



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Sistemática molecular del grupo de *Epidendrum
anisatum* (Orchidaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SEBASTIÁN QUIROGA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CAROLINA GRANADOS MENDOZA

Ciudad Universitaria, CD. MX. 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 está 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.

1. Datos del alumno

Apellido paterno: Quiroga

Apellido materno: González

Nombre(s): Sebastián

Teléfono: 5521418929

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera: Biología

Número de cuenta: 413078122

2. Datos del tutor

Grado: Dra

Nombre(s): Carolina

Apellido paterno: Granados

Apellido materno: Mendoza

3. Datos del sinodal 1

Grado: Dr

Nombre(s): Gerardo Adolfo

Apellido paterno: Salazar

Apellido materno: Chávez

4. Datos del sinodal 1

Grado: Dra

Nombre(s): Martha Juana

Apellido paterno: Martínez

Apellido materno: Gordillo

5. Datos del sinodal 1

Grado: Dra

Nombre(s): Susana Aurora

Apellido paterno: Magallón

Apellido materno: Puebla

6. Datos del sinodal 1

Grado: M en C

Nombre(s): Itzi

Apellido paterno: Fragoso

Apellido materno: Martínez

7. Datos del trabajo escrito.

Título: Sistemática molecular del grupo de
Epidendrum anisatum (Orchidaceae)

Subtítulo: No aplica

Número de páginas: 58

Año: 2017

Índice general

Agradecimientos	6
Resumen	8
Introducción	10
Justificación	18
Hipótesis	18
Objetivos	18
Materiales y métodos	19
Discusión	39
Conclusiones y consideraciones a futuro	46
Bibliografía citada	47
Anexo.....	52
Glosario	47
Abreviaturas	47

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Morfología vegetativa y floral del grupo de <i>Epidendrum anisatum</i>	11
Figura 2. Ejemplares de algunas de las especies empleadas en el estudio	12
Tabla 1. Especies reconocidas al interior del grupo de <i>Epidendrum anisatum</i> según Hágsater (1984) y García-Cruz (1995)	15
Tabla 2. Muestreo taxonómico empleado en el presente estudio	20
Figura 3. Estructura general de los marcadores plastidiales (A-F) utilizados en el presente estudio.....	24
Figura 4. Estructura general de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), de la familia multigénica ribosomal nuclear	25
Tabla 3. Primers empleados para la amplificación de las regiones exploradas en el presente estudio.....	27
Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados en las reacciones de PCR de las regiones amplificadas	29
Tabla 5. Programas de PCR utilizados en la amplificación de los marcadores	29
Tabla 6. Longitud en pares de bases alineadas de los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio.....	31
Tabla 7. Modelos de sustitución molecular de mejor ajuste y esquemas de partición de los datos obtenidos con PartitionFinder	32
Figura 5. Utilidad filogenética proporcionada por cada marcador molecular con base en el número de ramas altamente apoyados ($PP \geq 0.85$)	33
Figura 6. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia bayesiana de la matriz del marcador ribosomal-nuclear ITS, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo).....	36
Figura 7. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia bayesiana de la matriz combinada de todos los marcadores de cloroplasto y el marcador nuclear ITS, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo)	37
Figura 8. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia bayesiana de la matriz combinada de todos los marcadores de cloroplasto, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo).....	38
Figura 9. Fenograma resultante del estudio de García-Cruz (1995).....	44
Figura 10. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del EIG <i>atpI-atpH</i> del cloroplasto, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo).....	52

- Figura 11.** Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz de la región plastidial *matK-trnK*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo)..... 53
- Figura 12.** Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del intrón plastidial *rps16*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo) 54
- Figura 13.** Árbol consenso compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del EIG plastidial *trnH-psbA*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo) 55
- Figura 14.** Árbol consenso compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del EIG plastidial *trnL-trnF*, incluyendo 27 especies (13 del grupo interno y 14 del grupo externo) 56
- Figura 15.** Árbol consenso compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz de la región plastidial *trnS-trnfM*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo)..... 57

Agradecimientos

A Dios, por haberme permitido llegar a este punto, por brindarme la salud y las capacidades para desarrollarme como persona y lograr mis objetivos.

A mis padres, por brindarme siempre su apoyo tanto moral como económico, así como por sus consejos y ejemplo como modelo científico a seguir.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Ciencias y su Herbario (FCME), por ofrecerme los recursos para desarrollarme como Biólogo. Al Instituto de Biología (IB-UNAM) y su Herbario Nacional (MEXU), por aceptarme como estudiante para el desarrollo de este proyecto y brindarme los recursos académicos y materiales para el mismo.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. (IPICYT), por brindarme una beca de estancia en sus instalaciones, la cual fue crucial para la conclusión del presente trabajo.

A PAPIIT/DGAPA/UNAM por el apoyo financiero a través del Proyecto IG200316 (Titular: Susana Aurora Magallón Puebla), con financiamiento adicional amablemente proporcionado por el Instituto Chinoín, A. C.

A la Dra. Carolina Granados Mendoza, por fungir como mi asesora en este proyecto, por todo el tiempo, dedicación, enseñanza y paciencia que invirtió en mí y el término de este proyecto, así como por su amistad.

Al Dr. Gerardo A. Salazar Chávez, por proporcionarme los medios para desarrollarme en el área de la sistemática y la orquideología, así como brindarme el espacio y su tiempo para asesorarme, desarrollar correctamente este proyecto en el Instituto de Biología, UNAM y por proporcionar recursos económicos para el presente trabajo.

Al Ing. Eric Hágsater Gartenberg, por brindarme su asesoría con sus conocimientos sobre el género *Epidendrum*, el acceso al material vegetal de los ejemplares del invernadero del Herbario AMO y a su base de datos, así como brindar apoyo financiero para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Susana Magallón Puebla, por apoyarme en mi formación en la sistemática molecular por medio de su cátedra en la clase de Sistemática II como optativa de la carrera de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, así como por darme la oportunidad de participar en el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IG200316.

A la Dra. Lidia Irene Cabrera Martínez, por su apoyo y asesoría en mi trabajo en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Botánica, IB-UNAM.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, por su apoyo en el Laboratorio de Secuenciación del IB-UNAM, el cual fue crucial para la obtención de los datos utilizados en este proyecto.

A los Drs. Carolina Granados Mendoza, Gerardo Adolfo Salazar Chávez, Martha Juana Martínez Gordillo, Susana Magallón Puebla y la M. en C. Itzi Fragoso Martínez por revisar este escrito de tesis y participar como miembros de jurado de examen profesional.

A mis profesores de Taller Sistemática de Angiospermas (Facultad de Ciencias, UNAM): Jaime Jiménez Ramírez, Martha Juana Martínez Gordillo, Mercedes Isolda Luna Vega, Leonardo Osvaldo Alvarado Cárdenas, Itzi Fragoso Martínez, Ramiro Cruz Durán y María Eugenia Muñiz Díaz de León, por la formación que me brindaron como botánico y sistémata, así como su asesoría en el desarrollo de este proyecto.

A la UNAM y sus profesores, por marcar cada una de las etapas en mi formación universitaria y que me ayudaron con dudas en el desarrollo de este proyecto, y por brindar el apoyo en forma del proyecto PAPIIT al que estoy adjunto.

A la maestra Beatriz González Hidalgo, por motivarme a decidir tomar la línea de la botánica después de tomar su clase de Plantas I durante mi formación universitaria.

A mis amigos, Lidia Gabriela García Gutiérrez, Mónica Mariel Reyes Antúnez, Mariana Flores Navas, Alejandro Edgar Nava Guerrero, por su constante apoyo tanto en el ámbito académico como fuera de él.

Resumen

Epidendrum es uno de los géneros neotropicales de plantas con flores más diversos, con ca. 1,500 especies descritas, que exhiben una gran diversidad de arquitecturas vegetativas y florales. A pesar de ello, aún existe un conocimiento limitado sobre las relaciones filogenéticas al interior del género. El presente trabajo se enfoca a investigar las relaciones filogenéticas en un grupo de especies representadas por *E. anisatum*, y restringidas a los bosques montanos húmedos de pino-encino y bosques de niebla de México. En 1995, García-Cruz identificó una agrupación de 18 spp. al que denominó grupo de *E. anisatum*, que dividió en tres subgrupos con base en sus similitudes morfológicas. El presente estudio tiene como objetivos: 1) evaluar la monofilia del grupo *E. anisatum* (*sensu* García-Cruz, 1995); 2) explorar las relaciones filogenéticas de las especies que lo conforman y, con ello evaluar la monofilia de los tres grupos recuperados por García-Cruz (1995). Para ello, se realizaron análisis de inferencia filogenética con estadística bayesiana, de secuencias de ADN correspondientes a marcadores plastídicos, consistentes en las regiones *matK-trnK*, *trnH-psbA* y *trnS-trnfM*, los espaciadores intergénicos (EIG) *atpI-atpH* y *trnL-trnF*, los intrones de los genes *trnL* y *rps16*, así como la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de la familia multigénica ribosomal nuclear. Se incluyeron 13 de las 18 spp. del grupo de *E. anisatum sensu* García-Cruz (1995), además de 15 especies que fueron empleadas como grupo externo: diez de ellas pertenecientes a diferentes grupos a lo largo del género *Epidendrum* y cinco especies de otros géneros de subtribus y tribus cercanas al género en cuestión. Los análisis combinados de los marcadores de cloroplasto y el ITS combinado con los de cloroplasto fueron altamente consistentes; sin embargo, el análisis de la región ITS mostró algunas inconsistencias topológicas. Todas las fuentes de datos corroboraron la monofilia del

grupo *E. anisatum* con un alto apoyo (PP=1). Al interior de dicho grupo, *E. gasteriferum* se encuentra como especie hermana del resto de las especies. Este último clado, a su vez, se divide en dos grupos: el clado [[[*E. lowilliamsi* + *E. matudae*] [*E. gomezii* + *E. anisatum*]] *E. pastranae*] *E. juergensenii*]; y su clado hermano [[[*E. hueycantenangense* + *E. guerrerense* + *E. mixtecanum* + *E. oaxacanum*] *E. costatum*] *E. cusii*]. Ninguno de los tres grupos propuestos por García-Cruz (1995) fueron recuperados como monofiléticos en este trabajo.

Palabras clave: Filogenia molecular, grupo de *Epidendrum anisatum*, grupo monofilético, marcadores moleculares, inferencia bayesiana.

Introducción

El género neotropical *Epidendrum* L., con ca. 1,500 especies, es uno de los más diversos de la familia Orchidaceae (Asparagales; Frodin, 2004). Su distribución abarca desde el sureste de Estados Unidos (Carolina del Norte) hasta el norte de Argentina, siendo las cordilleras de los Andes y la Región de las Guayanas las zonas con mayor diversidad específica (Hágsater y Soto Arenas, 2005). En México se distribuyen 117 especies de *Epidendrum*, de las cuales 54 son endémicas al país (Villaseñor, 2016). El género habita en un amplio rango de tipos de vegetación, los cuales incluyen selvas húmedas tropicales, bosques de niebla y páramos (Hágsater y Soto Arenas, 2005).

Características morfológicas de *Epidendrum*

La mayoría de las especies de *Epidendrum* se distinguen de otras Orchidaceae por ser plantas con tallos en forma de cañas, en lugar de pseudobulbos; sus flores presentan un falso nectario como resultado de la adnación del labelo con la columna; y presentan el rostelo paralelo al eje de la columna, bisectado tras la remoción del polinario y lóbulos laterales del estigma bien desarrollados (**Figura 1**; Hágsater y Soto Arenas, 2005).

Las especies de *Epidendrum* son hierbas, ya sea cespitosas y erectas, rastreras o colgantes, con crecimiento simpodial, o rara vez monopodial y con tallos simples o en ocasiones ramificados en la parte superior. Su tallo puede ser delgado y a veces engrosado, formando un pseudobulbo fusiforme o globoso. Sus hojas generalmente están arregladas dísticamente; pueden ser delgadas a coriáceas o suculentas, presentan una vaina cilíndrica y las láminas están generalmente articuladas a las vainas. Sus raíces generalmente surgen únicamente en la base

de los tallos, pero a veces lo hacen en los nodos, a lo largo del tallo. La inflorescencia es casi siempre apical, rara vez lateral, racemosa a paniculada y menos frecuentemente corimbosa (Hágsater y Soto Arenas, 2005).

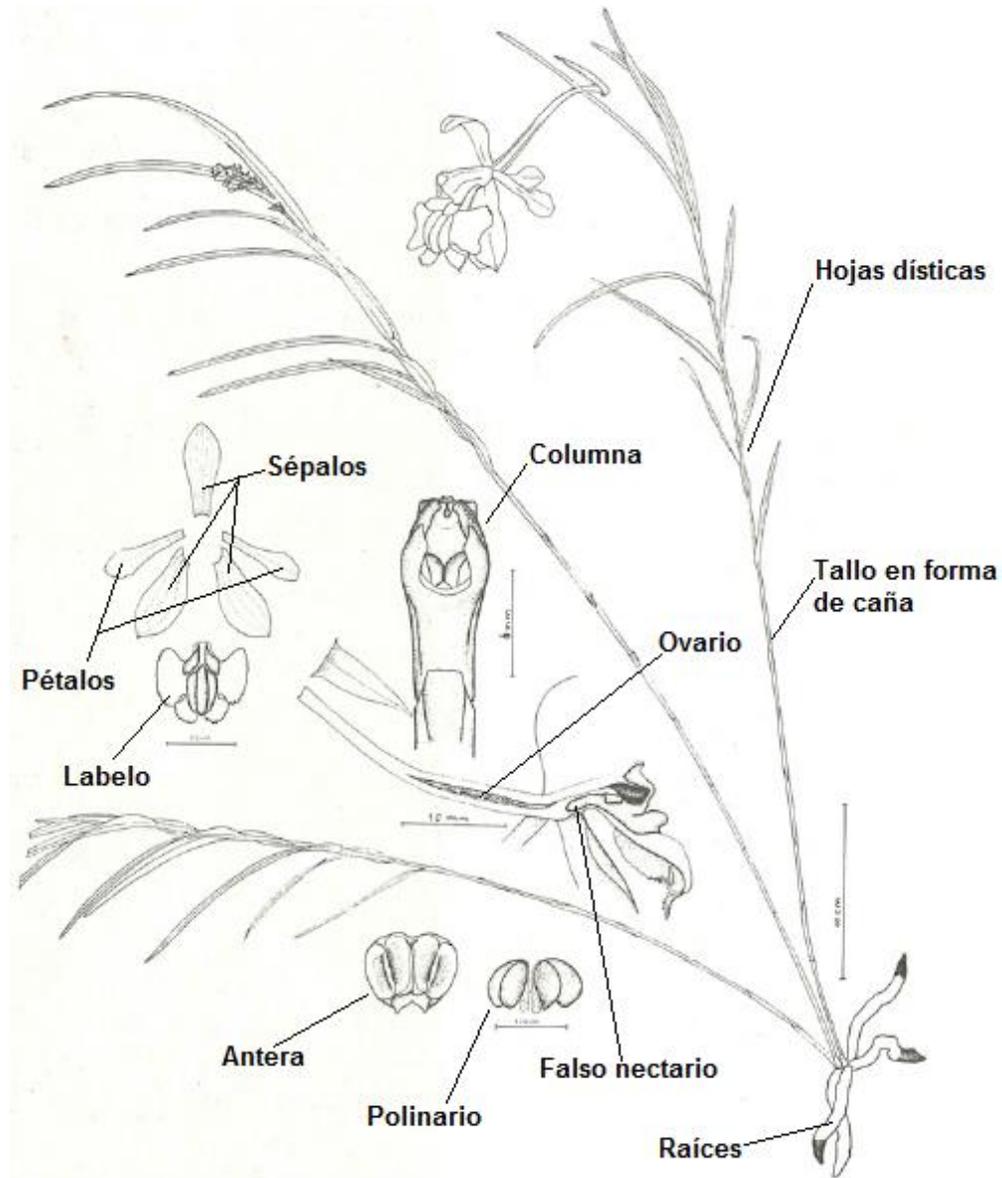


Figura 1. Morfología vegetativa y floral del grupo de *Epidendrum anisatum*. Como ejemplo se ilustra *Epidendrum cusii*. Dibujo modificado de Hágsater (1978).

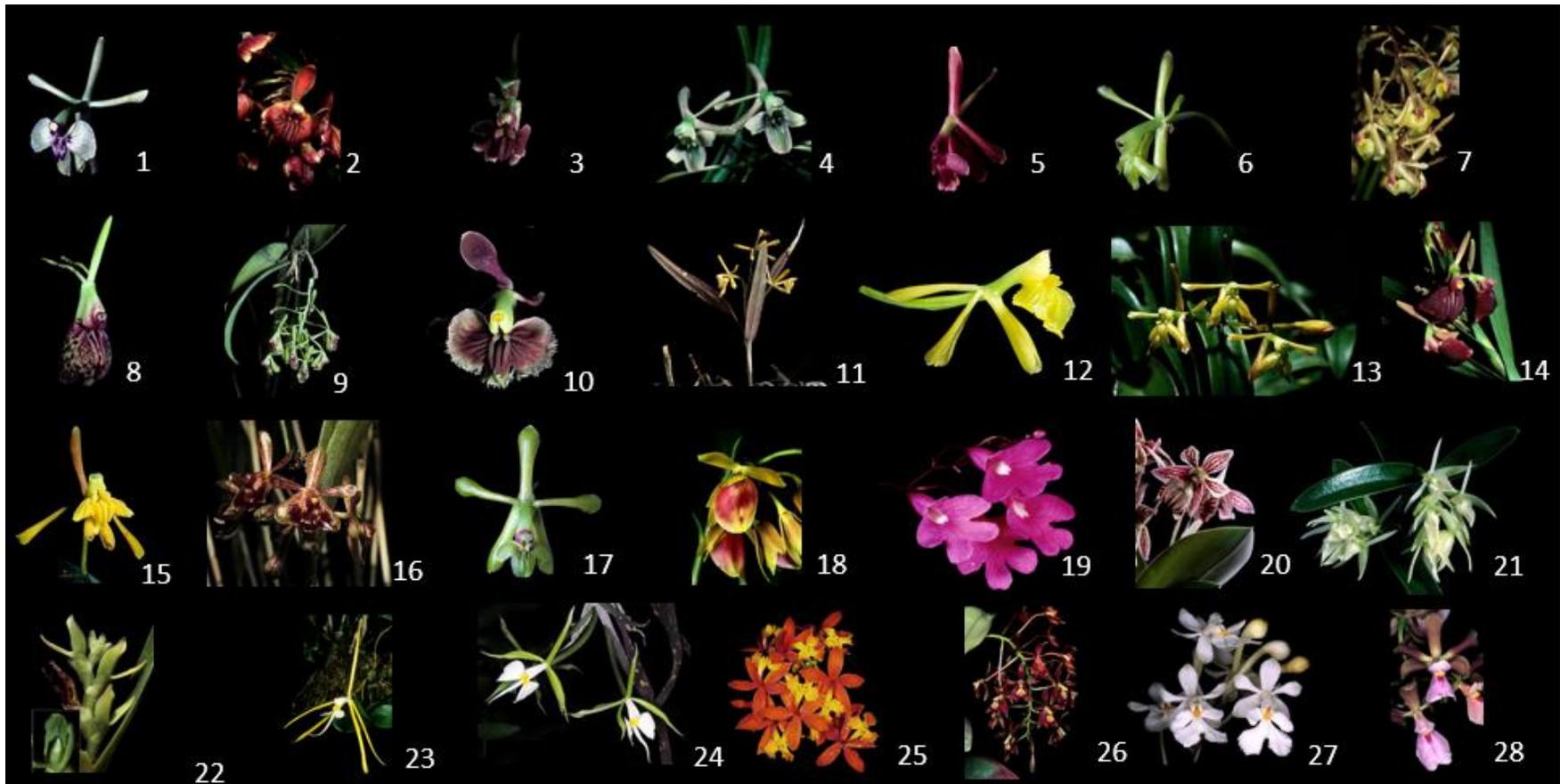


Figura 2. Ejemplares de algunas de las especies empleadas en el estudio. Especies del grupo de *E. anisatum* (1-17), otros miembros de *Epidendrum* (18-27), y una especie del género *Encyclia* como grupo externo. 1) *E. anisatum*, 2) *E. costatum*, 3) *E. cusii*, 4) *E. dorsocarinatum*, 5) *E. duranguense*, 6) *E. examinis*, 7) *E. gasteriferum*, 8) *E. gomezii*, 9) *E. guerrerense*, 10) *E. hueycantenangense*, 11) *E. juergensenii*, 12) *E. lowilliamsi*, 13) *E. matudae*, 14) *E. neogaliciense*, 15) *E. oaxacanum*, 16) *E. pastranae*, 17) *E. rosilloi*, 18) *E. eximium*, 19) *E. longicaule*, 20) *E. marmoratum*, 21) *E. mixtum*, 22) *E. nitens*, 23) *E. nocturnum*, 24) *E. parkinsonianum*, 25) *E. radicans*, 26) *E. radioferens*, 27) *E. verrucosum* y 28) *Encyclia cordigera*. Imágenes tomadas de Hágsater et al (2005), *Orchids of Mexico*, First Edition. Ed. Instituto Chinoín A.C., Lago Tangañica 18, 11520 Mexico City.

Sus flores son hermafroditas y pueden presentar o no resupinación. Varían principalmente en el labelo (e.g. forma, bordes y nervación); el color del perianto, que va desde colores claros y brillantes hasta los oscuros y opacos; así como la presencia o ausencia de fragancia, la cual puede ser diferente entre individuos de la misma especie (Moya y Ackerman, 1993).

En cuanto a su biología reproductiva y mecanismos de polinización, las especies del género *Epidendrum* se caracterizan por poseer una estructura de polinización conocida como “llave-cerradura”, en la cual el falso nectario floral tiene una longitud determinada, que obliga al polinizador a aproximarse mucho para poder introducir su probóscide o pico (mariposas y aves, respectivamente). De esta manera los polinizadores hacen contacto con el viscidio (la parte pegajosa que adhiere el polinario al polinizador). Los síndromes de polinización más frecuentes en *Epidendrum* son la psicofilia (mariposas) y falenofilia (polillas), y menos frecuentemente, la ornitofilia (aves, particularmente colibrís) y la mirmecofilia (hormigas; Almeida y Figueiredo, 2003). Ya que ninguna especie de *Epidendrum*, de las que han sido examinadas produce néctar floral, es muy probable que en muchos casos la polinización se lleve a cabo mediante un mecanismo de engaño (Bierzychudek, 1981).

Biología evolutiva de *Epidendrum*

La familia Orchidaceae pertenece al orden de las Asparagales, siendo la familia hermana de todas las demás Asparagales, divirgiendo como linaje independiente hace 109 millones de años (Magallón et al., 2015). Orchidaceae se divide en cinco subfamilias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae. El género *Epidendrum* se clasifica dentro de la subtribu Laeliinae, tribu Epidendreae, de la subfamilia Epidendroideae (Cameron

et al., 1999; Chase *et al.*, 2015). Estudios filogenéticos previos han identificado un clado dentro de las Epidendroideae denominado “alianza *Epidendrum*”, que además de *Epidendrum* (incluyendo *Oerstedella* Rchb. f., *Amblostoma* Scheidw., *Lanium* Lindl. y *Nanodes* Lindl.), consta de los géneros *Barkeria* Knowles y Westc., *Caularthron* Raf., *Microepidendrum* Brieger ex W. E. Higgins y *Orleanesia* Barb. Rodr. (van den Berg *et al.*, 2000, 2009; Hágsater y Soto-Arenas, 2005).

Entre los estudios filogenéticos previos, que han incluido especies de *Epidendrum*, se encuentran los trabajos de van den Berg (2000) y van den Berg *et al.* (2009); no obstante, debido a que el enfoque de dichos trabajos fue a niveles taxonómicos más inclusivos (i.e. tribu Epidendreae y subtribu Laeliinae), su muestreo al interior del género *Epidendrum* fue limitado (una y nueve especies, respectivamente), proporcionando información muy limitada sobre las relaciones filogenéticas del género.

Tal como lo citan Chase *et al.* (2015), para la familia Orchidaceae en general, la clasificación de *Epidendrum* se ve afectada por el enorme número de especies que contiene y por el gran número de especies nuevas que se siguen describiendo cada año. Adicionalmente, la falta de un contexto filogenético firmemente establecido y la escaséz de caracteres morfológicos que sustenten hipótesis de homología, obstaculizan la generación de una clasificación más natural. Se han propuesto varios esquemas de clasificación infragenérica para *Epidendrum*. Ames *et al.* (1936), Lindley (1841), Bentham y Hooker (1883) y Hágsater (1984), entre otros, han basado sus clasificaciones de *Epidendrum* en características florales y vegetativas. Sin embargo, todas esas clasificaciones son artificiales y carecen de bases filogenéticas (Hágsater y Soto Arenas, 2005).

Grupo de *Epidendrum anisatum*

Basado en caracteres morfológicos, Hágsater (1984) delimitó 31 grupos dentro de *Epidendrum*, identificándolos informalmente con el nombre de la especie mejor conocida o aquella que reúne el mayor número de características distintivas para cada grupo. Entre dichos grupos, destaca el de *Epidendrum anisatum*, que está integrado por 18 especies, distribuidas principalmente en la región montañosa del Pacífico Mexicano (Tabla 1). Las especies de dicho grupo se distinguen por ser plantas con hábito cespitoso, con tallos sencillos y racimos cortos, producidos generalmente a partir de una inflorescencia terminal corta. Cada año aparecen nuevos racimos axilares a partir del racimo interior, inclusive después de que los tallos han perdido las hojas; las hojas principalmente se distribuyen en la mitad apical del tallo (**Figuras 1 y 21-17**).

Tabla 1. Especies reconocidas al interior del grupo de *Epidendrum anisatum* según Hágsater (1984) y García-Cruz (1995).

Hágsater, 1984	García-Cruz, 1995
<i>E. anisatum</i> La Llave	<i>E. anisatum</i> La Llave
<i>E. chloë</i> Reichenbach	No reconocida
<i>E. costatum</i> Richard	<i>E. costatum</i> Richard
<i>E. culmiforme</i> Schlechter	No reconocida
<i>E. cusii</i> Hágsater	<i>E. cusii</i> Hágsater
<i>E. dorsocarinarum</i> Hágsater	<i>E. dorsocarinarum</i> Hágsater
<i>E. duranguense</i> Hágsater	Sinónimo de <i>E. vandifolium</i>
<i>E. eustirum</i> Ames	No reconocida
<i>E. examinis</i> Rosillo de Velasco	<u>Sinónimo de <i>E. matudae</i></u>
<i>E. gasteriferum</i> Scheeren	<i>E. gasteriferum</i> Scheeren
<i>E. gladiatum</i> Lindley	Sinónimo de <i>E. anisatum</i>
<i>E. gomezii</i> Schlechter	<i>E. gomezii</i> Schlechter
<i>E. juerguensenii</i> Reichenbach	<i>E. juerguensenii</i> Reichenbach
<i>E. lignosum</i> La Llave	No reconocida
<i>E. marmoratum</i> Richard	No reconocida
<i>E. matudae</i> Williams	<i>E. matudae</i> Williams
<i>E. neogaliciense</i> Hágsater	<i>E. neogaliciense</i> Hágsater

<i>E. oaxacanum</i> Rolfe	<i>E. oaxacanum</i> Rolfe
<i>E. pastranae</i> Hágsater	<i>E. pastranae</i> Hágsater
<i>E. rosilloi</i> Hágsater	<i>E. rosilloi</i> Hágsater
<i>E. vandifolium</i> Lindley	<i>E. vandifolium</i> Lindley
<i>E. viridifuscatum</i> De Wildeman	No reconocida
No reconocida	<i>E. guerrerense</i> Hágsater
No reconocida	<i>E. hueycatenangense</i> Hágsater
No reconocida	<i>E. mixtecanum</i> Hágsater
No reconocida	<i>E. lowilliamsii</i> García-Cruz

En su revisión, García-Cruz (1995) incluyó en el grupo de *E. anisatum* 18 especies (**Tabla 1**), delimitando las especies con base en caracteres anatómicos de la hoja (e.g. grosor de la cutícula, número de haces vasculares en la vena media, posición de las células oclusivas de los estomas, etc.); así como palinológicos (e.g. aspecto de la caudícula, forma de las tétradas, etc.). No obstante, su trabajo es un estudio fenético, es decir, es un estudio basado en similitud general entre las especies, donde se emplearon caracteres morfológicos con la finalidad fue esclarecer límites interespecíficos en el grupo, sin considerar las relaciones de ancestría-descendencia. Dicho autor recuperó las siguientes agrupaciones: (*E. gasteriferum* ((*E. dorsocarinarum* y *E. lowilliamsii*) (*E. examinis*, (grupo I (grupo II y grupo III))))). El grupo I incluye *E. gomezii*, *E. costatum* y (*E. cusii* + *E. neogaliciense*). El grupo II incluye a *E. pastranae*, *E. rosilloi*, *E. juergensenii*, *E. vandofolium* y (*E. matudae* + *E. anisatum*), mientras que el grupo III está formado por *E. oaxacanum*, *E. hueycantenangense* y (*E. guerrerense* + *E. mixtecanum*).

El presente trabajo explora la utilidad de marcadores moleculares selectos para evaluar la monofilia del grupo de *E. anisatum* y los agrupamientos fenéticos obtenidos por García-Cruz (1995). Dichos marcadores se seleccionaron tomando bases en trabajos previos que los proponen. Lahaye *et al.* (2008), en su búsqueda de marcadores útiles para establecer un código

de barras genético para plantas, demostró la utilidad del espaciador intergénico (EIG) *trnH-psbA* y de la región *matK-trnK* en orquídeas. De manera similar, Marques *et al.* (2014), al estudiar los posibles mecanismos evolutivos que dieron origen a la actual diversidad de *Epidendrum*, mostró la resolución filogenética que la región *matK-trnK*, el intrón del gen *rps16* y el EIG *trnL-trnF* aportan. van den Berg (2000) y van den Berg *et al.* (2009) demostraron la utilidad de los marcadores plastidiales *matK-trnK*, el intrón de *trnL* y el EIG *trnL-trnF*, así como la región de los espaciadores internos transcritos del DNA ribosomal nuclear (ITS, por sus siglas en inglés), para resolver relaciones entre especies de la subtribu Laeliinae.

Si bien existe un estudio previo sobre el grupo de *E. anisatum* (García-Cruz, 1995), en él las relaciones filogenéticas del grupo no fueron exploradas. El presente trabajo busca, no solo resolver dichas relaciones, sino evaluar la monofilia del grupo, así como de los grupos recuperados por García-Cruz (1995) al interior de este. Para ello, se valió de la aplicación de métodos filogenéticos formales y el análisis de secuencias de ADN de diversas regiones plastídicas y nucleares. El contexto filogenético generado permitirá comprender con más claridad la evolución del grupo de *E. anisatum*, contribuyendo en nuestro entendimiento general sobre la evolución de *Epidendrum*.

Justificación

Aunque García-Cruz (1995), aclaró los límites de las especies del grupo de *E. anisatum* y resolvió la nomenclatura de las mismas, no exploró las relaciones de parentesco, ya que aplicó únicamente métodos de similitud fenética. La aplicación de métodos filogenéticos formales permitirá explorar las relaciones de parentesco entre las especies del grupo, así como evaluar su monofilia, y las relaciones filogenéticas de este grupo con respecto a otros linajes de *Epidendrum*. El contexto filogenético, aquí generado, contribuirá a futuros estudios macroevolutivos que investiguen las causas de la actual megadiversidad de *Epidendrum*.

Hipótesis

- 1) El grupo de *Epidendrum anisatum* conforma un grupo monofilético.
- 2) Las relaciones entre las especies que lo conforman serán congruentes con las agrupaciones propuestas por García-Cruz (1995).

Objetivos

- Evaluar la monofilia del grupo de *Epidendrum anisatum* (*sensu* García-Cruz, 1995).
- Explorar las relaciones filogenéticas de las especies que lo conforman, y con ello evaluar la monofilia de los grupos recuperados por García-Cruz (1995).

Materiales y métodos

Revisión bibliográfica

Se revisó la literatura taxonómica concerniente al género *Epidendrum* y algunos géneros relacionados, incluyendo tratamientos florísticos, estudios taxonómicos y filogenéticos, así como descripciones originales de las especies objeto del grupo interno (García-Cruz, 1995; Hágsater y Salazar, 1993; van den Berg, 2000; Hágsater y Soto Arenas, 2005; van den Berg *et al.*, 2009).

Muestreo taxonómico

El material vegetal fue obtenido de especímenes disponibles en la colección de plantas vivas del Herbario AMO o de la colección de tejidos y extractos de DNA del Dr. Gerardo A. Salazar, del Instituto de Biología de la UNAM. El muestreo taxonómico consistió en 28 especies (**Tabla 2**). Como grupo interno se incluyeron 13 de las 18 especies reconocidas por García-Cruz (1995) al interior del grupo de *E. anisatum*. Las cuatro especies faltantes corresponden a *E. rosilloi*, *E. dorsocarinatum*, *E. neogaliciense* y *E. vandifolium*, las cuales no fueron incluidas por falta de disponibilidad del material vegetal y/o la imposibilidad de su colecta en campo, al tratarse de localidades de difícil acceso. Como grupos externos se incluyeron 15 especies, diez de ellas representantes de los principales linajes del género *Epidendrum* reconocidos por Hágsater y Soto Arenas (2005), cuatro más pertenecientes a géneros de diferentes subtribus de la tribu Epidendreae, y una última representante de la tribu Dendrobieae (i.e. *Dendrobium officinale*), la cual se utilizó para arraigar los árboles (**Tabla 2**).

Tabla 2. Muestreo taxonómico empleado en el presente estudio.

Especie	Estado, país	No. lab	Colector, No. colecta	Código de Genbank: ITS; Región <i>matK-trnK</i> ; Región <i>trnH-psbA</i> ; EIG <i>trnL-trnF</i> ; Región <i>trnS-trnfM</i>
Grupo interno				
<i>E. anisatum</i> Lex.	Edo. de México, México	E026	Hágsater, 14559 (MEXU)	pendiente
<i>E. costatum</i> A.Rich. & Galeotti	Oaxaca, México	E148	Salazar, 8322, (MEXU)	pendiente
<i>E. cusii</i> Hágsater	Guerrero, México	E432	Salazar, 7467, (MEXU)	pendiente
<i>E. gasteriferum</i> Scheeren	Oaxaca, México	E147	Salazar, 7566, (MEXU)	pendiente
<i>E. gomezii</i> Schltr.	NA, NA	E304	Soto, 8620, (MEXU)	pendiente
<i>E. guerrerense</i> Hágsater	NA, NA	E504	Salazar, 9847, (MEXU)	pendiente
<i>E. hueycantenangense</i> Hágsater	Guerrero, México	E146	Salazar, 7292, (MEXU)	pendiente
<i>E. juergensenii</i> Rchb.f.	NA, NA	E145	Salazar, 7867, (MEXU)	pendiente
<i>E. lowilliamsi</i> García-Cruz	NA, NA	E519	Jiménez, 1246, (MEXU)	pendiente
<i>E. matudae</i> L.O.Williams	NA, NA	E080	Hágsater, 12621, (MEXU)	pendiente
<i>E. mixtecanum</i> Hágsater	NA, NA	E424	Salazar, 7578, (MEXU)	pendiente
<i>E. oaxacacum</i> Rolfe	México	E434	Sánchez, s/n, (MEXU)	pendiente
<i>E. pastranae</i> Hágsater	NA, NA	E438	Salazar, 8328, (MEXU)	pendiente
Grupo externo				

<i>E. eximium</i> L.O.Williams	NA, NA	E183	Hágsater, 11590, (MEXU)	pendiente
<i>E. longicaule</i> L.O.Williams	Jalisco, México	E013	Jiménez, 2763-B, (MEXU)	pendiente
<i>E. marmoratum</i> A.Rich. & Galeotti	NA, NA	E473	Pérez, s/n, (MEXU)	pendiente
<i>E. mixtum</i> Schltr.	NA, NA	E407	Soto, 6530, (MEXU)	pendiente
<i>E. nitens</i> Rchb.f.	NA, NA	E522	Dietz 12296, (MEXU)	pendiente
<i>E. nocturnum</i> Jacq.	Quintana Roo, México	E065	Hágsater 13963, (MEXU)	pendiente
<i>E. parkinsonianum</i> Hook.	NA, NA	E437	Salazar, 6406, (MEXU)	pendiente
<i>E. radicans</i> Pavón ex Lindl.	NA, NA	E521	Salazar, s/n, (MEXU)	pendiente
<i>E. radioferens</i> Hágsater	NA, NA	E520	Dietz 10122, (MEXU)	pendiente
<i>E. verrucosum</i> Sw.	NA, NA	E156	Soto, 7983, (MEXU)	pendiente
<i>Encyclia cordigera</i> (Kunth) Dressler	NA, NA	NA	NA	AY008528.1; AY396114.1; EU213735.1; AY422417.1; HM768328.1
<i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	NA, NA	NA	NA	AY429394.1; AY396102.1; EU140032.1; AY422405.1. NA
<i>Bletia purpurea</i> (Lam.) D.C.	NA, NA	NA	NA	AF302728.1; AY121719.1; NA; AY008451.1; NA
<i>Stelis emarginata</i> Lindl.	NA, NA	NA	NA	AF262845.1; AF265466.1; NA; AF265514.1; NA
<i>Dendrobium officinale</i> Kimura & Migo	NA, NA	NA	NA	GU339109.1; FJ794043.1; GQ153537.1; EF397937.1; NA

Selección de caracteres moleculares

Se secuenciaron los siguientes marcadores del cloroplasto:

- Región *trnH-psbA*: Abarca desde el gen *trnH*, pasando por el gen *rps19* y terminando en *psbA* (a través de dos espaciadores intergénicos). **(Figura3-A)**
- Región *matK-trnK*: Compuesta por el gen *matK* y porciones de los extremos 5' y 3' del intrón del gen *trnK*. La estructura de esta región es única por ubicarse *matK* dentro del gen *trnK*. **(Figura3-B)**
- Intrón *rps16*: Corresponde únicamente a la porción no codificante dentro del gen de *rps16*. **(Figura3-C)**
- Espaciador intergénico *atpI-atpH*: Abarca la porción no codificante del genoma plastidial ubicada entre los genes *atpI* y *atpH*. **(Figura3-D)**
- Región *trnS-trnfM*: Esta región abarca desde el gen *trnS* pasando por los genes *lhbA* y *trnG* (y sus correspondientes espaciadores intergénicos) hasta el gen *trnfM*. **(Figura3-E)**
- Región *trnL-trnF*: Esta región incluye al gen *trnL*, pasando por su intrón y dos exones, y llegando hasta el gen *trnF* a través del espaciador intergénico correspondiente. **(Figura3-F)**

Estos marcadores fueron seleccionados para este trabajo debido a su utilidad filogenética a nivel de género y especie previamente reportada en otros grupos de Orchidaceae (van den Berg, 2000; Lahaye *et al.*, 2008; Neubig *et al.*, 2009; van den Berg *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2010; Konhar *et al.*, 2016; **Figura 3**). Adicionalmente, se amplificó la región nuclear ITS (**Figura 4**),

que ha mostrado ser útil para estudiar las relaciones a nivel de especie en la familia (van den Berg *et al.*, 2009). ITS corresponde a la porción no codificante del genoma nuclear ubicada entre los exones codificantes del RNA ribosomal (unidad pequeña y grande del RNA ribosomal, Soltis *et al.*, 1992).

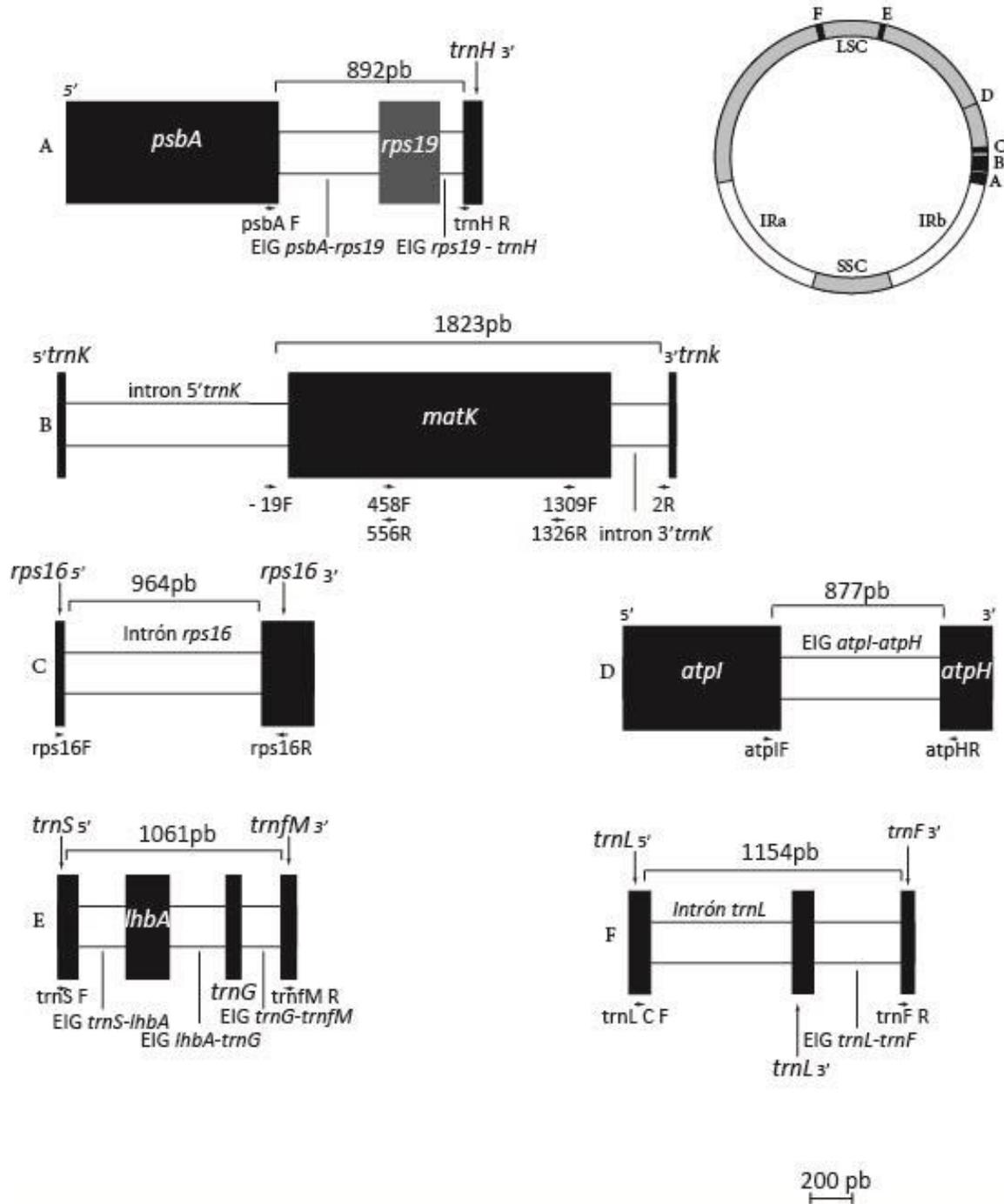


Figura 3. Estructura general de los marcadores plastidiales utilizados en el presente estudio y referidos en el texto con las letras A-F. Las longitudes y posición relativa de dichos marcadores en el plastoma se presentan usando como referencia *Dendrobium nobile* (No. de acceso a GenBank: KX377961.1; Konhar *et al.*, 2016). Los corchetes indican la longitud aproximada de la región amplificada. Las cajas negras y grises corresponden a genes que codifican en dirección o en contra de las manecillas del reloj del esquema mostrado, respectivamente.

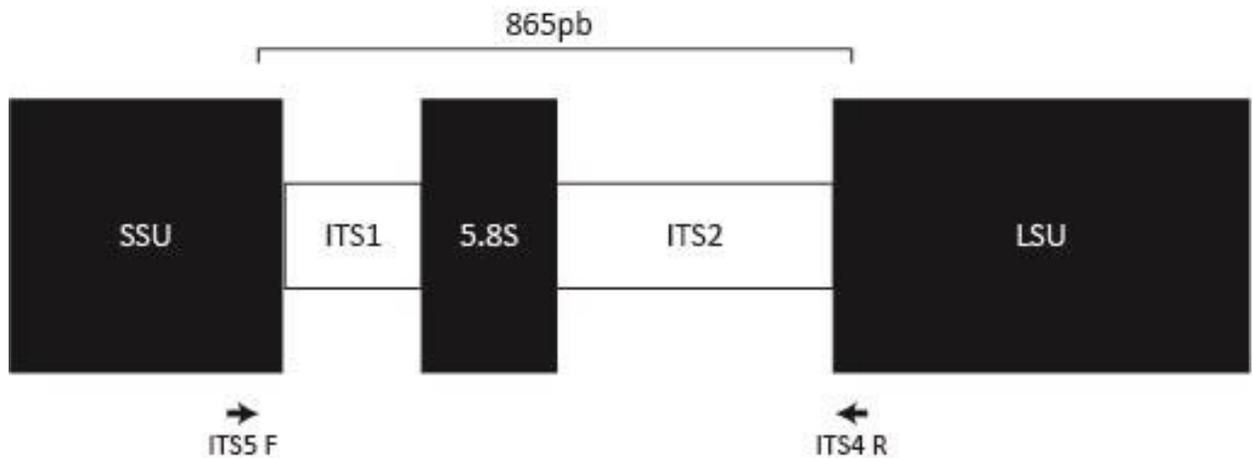


Figura 4. Estructura general de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), de la familia multigénica ribosomal nuclear. Las cajas negras y blancas corresponden a regiones codificantes y no codificantes, respectivamente (Soltis *et al.*, 1992).

Se hicieron pruebas para incluir más marcadores que los aquí presentados; sin embargo, éstos presentaron diferentes problemas que llevaron a su exclusión. Entre ellos se encuentra el marcador nuclear conocido como Espaciador Transcrito Externo (ETS por sus siglas en inglés), el cual mostró múltiples bandas en los geles de electroforesis. Dichos productos de PCR fueron escindidos del gel y purificados por separado; no obstante, los electroferogramas presentaron aún dobles picos. Es altamente probable que existan múltiples copias del ETS en las especies focales (debido a que ETS corresponde a toda una familia de genes) y que dichas copias tengan una longitud nucleotídica demasiado similar como para poder ser separados en un gel de electroforesis.

También se probaron dos regiones nucleares correspondientes a los genes AT3G19900 (proteína de función desconocida) y AT5G64050 (glutamato tRNA ligasa); sin embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos con la región ribosomal-nuclear ETS, sugiriendo la presencia de múltiples copias para dichos marcadores nucleares.

Otros marcadores plásticos considerados fueron el espaciador intergénico *rpob-trnC* y los intrones de los genes *rpL16* y *ycf1*. Estos marcadores no lograron ser amplificados, probablemente debido a la inespecificidad de los primers empleados.

Métodos moleculares

Extracción de DNA

Se extrajo ADN total a partir de material secado en gel de sílice usando una modificación por Salazar *et al.* (2003) del procedimiento del 2x CTAB descrito en Doyle y Doyle (1987). Para ello se molieron cerca de 20 mg de tejido seco y congelado con la ayuda del disruptor de tejidos TissueLyser (Quiagen) y balines metálicos. Al tejido ya molido se le agregaron 700 µl de CTAB con 4% de 2-mercaptoetanol, previamente calentado a 65°C. A dicha mezcla se le agregaron 7 µl de RNAsa (Quiagen), para ser posteriormente incubada a 65°C durante 45 min. Después de esta primera incubación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente por cinco min y se agregó proteinasa K (Quiagen), para incubar por segunda vez a 55°C por 30 min. La extracción se realizó con 600 µl de SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1), mezclando suavemente, varias veces, durante 15 min. El extracto fue centrifugado a 9,000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 min. El sobrenadante fue trasladado a un microtubo limpio, cuidando de no tomar la fase aceitosa ni los sólidos. El ADN fue precipitado por medio de la adición de lo equivalente a dos tercios del volumen del extracto obtenido de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C, invirtiendo el microtubo suavemente varias veces, hasta observar enturbiamiento de la mezcla. El extracto se dejó reposar durante 12 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 RPM durante 5 min, se descartó el alcohol y el precipitado fue lavado añadiéndole 500 µl de etanol al 70% a temperatura

ambiente. Se efectuaron tres lavados más, pero con etanol pre-enfriado a -20°C . El alcohol fue descartado y el precipitado limpio fue secado en una centrífuga al vacío durante 4 min y resuspendido en 55 μl de buffer AE (Quiagen). El extracto se evaluó en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed para confirmar la obtención de ADN de alto peso molecular.

Amplificación y secuenciación de las regiones de ADN de interés

La amplificación de las regiones de ADN de interés se efectuó por medio de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), usando la mezcla comercial “Taq PCR Core Kit” (Qiagen), en volúmenes de 15 μl . Se amplificó un solo par de primers para cada marcador, excepto para la región *matK-trnK*, que por su longitud requirió tres pares de primers (**Tabla 3**). En la **Tabla 4** se presentan los reactivos y cantidades que componen las mezclas para cada región. Los perfiles de temperatura utilizados para amplificar cada región se resumen en la **Tablas 5**. La obtención de producto de PCR se confirmó en un gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed. En caso de existir múltiples productos de PCR (bandas), éstas fueron cortadas individualmente para posteriormente ser purificadas con un kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

Tabla 3. Primers empleados para la amplificación de las regiones exploradas en el presente estudio, secuencia y referencia bibliográfica.

Marcador	Primer forward: 5'-3'	Autor
EIG <i>atpI-atpH</i>	atpI F: 5'-CCAAYCCAGCAGCAATAAC-3' atpH R: 5'-AGCTTGAATACCRCTTGTAATA-3'	(Provan <i>et al.</i> , 2004)
Región ITS	ITS 5 F: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ITS 4 R: 5'-TCCTCCCGTTATTGATATGC-3'	(White <i>et al.</i> , 1990)

Región <i>matK-trnK</i>	matK -19 F: 5'-CCGTTMTSACCATATTGC-3' matK 458 F: 5'-CTACTAATACCCYATCCCATC-3' matK 556 R: 5'-TGGATMAAAGATGTTYCTTC-3' matK 1309 F: 5'-GACTTTCTTGTGCTAGAACT-3' matK 1326 R: 5'-ACTTCGACTTTCGTGTGCTAGA-3' trnK 2R: 5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3'	(Johnson and Soltis, 1994; Molvray <i>et al.</i> , 2000)
Intrón de <i>rps16</i>	rps16 F: 5'-CCTGTAGGYTGNGCNCCYTT-3' rps16 R: 5'-AAACGATGTGGNAGNAARCA-3'	(Oxelman <i>et al.</i> , 1997)
Región <i>trnH-psbA</i>	trnH F: 5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3' psbA R: 5'-GAGCATTACGTTTCATGCATAAC-3'	(Sang <i>et al.</i> , 1995; Tate and Simpson, 2003)
EIG <i>trnL-</i> <i>trnF</i>	trnL F: 5'-CGAATTCGGTAGACGCTACG-3' trnF R: 5'-CTCGTGTCACCAGTTCAAAT-3'	(Taberlet <i>et al.</i> , 1991)
Región <i>trnS-trnfM</i>	trnS F: 5'-GAGAGAGAGCGATTCTGAACC-3' trnfM R: 5'-CCCGTGACCTCAAGGTTATG-3'	(Demesure <i>et al.</i> , 1995)

Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados en las reacciones de PCR de las regiones

Reactivos	Región <i>trnS-trnfM</i> , EIG <i>atpI-atpH</i>	Región <i>matK-trnK</i> , EIG <i>trnL-trnF</i>	Región <i>trnH-psbA</i>	Intrón <i>rps16</i>	ITS
ADN total	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL
H ₂ O	11.75 µL	12.03 µL	11.89 µL	12.03 µL	12.03 µL
PCR buffer 10X (MgCl ₂ 15 mM)	1.4 µL	1.4 µL	1.4 µL	1.4 µL	1.4 µL
Suero de albúmina bovina	0.56 µL	0 µL	0.56 µL	0.56 µL	0.56 µL
DNTPs-Mix 10mM de cada dNTP	0.28 µL	0.28 µL	0.28 µL	0.28 µL	0.28 µL
Primer forward	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL
Primer reverse	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL
MgCl ₂	0.28 µL	0.84 µL	0.42 µL	0.28 µL	0 µL
DMSO	0.28 µL	0 µL	0 µL	0 µL	0.28 µL
Polimerasa 5 U/µL	0.07 µL	0.07 µL	0.07 µL	0.07 µL	0.07 µL

Tabla 5. Programas de PCR utilizados en la amplificación de los marcadores.

	Temperatura/Tiempo					
	Región <i>matK-trnK</i>	Región <i>trnS-trnfM</i> , EIG <i>atpI-atpH</i>	EIG <i>trnL-trnF</i>	Intrón <i>rps16</i>	Región <i>trnH-psbA</i>	Región ITS
Pre-desnaturalización	94°C/2 min	94°C/2 min	94°C/2 min	94°C/2 min	94°C/1 min	94°C/2 min
Desnaturalización	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/30s	94°C/30 min	94°C/1 min
Re-naturalización	52°C/1 min	52°C/1 min	48°C/1 min	52°C/30s	53°C/40s	50°C/1 min
Extensión	72°C/2 min	72°C/1 min	72°C/3 min	72°C/1 min	72°C/40s	72°C/1.5 min
Número de ciclos	28	28	30	35	30	30
Extensión final	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/5 min	72°C/7 min

El marcador plastidial que incluye al intrón de *trnL* y al EIG *trnL-trnF*, aquí analizado, amplificó con facilidad para la mayoría de las especies; sin embargo, en *E. juergensenii* y *E. pastranae* se detectó una segunda copia de mayor longitud. Pruebas en otros linajes de Orchidaceae han detectado copias adicionales de mayor longitud para este marcador (Salazar *et al.*, 2016), la mayoría de ellas de un tamaño de 1,150 pb, y una minoría de alrededor de 450 pb. Estos resultados sugieren la posibilidad de que existan dos copias de este marcador en el genoma de las Orchidaceae. La amplificación de una u otra copia depende de pequeñas variaciones en los parámetros de amplificación por PCR, en nuestro caso la copia amplificada fue la más larga.

Edición de secuencias, alineamiento y codificación de indels

Las secuencias fueron editadas con el programa Sequencher v. 5 (Genes Codes Corp.) y alineadas usando el servidor en línea del paquete de alineamiento automatizado MAFFT (Katoh and Standley, 2013, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Posteriormente, los alineamientos fueron revisados y modificados manualmente, en caso de ser necesario, usando el programa PhyDE v. 0.9971 (Müller *et al.*, 2010, <http://www.phyde.de/download.html>). Los eventos de inserción-delección (indels) fueron codificados de manera manual por medio del método simple, propuesto por Simmons y Ochoterena (2000). Las inversiones encontradas se alinearon como indels para las especies que no contaran con ellas; en este trabajo se encontró una sola inversión de 35 pb de longitud en una especie (*E. mixtum*) en un solo marcador (región *trnS-trnfM*), por lo que no se realizó ninguna codificación especial para ella.

La matriz combinada de los marcadores plastídicos y el ITS consistió de 28 terminales y un total de 8,388 caracteres de los cuales 8,352 son posiciones de nucleótidos y 36 son indels, es

decir, porciones de inserciones o deleciones en la secuencia de DNA codificados. La **Tabla 6** muestra la longitud en pares de bases alineadas de cada uno de los marcadores analizados.

Tabla 6. Longitud en pares de bases alineadas de los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio.

	Longitud en pares de bases alineadas
Región <i>trnS-trnfM</i>	1,106 pb
Región <i>matK-trnK</i>	1,834 pb
Región <i>trnH-psbA</i>	1,033 pb
EIG <i>trnL-trnF</i>	1,150 pb
EIG <i>atpI-atpH</i>	877 pb
Intrón <i>rps16</i>	964 pb
ITS	865 pb

Análisis filogenéticos

Los distintos marcadores moleculares fueron analizados individualmente para evaluar su desempeño en la reconstrucción filogenética, y también se analizaron en dos matrices combinadas y particionadas incluyendo: 1) todos los marcadores plastidiales y 2) los marcadores plastidiales más la región nuclear ITS. El análisis individual del marcador ITS tiene una utilidad adicional a los demás, que consiste en proporcionar un árbol filogenético que muestre una historia evolutiva del núcleo celular, para así contrastar con el cloroplasto. Primero se realizó un análisis de la matriz combinada de cloroplasto y nuclear en PartitionFinder v1.1.0 (Lanfear *et al.*, 2012), con la finalidad de encontrar conjuntos de particiones a ser analizadas bajo el mismo modelo de sustitución molecular, así como para determinar el mejor modelo de sustitución molecular para dichos conjuntos. Con las particiones y modelos seleccionados por PartitionFinder (**Tabla 7**), se realizaron análisis de inferencia bayesiana de las matrices combinada de los marcadores plastidiales, plastidiales más la región nuclear ITS y de la región ITS individual. Los

análisis se realizaron con el programa MrBayes v3.2 (Ronquist *et al.*, 2012) y consistieron en dos corridas independientes y simultáneas de cuatro cadenas, cada una con 2,000,000 de generaciones y frecuencia de muestreo cada 500 generaciones. Mediante el programa Tracer v1.6 (Rambaut y Drummond, 2007) se confirmó la convergencia de los análisis y se verificó que los valores del tamaño de muestreo efectivo (ESS, “Effective Sample Size”) no fueran menores a 100 en ninguno de los parámetros. El “burn-in” se estableció en 10% de las cadenas markovianas llevadas a cabo. Los árboles consenso de compromiso, es decir, de componentes combinables (que no entran en conflicto con los árboles comparados), y las probabilidades posteriores de las ramas fueron calculados con los árboles retenidos después de la exclusión del burn-in (de 5414 a 7197). Los árboles de consenso resultantes fueron editados con el programa FigTree v. 1.4.0 (Rambaut, 2009).

Tabla 7. Modelos de sustitución molecular de mejor ajuste y esquemas de partición de los datos obtenidos con PartitionFinder.

Partición	Modelo evolutivo	Regiones analizadas
1	JC	Gen <i>atpI</i> , gen <i>trnH</i> , gen <i>rps19</i> , gen <i>trnF</i> , gen <i>trnS</i>
2	K81uf+I+G	EIG <i>atpI-atpH</i> , porción 5' del intrón <i>trnK</i> , exon <i>rps16</i> , EIG <i>rps19-psbA</i> , exon <i>psbA</i> , EIG <i>trnL-trnF</i> , intrón <i>trnL</i>
3	K81uf+I	Exón <i>atpH</i> , gen <i>matK</i> , EIG <i>trnH-rps19</i> , EIG <i>trnS-lhbA</i> , gen <i>lhbA</i> , EIG <i>lhbA-trnG</i> , gen <i>trnG</i>
4	TrN+G	ITS
5	F81	Porción 3' del intrón <i>trnK</i> , EIG <i>trnG-trnfM</i>

Resultados

PartitionFinder v1.1.0 distinguió 22 particiones de entre todos los datos de los siete marcadores utilizados (**Tabla 7**).

Considerando el número de ramas altamente apoyadas (Probabilidad Posterior, $PP \geq 0.85$) obtenido con cada marcador individual (independientemente de que fueran o no congruentes entre sí), los marcadores región *matK-trnK* e ITS fueron los más informativos, seguidos por los EIG *trnS-trnfM* y *atpI-atpH*, el intrón del gen *rps16* y los EIG *trnH-psbA* y *trnL-trnF* (**Figura 5**). Los árboles de los marcadores moleculares individuales (excepto ITS; Fig. 6) se encuentran en el **Anexo (Figuras 10 a 15)**.

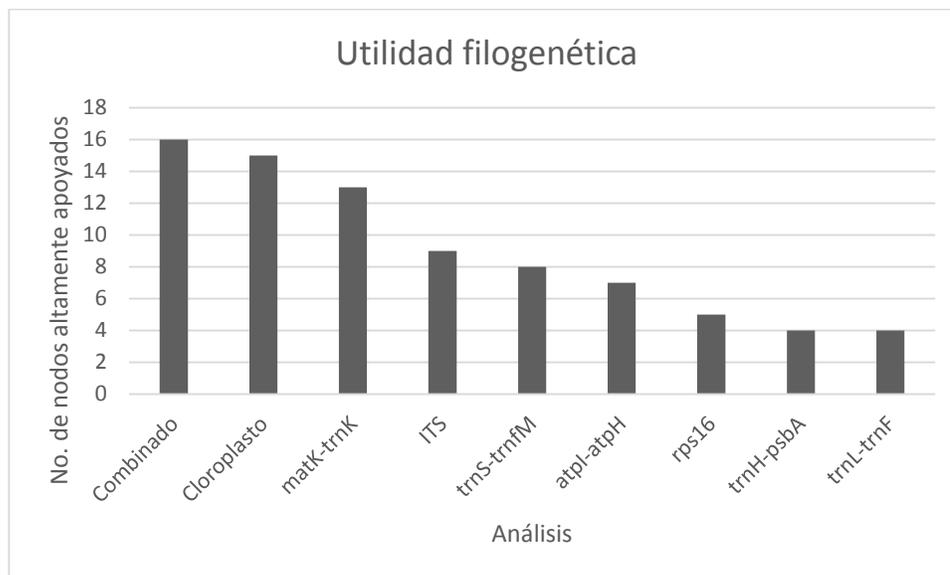


Figura 5. Utilidad filogenética proporcionada por cada marcador molecular con base en el número de ramas altamente apoyados ($PP \geq 0.85$).

El análisis del marcador ribosomal-nuclear ITS resultó en algunas relaciones topológicas altamente apoyadas, que son incongruentes con aquellas encontradas en los dos análisis

combinados (**Figura 6**). En la primera de ellas, el género *Epidendrum* no aparece como monofilético, pues incluye también a *Encyclia cordigera* como hermana de *Epidendrum marmoratum*. Varias otras especies y clados de *Epidendrum* no pertenecientes al grupo *E. anisatum* aparecieron altamente apoyados en diferente posición con respecto a los dos análisis combinados, incluyendo a *E. radioferens*, *E. parkinsonianum*, y *E. eximium*; el clado conformado por *E. mixtum*, *E. verrucosum*, *E. nitens*, *E. longicaule*, *E. nocturnum* y *E. radicans*; y la relación de grupo hermano entre el clado anterior y el grupo de *E. anisatum*. En contraste, el grupo de *E. anisatum* es fuertemente apoyado como monofilético (PP=1.00). Al interior del grupo de *E. anisatum* todas las relaciones fuertemente apoyadas son consistentes con los análisis combinados.

Los análisis de las matrices combinadas de cloroplasto, y cloroplasto más ITS (**Figuras 7 y 8**), mostraron las mismas relaciones filogenéticas con fuerte apoyo. El texto subsecuente sólo se referirá al árbol combinado de consenso de compromiso de todos los marcadores (**Figura 7**), haciendo referencia a los grupos altamente apoyados (PP \geq 0.85). Se obtiene un clado que incluye a *Cattleya forbesii*, *Encyclia cordigera* y todas las especies de *Epidendrum*. Al interior de éste se encuentra un clado conformado por *E. nocturnum* y *E. radicans*, como hermano de un linaje que contiene al resto de las especies del género. Dentro de este último linaje, forman un clado *E. nitens*, *E. mixtum* y *E. verrucosum*. Luego se forma un grado con *E. longicaule*, *E. marmoratum* y el resto de los *Epidendrum*. El siguiente clado apoyado es el del grupo de *E. anisatum*, que fue recuperado como monofilético y fuertemente apoyado (PP=1.00). Inmediatamente después se encuentra el clado de todos los miembros del grupo de *E. anisatum* excepto *E. gasteriferum*,

posicionándolo como la especie hermana del resto del grupo. Después, el grupo se divide en dos clados:

- 1) Clado 1: Conformado por *E. matudae*, *E. lowilliamsi*, *E. anisatum*, *E. gomezii* y *E. pastranae*. Después se forma un clado con todas las especies antes mencionadas, excepto *E. pastranae*, la cual se posiciona como hermana del resto del clado 1. Las relaciones someras restantes no se resuelven.
- 2) Clado 2: Conformado por *E. mixtecanum*, *E. oaxacanum*, *E. hueycantenangense*, *E. guerrerense*, *E. costatum* y *E. cusii*. Luego se forma un grado con *E. cusii* como la primera en divergir, seguida de *E. costatum*. El clado de las cuatro especies restantes (*E. mixtecanum*, *E. oaxacanum*, *E. hueycantenangense*, *E. guerrerense*) se mantiene bien apoyado, pero sin resolver las relaciones entre ellas.

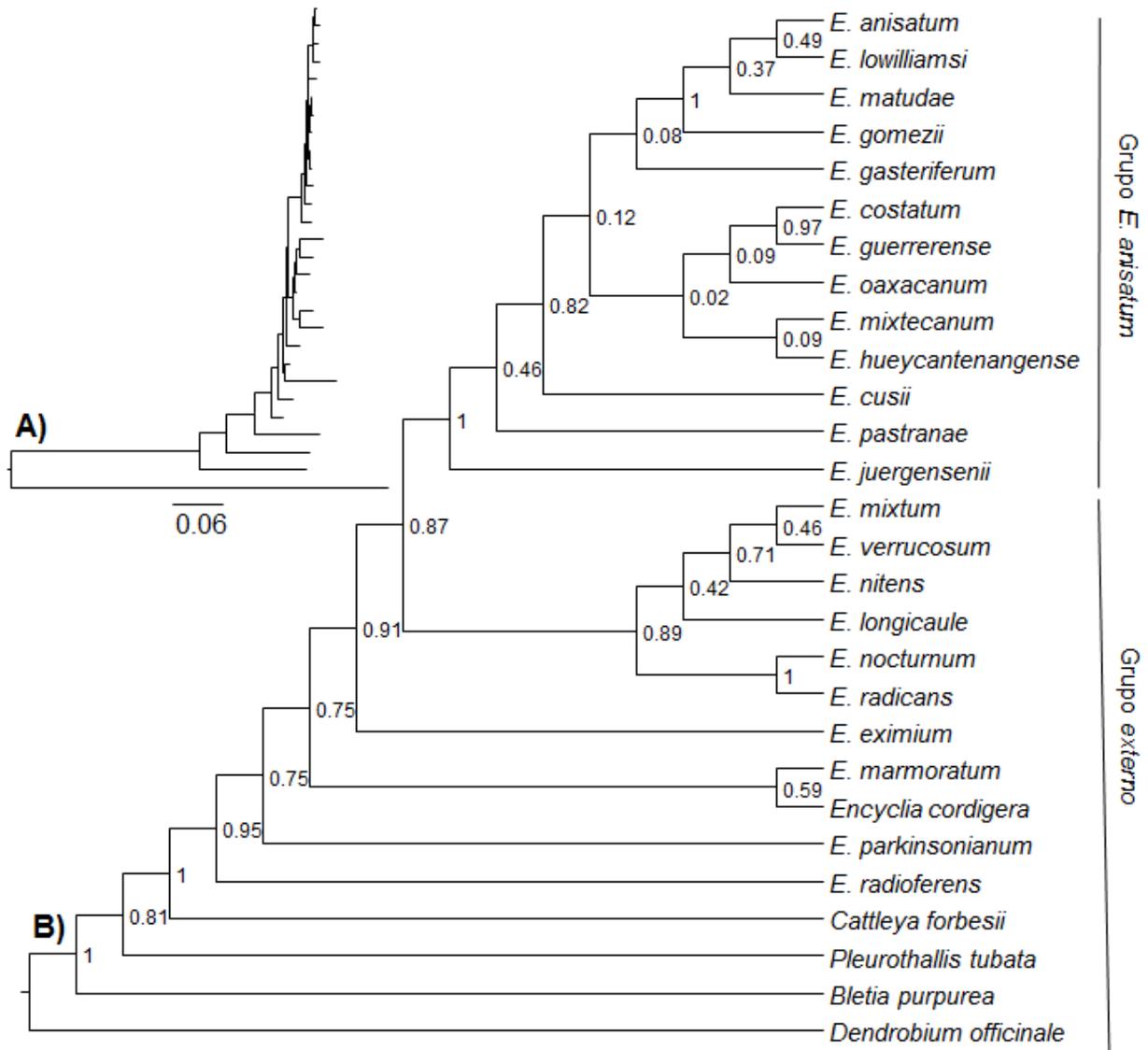


Figura 6. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia bayesiana de la matriz del marcador ribosomal-nuclear ITS, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

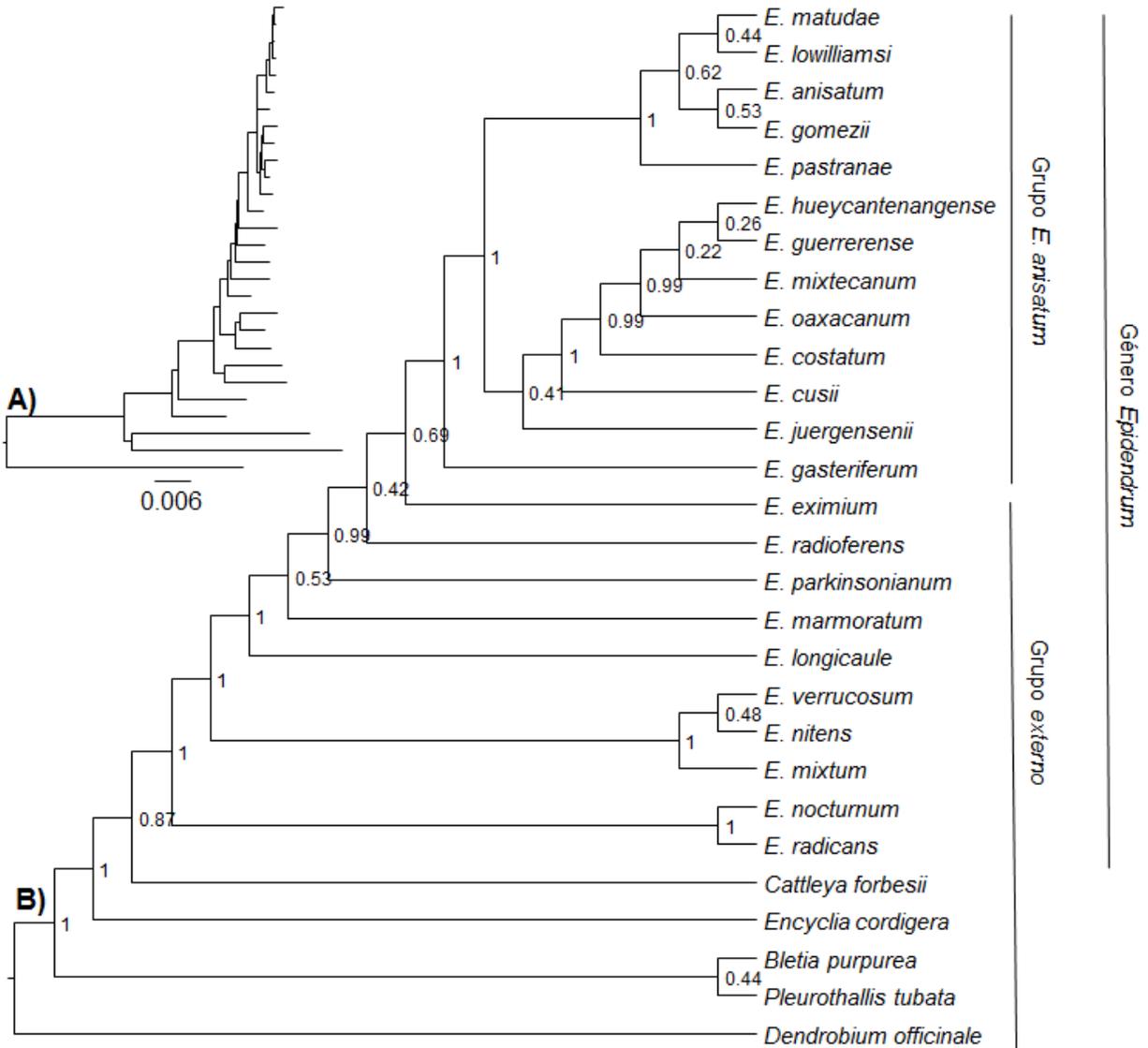


Figura 8. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia bayesiana de la matriz combinada de todos los marcadores de cloroplasto, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

Discusión

Utilidad filogenética de los marcadores empleados

El presente trabajo representa la primera evaluación formal de la monofilia y relaciones filogenéticas del grupo de *Epidendrum anisatum*, mediante la obtención y análisis de varios marcadores moleculares heredados por vía uniparental y biparental. Estudios previos en el grupo se habían enfocado únicamente en abordar propuestas prácticas de clasificación y delimitación de especies basadas en atributos morfológicos y anatómicos (García-Cruz, 1995; Hágsater, 1984). Sin embargo, ninguno de estos estudios aplicó métodos filogenéticos formales que permitieran evaluar la monofilia y relaciones dentro del grupo.

Nuestro análisis combinado de las regiones del cloroplasto y el ITS obtuvo un árbol resuelto (excepto en divergencias someras), en donde la mayoría de las relaciones filogenéticas están altamente apoyadas ($PP \geq 0.85$), concentrándose el bajo apoyo en ramas de longitud comparablemente más cortas, localizadas, tanto en divergencias someras como profundas. La resolución poco apoyada de grupos a los que subyacen ramas cortas, en donde los linajes divergen en sucesión rápida, es un problema común en muchos estudios filogenéticos (Granados Mendoza *et al.*, 2013; Naumann *et al.*, 2013; Rothfels *et al.*, 2012). En el caso de las ramas cortas y profundas, el bajo apoyo se ha atribuido a la baja probabilidad de que un carácter informativo cambie en un entrecruzamiento ancestral, permaneciendo sin cambios subsecuentes durante la evolución del linaje de interés. También es posible que las divergencias filogenéticas ocurrieran lo muy rápido como para que los marcadores conservados las registren y los marcadores con mayores tasas de cambio se hallen saturados; mientras que las ramas cortas y someras

representan divergencias recientes, a partir de las cuales pocos cambios moleculares podrían haberse acumulado (Townsend y Leuenberger, 2011; Townsend, 2007).

Los análisis combinado total y combinado de marcadores de cloroplasto, mostraron alta congruencia topológica, lo cual podría ser el resultado de la inclusión de una proporción considerablemente mayor de marcadores plastídicos, con relación al único marcador nuclear analizado. En contraste, el análisis individual del marcador nuclear (región ITS) mostró algunas relaciones altamente apoyadas, que no son congruentes con los resultados de los dos análisis combinados. La presencia de incongruencia topológica entre fuentes de datos plastídicos y nucleares ha sido reportada en varios linajes de angiospermas. Tal es el caso de las familias Plantaginaceae y Brassicaceae (Albach y Chase, 2004; Lihova *et al.*, 2006). Dichas incongruencias han sido atribuidas principalmente a posibles eventos de hibridación o poliploidización. Posiciones alternativas de un terminal, en filogenias obtenidas por medio de análisis separados, de fuentes de datos uniparentales y biparentales, pueden sugerir cuáles son las especies o linajes parentales que dieron origen a un taxón híbrido. Un ejemplo de ello es el estudio de Majure *et al.* (2012), el cual sugiere el origen híbrido de *Opuntia ficus-indica* (el nopal comestible), mediante la reconstrucción filogenética con marcadores plastidiales y el marcador nuclear ITS. En el caso de este análisis de *Epidendrum*, fue de gran importancia contrastar los resultados de los análisis separados de grupos de datos heredados por vías parentales distintas, como el caso de *E. juergensenii*, que aparece en diferentes clados en los diferentes análisis (aunque con bajo apoyo). Algunos estudios previos han reportado hibridación dentro del género *Epidendrum*, así como la presencia de especies poliploides (Pinheiro *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2014), sugiriendo que la

incongruencia topológica entre el marcador nuclear y los plastidiales, aquí encontrada, pudiera también deberse a alguno de estos procesos evolutivos.

Otra razón que puede explicar la incongruencia topológica entre el cloroplasto y el núcleo, es que la región ITS, formando parte de una familia multigénica de la que pueden estar presentes miles de copias por genoma nuclear, puede presentar homogenización incompleta de la familia de genes que lo conforma (Granados Mendoza *et al.*, 2015), siendo una posibilidad que la matriz de ITS incluya copias parálogas para algunas especies. Sin embargo, esta explicación alternativa no parece ser el caso para los datos presentes, ya que los geles de electroforesis mostraron una única banda (un solo producto de PCR) y los electroferogramas resultantes mostraron picos bien definidos, lo que indica que, en cada caso, solo una versión o copia fue amplificada y secuenciada. Esto, por ejemplo, no fue el caso de las pruebas con otro marcador ribosomal nuclear, el espaciador externo transcrito (ETS, por sus siglas en inglés; datos no mostrados), en donde se detectaron múltiples productos de PCR adicionales y posiciones con dobles picos en los electroferogramas.

Al considerar cada marcador individual, la región plastidial *matK-trnK* y el ITS fueron los más informativos en términos de número de ramas altamente apoyadas. La región *matK-trnK* incluye a al gen *matK* y porciones del intrón del gen *trnK*, dentro del cual se encuentra inmerso, por lo que este marcador es una combinación de regiones codificantes y no codificantes, las cuales, en conjunto, pueden ser informativas a diferentes profundidades taxonómicas. La utilidad filogenética de la región del *matK-trnK*, a niveles taxonómicos finos, ha sido corroborada por varios estudios filogenéticos previos en Orchidaceae (p. ej. tribu Arethuseae; subtribu Aeridinae, (Goldman *et al.*, 2001; Group *et al.*, 2009; Topik *et al.*, 2005)). Los trabajos de van den Berg (2000)

y van den Berg *et al.* (2009), corroboran la utilidad filogenética de *matK-trnK* en *Epidendrum* y géneros cercanos. Los marcadores ribosomales nucleares, por lo general, son más variables que aquellos provenientes del cloroplasto (van den Berg, 2000; Topik *et al.* 2005), lo cual es congruente con los resultados, en donde el ITS mostró un mayor número de grupos altamente apoyados respecto a casi todas las regiones del cloroplasto analizadas. Estudios previos en Orchidaceae, han reportado el uso exitoso del marcador ITS para resolver relaciones al nivel de especie en los géneros *Phalaenopsis* (Tsai *et al.* 2004) y *Dendrobium* (Tsai *et al.* 2005), mientras que el trabajo de Hågsater y Soto (2005) muestran la utilidad de ITS en el género *Epidendrum*.

Monofilia de *Epidendrum* y del grupo de *E. anisatum*

Una de las incongruencias topológicas más notables entre ITS y los marcadores de cloroplasto es la parafilia, en el primer caso, del género *Epidendrum* respecto a *Encyclia cordigera*. Si bien, históricamente, *Encyclia* y *Epidendrum* formaban parte de un solo género, ningún estudio filogenético formal previo ha encontrado a una especie de *Encyclia* dentro de *Epidendrum* (Hågsater y Soto, 2005). Si bien el apoyo es muy bajo, de acuerdo a los trabajos de van den Berg (2000) y van den Berg *et al.* (2009), *Encyclia* conforma su propio grupo, denominado “Alianza *Encyclia*”, el cual no fue recuperado como hermano o ni cercano al linaje de *Epidendrum*.

Pese a las incongruencias topológicas detectadas entre esas dos fuentes de datos, la monofilia del grupo de *E. anisatum* fue consistente en ambos casos (**Figuras 6 y 7**). Este resultado fue también corroborado por los análisis individuales de las regiones del cloroplasto *matK-trnK* y *trnS-trnfM*, mientras que los análisis individuales restantes carecieron de resolución filogenética a dicho nivel.

Relaciones filogenéticas al interior del grupo de *E. anisatum*

Los análisis filogenéticos recuperan dos linajes principales en el grupo de *E. anisatum*. El primero está conformado por *E. matudae*, *E. anisatum*, *E. lowilliamsi*, *E. gomezii* y *E. pastranae*, especies distribuidas en la Sierra Madre Occidental, el Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Madre del Sur. El segundo linaje está integrado por *E. mixtecanum*, *E. oaxacanum*, *E. hueycantenangense*, *E. guerrerense*, *E. costatum* y *E. cusii*, todas distribuidas en la Sierra Madre del Sur, en el estado de Oaxaca, excepto *E. cusii*, presente en la región del Eje Neovolcánico Transversal, en el Estado de México y la Sierra Madre del Sur, en el extremo occidental de Guerrero; y *E. guerrerense* distribuido en la región del extremo Oeste de la Sierra Madre Occidental, en Guerrero. *Epidendrum gasteriferum*, la especie hermana al resto de las especies del grupo *E. anisatum*, se distribuye en la Sierra Madre del Sur, en Oaxaca. En el caso de *E. juergensenii*, distribuida en los estados de Oaxaca y Veracruz, nuestros resultados no produjeron una indicación altamente apoyada de su posición filogenética. En general, el grupo de *E. anisatum* habita principalmente los bosques de encino, entre los 1200-2000 msnm.

García-Cruz (1995), definió tres grupos principales en su fenograma (Fig. 9), basado en caracteres morfológicos y anatómicos, ubicando a algunas especies (*E. examinis*, *E. dorsocarinatum*, *E. lowilliamsi* y *E. gasteriferum*), al exterior de dichos grupos. Los grupos de García-Cruz (1995) están compuestos de la siguiente forma:

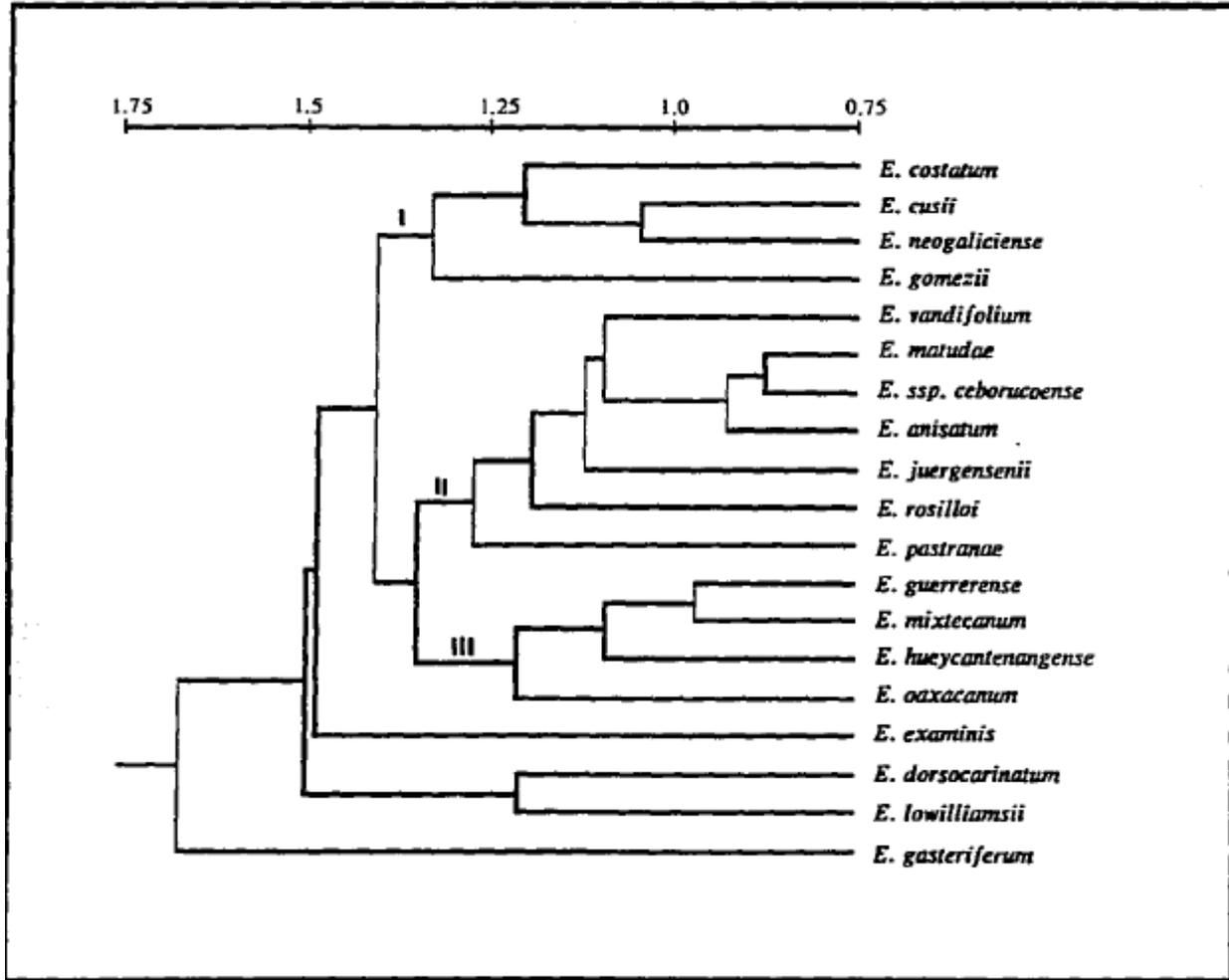


Figura 9. Fenograma resultante del estudio de García-Cruz (1995), los grupos I, II y III son los resultantes del análisis de conglomerados realizado en el mismo. Figura modificada de García-Cruz (1995).

En conjunto, los grupos I y II, de dicho autor, corresponden casi por completo al clado 1 rescatado en el presente estudio, mientras que el tercer grupo corresponde al clado 2. Sin embargo, dicha correspondencia no es exacta, ya que *E. costatum* y *E. cusii* se ubicaron al interior del clado 2. Los resultados del presente estudio posicionan a *E. gasteriferum* como la primera especie divergente del grupo *E. anisatum*; de manera similar, García-Cruz (1995) denota a esta especie como la más diferente morfológicamente a todas las demás del grupo. Una diferencia

entre la agrupación de García-Cruz (1995) y el presente trabajo, es que *E. lowilliamsi* y *E. examinis* (sinónimo de *E. matudae*) forman parte del clado 1, y no están escalonadas junto con *E. gasteriferum*.

La filogenia obtenida muestra congruencia con la morfología del labelo. Las flores de *E. costatum*, *E. cusii*, *E. guerrerense*, y *E. hueycantenangense* se distinguen por tener labelos anchos, ligeramente lobados. Por otro lado, *E. anisatum*, *E. matudae*, *E. juergensenii*, y *E. lowilliamsi* tienen labelos más angostos, rotundamente trilobados. Las excepciones son *E. pastranae*, perteneciente al clado 1, que tiene el labelo ancho y ligeramente trilobado, y *E. gomezii*, perteneciente a este mismo clado, pero presentando un labelo ancho y escasamente trilobado. De igual manera, *E. oaxacatum*, especie del clado 2, presenta un labelo angosto, notoriamente trilobado.

Conclusiones y consideraciones a futuro

El grupo de *E. anisatum* fue encontrado como monofilético con un alto apoyo, tanto por los marcadores de cloroplasto, como por la región nuclear analizada. La mayoría de las relaciones filogenéticas obtenidas al interior del grupo recibieron alto apoyo, con excepción de aquellas correspondientes principalmente a las divergencias más recientes. Los resultados muestran una congruencia parcial con grupos propuestos por García-Cruz (1995). Las diferencias principales son que dicho trabajo separa en dos grupos (I y II) al clado 1, recuperado con alto apoyo como monofilético, y *E. lowilliamsi* no aparece agrupado con *E. matudae*, *E. anisatum*, *E. gomezii* o *E. pastranae* (como sí ocurre en el presente análisis). De igual manera, se observó congruencia morfológica en lo que respecta la forma del labelo. Dichos caracteres florales, así como otros caracteres vegetativos y reproductivos, adicionales, podrían ser analizados en el futuro bajo el contexto filogenético aquí generado.

Estudios futuros, que busquen mejorar la resolución y apoyo filogenético, aquí obtenidos, requerirán la inclusión de marcadores adicionales, tanto plastidiales como nucleares. Además, un muestreo mucho mayor de especies representativas de los diferentes linajes del género, identificados por Hágsater y Soto (2005), permitirá establecer un linaje hermano del grupo *E. anisatum*. La inclusión en el futuro de otros marcadores heredados biparentalmente, como son los genes nucleares de pocas o una copia, permitiría contrastar las incongruencias topológicas entre el marcador nuclear ITS y los marcadores plastídicos detectados aquí.

Bibliografía citada

- Albach, D.C., Chase, M.W., 2004. Incongruence in Veroniceae (Plantaginaceae): evidence from two plastid and a nuclear ribosomal DNA region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 183–197. doi:10.1016/j.ympev.2003.12.001
- Almeida, A.M., Figueiredo, R.A., 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Braz. J. Biol.* 63: 551–558.
- Ames, O., Schweinfurth, C., Hubbard, F.T., 1875-1936. The genus *Epidendrum* in the United States and Middle America. Botanical Museum, Cambridge, Mass.
- Bentham, G., Hooker, J.D., 1883. Genera plantarum: ad exemplaria imprimis in Herbariis Kewensibus servata definita /auctoribus G. Bentham et J.D. Hooker. A. Black, Londres :
- Bierzzychudek, P., 1981. *Asclepias*, *Lantana*, and *Epidendrum*: A Floral Mimicry Complex? *Biotropica* 13, 54–58. doi:10.2307/2388070
- Cameron, K.M., Chase, M.W., Whitten, W.M., Kores, P.J., Jarrell, D.C., Albert, V.A., Yukawa, T., Hills, H.G., Goldman, D.H., 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcl* nucleotide sequences. *Am. J. Bot.* 86: 208–224.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., van den Berg, C., Schuiteman, A., 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 177: 151–174. doi:10.1111/boj.12234
- Demesure, B., Sodzi, N., Petit, R.J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4: 129–134. doi:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00201.x
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19 11–15.
- Frodin, D.G., 2004. History and concepts of big plant genera. *Int. Assoc. Plant Taxon.* 53.
- García-Cruz, C.J., 1995. Sistemática del grupo *Epidendrum anisatum* (Orchidaceae). Tesis de grado de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Goldman, D.H., Freudenstein, J.V., Kores, P.J., Molvray, M., Jarrell, D.C., Whitten, W.M., Cameron, K.M., Jansen, R.K., Chase, M.W., 2001. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) Based on Plastid *matK* and *rbcl* Sequences. *Syst. Bot.* 26: 670–695. doi:10.1043/0363-6445-26.3.670
- Granados Mendoza, C., Naumann, J., Samain, M.-S., Goetghebeur, P., De Smet, Y., Wanke, S., 2015. A genome-scale mining strategy for recovering novel rapidly-evolving nuclear single-copy genes for addressing shallow-scale phylogenetics in *Hydrangea*. *BMC Evol. Biol.* 15: 132. doi:10.1186/s12862-015-0416-z

- Granados Mendoza, C., Wanke, S., Salomo, K., Goetghebeur, P., Samain, M.-S., 2013. Application of the phylogenetic informativeness method to chloroplast markers: a test case of closely related species in tribe Hydrangeeae (Hydrangeaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 66: 233–242. doi:10.1016/j.ympev.2012.09.029
- Group, C.P.W., Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J., Graham, S.W., James, K.E., Kim, K.-J., Kress, W.J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S.C.H., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K.S., Cameron, K.M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J.J., Conrad, F., Devey, D.S., Ford, C.S., Hedderon, T.A.J., Hollingsworth, M.L., Husband, B.C., Kelly, L.J., Kesanakurti, P.R., Kim, J.S., Kim, Y.-D., Lahaye, R., Lee, H.-L., Long, D.G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S.G., Park, C.-W., Percy, D.M., Petersen, G., Richardson, J.E., Salazar, G.A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M.J., Yi, D.-K., Little, D.P., 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 12794–12797.
- Hágsater, E., 1984. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. En: Tan KW (eds.), Proceedings 11th World Orchid Conference, pp: 195-201. Miami, Florida.
- Hágsater, E., 1978. *Epidendrum cusii* y *Epidendrum pastranae*: Dos especies nuevas del sur de México. *Orquídea* 7.
- Hágsater, E., Salazar, G., 1993. The Genus *Epidendrum* Part 1 “A century of new species in *Epidendrum*” 2. *Icones Orchidacearum*.
- Hágsater, E., Soto Arenas, M.A., 2005. *Genera Ochidacearum*. Oxford University Press.
- Johnson, L.A., Soltis, D.E., 1994. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s.s. *Syst. Bot.* 19, 143–156.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Konhar, R., Biswal, D.K., Debnath, M., Parameswaran, S., Sundar, D., Tandon, P., 2016. Complete Chloroplast Genome Sequence of *Dendrobium nobile* from Northeastern India. *Genome Announc.* 4, e01088-16. doi:10.1128/genomeA.01088-16
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V., 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2923–2928. doi:10.1073/pnas.0709936105
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guidon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection or partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29 (6), 1695–1701. doi:http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss020
- Lihova, J., Shimizu, K.K., Marhold, K., 2006. Allopolyploid origin of *Cardamine asarifolia* (Brassicaceae): incongruence between plastid and nuclear ribosomal DNA sequences solved by a single-copy nuclear gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 759–786. doi:10.1016/j.ympev.2006.01.027

- Lindley, J., 1841. Notes upon the genus *Epidendrum*. *J. Bot. Hooker* 3.
- Magallón, S., Gómez-Acevedo, S., Sánchez-Reyes, L.L., Hernández-Hernández, T., 2015. A metacalibrated time-tree documents the early rise of flowering plant phylogenetic diversity. *New Phytol.* 207: 437–453. doi:10.1111/nph.13264
- Majure, L.C., Puente, R., Griffith, M.P., Judd, W.S., Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2012. Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *Am. J. Bot.* 99, 847–864. doi:10.3732/ajb.1100375
- Marques, I., Draper, D., Riofrío, L., Naranjo, C., 2014. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *BMC Evol. Biol.* 14, 20. doi:10.1186/1471-2148-14-20
- Molvray, M., Kores, P.J., Chase, M.W., 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters, in: Wilson, K.L., Morrison, D.A. (Eds.), *Monocots: Systematic and Evolution*. CSIRO, Melbourne.
- Monteiro, S.H.N., Selbach-Schnadelbach, A., Oliveira, R.P. de, Berg, C. van den, 2010. Molecular Phylogenetics of *Galeandra* (Orchidaceae: Catasetinae) Based on Plastid and Nuclear DNA Sequences. *Syst. Bot.* 35, 476–486. doi:10.1600/036364410792495944
- Moya, S., Ackerman, J.D., 1993. Variation in the floral fragrance of *Epidendrum ciliare* (Orchidaceae). *Nord. J. Bot.* 13, 41–47. doi:10.1111/j.1756-1051.1993.tb00009.x
- Müller, K., Müller, J., Quandt, D., 2010. PhyDE - Phylogenetic Data Editor.
- Naumann, J., Salomo, K., Der, J.P., Wafula, E.K., Bolin, J.F., Maass, E., Frenzke, L., Samain, M.-S., Neinhuis, C., dePamphilis, C.W., Wanke, S., 2013. Single-Copy Nuclear Genes Place Haustorial Hydnoraceae within Piperales and Reveal a Cretaceous Origin of Multiple Parasitic Angiosperm Lineages. *PLoS ONE* 8, e79204. doi:10.1371/journal.pone.0079204
- Neubig, K.M., Whitten, W.M., Carlswald, B., Blanco, M., Endara, L., Williams, N.H., Moore, M., 2009. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK*. *Plant Syst. Evol.* 277, 75–84.
- Oxelman, B., Lidén, M., Berglund, D., 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst. Evol.* 206, 393–410. doi:10.1007/BF00987959
- Pinheiro, F., De Barros, F., Palma-Silva, C., Meyer, D., Fay, M.F., Suzuki, R.M., Lexer, C., Cozzolino, S., 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Mol Ecol* 19. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04780.x
- Provan, J., Biss, P.M., McMeel, D., Mathews, S., 2004. Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Mol. Ecol. Notes* 4, 262–264. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00636.x
- Rambaut, A., 2009. FigTree. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1. 4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>)
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Rothfels, C.J., Larsson, A., Kuo, L.-Y., Korall, P., Chiou, W.-L., Pryer, K.M., 2012. Overcoming deep roots, fast rates, and short internodes to resolve the ancient rapid radiation of eupolypod II ferns. *Syst. Biol.* 61, 490–509. doi:10.1093/sysbio/sys001
- Salazar, G., Chase, M.W., Soto Arenas, M.A., Ingrouille, M., 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *Am. J. Bot.* 90(5), 777–795.
- Salazar, G.A., Cabrera, L.I., Gerlach, G., Hágsater, E., Chase, M.W., 2016. Phylogenetic relationships in *Mormodes* (Orchidaceae, Cymbidieae, Catasetinae) inferred from nuclear and plastid DNA sequences and morphology. *Phytotaxa* 263, 13.
- Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F., 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6813–6817.
- Simmons, M.P., Ochoterena, H., 2000. Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. *Syst. Biol.* 49(2), 369–381.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J. (Eds.), 1992. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, in: *Molecular Systematics of Plants*. Springer US, New York, pp. 2–42.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17. doi:10.1007/BF00037152
- Tate, J.A., Simpson, B.B., 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* 28, 723–737. doi:10.1043/02-64.1
- Topik, H., Yukawa, T., Ito, M., 2005. Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences. *J. Plant Res.* 118, 271–284. doi:10.1007/s10265-005-0217-3
- Townsend, J.P., Leuenberger, C., 2011. Taxon sampling and the optimal rates of evolution for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 60, 358–365. doi:10.1093/sysbio/syq097
- van den Berg, C., 2000. Molecular phylogenetics of tribe Epidendreae with emphasis on subtribe Laeliinae (Orchidaceae). Tesis de grado de doctorado, Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Soto-Arenas, M.A., Chase, M.W., 2009. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Ann. Bot.* 104, 417–430. doi:10.1093/aob/mcp101

Villaseñor, J.L., 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. *Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich*, Publishers, San Diego, California, pp. 315–322

Anexo

Árboles resultantes de los análisis individuales de las regiones empleadas en el presente estudio.

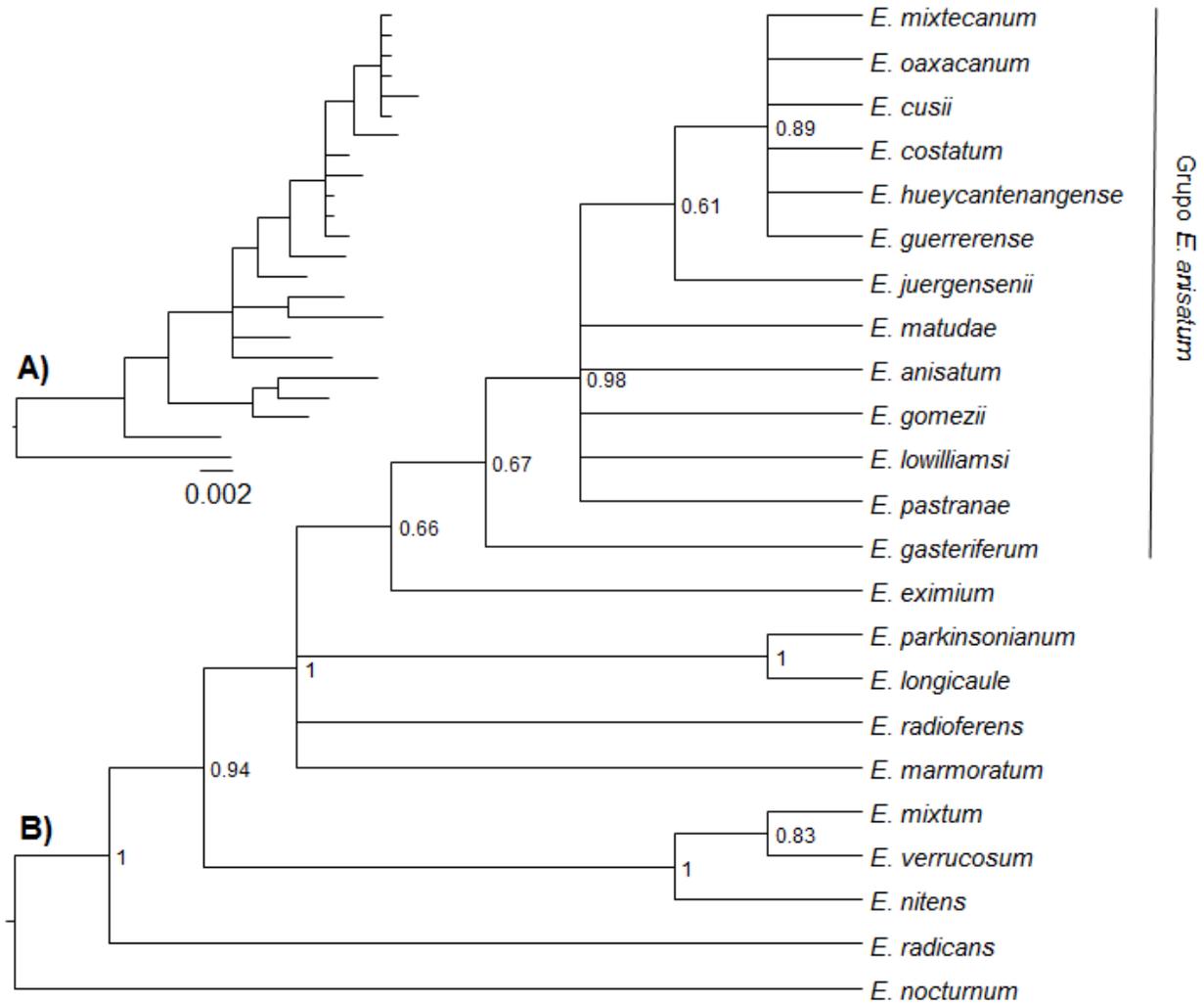


Figura 10. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del EIG *atpI-atpH* del cloroplasto, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

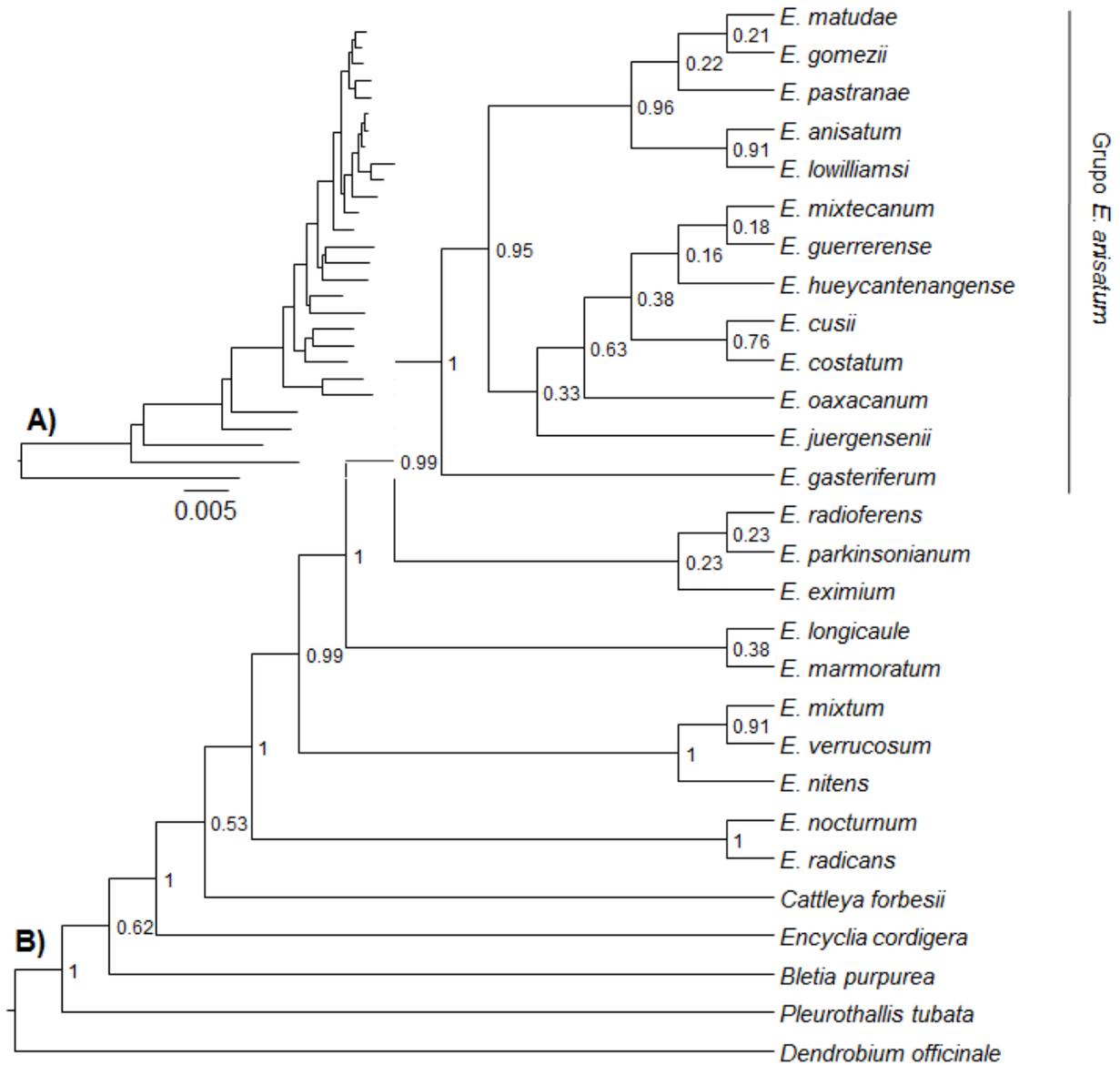


Figura 11. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz de la región plastidial *matK-trnK*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

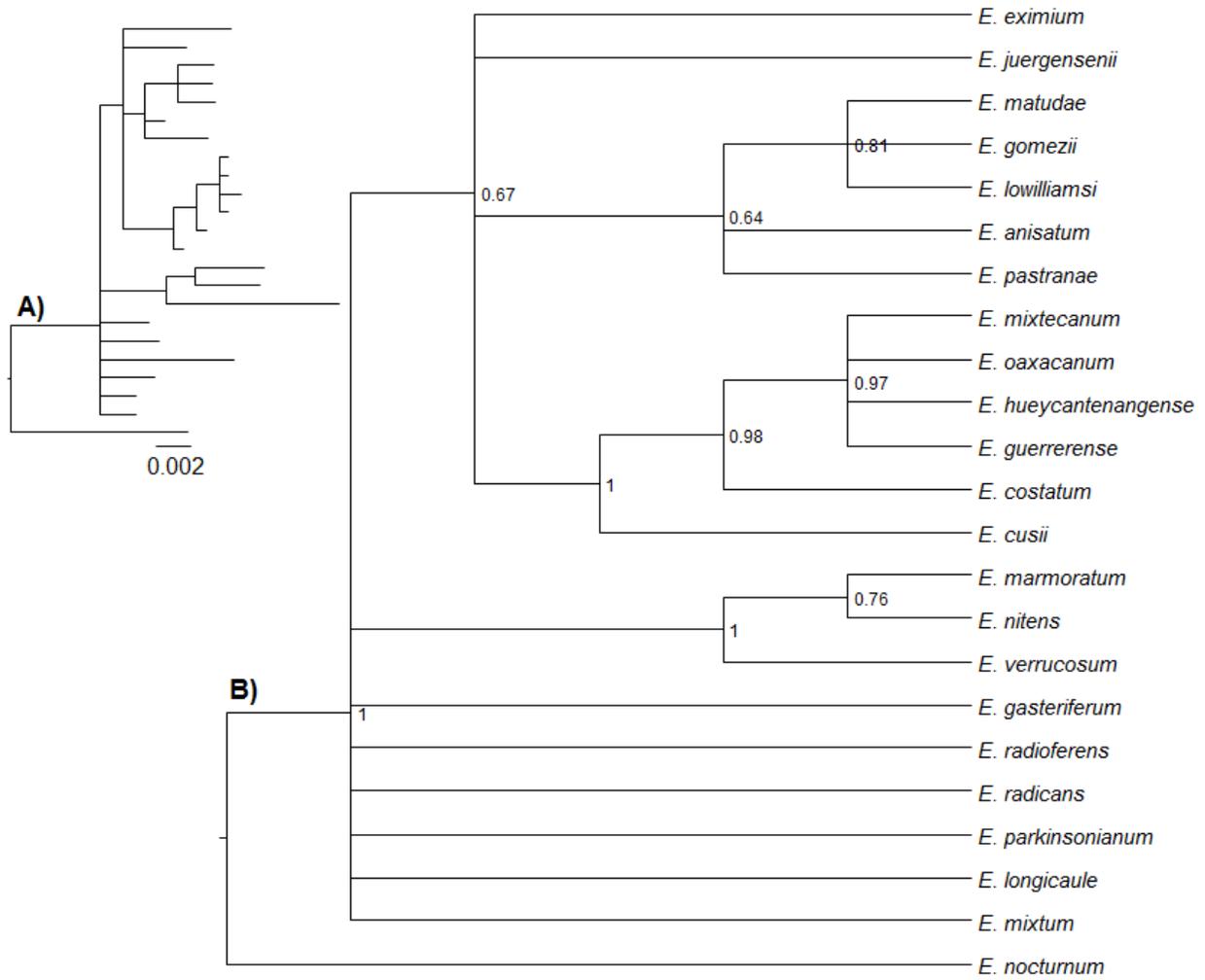


Figura 12. Árbol consenso de compromiso resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del intrón plastidial *rps16*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

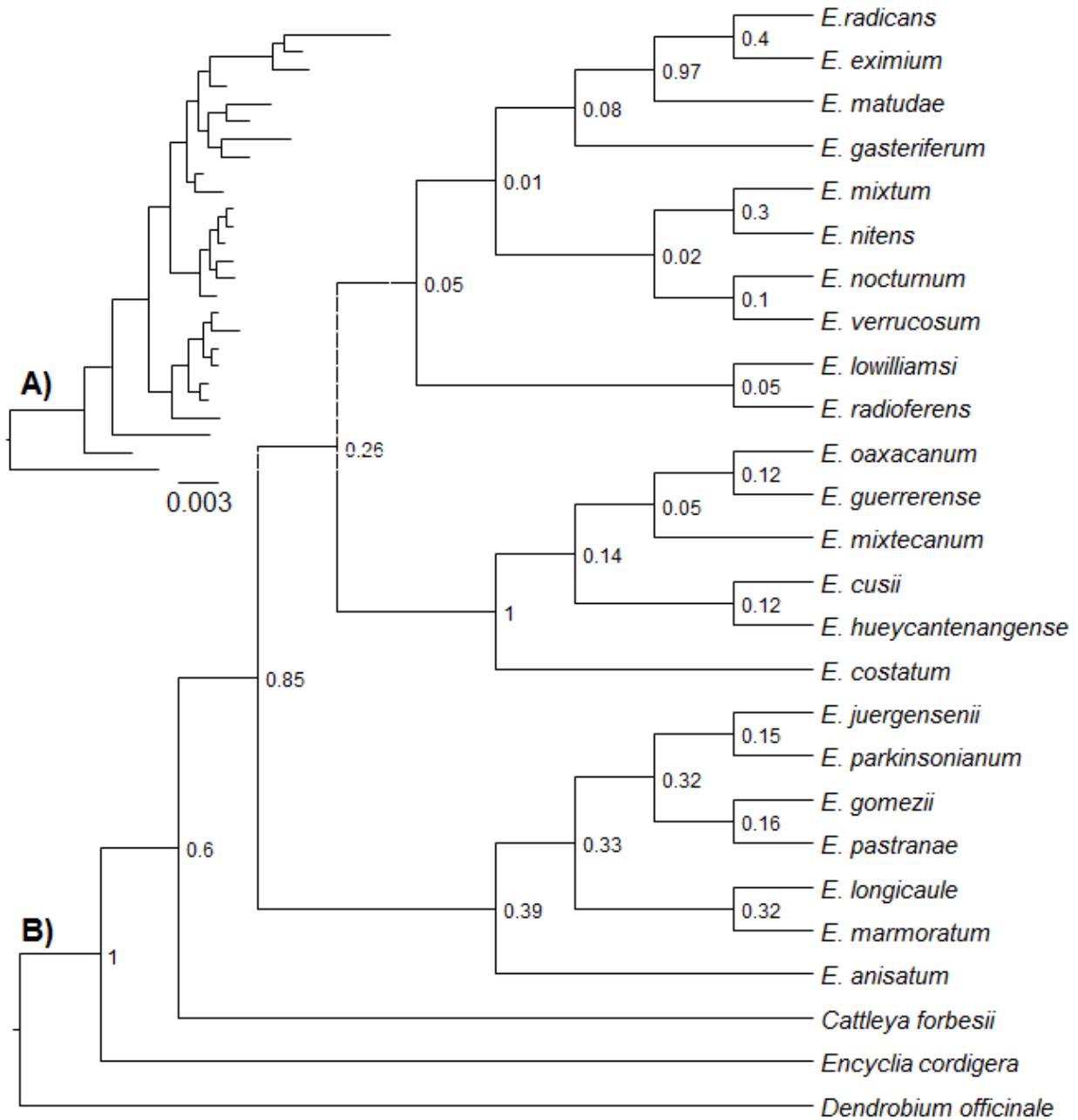


Figura 13. Árbol consenso comprometido resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del EIG plastidial *trnH-psbA*, incluyendo 28 especies (13 del grupo interno y 15 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

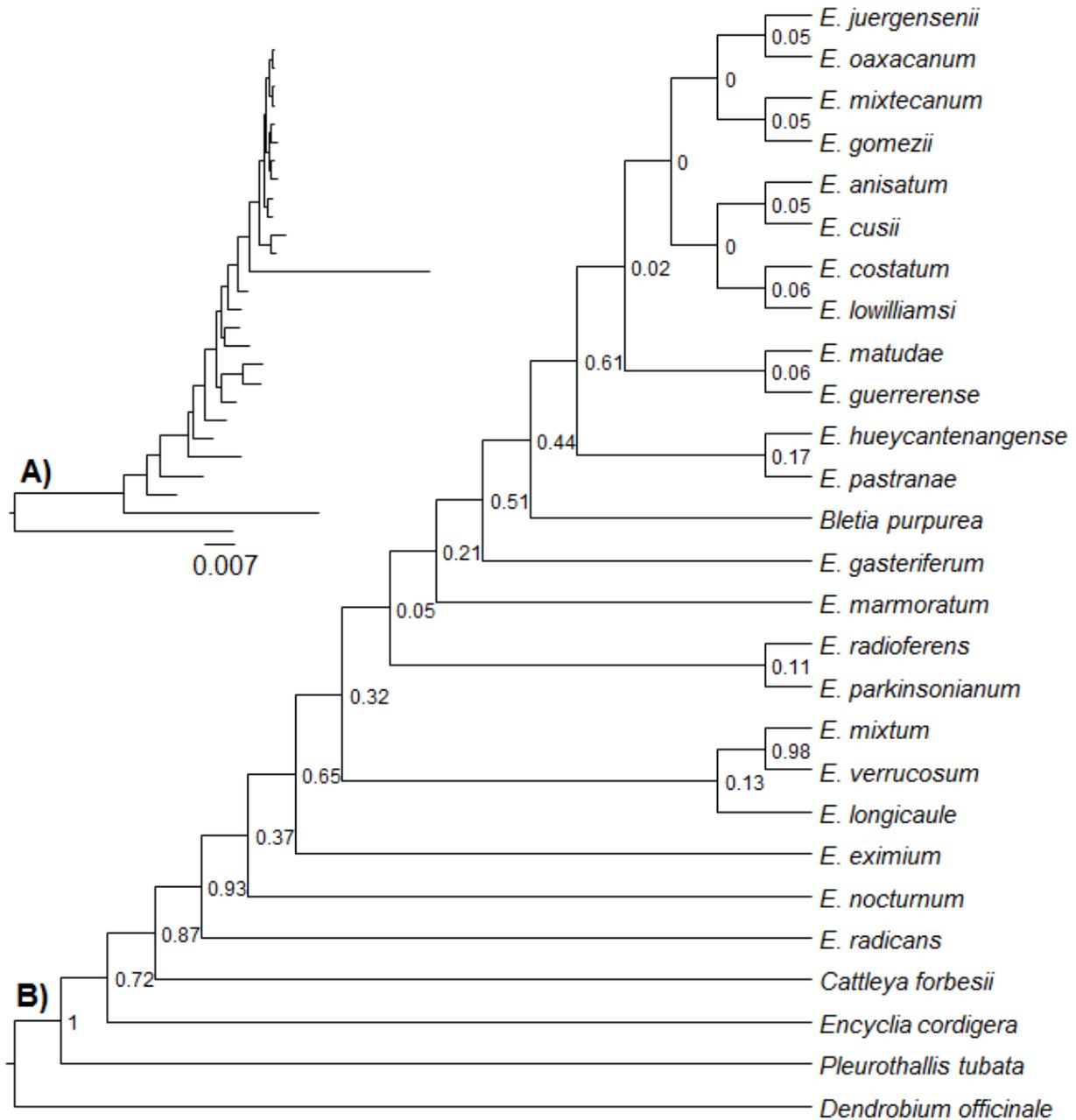


Figura 14. Árbol consenso comprometido resultante del análisis de inferencia Bayesiana de la matriz del EIG plastidial *trnL-trnF*, incluyendo 27 especies (13 del grupo interno y 14 del grupo externo). Para facilitar la visualización, el largo de las ramas fue modificado a manera de cladograma en (B), mientras que (A) muestra la configuración original del largo de ramas. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior obtenida para cada clado.

Glosario de términos botánicos

Adnado: Adherido, conrescente. Órganos o partes de órganos diferentes que se unen o fusionan parcialmente, como ocurre entre los pétalos y los estambres.

Cespitoso: Tipo de crecimiento donde la planta crece corta y muy junta a manera de césped, como el pasto.

Célula oclusiva: Cada una de las dos células que forman un estoma, es sinónimo de célula guarda.

Columna: Estructura formada por la adnación de los estambres, estilo y estigma en las flores de las orquídeas. Sinónimo de ginandro y ginostemio.

Corimbo: Inflorescencia formada por agrupaciones de flores con pedicelos de diferentes largos pero cuyas flores llegan al mismo nivel o altura. Puede ser una inflorescencia simple o compuesta y cimosa o racemosa.

Cutícula: Capa impermeable y cerosa sobre la cara externa de las células epidérmicas. Protege a las plantas de la desecación, generalmente cubre totalmente a la planta a excepción de las raíces, los órganos sumergidos de las plantas acuáticas y de algunas briofitas *sensu lato*.

Dístico: Posición de órganos o apéndices que se arreglan en dos filas verticales opuestas. Generalmente se utiliza para referirse a la disposición de las hojas sobre los tallos.

Estigma: En angiospermas, es la zona apical del pistilo de las flores, en donde se reciben los granos de polen. Puede tener diversas formas.

Fusiforme: Con forma de uso, elipsoide, el centro ancho y adelgazado hacia los extremos.

Labelo: Tépallo medio de las orquídeas que asume una posición basal, con mayor tamaño que los cinco restantes y cuya función principal es la de atraer a los polinizadores.

Lámina: Porción aplanada de las hojas, tiene dos caras: haz y envés o adaxial y abaxial.

Monopodial: Condición en la que se presenta un eje principal de crecimiento con o sin ramificaciones laterales. En este tipo de crecimiento los ejes

laterales se desarrollan menos que el eje central o principal, produciéndose una dominancia apical.

Panícula: Inflorescencia muy ramificada.

Palinológico: Referente al estudio o tratado de las esporas y el polen.

Perianto: Conjunto de vetículos estériles de la flor conformado por el cáliz y la corola, aunque estos pueden carecer de diferenciación, estar fusionados o solo estar presente uno de ellos.

Racimo: Inflorescencia simple indefinida, presenta un eje central y flores pediceladas en torno a éste.

Simpodial: Tipo de crecimiento ramificado de las plantas en donde no se distingue un eje principal o rama principal. Las ramas laterales se desarrollan más o igual que el eje principal.

Vaina: Parte basal de una hoja que rodea al tallo a manera de tubo.

Abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

EIG: Espaciador intergénico

ETS: Espaciador externo transcrito (por sus siglas en inglés)

ITS: Espaciador interno transcrito (por sus siglas en inglés)

Min: Minutos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)