El status taxonómico de este grupo ha sido objeto de diversos debates. Nuttall (1818) lo reconoció como un grupo dentro de *Malaxis*. Dressler y Dodson (1960) lo sugieren como sinónimo del grupo focal y botánicos como Eaton (1822), Pfitzer (1888), Szlachetko y Margónska (2006) y Margónska *et al.* (2012) lo consideran un género independiente. Sin embargo, a pesar de que los datos moleculares reconocen al clado *Microstylis* como un grupo monofilético con características morfológicas como el tamaño de la columna (en *Malaxis* muy pequeña, casi vestigial y alargada en las especies de *Microstylis*), que permiten hacer una clara distinción entre linajes, la segregación de *Microstylis* (sensu Margónska *et al.* 2012) carece de fines prácticos para la taxonomía del grupo, en primer lugar porque las especies de este último linaje se muestran completamente anidadas dentro de *Malaxis* s.s y en segundo lugar, porque siguiendo los mismos criterios, sería necesario proponer géneros independientes para el resto de los linajes que integran el género *Malaxis* s.s.

**Clado IV** (Fig. 10): Agrupa el mayor número de especies de *Malaxis*. La sinapomorfia encontrada para el linaje es la presencia de fóveas en la base del labelo aunque no todas las especies las presentan (Fig.11B). Dentro del clado IV se distinguen dos subclados denominados clado IVA y clado IVB (Fig. 10) los cuales corresponden a los denominados por Radins *et. al.* (2014): clado mexicano y clado sudamericano en el mismo orden.

La monofilia del clado mexicano (IVA) fue apoyada por valores de bootstrap del 96%. En él, se agrupan aproximadamente un tercio de los 60 taxones registrados para México (Soto *et al.*, 2007) y se incluyen dos especies inéditas (*M. sp.* 132 y *M. sagitifera* sp. nov). No se encontraron atributos fenotípicos que permitan distinguir al grupo del resto de los *Malaxis* y si bien este clado debe su nombre a la distribución principal de las especies que lo integran, no todas son endémicas del país. Algunas como *Malaxis brachysthachys* y *M. corymbosa* se distribuyen desde el sur de Estados Unidos de América hasta Sudamérica.

Para el clado sudamericano (IVB), se registraron dos sinapomorfias morfológicas: cormos epigeos y la forma fusiforme de éstos (excepto en *M. irmae* y *M. cipoensis*). La literatura indica que la mayoría de las especies americanas bifolioladas de *Malaxis* presentan cormos ovoides epigeos, mientras que las especies unifolioladas tienen

principalmente hipógeos y globosos (Dressler,2003). Sin embargo, en los resultados de este estudio no se registró correlación entre el número de hojas y las características del cormo. No obstante, se refuerza la hipótesis de Bell (1993) quien sugiere que la forma y estructura de los cormos dependen en gran medida de las presiones selectivas que el ambiente ejerce sobre los organismos, pues se observó que las especies con cormos epígeos-fusiformes, como *M. lepanthiflora*, *M. rosilloi*, *M. hasaterii* o *M. histhionantha*, por citar algunas, habitan principalmente ambientes con elevada humedad como los bosques mesófilos de montaña. Mientras que especies como *M. abieticola*, *M. urbana*, *M. corymbosa*, *M. ochreatea* o *M. brachystachys* con cormos hipógeos-ovoides, habitan preferentemente bosques de coníferas o bosques mixtos de encino-pino, en menor proporción pastizales y matorrales xerófilos además de ambientes muy húmedos como bosques mesófilos o selvas perennifolias.

*Malaxis irame* y *M. zempoalensis*, tienen reversiones independientes relacionadas con el tipo y la forma del cormo, debido a que son especies lejanamente emparentadas con distribución restringida a Argentina y Uruguay en el primer caso y a México en el segundo; que además de presentar cormos hipógeos de forma ovoide, comparten el hábito paludícola. Lo anterior, sugiere que el cormo hipógeo y la forma ovoide del mismo son probables adaptaciones a los ambientes anegados, que evitan el colapso de la planta debido a la saturación de agua (Schlüter et al., 1993). Con ello, se retoma nuevamente la hipótesis de Niklas (1988) sobre la interacción de los procesos morfogénicos y la adaptación ecológica, ya que en este caso, la forma y el tipo de cormo no necesariamente pueden ser explicados para una función específica, pues los resultados sugieren que las mismas adaptaciones morfológicas desarrolladas por los *Malaxis* pueden responder a presiones selectivas diferentes.

### 5.3. Implicaciones taxonómicas

Margónska *et al.* (2012) proponen que el género *Malaxis* se divida en secciones, subsecciones y series a pesar de que el breve análisis filogenético molecular que incluyen en su obra no respalda esta propuesta taxonómica, la cual se sustenta únicamente en la evaluación visual y por lo tanto subjetiva, de características morfológicas entre especies. En este sentido, los resultados de los análisis filogenéticos de esta investigación no

coinciden con la propuesta de dividir al género en niveles taxonómicos menos inclusivos, mucho menos en los sugeridos por Margónska *et. al.* (2012). De esta manera, su propuesta es poco funcional, innecesaria y muy conflictiva la delimitación de *Malaxis* (*sensu* Margónska *et. al.*, 2012).

Respecto a la segregación en un género independiente del “clado *Microstylis*”, nuestros resultados no descartan tajantemente la propuesta pues además de las características morfológicas que comparten los integrantes del clado, éste constituye un linaje natural dentro de la filogenia de *Malaxis*, sin embargo, se debe considerar que la exclusión de estos taxones no es necesaria, pues la monofilia del género no se ve afectada. Sin embargo, para mantener la monofilia de *Malaxis* s.s., se sugiere la exclusión del género de las especies de *Malaxis* s.l. con distribución en el Viejo Mundo y Asia, como *M. monophyllos*. No obstante, para corroborar esta propuesta taxonómica es necesario realizar un muestreo más exhaustivo en futuros estudios filogenéticos.

La propuesta de considerar sinónimos a *Malaxis reichei* y *M. javesiae* sugerida por Margónska *et al.* (2012), ya que en este trabajo existe evidencia de que representan especies diferentes, aunque estrechamente relacionadas.

#### **5.4. Acercamiento a la historia biogeográfica**

La obtención de las áreas de distribución ancestrales para *Malaxis*, nos da la oportunidad de adquirir información sobre su historia biogeográfica para corroborar la hipótesis que sugiere que el género en sentido estricto, está restringido a la zona neotropical y de esta manera ofrecer una evidencia más que respalde la necesidad de una nueva circunscripción del género.

En la hipótesis elaborada en este trabajo se muestra el probable origen de los linajes neotropicales (incluido *Malaxis*) a partir de un ancestro con distribución amplia en el continente americano (zona Neártica y Neotropical) y que a partir de un evento de vicarianza hubo una separación de linajes, surgiendo de esta manera el ancestro del clado de especies neotropicales. Sin embargo, resulta demasiado especulativo con los datos obtenidos suponer el surgimiento de alguna barrera geológica que interviniera en esta divergencia, por lo que no se descarta la posibilidad de que la dinámica en la

diversificación del clado neotropical y de los *Malaxis* se debiera a cambios en factores abióticos.

Se ha planteado que la colonización del continente americano de las especies de *Malaxis* ocurrió en dirección sur a norte a partir de un ancestro sudamericano (González-Tamayo, 2002). Sin embargo, en los resultados de este trabajo se observa la posición de linajes orientales o paleotropicales en la parte más basal de la filogenia. Esto sugiere la existencia de un ancestro que ocupó el área paleotropical y que se dispersó hacia la zona Paleártica (C), dando origen al linaje que posteriormente colonizó la parte norte del continente Americano (Neártico, A), a partir del cual se diversificaron los grupos neotropicales incluido *Malaxis* probablemente en dirección de norte a sur.

El planteamiento anterior resulta la manera más parsimoniosa de explicar el patrón de diversificación del género si se toman en cuenta las referencias donde se discute la semejanza entre las floras de Europa y Asia con la de América del Norte (e.g. Martínez-Millán 2004; Martínez-Cabrera 2004) en donde también se ha comprobado gracias a estudios filogenéticos moleculares y de reloj molecular, la reciente diversificación de las especies que componen la flora neotropical y su integración a ésta desde América del Norte (Wolfe 1975; Tiffney 1985; Richardson *et al.* 2001). Este patrón de diversificación, también ha sido señalado en otros grupos de organismos, entre ellas las aves (Dacosta y Klicka, 2008; Weir *et al.*, 2008; Pérez-Emán, 2005; Miller *et al.*, 2007; Navarro-Sigüenza *et al.*, 2008).

En el cladograma de áreas (Fig. 15) los resultados sugieren que las plantas de este género se originaron en el Neotrópico, aunque no se puede precisar el área exacta, donde posteriormente se diversificó. Además, a partir de este análisis biogeográfico se deduce también que el grupo llegó eventualmente de América del Norte a las islas del Caribe (Lavin *et al.* 2003). Relaciones similares han sido postuladas para otras plantas que habitan la costa oeste de México y las islas caribeñas (Johnson, 1931; Standley, 1936).

## VI. Conclusiones

Por primera vez se analizaron características morfológicas en un contexto filogenético dentro del género *Malaxis*, de manera que el presente análisis permitió la evaluación de caracteres utilizados tradicionalmente, también se corrobora que algunos de ellos son caracteres sistemáticamente informativos.

Del análisis sobre los patrones de evolución de los caracteres morfológicos se concluye que la mayoría han tenido cambios a lo largo de la evolución del género mientras que tres de ellos (aparición de la inflorescencia respecto a la disposición de las flores sobre el raquis, forma del ápice del labelo y tipo de margen del labelo) han tenido un mayor número de cambios. Los cambios que estos caracteres han manifestado pudieran ser postulados como ventajas adaptativas que contribuyeron a la diversificación del género. Esta reconstrucción de estados ancestrales en el árbol filogenético combinado (morfológico-molecular) permitió explorar nuevas hipótesis y poner a prueba las ya existentes sobre la evolución de dichos caracteres dentro del grupo.

Desde la perspectiva taxonómica, el número de hojas es un carácter importante pues permite delimitar el clado I o “clado *Microstylis*” dentro del género *Malaxis*, aunque el atributo evolucionó independientemente en otras especies.

Se registró que entre el tipo y la forma del cormo existe una fuerte correlación. Los cormos epígeos y fusiformes agrupan al “clado sudamericano” y evolucionaron de manera independiente en *M. lyonetti* y *M. majanthemifolia*.

Algunas características morfológicas de *Malaxis*, como la forma y el margen del labelo, son altamente variables por lo que resultan difíciles de analizar tanto en el contexto taxonómico como filogenético.

A través de los análisis combinados y simultáneos, se pone en evidencia que algunos caracteres morfológicos son significativos en la filogenia de *Malaxis* e importantes en el establecimiento de las relaciones de sus grupos pues algunos de los clados obtenidos están soportados por al menos una característica estructural. Sin embargo, las características morfológicas no resuelven por sí solas las relaciones filogenéticas.

En este estudio se demuestra que incluir un mayor número de evidencias y realizar análisis combinados tiene un efecto positivo sobre el soporte de las ramas a pesar de que



se ha planteado que los caracteres morfológicos presentan altos niveles de homoplasia, bajos niveles de resolución y bajos niveles de soporte (Scotland *et al.*, 2003).

análisis combinado recuperó una filogenia estable. Las relaciones de *Malaxis* s.s. se mantienen sin cambios significativos en las distintas inferencias filogenéticas, lo que coloca al género como un grupo monofilético. Los resultados de este trabajo descartan la propuesta de Margónska *et al.* (2012) de excluir a las especies del “clado *Microstylis*” para considerarlas como un género independiente debido a que la monofilia de *Malaxis* en los análisis realizados se mantiene y el “clado *Microstylis*” se muestra claramente anidado dentro del grupo.

Con esta nueva inferencia filogenética, se refuerza la hipótesis de que *Malaxis* en sentido estricto es un género restringido al Neotrópico pues los taxones del Viejo Mundo no forman parte del grupo natural que conforman los representantes neotropicales, por lo que se propone la reclasificación de estos taxones.

La filogenia obtenida puede ser considerada como una hipótesis robusta de relaciones evolutivas en *Malaxis* debido a su resolución y su buen soporte de bootstrap presentados para la mayoría de los clados. Este estudio por lo tanto confirma la efectividad de combinar conjuntos de datos independientes para los estudios filogenéticos, como lo propusieron Qiu *et al.* (1999).

La colonización de los linajes neotropicales ocurrió probablemente con dirección norte a sur en el continente Americano, a partir de un ancestro paleotropical. De la misma manera, se sugiere la diversificación del género *Malaxis* en el mismo sentido con un posible ancestro de distribución amplia en el continente Americano.

## VII. Literatura citada

- Ames, O. 1938. Resupination as a diagnostic character in the Orchidaceae with special reference to *Malaxis monophyllos*. *Botanical Museum Leaflets*, Harvard University 6: 145–183.
- Atwood, J.T. 1986. The size of Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell y M.J. Donohue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a value source of evidence of angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Batista, J.A.N., T.E.C. Meneguzzo, G.A. Salazar, L.B. Bianchetti y A.J. Ramalho. 2011. Phylogenetic placement, taxonomic revision and new species of *Nothostele* (Orchidaceae) and enigmatic genus edemic to the cerrado of central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 348-363.
- Bell, A.D. 1993. Plant form and illustrated Guide to Flowering Plant Morphology. Oxford Univ. Press.
- Borba, E.L., G.A. Salazar, S. Mazzoni-Viveiros y J.A.N. Batista. 2014. Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical journal of the Linnean Society* 175: 29-46.
- Britton, N. y A. Brown. 1913. Illustrated Flora of the Northern United States, Canada and the British possessions, 2° ed. New York. 570 pp.
- Brown, J.M. y A.R. Lemmon. 2007. The Importance of Data Partitioning and the Utility of Bayes Factors in Bayesian Phylogenetics. *Systematic Biology* 56(4): 643-655.
- Burnham, R..J, y A. Graham.1999. The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86(2):540-589.
- Cameron, K., M. Chase, M. Whitten, P.Kores, D. Jarrell, V. Albert, T. Yukawa, H.Hills, y D. Goldman. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208–224.
- Cameron, K.M. 2002. Intertribal relationships within Orchidaceae as inferred from analyses of five plastid genes. En: *Abstracts of Botany*. Madison, Wisconsin, USA, abstract 116.
- Cameron, K.M. 2005. Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92:1025-1032.

- Carnevali, F.C.G. y E. Noguera. 2008. A New Species of *Malaxis* (Orchidaceae, Epidendroideae, Malaxideae) from the Venezuelan Andes. *Journal for Botanical Nomenclature* 18(4): 425-428.
- Carnevali, G. y I. M. Ramírez-Morillo. 2003. *Malaxis*. Pp. 422–423 in P. Berry, K. Yatskiy y B. Holst (editors), *Flora of the Venezuelan Guayana*, Vol. 7. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Cervantes, L. M. 2009. Estudio de la anatomía foliar de la subtribu Ponerinae (Orchidaceae, Epidendroideae) en un contexto filogenético. Tesis, maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 91 pp.
- Chase, M. W., K. M. Cameron, J.V. Freudenstein, A. M. Pridgeon, G.A. Salazar, C. Van Den Berg y A. Schuiteman. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 151–174.
- Chase, M.W., J.F. Freudenstein y K.M. Cameron. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. En K.W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett, y P. J. Cribb (eds.), *Orchid conservation*, 69-89. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Chen S.C., K. Y. Lang, W.G. Stephan, J.C. Phillip, O. Paul. 2009. Subfamily Orchidoideae. In: Z.Y. Wu, P.H. Raven, D.Y. Hong , (eds.) *Flora of China*, Vol. 25 . Beijing: Science Press; St. Louis, MO: Missouri Botanical Garden Press, 45–166.
- Cribb, P.J. 2005. *Malaxis*. En: Pridgeon, P.J., Cribb, M.W. Chase y F.N. Rasmussen (eds.), *Genera Orchidacearum*, vol. 4: *Epidendroideae*, part 1, 471-475. Oxford: Oxford University Press.
- Cuénod, P., Savolainen, V., Chatrou, L.W., Powell, M., Grayer, R.J. y Chase, M.W. (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany* 89: 132–144. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.89.1.132>.
- Dacosta, J.M. y Klicka, J. 2008. The Great American Interchange in birds: a phylogenetic perspective with the genus Trogon. *Molecular Ecology* 17(5): 1328- 1343.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo y D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772.
- De Barros, F. 1996. Uma nova espécie de *Malaxis* Sol. ex Sw. (Orquidaceae) da serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil) e considerações sobre as seções brasileiras do gênero. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 15: 31-34.

- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaves tissue. *Phytochemical Bulletin* 19 (1): 11-15.
- Dressler, R. L. y C.H. Dodson. 1960. Classification and phylogeny in the Orchidaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 47: 25–68.
- Dressler, R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and clasification of orchid family. Portland: Dioscorides Press. 314 pp.
- Dressler, R.L. 2003. Mesoamerican orchid novelties 4, Malaxis. *Selbyana* 24(2): 141-143.
- Eaton, A. 1822. Manual of botany for the northern States, 3° ed. Albany. 353 pp.
- Endress, P. K. 2001. Origins of flower morphology. *Journal of Experimental Zoology* 291:105-115.
- Espejo–Serna A. y A.R. López–Ferrari (a). 1998. Las monocotiledóneas mexicanas, una sinopsis florística. 1. Lista de referencia. Parte VIII. Orchidaceae 2. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C., Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 115pp.
- Espejo–Serna, A., A.R. López–Ferrari, J. García-Cruz, R. Jiménez M. y L. Sánchez A (b). 1998. Dos nuevas adiciones a la orquideoflora mexicana. *Sida* 18(2): 411-418.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- Figuroa, C., G. A. Salazar, H. A. Zavaleta y E. M. Engleman. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101:509-520.
- Freudenstein, J. V., F.N. Rasmussen. 1999. What does morphology tell about orchid relationships. A cladistic analisis. *American Journal of Botany* 86: 225-248.
- Freudestein, J.V., E.M. Harris, H. Rasmussen. 2002. The evolution of the anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia and the vandoid complex. *American Journal of Botany* 89: 1747-1755.
- García-Cruz, J. y V. Sosa. 2005. Phylogenetic relationships and character evolution in Govenia (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 83:329-1339.

- Goloboff, P. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415-428.
- Goloboff, P. 2003. Parsimony, likelihood and simplicity. *Cladistics* 19: 91-103.
- Goloboff, P., J. S. Farris y K.C. Nixon. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24:774-786.
- González-Tamayo R., y D.L. Szlachetko. 1998. A new definition of the genus Tamayorkis Szlach. (Orchidaceae, Malaxidae). *Annales Botanici Fennici* 35:21–27.
- González-Tamayo, R. 2002. Malaxis (Orchidaceae), breve discusión de los rasgos específicos y dos taxones nuevos mexicanos. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUGANA)* 10 (1-2):67-75.
- González-Tamayo, R., L. Hernández y M. E. Del Carmen Ramírez Medina. 2007. Algunas novedades del género Malaxis (Orchidaceae) en el occidente de México. *Ibugana* 15: 35-64.
- Greenwood, E.W. y R. González-Tamayo 1981. *Malaxis amplexicolumna*: una nueva especie de Chiapas, México. *Orquidea* 8 (1): 121-136.
- Greenwood, E. W. y R. González-Tamayo. 1983. *Malaxis javensiae* (Reichb. f.) Ames. *Orquídea* 9(1): 123-134.
- Jhonson, A.M. 1931. Taxonomy of the flowering Plants. New York: Century.
- Katoh, K. y D.M. Standley. 2013. MAAFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (4): 772-780.
- Kite, C.G. y G.A. Salazar. 2008. Chemical composition of the inflorescence odor of *Malaxis rzedowskiana* (Orchidaceae). *Revista Mexicana de biodiversidad* 79: 153- 157.
- Kocyan, A. y P.K. Endress. 2001. Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasioideae) and their relationships to other Orchidaceae. *International Journal of Plant Science* 162: 847-867.
- Lavin M., M.F. Wojcishowski, P. Gasson, C.E. Hughes, E. Wheeler. 2003. Phylogeny of Robinoid legumes (Fabaceae) revisited: *Coursetia* and *Gliricidia* recircumscribed, and a biogeographical appraisal of the Caribbean endemics. *Systematic Botany* 28:387-409.

- Lewis, P.O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50: 913-925.
- Li, L. y H. Yan. 2013. A Remarkable New Species of *Liparis* (Orchidaceae) from China and Its Phylogenetic Implications. PLoS ONE 8(11): e78112. doi: 10.1371/journal.pone.0078112.
- Maddison, W.P. y D.R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.
- Malaxis Sol. ex Sw. and Microstylis (Nutt.) Eaton (Orchidaceae, Epidendroideae). *Acta Soc Bot Pol* 75(3):229–231.
- Margónska, H.B. 2006. Seidenforchis. A new genus of Malaxidinae (Orchidaceae), from Thailand. *Acta Soc. Bot. Pol.* (in press).
- Margońska, H.B. A.K. Kowlkowska, M. Gorniak, P. Rutkowski P. 2012. *Taxonomic redefinition of the subtribe Malaxidinae (Orchidales, Malaxidae)*. Koeltz, Koenigstein, 606 pp.
- Marler, T. y Clemente, H. Papaya seedling growth responses to wind and water deficit is additive. *HortScience*, 2006, vol. 41, pp. 96-98.
- Martínez-Cabrera, H.I. 2004. Caracteres anatómicos de la madera como indicadores paleoambientales: el caso de la flora de la Formación El Cien (Oligoceno-Mioceno), Baja California Sur. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Martínez-Millán, M. 2004. Biogeografía histórica (Terciario) de Anacardiaceae con base en arquitectura foliar. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México. D.F. 102 pp.
- Mutanen, M. y Pretorius, E. 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*, 32: 371-386.
- Meagher, T.R. y D.J. Futuyama (eds) 2001. Executive document: Evolution, Science and Society. *The American Naturalist* 158, Suplemento de Octubre, 46 pp.
- Miller, M.J., E. Bermingham. y R.E. Ricklefs. 2007. Historical biogeography of the New World solitaires (Myadestes). *Auk* 124: 868–885.
- Molvary, M.P., P.J. Kores y M.W. Chase. 2000. Polyphyly of micoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. En: Wilson, K. L. y D.

- A. Morrison (eds.), *Monocots: systematic s and evolution*, 441-448. CSIRO. Australia.
- Navarro-Sigüenza, A.G., Peterson, A. T., Nyari, A., García-Deras, G.M. y García-Moreno, J. 2008. Phylogeography of the Buarremon brush-finch complex (Aves, Emberizidae) in Mesoamerica. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 21-35.
- Neyland, R. y L. Urbatsch. 1995. A terrestrial origin for the Orchidaceae suggested by a phylogeny inferred from ndhF chloroplast gene sequences. *Lindleyana* 10: 244–251.
- Niklas, K.I. 1988. *Biophysical limitations on plant form and evolution*. In: Gottlieb, L.B. y Jains S.K. (eds.): *Plant evolutionary biology*. Chapman and Hall, London, pp. 185-220.
- Nixon, K.C. y Carpenter, J.M. 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12: 221-241.
- Novoa, P. 2005. Algunos alcances a la interacción entre insectos y orquídeas”. *Revista Chagual* (Jardín Botánico de Santiago) 3: 2-37.
- Nuttall, T. 1818. *The genera of North American plants and catalogue of the species to the year 1817*. Heartt, Philadelphia.
- Padial, J.M., A. Miralles, I. De la Rival, M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. *Font Zoo* 7: 16.
- Perez-Eman, J.L. 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of the neotropical redstarts (Myoborus: Aves, Parulinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 511-528.
- Pfitzer, E. 1888. Orchidaceae. In Engler and Prantl. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* II. 4:52-224.
- Posada, D. y K.A. Candrall. 2001. Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. *Systematic Biology* 50 (4): 580- 601.
- Pridgeon, A.M. 1987. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J, ed. *Orchid biology, reviews and perspectives, IV*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 139-192.
- Pridgeon, A.M., y M. W. Chase. 1995. Subterranean axes in tribe Diurideae (Orchidaceae) morphology, anatomy and systematic significance. *American Journal of Botany* 82: 1473-1495.
- Pridgeon, A.M., P.M. Cribb, M.W. Chase y F.N. Rasmussen. 2005. *Genera Orchidaceum*, vol. 4. Epidendroideae (parte 1). Oxford: Oxford University Press, New York.

- Qiu Y.L., J. Lee, F. Bernasconi-Quadroni, D.E Soltis, P.S Soltis, M. Zanis, E.A Zimmer, Z. Chen, V. Savolainen, M.W Chase. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402:404–407.
- Raddins, J.A., G.A. Salazar, L.I. Cabrera, R. Jiménez-Machorro y J. A. Batista. 2014. A new paludicolous species of *Malaxis* (Orchidaceae) from Argentina y Uruguay. *Phytotaxa* 175 (3): 121-132.
- Rambaut, A. 2009. FigTree. Versión 1.3.1. Disponible en línea.
- Reeves, L.M. y T. Reeves. 1984. Life history and reproduction of *Malaxis paludosa* in Minnesota. *American Orchid Society Bulletin* 53:1280-1281.
- Richardson, J.E., R.T. Pennington, T.D. Pennington, P.M. Hollingsworth. 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. *Science* 293:2242-2245.
- Rickett, H.W. 1944. The classification of inflorescences. *Botanical Review* 10: 1 87-231.
- Ridley, H.N. 1888. A revision of the genera *Microstylis* and *Malaxis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 24: 308-351
- Salazar, G.A. y M. A. Soto. 1990. Una nueva especie de *Malaxis* (Orchidaceae) de flores grandes del norte de Chiapas. *Acta Botanica Mexicana* 10:45-49.
- Salazar, G.A., M.W. Chase, M.A. Soto Arenas y M. Ingrouille. 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
- Salazar, G.A. y R.L. Dressler. 2011. The leaves got it right again: DNA phylogenetics supports a sister group relationship between *Eurysteles* and *Lankesterella* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Lankesteriana* 11 (3): 337-347.
- Sathiyadash, K., T. Muthukumar, E. Uma, y R.R. Pandey. 2012. Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions* 7: 238-247.
- Schäffer, S., T. Pfingstl, S. Koblmüller, K.A. Winkler, C. Sturmbauer, G. Krisper. 2010. Phylogenetic analysis of European Scutovertex mites (Acari, Oribatida, Scutoverticidae) reveals paraphyly and cryptic diversity: a molecular genetic and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55:677-688.
- Schlechter, R. 1911. Die Orchidaceen von Deutsch Neu-Guinea. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis, Beihefte* 1: 1-1079.



- Sclater, P.L. 1858. On the general geographic distribution of the members of the class Aves. *Journal of the Linnean Society of Zoology* 2: 130-145.
- Scotland, R. W., R. G. Olmstead y J. R. Bennett. 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology* 52:539-548
- Silvestro, D., y I. Michalak. 2011. raxmlGUI: A graphical frontend from RaxML. *Organism Diversity Evolution*.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis y J.J. Doyle (eds.) 1998. Molecular systematics of plants II. DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers. Boston, USA.
- Soto, M.A., E. Hágsater, R. Jiménez, G.A. Salazar, R. Solano, R. Flores, y I. Ruiz. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital (DVD). Instituto Chinoín, México, D. F.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based on Phylogenetic Analyses with Thousand of Taxas and Mixed Models. *Bioinformatics* 22 (21): 2688-2690.
- Standley, P.C. 1936. Las relaciones geográficas de la flora mexicana. *Anales del Instituto de Biología*, México 7:9-16.
- Steele, K.P. y Vilgalys, R. (1994) Phylogenetic analysis of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK*. *Systematic Botany* 19: 126–142. <http://dx.doi.org/10.2307/2419717>.
- Strasburger, E. 1994. Tratado de Botánica, 8ª ed. Ediciones Omega. Barcelona. España. 1088 pp.
- Stern, W.L. y W.M. Whitten. 1999. Comparative vegetative anatomy of Stanhopeinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 129: 87-103.
- Stern, W. L. y W. S. Judd. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 136:153–178.
- Stern, W. L. y W. S. Judd. 2002. Systematic and comparative anatomy of Cymbidieae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139:1–27.
- Swartz O. 1788. Nova Genera et Species Plantarum seu Prodrromus. Orchidaceae. Upsala y Abo. 118-126.
- Szlachetko, D.L., H.B. Margónska. 2006. Redefinition of the genera *Malaxis* Sol. ex Sw. and *Microstylis* (Nutt.) Eaton (Orchidaceae, Epidendroideae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 75(3):229-231.

- Szlachetko, D.L., H.B. Margonòska, M. Kułak. 2008. Nomenclatorial changes in Liparis-complex (Malaxidinae, Epidendroideae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 77(1):35-40.
- Szlachetko, D.L., M. Kolanowska. 2013. New species of the genus *Cranichis* (Orchidaceae, Cranichidinae) from Colombia. *Plant Systematics and Evolution* 299(5):979–983.
- Tiffney, B.H. 1985. Perspectives on the origin of the floristic similarity between eastern Asia and eastern North America. *Journal of the Arnold Arboretum* 66:73-94.
- Udvardy, M. 1975. A Classification of the Biogeographical Provinces of the World. International Union for conservation of nature and natural resources. Morges, Zwitterland. 50 pp.
- Uhl, N.W. 1976. Developmental studies in *Ptychosperma* (Palmae) I. The inflorescence and the flower. *American Journal of Botany* 63: 82-96.
- Uhl, N.W. y H.E. Moore. 1973. The protection of pollen and ovules in palms. *Principles* 17: 111-149.
- Wallace, A.R. 1876. The geographical distribution of animals, McMillan, Londres.
- Weir, J.T. 2008. Implications of genetic differentiation in neotropical montane forest birds. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 410–433.
- White, T.J., Burns T., Lee, S. y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J. J. y White T. (Eds.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Pp. 315-322, Academic Press San Diego.
- Wiens, I. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47: 568-581.
- Wiens, J. 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology* 53:653–661.
- Williams L.O. 1951. The Orchidaceae of Mexico. *Ceiba* 2:1–321.
- Wolfe, J.A. 1975. Some aspects of plant geography of the Northern Hemisphere during the late Cretaceous and Tertiary. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62(2):264-279.
- Yu Y., A. J. Harris y X.J. He. 2011. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) 1.1. Available at <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>.

## APÉNDICE I

Taxones incluidos en los análisis moleculares, morfológico y biogeográfico; ejemplares de respaldo, número de acceso de Gen Bank y herbario en el que se encuentran depositados los respaldos. S/P= sin publicar

	<b>Especie</b>	<b>Voucher</b>	<b>ITS</b>	<b>matK</b>
1	<i>Malaxis abieticola</i> Salazar y Soto Arenas	Salazar s.n.	SP	SP
2	<i>Malaxis andicola</i> (Ridl.) Kuntze	Jardín Botánico Universidad de Mérida	SP	SP
3	<i>Malaxis aurea</i> Ames	Salazar 6379	SP	SP
4	<i>Malaxis acianthoides</i> (Schltr.) Ames	Soto 10164	SP	SP
5	<i>Malaxis brachyrrhynchos</i> (Rchb.f.) Ames	Salazar 7484 (MEXU)	HG970121	HG970143
6	<i>Malaxis brachystachys</i> (Rchb.f.) Kuntze	Hornung s.n.	presente	presente
7	<i>Malaxis cabreræ</i> sp.nov	Salazar 7483	SP	SP
8	<i>Malaxis carnosa</i> (Kunth) C. Schweinf.	Jimenez-Machorro 2867	presente	No incluido
9	<i>Malaxis carpintera</i> (Schltr.) Ames	Salazar s.n. (MEXU)	HG970125	HG970147
10	<i>Malaxis cipoensis</i> F. Barros	Batista 2328 (BHCB)	HG970126	HG970148
11	<i>Malaxis corymbosa</i> (S.Watson) Kuntze	Cameron (2005)	AY907110	AY907176
12	<i>Malaxis elliptica</i> A. Rich. & Galeotti	Soto 9738	SP	SP
13	<i>Malaxis fastigiata</i> (Rchb.f.) Kuntze	Soto 9740	SP	SP
14	<i>Malaxis hagsateri</i> Salazar	Salazar 6773 (MEXU)	HG97123	HG970145

<b>15</b>	<b><i>Malaxis hastilabia</i> (Rchb. f.) Kuntze</b>	Salazar s.n. (MEXU)	HG970128	HG970150
<b>16</b>	<b><i>Malaxis histhionantha</i> (Link, Klotzsch &amp; Otto) Garay &amp; Dunst.</b>	Soto 8958 (AMO)	HG970124	HG970146
<b>17</b>	<b><i>Malaxis irmae</i> Radins &amp; Salazar</b>	Radins, 105 (CTES)	HG970127	HG970149
<b>18</b>	<b><i>Malaxis javesiae</i> (Rchb. f.) Ames</b>	Soto 9734	SP	SP
<b>19</b>	<b><i>Malaxis lepanthiflora</i> (Schltr.) Ames</b>	Reyes 5469 (MEXU)	HG97129	HG970141
<b>20</b>	<b><i>Malaxis lepidota</i> (Finet) Ames</b>	Soto 9733 (AMO)	HG970122	HG970144
<b>21</b>	<b><i>Malaxis lyonnetii</i> Salazar</b>	Nava 107	SP	SP
<b>22</b>	<b><i>Malaxis maianthemifolia</i> Cham. &amp; Schldl.</b>	M. Lopez & Salazar s.n.	SP	SP
<b>23</b>	<b><i>Malaxis maxonii</i> Ames</b>	Salazar 7519 (MEXU)	HG97130	HG970152
<b>24</b>	<b><i>Malaxis molotensis</i> Salazar &amp; de Santiago</b>	De Santiago 1320 (MEXU)	HG970131	HG970153
<b>25</b>	<b><i>Malaxis moritzii</i> (Rdl. Kuntze)</b>	Jardín Botánico Universidad de Mérida (MEXU)	HG970132	HG970154
<b>26</b>	<b><i>Malaxis myurus</i> (Lindl.) Kuntze</b>	Soto 9737	SP	SP
<b>27</b>	<b><i>Malaxis ocreata</i> (S.Watson) Ames</b>	Salazar 7251	SP	SP
<b>28</b>	<b><i>Malaxis pandurata</i> (Schltr.) Ames</b>	Soto 1564	SP	SP
<b>29</b>	<b><i>Malaxis parthonii</i> C. Morren</b>	J. Randis s.n. (MEXU)	HG970133	HG970155
<b>30</b>	<b><i>Malaxis pringlei</i> (S. Watson) Ames</b>	Pulido-Díaz 4	No incluido	Presente

<b>31</b>	<b><i>Malaxis reichei</i> (Schltr.) Ames &amp; C. Schweinf</b>	Jimenez-Machorro 2812	presente	SP
<b>32</b>	<b><i>Malaxis roblesgiliana</i> R. González</b>	Salazar 7233	SP	SP
<b>33</b>	<b><i>Malaxis rolandoana</i> sp. nov</b>	Rizo-Patrón 11	SP	SP
<b>34</b>	<b><i>Malaxis rosei</i> Ames</b>	Pulido-Díaz 6	SP	Presente
<b>35</b>	<b><i>Malaxis rosilloi</i> R. González &amp; E.W. Greenw</b>	Jimenez-Machorro 2812	presente	presente
<b>36</b>	<b><i>Malaxis rzedowskiana</i> R.González</b>	Diego & Gispert 8469 (MEXU)	SP	SP
<b>37</b>	<b><i>Malaxis sagitifera</i> sp. nov.</b>	Hernández 131	presente	No incluido
<b>38</b>	<b><i>Malaxis soulei</i> L.O. Williams</b>	RSG 4099	presente	presente
<b>39</b>	<b><i>Malaxis steyermarkii</i> Correll</b>	Salazar 6402	SP	EU214179
<b>40</b>	<b><i>Malaxis spicata</i> Sw.</b>	Chase 377 (K)	AF521068	HG970157
<b>41</b>	<b><i>Malaxis streptopetala</i> (A. Rob. &amp; Greenm.) Ames</b>	Soto 10145	SP	SP
<b>42</b>	<b><i>Malaxis stricta</i> L.O. Williams</b>	H.Nava s.n.	SP	SP
<b>43</b>	<b><i>Malaxis thlaspiiformis</i> A. Rich. &amp; Galeotti</b>	Jimenez-Machorro 2820	presente	No incluido
<b>44</b>	<b><i>Malaxis urbana</i> E.W.Greenw.</b>	Calzada 20062	SP	SP
<b>45</b>	<b><i>Malaxis velazquezii</i> sp. nov.</b>	De Santiago 1880	SP	SP
<b>46</b>	<b><i>Malaxis zempoalensis</i> Soto Arenas &amp; Salazar</b>	Espejo 5714 (AMO)	HG970120	HG970142
<b>47</b>	<b><i>Malaxis</i> sp. 132</b>	Hernández 132	presente	presente

<b>48</b>	<i>Malaxis monophyllos</i> (L.) Sw.	Cameron 2136 (NY)	AY907108	AY907175
<b>49</b>	<i>Bulbophyllum lobbii</i> Lindl.	Hosseini et al. (2011)/ Saetai et al. (2014)	JF428099	KJ462089
<b>50</b>	<i>Crepidium acuminatum</i> (D. Don.) Szlach.	Ohi-Tomas (2007)	AB290884	AB290892
<b>51</b>	<i>Crossoliparis wendlandii</i> (Rchb. f) Marg	Salazar 6425 (MEXU)	HG970118	HG970141
<b>52</b>	<i>Crossoglossa fratrum</i> (Schltr.) Dressler ex Dodson	Dressler s.n. (USJ)	HG970119	HG970141
<b>53</b>	<i>Dendrobium aphyllum</i> (Roxb.) C.E.C. Fisch.			
<b>54</b>	<i>Dienia latifolia</i> (Sm.) M. A. Clem & D.L. Jones	Cameron (2005)	AY907114	AY907181
<b>55</b>	<i>Diteilis nervosa</i> (Thunb.) M.A.Clem. & D.L.Jones	Cameron (2005)	AY907092	AY907158
<b>56</b>	<i>Liparis greenwoodiana</i> Espejo	Espejo 5331 (MEXU)	SP	SP
<b>57</b>	<i>Liparis loeselii</i> (L.) Rich.	Chase 7238	SP	SP
<b>58</b>	<i>Liparis vexillifera</i> (La Llave & Lex.) Cogn.	Salazar 7417	SP	SP
<b>59</b>	<i>Oberonia rufilabris</i> Lindl.	Salazar s/n	SP	SP
<b>60</b>	<i>Oberonia setifera</i> Lindl.	Cameron (2005) (NY)	AY907136	AY907904
<b>61</b>	<i>Stichorkis gibbisiae</i> (J.J. Sm.) Marg., Szlach. & Kulak	Heidelberg Botanical Garden s.n. (HEID)	HG970116	HG970138
<b>62</b>	<i>Tamayorkis ehrenbergii</i> (Rchb.f.) Kuntze	Salazar 6675	SP	SP
<b>63</b>	<i>Tamayorkis hintonii</i> Todzia R. González & Szlach.	Hernández 155	presente	presente
<b>64</b>	<i>Tamayorkis porphyrea</i> (Ridl.) Kuntze	Cameron (2005)	AY907115	AY907182

## APÉNDICE II

Matriz de caracteres morfológicos cualitativos.

	Hábito	Cormo	Forma cormo	No. hojas	Venación mayor	Márgen foliar	Tamaño rel. peciolo	Inflorescencia	Ápice labelo	Aurículas labelo	Color sépalos y pétalos	Márgen labelo	Presencia de fóveas
<i>Bulb lobbia</i>	1	-	0	0	1	0	-	3	2	1	3	0	0
<i>Den aphyllum</i>	1	-	2	4	1	0	0	1	6	0	4	1	0
<i>Stich gibbosa</i>	1	-	0	0	1	0	-	3	0	1	2	0	0
<i>Ob setifera</i>	1	-	-	4	-	0	-	2	1	0	1	3	1
<i>Ob rufilabris</i>	1	-	-	4	-	0	-	1	1	0	1	0	0
<i>Mal monophyllos</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	0	4	0
<i>Lip loeselii</i>	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	1	0
<i>Crossol wendlandii</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	5	1	0	3	0
<i>Crossog fratrum</i>	0	0	-	1	1	1	0	1	2	1	0	2	0
<i>Lip vexillifera</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	6	1	0	3	0
<i>Lip greenwoodiana</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Mal acianthoides</i>	0	0	0	0	1	1	1	1	0	2	0	2	1
<i>Mal majanthemifolia</i>	0&1	1	0	0	1	1	1	1	0	2	0	0	0
<i>Tam hintonii</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	2	0
<i>Tam porphyrea</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0	0
<i>Tam ehrenbergii</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0	0
<i>Mal javesiae</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Mal reichei</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
<i>Mal hagsaterii</i>	0	1	1	2	1	1	1	1	3	2	0	1	1
<i>Mal velazquezii</i>	0	1	1	2	1	1	1	1	1	2	0	0	1
<i>Mal rolandoana</i>	0	1	1	2	1	1	1	0	1	1	0	0	1
<i>Mal andicola</i>	0	1	1	2	1	0	1	0	0	2	0	0	0

<i>Mal hastilabia</i>	0	1	1	2	1	0	1	0	1	3	0	0	1
<i>Mal moritzii</i>	0	1	1	2	1	0	1	0	0	2	0	0	0
<i>Mal carpinterae</i>	0	1	1	2	1	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>Mal lepanthiflora</i>	0	1	1	2	1	0	1	1	1	2	0	0	1
<i>Mal maxonii</i>	0	1	1	2	1	0	1	1	1	2	0	0	1
<i>Mal cabreræ</i>	0	1	1	2	1	0	1	0	6	3	0	0	1
<i>Mal rosilloi</i>	0	1	1	2	1	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Mal molotensis</i>	0	1	1	2	1	0	1	1	6	0	0	0	1
<i>Mal histionantha</i>	0	1	1	2	1	1	1	0	3	1	0	0	0
<i>Mal spicata</i>	0	1	1	3	1	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Mal parthonii</i>	0	1	1	2	1	1	1	0	6	0	0	0	1
<i>Mal irmae</i>	2	0	0	3	1	0	1	1	3	1	0	0	1
<i>Mal cipoensis</i>	0	0	0	2	1	0	1	0	3	1	0	0	1
<i>Mal lepidota</i>	0	0	0	2	1	1	1	1	3	1	0	1	0
<i>Mal zempolensis</i>	2	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	1
<i>Mal rosei</i>	0	0	0	1	1	1	1	0	6	3	0	0	1
<i>Mal carnosa</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0	0	0	1
<i>Mal aurea</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>Mal sp 132</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	2	?	0	0	1
<i>Mal sagitifera</i>	0	0	0	2	1	0	1	1	2	3	0	0	1
<i>Mal brachystachys</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0
<i>Mal corymbosa</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0
<i>Mal abieticola</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	0	0
<i>Mal lyonettii</i>	0	1	0	2	1	0	0	0	3	3	0	0	1
<i>Mal myurus</i>	0	0	0	2	1	0	1	2	0	1	0	0	1
<i>Mal urbana</i>	0	0	0	1	1	0	1	0	6	3	0	0	1
<i>M ochreatea</i>	0	0	0	2	1	0	1	1	6	3	0	0	1
<i>Mal fastigiata</i>	0	0	0	1	1	0	1	0	2	1	0	0	1



<i>Mal rzedowskiana</i>	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Mal brachyrrhynchos</i>	0	0	0	2	1	0	1	0	6	0	0	0	1
<i>Mal pandurata</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	5	1	0	1	0
<i>Mal steyermarkii</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
<i>Mal roblesgilana</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	2	2	0	0	0
<i>Mal streptopetala</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	4	2	0	0	0
<i>Mal soulei</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	4	1	0	0	0
<i>Mal thlaspiiformis</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	4	1	0	1	0
<i>Mal pringlei</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	6	1	0	0	0
<i>Mal eliptica</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	4	1	0	0	0
<i>Mal stricta</i>	0	0	0	0	1	0	1	2	0	2	0	0	0
<i>Dit nervosa</i>	0	0	2	4	0	1	0	1	5	1	1	0	0
<i>Die latifolia</i>	0&1	0	2	4	0	0	0	1	1	1	1	0	1
<i>Crep acuminatum</i>	0&1	0	2	4	0	1	0	1	5	2	1	0	0