



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVOLUCIÓN FLORAL EN *CHYSIS*, UN GÉNERO BASAL DE
LAS EPIDENDREAE (ORCHIDACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BENJAMÍN VALENCIA NIETO

TUTORA:

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA VICTORIA SOSA ORTEGA
INECOL A.C.

DR. JUAN SERVANDO NUÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2021.



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
FACULTAD DE CIENCIAS

**EVOLUCIÓN FLORAL EN *CHYSIS*, UN GÉNERO BASAL DE
LAS EPIDENDREAE (ORCHIDACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BENJAMÍN VALENCIA NIETO

TUTORA:

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA VICTORIA SOSA ORTEGA
INECOL A.C.

DR. JUAN SERVANDO NUÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

OFICIO CPCB/747/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que, en la reunión virtual del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de mayo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **VALENCIA NIETO BENJAMIN** con número de cuenta **401054170** con la tesis titulada **“EVOLUCIÓN FLORAL EN *Chysis*, UN GÉNERO BASAL DE LAS EPIDENDREAE (ORCHIDACEAE)”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Vocal: DR. FRANCISCO ROBERTO VERGARA SILVA
Vocal: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO
Vocal: DR. EDUARDO RUIZ SÁNCHEZ
Secretario: DRA. MARÍA VICTORIA SOSA ORTEGA

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

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad de realizar el Doctorado en Ciencias y por el apoyo recibido del programa PAEP-2014 para realizar una estancia de investigación del 5 de octubre al 14 de noviembre de 2014 en el INECOL A.C., Xalapa, México.

Al CONACYT por el apoyo económico recibido para realizar este estudio e investigación por medio de la beca (354898).

A mi tutora la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán por todo su apoyo y soporte para la realización de este proyecto en las instalaciones del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la Dra. María Victoria Sosa Ortega, miembro del comité tutor, por todo su apoyo y soporte para la realización de este proyecto y por las estancias de investigación (2015-1 y 2016-2) en las instalaciones del Laboratorio de Biología Evolutiva, INECOL A.C.

Al Dr. Juan Servando Núñez Farfán miembro del comité tutor por su apoyo y asesoría para este proyecto.

AGRADECIMIENTOS GENERALES

A la M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco, por su apoyo para la obtención de material biológico de la colección viva del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

Al Biól. Rolando Jiménez Machorro y al Ing. Eric Hágsater Gartenberg, por su apoyo para la obtención de material biológico de la colección viva del Herbario AMO del Instituto Chinoín A.C.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías por su apoyo para el procesamiento, observación y fotografiado del material biológico en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al M. en C. David Salinas Torres por todo su apoyo y facilidades para la realización de los enlaces digitales requeridos (videoconferencias) en el Aula de Cómputo y Microscopía del Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM.

Al Dr. Oscar F. Francke Ballvé por su apoyo para la obtención de material biológico.

A la Dra. Marilyn Vásquez por todo su apoyo, enseñanzas y ayuda en la parte de sistemática molecular.

A los miembros del jurado la Dra. Sonia Vázquez Santana, el Dr. Francisco Roberto Vergara Silva, la Dra. María Victoria Sosa Ortega, la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo y el Dr. Eduardo Ruiz Sánchez, por sus correcciones y valiosos comentarios que sin lugar a duda enriquecieron el manuscrito final de ésta tesis

A todos en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas por su apoyo, muy especialmente a la Dra. Margarita Collazo Ortega, la Dra. Sonia Vázquez Santana y la Dra. Clara Esquivel.

Y por último, pero no menos importante, a la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán; maestra, muchísimas gracias por toda una vida de apoyo a mi desarrollo profesional, por todos sus consejos académicos y de vida. La admiro muchísimo, admiro su curiosidad y su pasión por el conocimiento. Gracias inmensas por su confianza.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá Josefina P. Nieto Salazar y a mi papá Benjamín Valencia por todo, especialmente el apoyo que me han brindado desde que inicié mis estudios universitarios; si no hubiera sido por ellos, muy probablemente no hubiera llegado hasta donde me encuentro.

A mi entrañable Jonathan Alejos García (osito), tu paciencia, apoyo y ayuda han sido muy importante para mí, desde 2016 que se cruzaron nuestros caminos, y más durante los últimos dos años y medio.

A toda mi familia, muy especialmente en esta ocasión: a mis sobrinos-primos Eder Munguía y Nayeli que me abrigaron amablemente en su casa durante mis dos estancias de investigación en Xalapa en 2014 y 2016. A mi prima María de Lourdes Nieto Peña por todos sus consejos que, como una experta profesora me ha dado a lo largo de estos años, y por toda su ayuda cuando la he necesitado.

A mi querida sobrina prima Lourdes Peregrina Nieto y a toda su familia (esposo e hijos), por todo su cariño y su admiración, siempre me llamas doc aunque aún no tengo el grado. A Laura García Nieto, Lucy García Nieto y sus familias, a Julieta Nieto Peña y Brígido García por todo su cariño y la hospitalidad que nos brindan cuando los visitamos. A Luis Oliver Cruz Nieto y su familia, a Carlos y Jorge Millán Nieto y Adrianita Mendoza Nieto y su familia.

A mi muy querido amigo Oscar Federico Francke Ballvé, eres como un segundo papá para mí; siempre me has brindado tu amistad y apoyo, incluso desde antes de entrar a la carrera, eres un gran ejemplo para mí y te admiro muchísimo. Gracias por compartir el hobby de las orquídeas que se convirtió en una profesión para mí.

A mi muy querida amiga Laura Patricia Pliego Silva, soy tu gurú de las orquídeas pero tú eres como una segunda mamá para mí, siempre me has apoyado, desde cuidar mi salud hasta escucharme en mis peores crisis existenciales, muchas gracias por todo. A su hermana Eva Pliego Silva, gracias también por tu amistad y todos tus consejos.

A aquellos que se fueron físicamente, pero siempre están presentes en mi corazón, mi abuelo Francisco Nieto, mi tía Agustina Nieto, mis primas Elena y Lilia Nieto; a mis grandes amigos Edgar Molina López (mi comadre), Ana Lutteroth y Víctor M. Ramírez.

A mis amigos Saúl, Adair, Oscar y a los que por diversas circunstancias nos distanciamos: Alejandra, Kika, y David, muchas gracias siempre por los momentos que compartimos. A mis colegas: Itzel Guzmán hacemos un equipo de profes super chido, a Matías Amezcua Trigos por todas sus atenciones cuando estuve en Xalapa.

DEDICATORIA

A mi mamá Josefina Piedad Nieto Salazar y a mi papá Benjamín Valencia

A mi yo de 16 años

A Jonathan Alejos García (osito)

“El hombre que mueve montañas, comienza cargando pequeñas piedras”
Confucio

“Ningún sueño es demasiado grande y ningún soñador demasiado pequeño”
Anónimo

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
ANTECEDENTES GENERALES.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	24
LITERATURA CITADA EN ESTA SECCIÓN.....	25
CAPÍTULO I: ONTOGENIA FLORAL EN EPIDENDREAE.....	31
INTRODUCCIÓN.....	31
ANTECEDENTES.....	33
MATERIALES Y METODOS.....	35
Muestreo.....	35
Fijación y procesamiento del tejido.....	36
Preparación del material para microscopio electrónico de barrido (MEB)	37
RESULTADOS.....	38
Subtribu Calypsoinae: <i>Corallorhiza maculata</i>	42
Subtribu Calypsoinae: <i>Govenia alba</i>	43
Subtribu Coeliinae: <i>Coelia triptera</i>	43
Subtribu Bletinae: <i>Bletia purpurea</i>	44
Subtribu Bletinae: <i>Chysis bractescens</i> , <i>Chysis limminghei</i> y <i>Chysis laevis</i>	47
Subtribu Ponerinae: <i>Isochilus major</i>	50
Subtribu Ponerinae: <i>Ponera juncifolia</i>	50
Subtribu Pleurothallidinae: <i>Stelis ciliaris</i>	51
Subtribu Pleurothallidinae: <i>Specklinia digitale</i>	52
Subtribu Laeliinae: <i>Laelia speciosa</i>	55
Subtribu Laeliinae: <i>Oestlundia ligulata</i>	55
Subtribu Laeliinae: <i>Prosthechea squalida</i>	57
Subtribu Laeliinae: <i>Encyclia microbulbon</i>	57

DISCUSIÓN.....	69
<i>Chysis</i> y sus caracteres ontogenéticos.....	69
Antera incumbente en Epidendreae.....	69
Biología de la Polinización en Epidendreae.....	70
CONCLUSIONES.....	74
LITERATURA CITADA CAPÍTULO I.....	75
CAPÍTULO II: RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA EN EPIDENDREAE.....	81
INTRODUCCIÓN.....	81
ANTECEDENTES.....	83
MATERIALES Y METODOS.....	84
Muestreo.....	84
Extracción, purificación y secuenciación de ADN.....	85
Bases de datos de las secuencias en Gen Bank.....	85
Alineación de secuencias.....	86
Selección de Modelos.....	86
Análisis filogenético.....	86
RESULTADOS.....	87
DISCUSIÓN.....	95
Filogenia de <i>Chysis</i> , tribu Chysinae y su posición en Epidendreae.....	95
Resto de las subtribus de Epidendreae.....	97
CONCLUSIONES.....	99
LITERATURA CITADA CAPÍTULO II.....	100
DISCUSIÓN GENERAL.....	105
Tendencias de los caracteres morfológicos y la filogenia de <i>Chysis</i>	106
Incumbencia en Epidendreae y su implicación en la clasificación.....	108
Biología del desarrollo (Evo-devo) en Epidendreae.....	111
CONCLUSIONES FINALES.....	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
APÉNDICE I.....	124
ANEXO I.....	129

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

TABLA 1. Subtribus de la Tribu Epidendreae, su distribución, diversidad y síndromes de polinización.

FIGURA 1. Morfología vegetativa y floral de algunas especies de *Chysis*.

FIGURA 2. Especies estudiadas de la Tribu Epidendreae.

TABLA 2. Principales características observadas (caracteres del desarrollo de anteras, columna y labelo).

FIGURA 3. Etapas tardías del desarrollo (columna y antera).

FIGURA 4. Desarrollo del rostelo.

FIGURA 5. Cutícula de la epidermis de la cubierta de la antera.

FIGURA 6. Etapas tempranas del desarrollo tardío y la antesis del labelo.

FIGURA 7. Polinios y caudículas.

FIGURA 8. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferida de la matriz de secuencias de ITS de Epidendreae.

FIGURA 9. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferida de la matriz de secuencias de cloroplasto (*rbcL+matK+trnL-F*) de Epidendreae.

FIGURA 10. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferida de la matriz de secuencias de cloroplasto+ITS de Epidendreae.

FIGURA 11. Árbol de consenso de mayoría del 50% recuperado por la Inferencia Bayesiana (BI) de la matriz de secuencias de cloroplasto+ITS de Epidendreae.

FIGURA 12. Árbol de consenso de mayoría del 50% recuperado por la Inferencia Bayesiana (BI) de la matriz de secuencias de cloroplasto (*rbcL+matK+trnL-F*) de Epidendreae.

RESUMEN

Antecedentes: Epidendreae es una de las tribus más diversas de las orquídeas, con una variación notable en la forma de vida, la morfología floral y los síndromes de polinización. Su circunscripción fue revisada recientemente, y las subtribus Agrostophyllinae y Calypsoinae fueron transferidas a esta tribu. Dentro de Epidendreae: el género *Chysis* Lindl. ha variado en su posición, siendo considerada parte de su propia subtribu monogénica Chysinae, o bien incluida en un concepto amplio de la subtribu Bletiinae. Nada se sabe acerca de las relaciones filogenéticas de este género, ni sobre la tendencia y dirección de sus caracteres morfológicos-ontogenéticos (vegetativos y florales). Uno de los principales caracteres florales utilizados en la clasificación de las orquídeas, especialmente útil en Epidendreae, es la incumbencia de la antera y flexión de la columna.

Este estudio registra y compara las últimas etapas del desarrollo de la antera, columna y labelo, y analiza estos caracteres en quince taxones representativos de cinco de las seis subtribus de Epidendreae, a la luz de la clasificación y de la biología de la polinización de este grupo; así como también reconstruye las relaciones filogenéticas de *Chysis*, contrastando los caracteres obtenidos en el desarrollo tardío de la antera en las hipótesis filogenéticas obtenidas.

Métodos: Se tomaron muestras de una serie de etapas florales tardías y se fijaron para examinarlas con un microscopio electrónico de barrido. También se tomaron muestras de hojas para la extracción, purificación y secuenciación de ADN (*rbcL*, *matK*, *trnL-F* e ITS) para llevar a cabo análisis de reconstrucción filogenética de las secuencias de cloroplasto y cloroplasto+ITS, por medio de análisis de la máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana.

Resultados: *Chysis* presenta características distintivas que la diferencian de los miembros de Bletiinae, además las tendencias tradicionalmente establecidas de los caracteres utilizados en su clasificación taxonómica entre sus especies, no reflejan la filogenia del grupo.

En Epidendreae, la incumbencia o flexión de las anteras varía de 90° a casi 180° y se adquiere en las últimas etapas de desarrollo en las subtribus Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae; mientras que, en *Corallorhiza* y *Govenia*, de Calypsoinae, la incumbencia se alcanza por el síndrome vandoide, en las etapas tempranas del desarrollo. Una vía intermedia de la incumbencia se presenta en *Coelia*.

Discusión: Las observaciones indican que la posición de *Chysis* en la subtribu Bletiinae no es adecuada y existe suficiente evidencia, en los caracteres ontogenéticos y moleculares, para ser reconsiderado en su propia subtribu monogénica Chysinae. La composición subtribal de Epidendreae está compuesta por siete subtribus: Agrostophyllinae, Calypsoinae, Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae. Varios caracteres anatómicos, como cristales alrededor de los estomas actinocíticos, en la pared de la cubierta de la antera, así como cristales de azúcar en Laeliinae; ausencia de tricomas y papilas en las quillas del labelo en Bletiinae; el rostelo subdesarrollado en *Chysis laevis*; el mecanismo por el cual se desprende la cubierta de la antera en *Isochilus*, así como varios caracteres reportados en este estudio, están íntimamente relacionados con los síndromes de polinización y la biología reproductiva de este grupo.

Palabras clave: *Chysis*, Chysinae, antera, incumbencia, Epidendreae, desarrollo, polinización, Orchidaceae.

ABSTRACT

Background: Epidendreae is one of the most diverse tribes of orchids, with remarkable variation in life form, flower morphology, and pollination syndromes. Its circumscription was recently revised and the subtribes Agrostophyllinae and Calypsoinae were transferred to this tribe. Within Epidendreae: the genus *Chysis* Lindl. has varied in position, being considered part of its own monogeneric subtribe (Chysinae); or included in a broad concept of the Bletiinae subtribe. Nothing is known about the phylogenetic relationships of this group, nor about the trend and direction of its morphological-ontogenetic characters (vegetative and floral). One of the principal floral characters used in the classification of orchids, especially useful in Epidendreae, is the incumbency of the anther and bending of the column.

This study records and compares the late stages of the anther, column and lip development in fifteen representative taxa in five of the six Epidendreae subtribes; and also it reconstruct the phylogenetic relationships of *Chysis* (using DNA molecular markers of chloroplast and nuclear), contrasting the characters obtained in the late development in the light of the classification and the biology of pollination of this group.

Methods: A series of late floral stages were sampled and fixed for examination under a scanning electron microscope. Leaf samples were sampled for DNA extraction, purification, and sequencing (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*, and ITS) to carry out phylogenetic reconstruction analysis of chloroplast and chloroplast + ITS sequences using maximum likelihood analysis and Bayesian inference.

Results: *Chysis* presents distinctive characteristics that differentiate it from the members of Bletiinae. In addition the traditionally established tendencies of its own character, commonly used for its taxonomic classification among its species, do not reflect the phylogeny of the group.

In Epidendreae, the incumbency or flexion of anthers varies from 90° to almost 180 ° and is acquired in the last stages of development in the subtribes: Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae and Laeliinae; whereas in *Corallorhiza* and *Govenia* of Calypsoinae, the incumbency is reached out by the vandoid syndrome during the early stages of development. An intermediate path of incumbency is present in *Coelia*.

Discussion: Observations indicate that the position of *Chysis* in the Bletiinae subtribe is not adequate and there is enough evidence on ontogenetic and molecular traits to be reconsidered in its own monogeneric subtribe (Chysinae). According of this study Epidendreae is composed of seven subtribes: Agrostophyllinae, Calypsoinae, Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae, and Laeliinae. Various anatomical characters such as crystals around actinocytic stomata in the anther cap, as well as sugar crystals in Laeliinae; absence of trichomes and papillae on lip keels in Bletiinae; the underdeveloped rostellum in *Chysis*; the mechanism by which the anther cap is detached in *Isochilus*, as well as several more characters reported in this study, are closely related to pollination syndromes and the reproductive biology of this group.

Keywords: *Chysis*, Chysinae, anther, incumbency, Epidendreae, development, pollination, Orchidaceae.

EVOLUCIÓN FLORAL EN *CHYSIS*, UN GÉNERO BASAL DE LAS EPIDENDREAE (ORCHIDACEAE)

INTRODUCCIÓN GENERAL

Epidendroideae es la subfamilia más numerosa de Orchidaceae, cuenta con más de 21,000 especies que representan del 76-80% de esta familia (Freudenstein y Chase 2015; Givnish *et al.*, 2015).

La circunscripción taxonómica de esta subfamilia ha sido controvertida, a pesar de ser reconocida en todas las clasificaciones de Orchidaceae. Los estudios de van den Berg *et al.* (2000, 2005) identificaron varios grupos dentro de Epidendroideae; sin embargo, estos grupos no comparten caracteres morfológicos florales, debido a que es difícil identificar las tendencias y dirección de estos caracteres porque la mayoría de ellos presenta homoplasia, por paralelismo o convergencia, debido a la presión ejercida por la selección de polinizadores (van den Berg, 2005).

Chase *et al.* (2003, 2015) y Cribb y Chase (2015), propusieron una clasificación de la subfamilia Epidendroideae, incluyendo 16 tribus, y en la actualización más reciente de la subfamilia ésta composición se mantiene (Chase *et al.*, 2015).

Dentro de Epidendroideae, destaca como una de las más diversas, la tribu Epidendreae, que al igual que en el caso de la subfamilia Epidendroideae, su delimitación ha variado sustancialmente desde su descripción original, de acuerdo a diferentes estudios (Chase *et al.*, 2003; van den Berg, 2005; van den Berg *et al.*, 2005; Chase *et al.*, 2015; Freudenstein y Chase, 2015).

Recientemente, Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015), propusieron la adición de los géneros asiáticos *Agrostophyllum* Blume, *Calypso* Salisb. y *Earina* Lindl., por lo que la tribu Epidendreae ya no es exclusiva del neotrópico como fue considerada durante mucho tiempo; además experimentó cambios a nivel de las subtribus que la componen, siendo reconocidas como parte de ella: Agrostophyllinae, Calypsoinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae (Freudenstein y Chase, 2015; Chase *et al.*, 2015; Givnish *et al.*, 2015) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Subtribus de la tribu Epidendreae, su distribución, diversidad y síndromes de polinización. También se incluyen los taxones representativos estudiados aquí.

Subtribu	Agrostophyllinae	Calypsoinae	Coeliinae	Bletiinae	Ponerinae	Pleurothallidinae	Laeliinae
Distribución	Viejo mundo	Viejo y nuevo mundo	Nuevo mundo	Nuevo mundo	Nuevo mundo	Nuevo mundo	Nuevo mundo
Incluidos y observados en este estudio	Ninguno	<i>Corallorhiza maculata</i> Raf., <i>Govenia alba</i> A. Rich. Y Galeotti	<i>Coelia triptera</i> (Sm.) Mutel	<i>Bletia purpurea</i> (Lam.) A.DC., <i>Chysis bractescens</i> Lindl., <i>Chysis limminghei</i> Linden y Rchb. F., <i>Chysis laevis</i> Lindl.	<i>Isochilus major</i> Schltld. y Cham., <i>Ponera juncifolia</i> Lindl.	<i>Stelis ciliaris</i> Lindl., <i>Specklinia digitale</i> (Luer) Pridgeon y M.W. Chase	<i>Laelia speciosa</i> (Kunth) Schltr., <i>Oestlundia ligulata</i> (La Llave y Lex.) Soto-Arenas, <i>Prosthechea squalida</i> (Lex.) Soto-Arenas y Salazar,

							<i>Encyclia microbulbon</i> (Hook) Schltr.
Número de polinios	8 y 4	4	8	8	4 y 6	2, 4, 6 y 8	2, 4, 6, 8 y 12

<p>Polinizadores o síndrome de polinización</p>	<p>Abejas (Halictidae) y se ha reportado autogamia</p> <p>(Pridgeon et al; 2005)</p>	<p>Abejorros, moscas flotantes, empíidos, mosquitos, abejas y se ha reportado autogamia facultativa</p> <p>(Whigham y McWethy, 1980; van der Cingel, 2001; Freudesnstein, 2005a, b, c, d; García-Cruz y Sosa, 2005; Pansarin, 2008; García-Cruz et al., 2009; Toumi et al., 2015).</p>	<p>Desconocido</p>	<p>Varios tipos de abejas, abejorros, y se ha reportado autogamia</p> <p>(van der Cingel, 2001; Fowler, 2005; Soto-Arenas, 2005a; 2008a; Soto-Arenas y Solano, 2007; Sosa, 2007, Sosa et al., 2016; Salazar et al., 2016)</p>	<p>Colibríes, pequeñas abejas y avispas.</p> <p>(Salazar, 2005; Soto-Arenas, 2005a; Siegel, 2011)</p>	<p>Dípteros</p> <p>(Pridgeon et al., 2001, Blanco y Barbosa, 2005; Jersákova et al., 2006; Damon y Salas-Roblero, 2007; Karremans et al., 2015)</p>	<p>Abejas, avispas, aves, mariposas, polillas y dípteros.</p> <p>(van der Pijl et al., 1969; Dressler, 1993; Halbinger y Soto-Arenas, 1997; Borba y Braga, 2003; Higgins 2003; Soto-Arenas y Solano, 2007; van den Berg et al., 2009)</p>
--	--	--	--------------------	---	---	---	---

ANTECEDENTES GENERALES

Chysis Lindl. es uno de los géneros incluidos en la tribu Epidendreae y ha sido considerado en la mayoría de las clasificaciones dentro de su propia subtribu monogénica Chysinae, en contraste con el resto de las subtribus de Epidendreae que incluyen numerosas especies (Schlechter, 1926; Dressler, 1993; Chase *et al.*, 2003; van den Berg, 2005; van den Berg *et al.*, 2005; Soto-Arenas, 2005a). Solamente Dressler (1981) y recientemente Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015) incluyeron al género *Chysis* dentro de un concepto amplio de la subtribu Blettiinae.

Chysis fue nombrado por Lindley y su nombre proviene del griego *chysis*, que significa acción de fundir o fusionado, debido a que los polinios parecen fundirse con la columna al momento de la antesis, especialmente en las especies autógamas (Soto-Arenas, 2005a).

El género cuenta con 13 especies, así como un híbrido natural (Goaverts-WCSP, 2021), distribuidas desde México, Centroamérica y norte de Sudamérica con límite hasta la parte andina de Perú, la mayoría de las especies se encuentran en Mesoamérica (Dressler, 1993, 2000; Soto-Arenas, 2005a).

Son plantas herbáceas, epífitas deciduas o subdeciduas, suberectas o colgantes, con pseudobulbos fusiformes, las hojas son dísticas, imbricadas, plegadas, dispersas en el pseudobulbo. Las inflorescencias son laterales, a partir de nudos basales de brotes en desarrollo (Fig. 1A). Las flores son grandes, resupinadas, carnosas (Fig. 1B-E), algunas de sus especies presentan cinco quillas, subiguales y puberulentas en el labelo (Fig. 1B, C, F y G); y otras con un callo liso en el labelo, compuesto de tres quillas grandes, centrales (Fig. 1H e I) que también pueden contar con pequeñas quillas adicionales laterales. La columna es gruesa con un prominente pie de columna, la antera es terminal, encorvada (incumbente) bilobulada; el polinario se compone de ocho polinios amarillos (cuatro y cuatro, paralelos), duros, con caudículas en forma de placa, el estigma ventral es entero de semielíptico a oblongo. En las formas autógamas de *Chysis addita* y *Chysis laevis* se presentan polinios amorfos, suaves y coalescentes (Dressler, 1981, 1993, 2000; Soto-Arenas, 2005a).

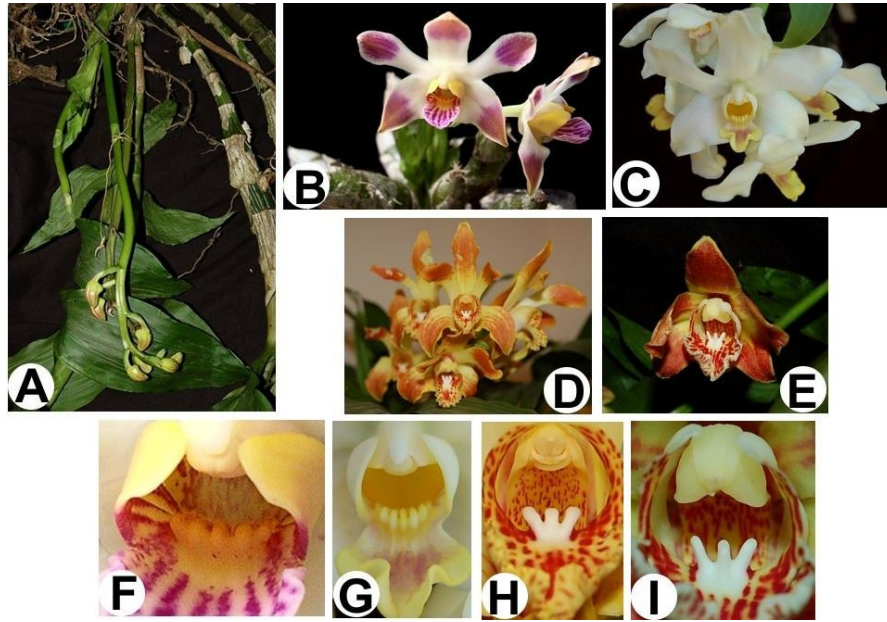


Figura 1. Morfología vegetativa y floral de algunas especies de *Chysis*. A. Planta colgante de *Chysis addita* con pseudobulbos fusiformes e inflorescencias laterales del brote en desarrollo. B. Flores de *Chysis limminghei* Linden & Rehb.f. C. Flores de *Chysis bractescens* Lindl. D. Flores de *Chysis laevis* Lindl. E. Flores de *Chysis addita* Dressler. F. Cinco quillas, subiguales y puberulentas en el labelo de *C. limminghei*. G. Cinco quillas, subiguales en el labelo de *Chysis bractescens* H. Tres quillas grandes y centrales en el labelo de *C. laevis* I. Tres quillas grandes y centrales en el labelo de *C. addita*.

Los estudios previos del género *Chysis* son pocos y han aportado principalmente información sobre su morfología pero son nulos en sus relaciones filogenéticas. Por lo anterior, se considera que *Chysis* es un género que requiere investigación taxonómica, basada en la búsqueda y reconocimiento de una mayor cantidad de caracteres morfológicos así como moleculares que permitan esclarecer sus relaciones filogenéticas.

Dada la uniformidad morfológica vegetativa y floral, es de suma importancia buscar otros caracteres, como los de ontogenia floral que permitan comprender mejor su evolución morfológica. En los estudios filogenéticos previos sobre la subfamilia Epidendroideae y la tribu Epidendreae (Chase *et al.*, 2003, 2015; van den Berg, 2005; van den Berg *et al.*, 2005; Freudenstein y Chase, 2015) se tomó en cuenta solamente un representante de *Chysis* (*Chysis bractescens*); por lo tanto, no se conocen las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies del género, y si, la inclusión de una mayor muestra de especies cambiaría las relaciones con el resto de las subtribus.

Durante las últimas tres décadas, los estudios de ontogenia o desarrollo floral han demostrado ser una fuente valiosa para encontrar caracteres morfológicos que sirven para reevaluar las relaciones filogenéticas de ciertos grupos de orquídeas y comprender su evolución morfológica. Ejemplo de ello son los de Kurzweil (1987a, 1987b, 1988, 1993), para describir la ontogenia general de las subfamilias de orquídeas reconocidas en ese momento: epidendroides y vandoides, orchidoides, neottioides y cyripedioides, estos estudios sentaron la base para hacer las primeras comparaciones con fines filogenéticos sobre la ontogenia y evolución de las anteras en las subfamilias de Orchidaceae, así como la evolución de los demás caracteres florales presentes en la columna. El trabajo de Freudenstein y Rasmussen (1996) define el número de polinios y la polaridad de este carácter en tres subfamilias de Orchidaceae (Orchidoideae, Epidendroideae y Vandoideae); el de Kocyan y Endress (2001), aborda el desarrollo de caracteres de las flores en el grupo basal de orquídeas apostasioides, resultando de gran relevancia, ya que permite comprender mejor la relación de este grupo basal, compuesto principalmente por especies triándricas, con el resto de las orquídeas mayoritariamente monándricas. Mientras que el estudio de Freudenstein *et al.* (2002) ayuda a definir los estados de carácter de la antera incumbente en el complejo Vandoide, que permite aclarar la posición de este grupo, al mapear estos caracteres del desarrollo dentro de la filogenia de la subfamilia Epidendroideae. El de Valencia-Nieto *et al.* (2016) para esclarecer la posición de *Microepidendrum* Brieger ex. Higgins en la subtribu Laeliinae.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la evolución floral del género *Chysis*, a través de la descripción y estudio comparativo de la ontogenia floral (con énfasis en el desarrollo de la antera y la columna) de algunas de las especies de este género, así como de algunos representantes de las subtribus de Epidendreae.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar la ontogenia floral con énfasis en el desarrollo de la columna y antera entre especies de *Chysis*.
2. Estudiar la ontogenia floral con énfasis en el desarrollo de la columna y antera en algunos representantes de las subtribus de Epidendreae.

3. Obtener secuencias de ADN de varias especies de *Chysis* para complementar la filogenia molecular de la tribu Epidendreae.
4. Discutir las tendencias de los caracteres de la ontogenia floral (de *Chysis* y algunos representantes de las subtribus) en la filogenia existente de Epidendreae.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Este manuscrito se encuentra integrado por una introducción general, antecedentes generales, objetivo general y objetivos particulares, así como:

Capítulo I: Ontogenia floral en Epidendreae

Se aborda el estudio de la morfología (de los taxones representantes seleccionados en cinco de las seis subtribus de Epidendreae); a través del microscopio electrónico de barrido y con especial énfasis en la columna, antera y labelo, desde las etapas tempranas del desarrollo tardío hasta la antesis. Los resultados obtenidos se discuten haciendo énfasis en el género *Chysis* y sus caracteres ontogenéticos; así como en la antera incumbente y la biología de la polinización en Epidendreae.

Capítulo II: Reconstrucción filogenética en Epidendreae

Se aborda la obtención de secuencias de marcadores de ADN de cloroplasto (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*) y nuclear (ITS) en varias especies de *Chysis* (*C. addita*, *C. aurea*, *C. laevis*, *C. limminghei*, *C. cf chironii*); así como también en algunos de los taxones representativos de cinco de las seis subtribus de Epidendreae (utilizados en la morfología del desarrollo). Las secuencias se integran con las obtenidas en estudios previos de la tribu; y se analizan por medio de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, produciendo nuevas hipótesis filogenéticas de Epidendreae. Los resultados de los análisis se discuten haciendo énfasis en el género *Chysis* y sus relaciones entre especies, así como, con los demás miembros de Epidendreae.

La última sección de la tesis se compone de una discusión general y conclusiones generales, así como de la literatura citada y apéndice.

LITERATURA CITADA EN ESTA SECCIÓN:

- Blanco, M.A., Barboza, G. 2005.** Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany* **95**: 763-772. DOI: [10.1093/aob/mci090](https://doi.org/10.1093/aob/mci090)
- Borba, E.L., Braga, P.I.S. 2003.** Biología reproductiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 541-549. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042003000400013>
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. En: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barret, R.L., Cribb, P.J.(Eds.) *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malasya.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Berg, C., Schuiteman, A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151-174. DOI:[10.1111/boj.12234](https://doi.org/10.1111/boj.12234)
- Cribb, J.P., Chase M.W. 2005.** Epidendroideae En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 3-8.
- Damon, A., Roblero, P.S. 2007.** A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* **48**: 1-14. http://www.tropecol.com/pdf/open/PDF_48_1/Damon_n_Pedro.pdf
- Dressler, R.L. 1981.** The orchids, natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Dressler, R.L. 1993.** Phylogeny and classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon.
- Dressler, R.L. 2000.** Mesoamerican orchid novelties 3. *Novon*, 193-200. <https://doi.org/10.2307/3393099>
- Fowler, J.A. 2005.** Wild Orchids of South Carolina. A popular natural history. University of South Carolina Press. South Carolina.

- Freudenstein, J.V. 2005a.** *Calypso*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 93-97
- Freudenstein, J.V. 2005b.** *Corallorhiza*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 97-99
- Freudenstein, J.V. 2005c.** *Oreorchis*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp.105-107.
- Freudenstein, J.V. 2005d.** *Tipulara*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 107-109.
- Freudenstein, J.V., Rasmussen F.N. 1996.** Pollinium development and number in Orchidaceae. *American Journal of Botany* 83: 813-824. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12773.x>
- Freudenstein, J.V., Harris, E.M., Rasmussen, F.N. 2002.** The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the Vandoid complex. *American Journal of Botany* 89: 1747-1755. DOI: [10.3732/ajb.89.11.1747](https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1747)
- Freudenstein, J.V., Chase, M.W. 2015.** Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of botany* 11:665-681. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcu253>
- García-Cruz, J., Sosa, V. 2005.** Phylogenetic relationships and character evolution in *Govenia* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, 83:1329-1339. DOI: <https://doi.org/10.1139/b05-098>
- García-Cruz, J., González-Astorga, J., Sosa, V., Hernández-González, O. 2009.** Genetic diversity in six *Govenia* (Orchidaceae) species with different pollinator attraction strategies. *International journal of plant sciences*, 170: 894-905. DOI: <https://doi.org/10.1086/600149>
- Govaerts, R. 2021.** World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew <https://wmsp.science.kew.org/home.do> (Accesado el 1 de abril de 2021).

- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., Endara, L. 2015.** Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proc. R. Soc. B.* **1814**: 20151553. DOI: [10.1098/rspb.2015.1553](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553)
- Halbinger, F; Soto-Arenas, M.A. 1997.** "Laelias of México". *Orquídea (Mexico City)* **15**: 1-160. [http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea\(Mex.\)15.pdf](http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea(Mex.)15.pdf)
- Higgins, W.E. 2003.** *Prosthechea*: a chemical discontinuity in Laeliinae. *Lankesteriana* **7**: 39-41. <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/23010/23230>
- Jersáková, J., Johnson, S. D., Kindlmann, P. 2006.** Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**: 219-235. DOI: [10.1017/S1464793105006986](https://doi.org/10.1017/S1464793105006986)
- Karremans, A.P., Bogarin, D., Pupulin, F., Luer, C.A., Gravendeel, B. 2015.** The glandulous *Specklinia*: morphological convergence versus phylogenetic divergence. *Phytotaxa* **218**:101-127. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.2.1>
- Kocyan, A; Endress P.K. 2001.** Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasiodeae) and their relationships to other Orchidaceae. *International Journal of Plant Sciences* **162**: 847-867. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/320781>
- Kurzweil, H. 1987a.** Developmental studies in orchid flowers I: Epidendroid and Vandoid species. *Nordic Journal of Botany* **7**: 427-442. DOI: [10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x](https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x)
- Kurzweil, H. 1987b.** Developmental studies in orchid flowers II: Orchidoid. *Nordic Journal of Botany* **7**: 443-451. doi.org/10.1111/j.1756-1051.1987.tb00965.x
- Kurzweil, H. 1988.** Developmental studies in Orchid Flowers III: Neottiid species. *Nordic Journal of Botany* **8**: 271-282. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1988.tb01721.x>
- Kurzweil, H. 1993.** Developmental studies in Orchid Flowers VI: Cypripedoid species. *Nordic Journal of Botany* **13**: 423-430. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1993.tb00076.x>
- Pansarin, E.R. 2008.** Reproductive biology and pollination of *Govenia utriculata*: A syrphid fly orchid pollinated through a pollen-deceptive mechanism. *Plant Species Biology* **23**: 90-96. DOI: [10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x)

- Pridgeon, A.M., Solano, R., Chase, M.W. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286-2308. <http://www.amjbot.org/content/88/12/2286.full>
- Salazar, G.A. 2005.** *Isochilus*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. Oxford University Press. London. pp.
- Salazar, G.A., Chavez-Rendon, C., Jiménez-Machorro, R. 2016.** Floral similarity and vegetative divergence in a new species of *Bletia* (Orchidaceae) from Mexico. *Phytotaxa* **275**: 112-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.275.2.3>
- Siegel, C. 2011.** Orchids and hummingbirds: sex in the fast lane. *The Orchid Digest* **75**: 8-17. https://pdfs.semanticscholar.org/17d9/df36bf47eeb9fd0925cacf981e450e9c72b4.pdf?_ga=2.198704431.1430246362.1499451817-1927011864.1499451817
- Sosa, V. 2007.** A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Blettiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic botany* **32**: 34-42. <http://www.jstor.org/stable/25064226>
- Sosa, V., Cameron, K. M., Angulo, D. F., Hernández-Hernández, T. 2016.** Life form evolution in epidendroid orchids: Ecological consequences of the shift from epiphytism to terrestrial habit in *Hexalectris*. *Taxon*, **65**: 235-248. DOI: <https://doi.org/10.12705/652.2>
- Soto-Arenas, M.A. 2005a.** *Chysis*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. Oxford University Press. London. pp. 173-177.
- Soto-Arenas, M. 2008b.** *Isochilus alatus*. En: Hágsater, E., Soto M. (Eds.). *Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4*. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1030.
- Soto-Arenas, M.A., Solano-Gómez, A.R. 2007.** Ficha técnica de *Chysis bractescens* En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO.

- Schlechter, R. 1926.** Das System der Orchidaceen. *Notizblatt des Botanischen Garten and Museums zu Berlin-Dahlem* 88: 563-591. <https://www.jstor.org/stable/3994326?seq=1>
- Tuomi, J., Lämsä, J., Wannas, L., Abeli, T., Jäkäläniemi, A. 2015.** Pollinator Behaviour on a Food-Deceptive Orchid *Calypso bulbosa* and co-flowering Species. *The Scientific World Journal* **2015**:1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/482161>
- Valencia-Nieto, B., Sosa, V., Márquez-Guzmán, J. 2016.** Late stages of anther development and anther attributes in *Microepidendrum* differs from other genera of Epidendrum alliance (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **218**: 35-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.002>
- Van den Berg, C. 2005.** Epidendreae. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp. 162-164.
- Van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Soto-Arenas, M.A., Culhan, A., Chase, M.W. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- Van den Berg, C., Goldman, D. H., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Cameron, K. M., Chase, M.W. (2005).** An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, *92*(4), 613-624. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3732/ajb.92.4.613>
- 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. *Annals of Botany* **104**: 417-430. DOI: [10.1093/aob/mcp101](https://doi.org/10.1093/aob/mcp101)
- Van Der Cingel, N.A. 2001.** *An Atlas of Orchid Pollination: European Orchids.* CRC Press. USA.
- Van Der Pijl, L., Dodson, C. H., Flowers, O. 1969.** *Orchid Flowers. Their pollination and evolution.* (Fla, CG, ed.). University of Miami Press, Coral Gables, Florida.

Whigham, D.F., McWethy, M. 1980. Studies on the Pollination Ecology of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **67**: 550-555.
<http://www.jstor.org/stable/2442295>

CAPÍTULO I:

ONTOGENIA FLORAL EN EPIDENDREAE

INTRODUCCIÓN

En las orquídeas en general (incluida la tribu Epidendreae), uno de los elementos más notables de la flor es el labelo, un elemento del verticilo del perianto, el cual está conformado por los tépalos, los cuales muestran una evidente diversidad de forma y color (Rudall y Bateman 2004; Rudall, 2007).

Otro elemento llamativo en las flores de Orchidaceae es la columna o ginostemio, es una estructura que incluye los órganos sexuales masculinos y femeninos, esta formada por la fusión parcial o total del estilo y los filamentos de las anteras (Hágsater *et al.*, 2005) y en cuyo extremo distal se localizan las anteras mismas (de tres a uno, por lo tanto reconocidas como triándricas, diándricas o monándricas, siendo comúnmente utilizado este número para la clasificación intrafamiliar. Dressler, 1993). Las anteras contienen a los granos de polen, que se encuentran asociados en masas agregadas en el interior de unas estructuras en forma de sacos denominados polinios, y estos polinios son flanqueados por el rostelo que es una sección de tejido del lóbulo medio del estigma, que funciona como barrera que separa la antera de la parte fértil del estigma (Dressler, 1981, 1993).

Comúnmente, la posición del labelo y la columna es decisiva para forzar al polinizador a aproximarse y entrar a la flor de una forma determinada, de tal modo que al hacer contacto con el polinario (polinios más sus apéndices), éste se adhiera en el cuerpo del polinizador y se desprenda de la flor. Los polinios pueden moverse o cambiar su orientación después de ser removidos por el polinizador, en su camino para polinizar exitosamente la siguiente flor visitada (van der Pijl *et al.*, 1969; Peter y Johnson, 2006). Los polinios han alcanzado una remarcable complejidad en algunos grupos de orquídeas, incluyendo Epidendreae (Dressler, 1993), generalmente tienen varios apéndices, como el viscidio (almohadilla adhesiva), que es una porción de tejido que contiene una sustancia pegajosa que facilita su adherencia a los polinizadores (Dressler, 1993).

En algunas especies, solamente se encuentra una secreción líquida y pegajosa denominada viscario, que permite adherir los polinarios a los polinizadores (Dressler y Salazar, 1991; Hágsater *et al.*, 2005). Las caudículas son una extensión pálida, delgada y

elástica de los polinios o en la porción final del polinario, producidas dentro de la antera y por medio de la cual estos polinios son adheridos a los polinizadores (Dressler, 1981, 1993; Chase *et al.*, 2003).

Otra característica importante de Orchidaceae es la cubierta de la antera, que cubre a los polinios y en la mayoría de las especies se cae o desprende después de que los polinios son removidos por los polinizadores, pero, en algunas especies la cubierta de la antera abraza a los polinios durante un periodo de tiempo antes de caerse (Dressler, 1981; Peter y Johnson, 2006).

Dentro de Orchidaceae, la tribu Epidendreae ha sido recientemente identificada como un ejemplo de un grupo de angiospermas con radiación asociada al epifitismo y a los caracteres de la antera, que están altamente relacionados a la especificidad de polinizadores (Freudenstein y Chase, 2015).

Esta tribu incluye una impresionante diversidad de taxones entre ellos, *Epidendrum* L., que es uno de los géneros más grandes (cerca de 1,300 especies) del Neotrópico (Pinheiro *et al.*, 2009; Pinheiro y Cozzolino, 2013, Valencia-Nieto *et al.*, 2016), también incluye a la subtribu Pleurothallidinae, un grupo muy diverso con cerca de 5100 especies, principalmente de plantas miniaturas (Pridgeon *et al.*, 2001; Blanco y Barbosa, 2005; Damon y Salas-Roblero, 2007; Karremans *et al.*, 2015; Karremans, 2016).

Las plantas en Epidendreae muestran una variación notable en la forma de vida, la morfología floral y los síndromes de polinización (van der Pijl *et al.*, 1969; van den Berg, 2005; Jersákova *et al.*, 2006; Freudenstein y Chase 2015), por ejemplo, las llamativas especies de *Laelia* Lindl. y *Cattleya* Lindl., son polinizadas por diversos insectos (Halbinger y Soto-Arenas, 1997; Borba y Braga, 2003; van den Berg *et al.*, 2009); las fragantes *Encyclia* Hook. y *Prosthechea* Knowles y Westc., son polinizadas por abejas, las primeras, y las segundas exclusivamente por avispas (Higgins, 2003); *Isochilus* R.Br., con tallos en forma de junco, pseudobulbos inconspicuos y flores diminutas, tubulares y racimosas son polinizadas por colibríes (Salazar, 2005; Soto-Arenas, 2008b; Siegel, 2011); *Chysis* Lindl., con grandes pseudobulbos fusiformes, con flores carnosas y cerosas probablemente polinizadas por diferentes grupos de abejas (Dressler, 1993; Soto-Arenas, 2005a, 2008a; Soto-Arenas y Solano, 2007); *Bletia* Ruiz & Pav. y *Calypso* Salisb. de hábito terrestre y con

polinización por engaño (Sosa, 2007; Toumi *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2016); las mayormente autopolinizadas y micoheterotróficas son las especies de *Hexalectris* Raf. (Fowler, 2005; Sosa *et al.*, 2016), y las del género *Govenia* Lindl., son polinizadas por moscas flotantes (Whigham y McWethy, 1980; van der Cingel, 2001; García-Cruz y Sosa, 2005; Freudenstein, 2005a, b, c, d; Pansarin, 2008; García-Cruz *et al.*, 2009).

ANTECEDENTES

Basados en los análisis filogenéticos de Orchidaceae, las anteras erectas y paralelas al eje de la columna, son consideradas la condición basal (como sucede en la mayoría de miembros de la subfamilia Orchidoideae); mientras que, en Epidendroideae presentan la condición derivada: una antera que inicia erecta en el desarrollo y posteriormente se flexiona sobre si misma de 90° a 120°, por lo que la antera termina apoyándose, como un casquete, en el ápice de la columna (Dressler, 1981; Arditi, 1992; Freudenstein *et al.*, 2002). El término incumbente es usado para esta condición (Dressler, 1981, 1993; Chase *et al.*, 2003; Freudenstein y Chase, 2015) y es considerado el más importante carácter definitorio de la subfamilia Epidendroideae (Kurzweil, 1987a; Dressler 1981, 1993; Arditti, 1992; Freudenstein *et al.*, 2002; Freudenstein y Chase, 2015).

La antera incumbente ha sido identificada como la sinapomorfía clave de la subfamilia Epidendroideae (Freudenstein *et al.*, 2002; Freudenstein y Chase, 2015), y se han descrito tres vías principales para alcanzar la incumbencia de la antera:

La primera vía es descrita en la subfamilia basal Vanilloideae, se da principalmente como resultado del alargamiento sustancial del tejido conectivo de la antera (Freudenstein *et al.*, 2002).

La segunda vía, está presente en los miembros de los grupos epidendroides no vandoides (donde se ubican la mayoría de los géneros de este estudio: *Bletia*, *Chysis*, *Ponera*, *Isochilus*, *Laelia*, *Oestlundia*, *Prosthechea* y *Encyclia*) en la que la incumbencia tiene lugar en las etapas de ontogenia tardía, como resultado de la extensión (alargamiento de tejido de la antera) e inclinación de la antera madura (Freudenstein *et al.*, 2002; Valencia-Nieto *et al.*, 2016, 2018).

La tercera vía y la más variable se denomina morfología o síndrome vandoide (reportada entre otros grupos y en la subtribu Calypsoinae de reciente inclusión en

Epidendreae), donde la inflexión de la antera se alcanza en estadios ontogenéticos tempranos, como resultado de cambios en la dirección de crecimiento, que llevan a la antera a iniciar su desarrollo en una posición de partida con orientación incumbente (llamada incumbencia temprana de la antera) y asociada a los polinios superpuestos (resultados de una reorientación de las tecas durante el desarrollo), y también a la presencia de apéndices en el polinio (estipes) o también denominadas estructuras accesorias de los polinios (de origen externo a la antera) derivados del rostelo (zonas y cantidades variables de tejido de esta estructura), que tienen un origen ontogenético diferente a las caudículas (que también son apéndices pero, son extensiones derivadas del tejido interno de la antera. Dressler, 1981, 1993; Arditti, 1992; Freudenstein *et al.*, 2002; Valencia-Nieto *et al.*, 2016, 2018).

Es remarcable que el grado de inflexión varía entre las especies de Epidendroideae, y se han identificado reversiones en varias especies polinizadas por aves (Rasmussen, 1982; Freudenstein *et al.*, 2002). Además, de manera particular en el género *Coelia*, se ha reportado que presenta una inflexión temprana de la antera, que es característica del síndrome vandoide, pero carece de estipes y polinios superpuestos, ambos son características clave del síndrome vandoide (Freudenstein y Chase, 2015; Freudenstein *et al.*, 2017).

Recientemente, Freudenstein y Chase (2015) analizaron algunos caracteres de las anteras utilizando las hipótesis filogenéticas más actuales del grupo, para comprender los patrones de diversificación. Asimismo, buscaron correlaciones entre cambios en caracteres específicos y diversidad de especies, centrándose en la morfología vandoide. Sin embargo, estos caracteres de las anteras no están presentes entre las subtribus más diversas incluidas en la tribu Epidendreae (Freudenstein *et al.*, 2002, 2017; Valencia-Nieto *et al.*, 2016, 2018). Además, se han identificado ciertas características de las flores relacionadas con la especificidad del polinizador, creando así una oportunidad para realizar estudios detallados de la morfología de las anteras maduras y analizar la evolución de estos caracteres en este grupo de plantas.

El presente estudio se enfocó en describir y comparar las etapas tardías de la ontogenia de la antera, en especies representativas de la tribu Epidendreae, considerando cinco de las seis subtribus que la componen (*sensu* Chase *et al.*, 2015; Freudenstein y Chase, 2015: Calypsoinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae, Laeliinae). Se estudiaron las

últimas etapas del desarrollo de las anteras en quince taxones representativos, pertenecientes a Epidendreae. Se describe la ontogenia tardía de la columna con énfasis en el labelo, columna y antera. Estos caracteres se discuten a la luz de la clasificación más reciente y los síndromes de polinización de los grupos, con especial atención y detalle en especies del género *Chysis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras biológicas de flores y botones se obtuvieron de la colección viva de orquídeas del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM y del Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero” del INECOL A.C. Se accedió al material bajo los términos de los permisos científicos MX-JB-008-DF and VER-FLO-228-09-09.

Muestreo. Se seleccionaron especies representativas en la subtribu Calypsoinae, Coeliinae, Bletinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae de la tribu Epidendreae (Tabla 1, Fig. 2). Se estudiaron flores y botones florales de las siguientes especies: *Corallorhiza maculata* (Raf.) Greene (Calypsoinae Fig. 2A), *Govenia alba* A. Rich. & Galeotti (Calypsoinae Fig. 2B), *Coelia triptera* (Sm.) Mutel (Coeliinae Fig. 2C) *Bletia purpurea* (Lam.) DC. (Bletinae Fig. 2D), *Chysis bractescens* Lindl. (Bletinae Fig. 2E), *Chysis limminghei* Linden y Reichb.f (Bletinae Fig. 2F), *Chysis laevis* Lindl. (Bletinae Fig. 2G), *Isochilus major* Cham. & Schltdl. (Ponerinae, Fig. 2H), *Ponera juncifolia* Lindl. (Ponerinae, Fig. 2I) *Stelis ciliaris* Lindl. (Pleurothallidinae, Fig. 2J), *Specklinia digitale* (Luer) Pridgeon & M.W. Chase (Pleurothallidinae, Fig. 2K), *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (Laeliinae, Fig. 2L), *Oestlundia ligulata* (La Llave & Lex.) Soto Arenas (Laeliinae, Fig. 2M), *Prosthechea squalida* (Lex.) Soto Arenas & Salazar (Laeliinae, Fig. 2N) y *Encyclia microbulbon* Schltr. (Laeliinae, Fig. 2O).

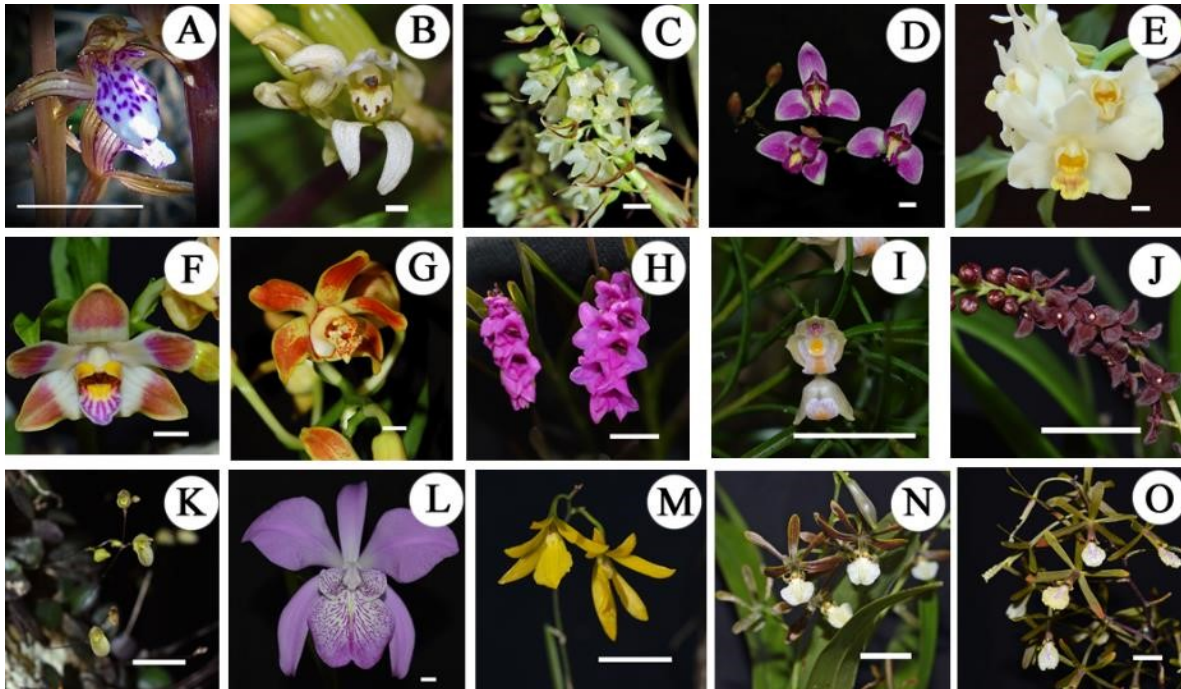


Figura 2. Especies estudiadas de la Tribu Epidendreae. A. *Corallorhiza maculata* (Calypsoinae). B. *Govenia alba* (Calypsoinae). C. *Coelia triptera* (Coeliinae). D. *Bletia purpurea* (Bletiinae). E. *Chysis bractescens* (Bletiinae). F. *Chysis limminghei* (Bletiinae). G. *Chysis laevis* (Bletiinae). H. *Isochilus major* (Ponerinae). I. *Poneria juncifolia* (Ponerinae). J. *Stelis ciliaris* (Pleurothallidinae). K. *Specklinia digitale* (Pleurothallidinae). L. *Laelia speciosa* (Laeliinae). M. *Oestlundia ligulata* (Laeliinae). N. *Prosthechea squalida* (Laeliinae). O. *Encyclia microbulbon* (Laeliinae).

Barras de escala = 1 cm

Fijación y procesamiento de tejido. Se seleccionaron tres estados de desarrollo tardío: flores en antesis y/o botones grandes previos a la antesis localizados en la base de las inflorescencias; etapas intermedias con botones, no completamente desarrolladas en la parte media de las inflorescencias; y etapas tempranas, con botones pequeños en el ápice de las inflorescencias. Cuando hubo suficientes individuos disponibles, se eligieron tres plantas al azar; en la mayoría de los casos, por escasez de ejemplares en las colecciones sólo se consideró una planta. Todos los botones florales y flores en antesis se fijaron en FAA (formaldehído 37%, etanol al 95%, ácido acético glacial, agua destilada 1: 5: 0,5: 3,5, v / v).

Preparación del material para microscopio electrónico de barrido (MEB): La morfología de las estructuras utilizados como caracteres se observaron bajo el microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras diseccionadas se deshidrataron en una serie de etanoles graduados (30, 75, 80, 96, 100 y 100%), se llevaron a punto crítico con una desecadora CPD-030-Bal-Tec, se colocaron en portamuestras metálicos con cinta de carbón de doble cara y se cubrieron con oro por pulverización catódica. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-5310 LV (JEOL, Tokio).

RESULTADOS

La Tabla 2 resume las características principales de la antera, columna y labelo de los taxones estudiados en cinco de las seis subtribus de Epidendreae.

Tabla 2. Principales características observadas (caracteres del desarrollo de anteras, columna y labelo).

Caracteres del desarrollo tardío		Subtribus y los taxones clave observados en Epidendreae													
	Calypsoinae		Coeliinae	Bletiinae				Ponerinae		Pleurothallidinae		Laeliinae			
	<i>Corallorhiza maculata</i>	<i>Govenia alba</i>	<i>Coelia triptera</i>	<i>Bletia purpurea</i>	<i>Chysis bracteata</i>	<i>Chysis limminghei</i>	<i>Chysis laevis</i>	<i>Isochilus major</i>	<i>Ponera juncifolia</i>	<i>Stelis ciliaris</i>	<i>Specklinia digitale</i>	<i>Laelia speciosa</i>	<i>Oestlundia ligulata</i>	<i>Prothecia squalida</i>	<i>Encyclia Microbulbon</i>
Flexión de columnas (Fig. 3)	Comienza erecta finaliza muy flexionada (parte apical pronunciada mente doblada sobre sí misma)	Comienza erecta finaliza muy flexionada (parte apical pronunciadamente doblada sobre sí misma)	Siempre erecta	Comienza erecta finaliza flexionada	Comienza erecta finaliza flexionada	Comienza erecta finaliza flexionada	Comienza erecta finaliza flexionada	Comienza erecta finaliza flexionada	Comienza erecta finaliza flexionada	Siempre erecta	Comienza erecta finaliza ligeramente flexionada	Comienza erecta finaliza ligeramente flexionada	Siempre erecta	Siempre erecta	Siempre erecta
Alas de columna (Fig. 3)	ausentes	presentes	ausentes	presentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	presentes	ausentes	Ausentes*	ausentes	ausentes

Incumbencia de la antera (grados desde la posición original. Fig. 3)	170°	170°	90°	170°	170°	170°	170°	180°	90°	170°	170°	140°	40°	90°	180°
Inflexión temprana de la antera (Fig.3)	presente	presente	presente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Rostelo (Fig. 4)	presente	presente	presente	presente	presente	presente	Sólo vestigial y en algunos casos ausente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Ornamentación de la epidermis de la antera (Fig. 5)	Lisa	Lisa	Lisa	Ligeramente estriada	Conspicuamente estriada	Estriada	Estriada	Lisa	Lisa a ligeramente estriada	Estriada o ligeramente corrugada	Densamente estriada	Estriada	Ligeramente estriada	Ligeramente estriada	Conspicuamente estriada
Tipo de estomas en el antera (Fig.5)	Ausentes	Ausentes	Tipo actinocítico	Tipo actinocítico	Tipo actinocítico	Tipo actinocítico	Tipo actinocítico	Tipo actinocítico	Tipo actinocítico	Ausentes	Ausentes	Tipo actinocítico	Ausentes	Tipo actinocítico	Tipo semiactinocítico

Estipe (Fig. 7)	Hamulus	Tegula	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Cantidad de polinios (Fig. 7)	4	4	8	8	8	8	8	4	4	2	2	8	4	4	4
Forma de los polinios (Fig. 7)	Iguales	Iguales	Iguales	Iguales	Desiguales	Desiguales	Desiguales	Iguales	Iguales	Iguales	Iguales	Desiguales	Iguales	Iguales	Iguales
Número de pares de caudículas (Fig. 7)	1	1 (masa irregular de células)	2	2	1	1	Ausentes	1	2	Ausentes	1	2	Ausentes	2	2
Número de quillas del labelo (Fig. 6)	2	5	0	3 centrales y 4 accesorias	5 centrales	5 centrales	3 centrales y 6-8 accesorias	0	0	0	2	3	1 central y 6 accesorias	3 centrales	2 centrales
Tricomas o papilas en el labelo (Fig. 6)	Ausentes	Papilas	Ausentes	Ausentes	Tricomas	Tricomas	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Tricomas	Ausentes	-----	Ausentes	Tricomas	Ausentes

Desarrollo de la columna y labelo	Labelo libre	Labelo libre pero, articulado por un pie de columna	Labelo libre pero, unido a la base por un pie de columna	Labelo libre	Labelo librepero, articulado por un pie de columna	Labelo libre pero, articulado por un pie de columna	Labelo libre pero, articulado por un pie de columna	Labelo libre pero, articulado por un pie de columna	La base del labelo unida por un pie de columna, descansar libre	Labelo libre	Labelo libre pero, articulado por un pie de columna	Labelo libre	Labelo parcialmente fusionado con la columna (1/3 de la base)	Labelo basalmente fusionado a la columna	El labelo connado basal a la columna
Diámetro de la flor (cm)	1.5	1	1.2	5	9	5.5	6.5	1	.5	.45	.3	14	1.4	2	3.5
Labelo longitud x ancho (mm)	-----	-----	5-5.5 x 3.8-4.1	-----	25-35 x 28-40	17 x 13	25 x 14	-----	-----	.9 x .7	1.5-2 x 0.6-1	40-70 x 35-50	3-4 x 2	10-14	-----
Antera longitud x ancho (mm)	-----	-----	1 x 1.3	-----	3.3 x 3.3	3.3 x 3	2.5 x 2	-----	-----	.32 x .3	0.35-0.5 x 0.3-0.4	5-6	1,8 x 1,5	0.75 x 1.1	2 x 1.6
Columna longitud x ancho (mm)	-----	-----	1.9-2.1 x 2.3-2.8	-----	15-18 x 8-9	9 x 4.2	15 X 7	-----	-----	.7 x .25	1.3-2 x 0.8	33-36 x 7-9	4-6 x 5.5	6-6.5 x 2.3-2.5	6-9.5 x 2.3

Subtribu Calypsoinae: *Corallorhiza maculata*

Etapas tempranas del desarrollo tardío. La **antera** está flexionada (incumbencia temprana), con cerca de 90° con respecto al eje de la columna, la epidermis de la antera es lisa, sin ornamentación. En su ápice, una **caudícula** está en contacto cercano con la parte apical del **rostelo**, que está compuesto en esta porción de células del **viscidio**. El ápice estrecho de la **columna**; está ligeramente encorvado sobre sí mismo, hacia la base la columna se ensancha, y a los lados se encuentran presentes las **aurículas** (como pequeñas protuberancias. Fig. 3a). Los márgenes y el ápice del **labelo** están recurvados; en la base del **labelo** están presentes dos cuerpos lamelares (laminillas o pequeñas protuberancias), más largos que anchos, formando un canal en la mitad; entre los bordes donde estas dos protuberancias están en contacto y en un acercamiento de las células de esta zona, se observa la presencia de abundantes poros (Fig. 6A-C). **En la antesis:** La **antera** ha crecido, tiene forma sub-globosa, operculada e incumbente; se observa como si hubiera experimentado una marcada inflexión, pero esto es resultado del pronunciado encorvamiento sobre sí misma en la porción de la columna (Fig. 3B-C). Una **cubierta de la antera** bien diferenciada está ausente, las células de la epidermis de la antera se aprecian de lisas a ligeramente estriadas (Fig. 5A). Por debajo del ápice de la antera, el **hamulus** sobresale en el centro como una estructura muy conspicua. Por detrás de éste, el resto del **rostelo** se extiende bajo la parte basal de la antera (Fig. 7A). En acercamiento las células del **hamulus** son lisas, redondas y granulosas (Fig. 7B). De la mitad al ápice, la **columna** se encuentra pronunciadamente encorvada sobre sí misma y parece como si fuera más corta en su longitud que en la etapa del desarrollo previa observada (Fig. 3C). La columna se ensancha hacia la base donde se localizan las dos **aurículas**, éstas son prominentes, gruesas y se extienden a lo largo de los lados; debajo del surgimiento de la columna el ovario tiene el mismo ancho (Fig. 3B-C). El ápice del **labelo** y sus márgenes ya se encuentran extendidos.

Subtribu Calypsoinae: *Govenia alba*

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** está flexionada (incumbencia temprana) cerca de 90° con respecto al eje de la columna, es unilobulada y de forma subcuadrada. Las células de la epidermis de la antera son, de lisas a ligeramente rugosas. En la mitad, debajo del ápice de la antera, es visible un prominente **viscidio** sub-ovalado conectado a ésta; por medio de un **estipe (tegula)** agudo. La **columna** es erecta y de la misma anchura en todo su largo. Dos pequeñas **alas** comienzan a desarrollarse a lo largo de los lados (Fig. 3D). **En la antesis:** La **antera** se encuentra ahora muy flexionada, aproximadamente 170° al eje de la columna, con forma ovoide y ha crecido notablemente; en la parte media presenta una quilla muy prominente compuesta por células muy conspicuas (Fig. 3E-F); el resto de la epidermis de la antera tiene células de lisas a ligeramente rugosas (Figs. 3F y 5B). En medio, debajo del ápice de la antera se presenta un **viscidio** peltado, y es visible la **tégula**, compuesta de una línea de células granuladas (Fig. 7C). La **columna** es de la misma anchura a todo su largo y se encuentra pronunciadamente inclinada sobre sí misma; en sus lados las **alas** alargadas y redondeadas están ligeramente desplegadas (Fig. 3E).

Subtribu Coeliinae: *Coelia triptera*

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** bilobulada está flexionada (incumbencia temprana) cerca de 35° con respecto al eje de la columna, y la punta de la antera se ensancha hacia el ápice; justo por debajo del ápice de la antera son visibles dos pequeñas protuberancias y la **cubierta de la antera** no es distinguible del resto de la epidermis de la antera. La **columna** es hexagonal (Fig. 3G). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** está más flexionada, cerca de 45° con respecto al eje de la columna, permanece de forma bilobulada y con un ápice conspicuo, las dos pequeñas protuberancias redondeadas ahora se encuentran más desarrolladas. La cutícula de la epidermis de la antera está compuesta de células redondas, lisas pero la **cubierta de la antera** no es distinguible (Fig. 3H). En la base de la antera, el rostelo en desarrollo se compone de una estructura transversa con células rectangulares, lisas, en la capa inferior de este tejido se observan numerosas conexiones intercelulares entre las paredes (Figs. 3H y 4A). La **columna** es corta y no se aprecia un clinandrio conspicuo. El **labelo** es simple, con forma de punta de flecha y sin ornamentaciones o proyecciones en su superficie adaxial, sólo se aprecian sus

lados abultados como pliegues convexos anticlinales, convergiendo en el ápice (Fig. 6D). **En la antesis** la antera está totalmente flexionada, su ápice se localiza 90° de su posición original (al eje de la columna. Fig. 3I, J). La **cubierta de la antera** es claramente distinguible, las células de su cutícula son redondas y lisas, con algunos estomas actinocíticos, con secreciones (Fig. 5C). Debajo de la cubierta de la antera, en la punta de cada polinio, hay dos pares de **caudículas** redondas con células poliédricas, que según la descripción de Salazar, 1990 eran granuladas (Figs. 3J y 7D). El **rostelo** bien desarrollado forma una barrera morfológica que separa la **superficie estigmática** receptiva que se encuentra por debajo y es similar a la apertura de una caverna (Figs. 3I, J y 4B). La **columna** es hexagonal, en su base se une al ovario que tiene proyecciones puntiagudas; es muy ancha, con grandes surcos longitudinales. (Figura 3I). El labelo ha crecido en longitud y conserva los atributos descritos anteriormente; y en primer plano sus células son redondeadas y lisas (Fig. 6E-F).

Subtribu Bletinae: *Bletia purpurea*

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** comienza su diferenciación como una estructura erecta, es sub-cuadrada y bilobulada, con el ápice trapezoidal distalmente. Debajo de la base de la antera, la **columna** presenta dos pequeños apéndices laterales, que corresponden a las fases iniciales del **clinandrio** (Fig. 3K), en medio, una cresta transversal de tejido comienza a desarrollarse, correspondiente a las etapas iniciales del **rostelo** (Fig. 4C); debajo del rostelo hay un área semicircular compuesta de tejido granuloso, correspondiente a la superficie incipiente del **tejido estigmático** (Fig. 3K). En el **labelo** se pueden observar tres quillas centrales que se extienden longitudinalmente desde la base hasta el ápice (Fig. 6G). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** es redonda (esférica en vista tridimensional); está flexionada y su ápice se localiza aproximadamente 160° de su posición original; ahora se observa a la **cubierta de la antera** de forma cucullada, con células epidérmicas redondeadas, y abundantes estomas actinocíticos en su parte superior; debajo las células son menos llamativas, más pequeñas y rectangulares. En la parte inferior de la cubierta de la antera, los dos lóbulos muestran signos de división longitudinal. En esta etapa, la **columna** está más desarrollada y ensanchada. Los dos apéndices laterales observados en los lados del ápice de la columna ahora se ensanchan, formando claramente el **clinandrio**; por el centro, la cresta transversal de tejido forma un **rostelo** definido, proyectado

como una estructura en forma de lengua bien desarrollada con células epidérmicas rectangulares. Debajo está la **superficie estigmática**, cubierta por el rostelo bien desarrollado (Fig. 3L). **En la antesis:** la **antera** con flexión de 170° luce obtriangular, con bordes redondeados; la **cubierta de la antera** completamente desarrollada está compuesta por una epidermis con células estriadas irregulares, los estomas actinocíticos son menos visibles pero presentes en la misma zona de la etapa anterior. (Figs. 3M y 5C). Debajo de la cubierta de la antera se exponen los **polinios** completamente desarrollados, los cuatro superiores son visibles y debajo de ellos se ubican otras cuatro (como se informó anteriormente en el género por Sosa 2002, 2008); las células poliédricas desarrolladas en el ápice de cada polinio son más redondeadas y engrosadas, formando las **caudículas** (Figs. 3M y 7E). La **antera** está asentada en el bien definido clinandrio, el **rostelo** tiene una forma semilunada, formando un escudo que separa el polinario de la superficie fértil del **estigma** ubicado debajo (Figs. 3M y 4D). Los lados de la **columna** se están extendiendo, formando las **alas** de la columna (Fig. 3M). En el **labelo** se observan tres quillas centrales y pocas quillas accesorias que se extienden longitudinalmente desde la base hasta el ápice (Fig. 6H). Las células de la epidermis del labelo son estriadas (Fig. 6I).

Figura 3 Parte 1 (página siguiente). Etapas tardías del desarrollo (columna y antera) de *Corallorhiza maculata* (A, B, C). A. Incumbencia temprana de la antera. B. Antera incumbente en crecimiento. C. Vista lateral de la columna inclinada sobre sí misma y la antera incumbente. *Govenia alba* (D, E, F) D. Antera incumbente (etapa temprana), columna erguida (del mismo ancho en toda su longitud) y pequeñas alas en desarrollo. E. Antera madura notablemente incumbente. F. Quilla prominente en medio de la antera, justo debajo de la parte apical de la tegula (escudo del viscidio). *Coelia triptera* (G, H, I, J) G. Incumbencia temprana de la antera H. Etapa intermedia tardía de la antera incumbente. I. Antera totalmente flexionada, columna con forma de hexágono, la base se une al ovario que presenta proyecciones puntiagudas (flechas negras) y con grandes surcos que se cruzan longitudinalmente (flechas blancas). J. Acercamiento de la antera en la antesis, las flechas negras señalan el límite entre la cubierta de la antera y cada polinio, respectivamente (dos pares de caudículas granulas expuestos en el ápice). *Bletia purpurea* (K, L, M); K. Incumbencia temprana de la antera (subcuadrada, bilobulada con ápice trapezoidal). L. Etapa intermedia tardía, antera flexionada (incumbente), la cubierta de la antera cucullada con estomas actinocíticos embebidos en su parte superior (flechas blancas, acercamiento en el recuadro y Fig. 5B). M. Antera flexionada en la antesis, cubierta de la antera completamente desarrollada, polinios (cuatro superiores visibles).

Barras de escala:

A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L, M = 100 μ m

I = 1 mm

Abreviaturas:

* = ápice de antera, **a** = antera, **ac** = cubierta de la antera, **ap** = apéndice, **au** = aurícula, **c** = columna, **cau** = caudícula, **cl** = clinandrio, **dp** = pollinia dehisciente, **h** = hamulus, **l** = labelo, **lo** = lóbulo, **lp** = pétalo lateral, **m** = mentum, **o** = ovario, **p** = polinio, **r** = rostelo, **s** = estomas, **st** = estigma, **t** = tegula, **v** = viscidio, **w** = alas de columna.

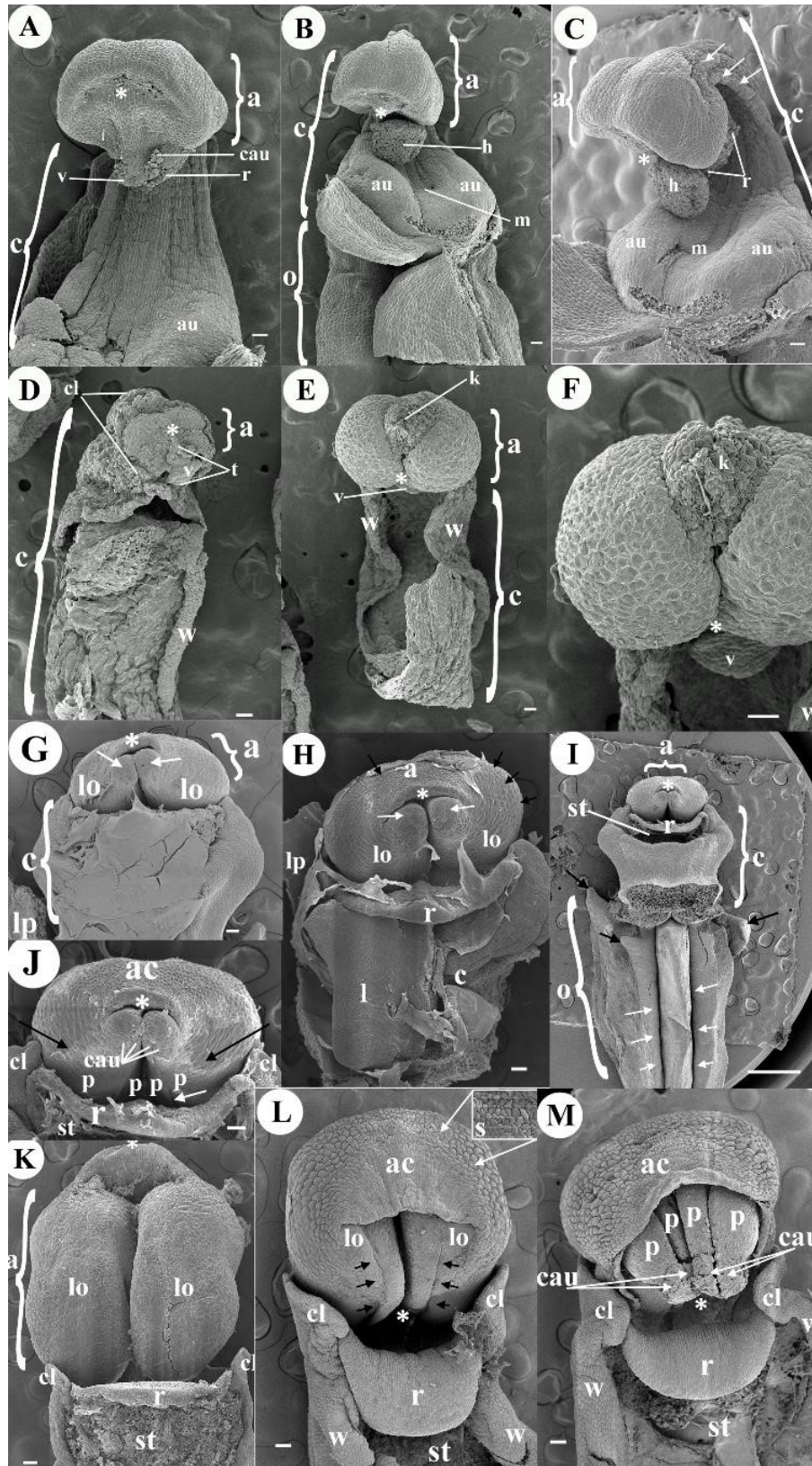


Figura 3. Parte 1

Subtribu Bletiinae: *Chysis bractescens*, *Chysis limminghei* y *Chysis laevis*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: las **anteras** de las tres especies, comienzan su diferenciación como estructuras erectas, en *C. bractescens* y *C. limminghei* son redondas y en *C. laevis* más semicirculares o como medio círculo, todas son bilobuladas, presentando cada lóbulo una línea longitudinal bien marcada en el tejido epidérmico (Fig. 3N, Q, T); *C. laevis* muestra un tejido en su ápice (de forma trapezoidal) y en las otras dos especies el ápice no es pronunciado. En la base de la antera, hacia el frente, en la **columna** de *C. bractescens* y *C. limminghei*, respectivamente, se forma un **rostelo** en desarrollo temprano, que se proyecta conspicuamente hacia arriba con una forma semilunar, cubriendo aproximadamente la mitad de la longitud de la columna (Figs. 3N, Q y 4E, G). Sin embargo, en la misma etapa de *C. laevis*, sólo se pueden observar dos proyecciones muy poco visibles o primordios del rostelo por debajo de la antera (Fig. 3T). No se puede observar ningún desarrollo de los apéndices de **clinandrio** en ninguna de las tres especies; ni **superficie estigmática** ni su tejido receptivo. En medio del labelo de *C. bractescens* y *C. limminghei* comienzan a desarrollarse **cinco quillas**; algunas células de las papilas epidérmicas (parecen más grandes y redondeadas) comienzan a diferenciarse y a sobresalir en el medio de cada quilla (Fig. 6 J, M). En *C. laevis*, sólo se desarrollan tres quillas anchas, sin que sobresalgan diferentes células en su epidermis (Fig. 6P). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la forma de la **antera** en *C. bractescens* y *C. limminghei* es más cuadrada, ligeramente menos erecta, en su parte superior por encima de los dos lóbulos, ahora tiene una cubierta de la antera más definida (Fig. 3O, R). El **rostelo** se proyecta hacia el frente en *C. bractescens* y *C. limminghei*, pero en *C. laevis* los apéndices del rostelo permanecen subdesarrollados y son ligeramente más puntiagudos (Fig. 3U). En *C. limminghei* y *C. laevis*, se forma una hendidura transversal del tejido que corresponde a la futura **superficie estigmática receptiva** y en esta zona se pueden observar algunas secreciones. El ápice de la **columna** de *C. bractescens* y *C. limminghei* se ensancha y se observan dos pequeños dientes laterales formando el **clinandrio** (Fig. 3O, R); de manera similar, la columna también se ensancha en *C. laevis*, pero no hay apéndices ni dientes (Fig. 3U). **En la antesis:** las **anteras** completamente desarrolladas de las tres especies están flexionadas, su ápice ahora se encuentra a unos 170° de su posición original (Fig. 3P, S, V). En *C. bractescens* y *C. limminghei* tiene forma galeada, en ambas, la **cubierta de la antera** (con forma de casco con máscara), cubre casi por completo los

polinios, y sus células epidérmicas tienen cutícula irregular estriada con pocos estomas actinocíticos (Fig. 5F). Bajo la cubierta de la antera, en el ápice, se expone un par de polinios que portan dos **caudículas** laminares compuestos por una zona membranácea (como fue observado por Soto-Arenas, 2008a en flores frescas. Fig. 7F, G). Por debajo, el **rostelo** transversal forma una estructura muy llamativa, a modo de escudo rectangular, compuesto por células epidérmicas rectangulares en forma de empalizada (Figs. 3P, S y 4F, H). Bajo este, la hendidura se ensancha y está cubierta con una gruesa capa de secreciones. La **columna** es muy ancha, lateralmente se observan dos dientes, uno a cada lado de la columna. De manera diferente, en *C. laevis* la **cubierta de la antera** es cónica, como una capucha, coalescente, aparentemente fusionada por los lados a la columna; debajo, los polinios son dehiscentes, abiertos, sin **caudículas** (Figs. 3V y 7H); no hay **rostelo** desarrollado, solo se ven dos apéndices, subdesarrollados, enrollados sobre sí mismos a los lados de la columna (Figs. 3V y 4I, J). En la parte media de esa zona hay un gran hueco con secreciones en su superficie, correspondiente a la zona receptora del **estigma**. La **columna** es alargada y no muy ancha. Las **cinco quillas** en el **labelo** de *C. bractescens* y *C. limminghei* están completamente desarrolladas, numerosos tricomas simples y papilas están presentes a lo largo de la parte media de cada quilla (Fig. 6K, L, N, O); de manera distinta, en *C. laevis* solo tres quillas grandes están completamente desarrolladas y han surgido varias quillas accesorias menos conspicuas, cuatro a cada lado del labelo, y los tricomas no están presentes (Fig. 6Q, R).

Figura 3 Parte 2 (página siguiente). Etapas tardías del desarrollo (columna y antera) de *Chysis bractescens* (N, O, P) N. Antera (etapa temprana), erecta, redonda, bilobulada con líneas longitudinales marcadas en su tejido epidérmico (flechas negras). **O.** Etapa intermedia tardía, la antera cuadrada y ligeramente menos erecta (ápice con cierto grado de inflexión), cubierta de la antera visible. **P.** Antera galeada, totalmente flexionada (incumbente), cucullada. Un par de polinios expuestos, con dos caudículas laminares (flechas negras) que rodean a los polinios. ***Chysis limminghei* (Q, R, S); Q.** Antera (etapa temprana), erecta, redonda, bilobulada con líneas longitudinales marcadas en su tejido epidérmico (flechas negras). **R.** Etapa intermedia tardía, la antera más cuadrada, ligeramente menos erecta (ápice con cierto grado de inflexión), cubierta de la antera cucullada visible. **S.** Antera galeada, totalmente flexionada (incumbente), cubierta de la antera cucullada. Un par de polinios expuestas con dos caudículas laminares (flechas blancas). ***Chysis laevis* (T, U, V); T.** Antera (etapa temprana) erecta, ápice pronunciado (forma trapezoidal), semicircular, bilobulada con líneas longitudinales marcadas en su tejido epidérmico (flechas negras). Dos primordios de rostelo muy discretos (flechas blancas). **U.** Etapa intermedia tardía, antera ligeramente menos erecta (ápice con cierto grado de inflexión), bilobulada, cubierta de la antera visible. Los apéndices del rostelo permanecen subdesarrollados (flechas blancas). **V.** Antera incumbente, cubierta de la antera cónica (como una capucha), coalescente (fusionada por los lados a la columna), polinio dehiscente, abierto, sin caudículas. Sin rostelo solo dos apéndices subdesarrollados enrollados sobre sí mismos (flechas blancas).

Barras de escala:

N, O, P, Q, R, S, T, U, V = 1 mm

Abreviaturas:

* = ápice de antera, **a** = antera, **ac** = cubierta de la antera, **ap** = apéndice, **au** = aurícula, **c** = columna, **cau** = caudícula, **cl** = clinandrio, **dp** = pollinia dehiscente, **h** = hamulus, **l** = labelo, **lo** = lóbulo, **lp** = pétalo lateral, **m** = mentum, **o** = ovario, **p** = polinio, **r** = rostelo, **s** = estomas, **st** = estigma, **t** = tegula, **v** = viscidio, **w** = alas de columna.

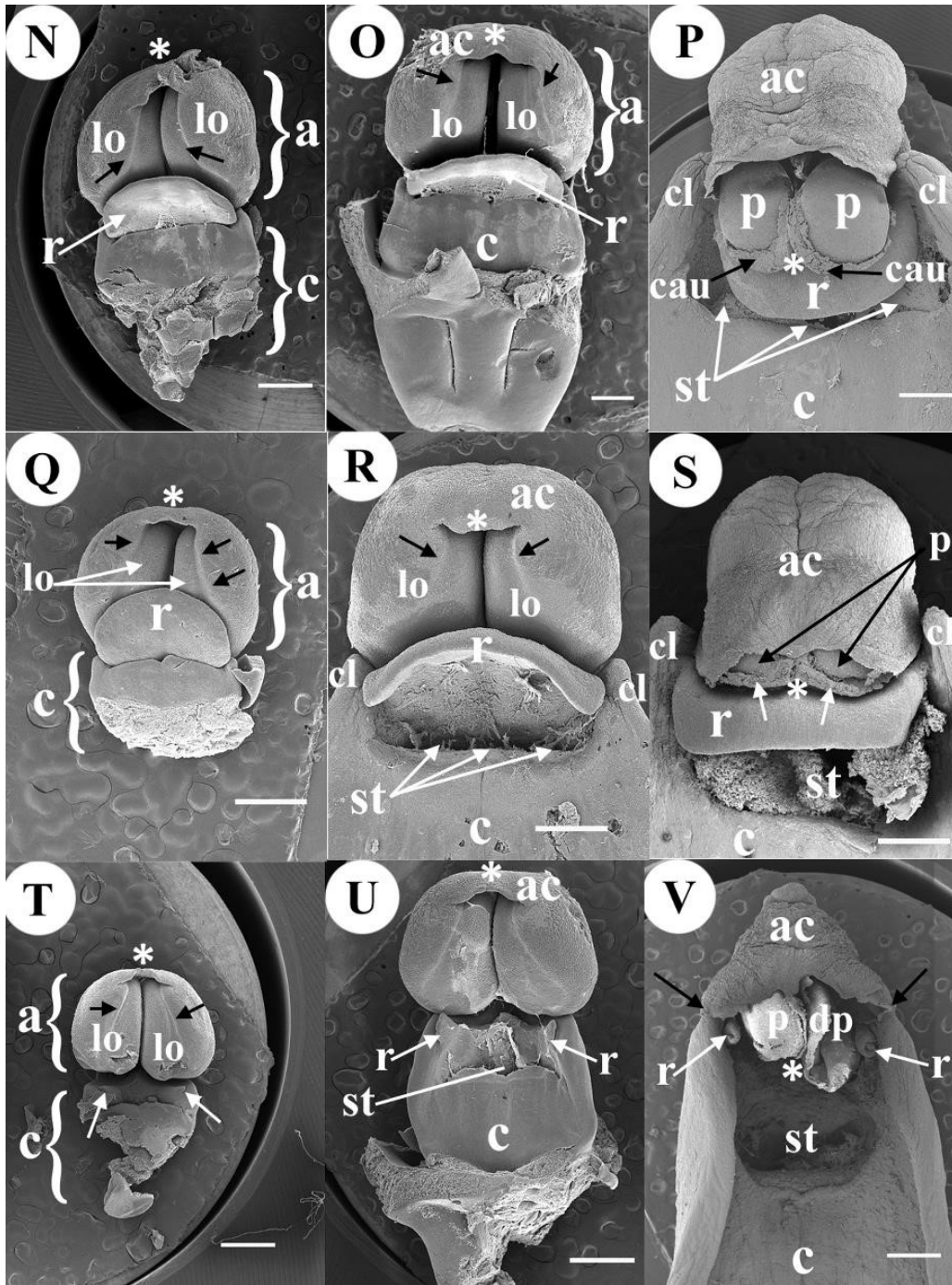


Figura 3. Parte 2

Subtribu Ponerinae: *Isochilus major*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** comienza su diferenciación erecta, alargada, bilobulada, vertical y semirectangular, con un ápice puntiagudo compuesto por grandes células conspicuas; en la base de la antera, en el frente, el **rostelo** en desarrollo temprano es de forma deltoide, proyectado conspicuamente hacia arriba. La **columna** es estrecha y delgada (Fig. 3W). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** se flexiona alrededor de 45° desde su posición original, continúa de forma semirectangular, bilobulada, con ápice puntiagudo con grandes células conspicuas; cada lóbulo tiene ahora una línea en la parte media, como signo de que experimentó una división longitudinal (Fig. 3X); las observaciones de la epidermis de la **cubierta de la antera** revelan la presencia de estomas actinocíticos embebidos en las células epidérmicas lisas (Fig. 5G). En la parte media, frente a la base de la antera, el **rostelo** agudo se proyecta ahora hacia el frente, está compuesto por dos tipos celulares: uno, hecho de células alargadas longitudinales; y a los dos lados de la parte central, el otro tipo celular corresponde a tejido glandular formado por células redondeadas y abundantes secreciones en todo su diámetro, que corresponde al **viscidio** (Fig. 4K, L). A cada lado de la columna se observan dientes laterales prominentes que forman el **clinandrio**. La **columna** es muy estrecha, alargada (Fig. 3X). **En la antesis:** La **antera** está completamente flexionada alrededor de 180° de su posición original, tiene cuatro **polinios** elípticos expuestos: no se observa la **cubierta de la antera** (porque se perdió cuando se hicieron las disecciones). El **clinandrio** tiene tres dientes, dos son dientes laterales y un diente medio prominente. La **columna** continúa estrecha y más alargada (Fig. 3Y). El **labelo** es largo y estrecho, en su base tiene un canal plano, cerca de la parte media está muy plegado, formando un canal delgado que se extiende hasta la entrada formada por el ápice agudo, dos tipos celulares diferentes están presentes en estas zonas de la epidermis (Figura 6S-U).

Subtribu Ponerinae: *Ponera juncifolia*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** en esta etapa inicia erecta, redonda y bilobulada, cada lóbulo es de forma ovoide (Fig. 3Z), las células de la cutícula de la epidermis de la **cubierta de la antera** son casi lisas con estomas actinocíticos embebidos a lo largo de su parte superior (Fig. 5H). En la base de la antera, el **rostelo** obtriangular se proyecta hacia el frente, en él se distinguen dos tipos celulares: los que se extienden desde la

base hasta la parte media del triángulo invertido que son esbeltas células alargadas longitudinales; en el ápice, el otro tipo celular está compuesto por tejido glandular con células redondeadas con abundantes secreciones en todo su diámetro (como se describió anteriormente en *I. major*) y que corresponden al **viscidio** (Figs. 3Z y 7I). Basalmente, la **columna** tiene una forma de “V” sin **clinandrio** visible. El **labelo** es trilobulado, sin quillas ni ornamentaciones; la punta del lóbulo medio está muy doblada sobre sí misma (Fig. 6V). **En la antesis:** la **antera** se flexiona unos 90° desde su posición original; la **cubierta de la antera** es muy conspicua, con una epidermis compuesta de algunas células lisas grandes y otras células ligeramente estriadas y estomas actinocíticos incrustados (Figs. 3A', B' y 5H). En la zona media por el ápice, donde la **cubierta de la antera** no obstruye la vista, se ven dos **polinios** en cada lóbulo y se exponen cuatro **caudículas** largas, los ápices de esas caudículas se aprecian en cercano contacto con el **viscidio** (Figs. 3B' y 7I). El resto del **rostelo** forma un escudo en forma de V bien definido con el borde hecho de células rectangulares (Figs. 3B' y 4M-N). Se ven dos pequeñas protuberancias a los lados de la **columna** que forman un pequeño clinandrio (Fig. 3B'). Las puntas del labelo trilobulado están extendidas y las células estriadas de su parte media tienen forma subcuadrada (Fig. 6X-Y).

Subtribu Pleurothallidinae: *Stelis ciliaris*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** es erecta, bilobulada, cada lóbulo es ovoide con un pequeño ápice redondeado, la parte superior de la **cubierta de la antera** comienza su diferenciación, su tejido está marcado claramente por una línea que delimita dos tipos de células epidérmicas (Fig. 3C'). La epidermis de la cubierta de la antera es arrugada. En la base de la antera, colgando en el centro en la parte media de la punta del **rostelo**, el **viscidio** forma un apéndice bífido, las células en la punta de este apéndice son muy conspicuas. Las células de su borde exterior son muy notoriamente redondeadas. Debajo de esta área hay una estructura hueca (Fig. 3C'). El **labelo** cordiforme no está bien extendido tiene márgenes crenulados, su epidermis tiene células redondeadas muy visibles, en la base en el centro tiene una estructura hueca conocida como glenion (Fig. 6Y). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** está flexionada aproximadamente 90° de su posición original, bilobulada, y la **cubierta de la antera** tiene grandes células epidérmicas

estriadas (Figs. 3D' y 5I). Debajo de la **cubierta de la antera**, dos **polinios** ovoides están en estrecho contacto con la parte superior de la punta del **rostelo** bífido (**viscidio**), el resto del rostelo tiene células grandes y redondas (Fig. 3D'). **En la antesis:** la **antera** está flexionada alrededor de 170° desde su posición original, la **cubierta de la antera** tiene forma de corazón invertido (Fig. 3E'), su epidermis con células corrugadas conspicuas colapsadas (Fig. 5I). En el centro por el ápice de la antera, debajo de la cubierta de la antera se exponen dos **polinios**, estos dos están en estrecho contacto con el **rostelo** superior y, su punta cuyos lados están cubiertos con una densa secreción correspondiente al **viscidio** (Figs. 4° y 7J). El resto del rostelo tiene grandes células redondas (Figs. 3E' y 4P). El **estigma** es prominente, destacándose como los extremos de una corona de olivo a cada lado de la antera (Fig. 3E'). El **labelo** es cordado extendido, en la base el **glenion** está lleno de tricomas incrustados con secreciones (Fig. 6Z, A').

Subtribu Pleurothallidinae: *Specklinia digitale*.

Solo se observaron las etapas tardías intermedias y la etapa de antesis de esta especie. **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** el ápice de la **antera** está a 145° del eje de la columna, su forma es cucullada, las puntas de dos **polinios** están expuestas. Debajo del **rostelo** crenulado se forma una barrera morfológica transversal hecha de grandes células longitudinales. Justo debajo, hay un agujero, la **columna** debajo de esta entrada tiene dos dientes. Abajo, la columna se estrecha y en el centro es canaliculada y el **clinandrio** es un pequeño lóbulo detrás de la antera. Las **alas** de la columna están diferenciadas en la parte superior y las puntas son como dientes en cada lado (Fig. 3F'). **En la etapa posterior,** la **antera** está ligeramente más flexionada que en la etapa previa (cerca de 155°). El **rostelo** es más estrecho y ya no está crenulado, formando una barrera morfológica transversal hecha de grandes células longitudinales. Justo debajo, hay una depresión donde se encuentra el **estigma**, la columna debajo de esta entrada tiene dos dientes. Abajo, la columna se alarga, se estrecha y está canaliculada. Las **alas** de la columna están un poco más diferenciadas y extendidas (Fig. 3G'). El **labelo** es simple, estrecho, ligulado, ligeramente arqueado con dos **quillas** simples engrosadas, que se extienden desde la base casi hasta el ápice (Fig. 6B'). **En la antesis:** La **antera** es cucullada (Fig. 3H'), dos **polinios** están con las **caudículas** expuestas, las células en sus puntas son grandes y lisas, en forma de garra (Fig. 7K). El ápice de la antera está a 170° del eje de la columna. En esta etapa, la epidermis de la **cubierta de**

la **antera** tiene células densamente estriadas (Fig. 5J). Debajo, el **rostelo** ventral forma una barrera morfológica transversal hecha de grandes células longitudinales. Justo debajo hay un hueco con el **estigma** (Fig. 4Q, R). La columna es delgada y larga, canaliculada en la porción media y con **alas** verticales; el **clinandrio** se extiende a los lados y a lo largo del borde de la antera (Fig. 3H'). El **labelo** es simple, ligulado, ligeramente arqueado con dos **quillas** simples engrosadas con células redondas ligeramente estriadas, que se extienden desde la base casi hasta el ápice (Fig. 6C', D').

Figura 3 Parte 3 (página siguiente). Etapas tardías del desarrollo (columna y antera) de *Isochilus major* (W, X, Y); W. Antera erecta (etapa temprana), semirectangular con el ápice puntiagudo, bilobulada. Columna estrecha y delgada. **X.** Etapa intermedia tardía, la antera continua semirectangular, su ápice puntiagudo de células conspicuas engrosadas, bilobuladas, cada lóbulo con una división longitudinal (flecha negra). **Y.** En la anthesis, la cubierta de la antera no se observó porque se desprendió durante la disección, la estructura suelta (cubierta de la antera) se colocó al lado de la columna en el portaobjetos (flechas blancas), se observan cuatro polinios elípticos con inflexión. ***Ponera juncifolia* (Z, A', B');** **Z.** Antera erecta (etapa temprana), redondeada y bilobulada, cada lóbulo ovoide (flechas blancas). **A'.** Etapa intermedia tardía, la antera con caudículas expuestas. **B'.** Cubierta de la antera muy conspicua con estomas actinocíticos embebidos (flechas negras). Dos polinios visibles en cada lóbulo, cuatro caudículas larga expuestas. ***Stelis ciliaris* (C', D', E')** **C'.** Antera (etapa temprana), erecta bilobulada, cada lóbulo ovoide con un pequeño ápice redondeado, la cubierta de la antera inicia su diferenciación del tejido del resto de la antera, una línea claramente marcada la delimita (flechas negras). **D'.** Etapa intermedia tardía, antera bilobulada, la cubierta de la antera claramente diferenciada (flechas negras), debajo de ella, dos polinios ovoides y en estrecho contacto con la parte superior de la punta del rostelo (viscidio bífido, flecha blanca). **MI'.** Antera incumbente, cubierta de la antera con forma de corazón invertido, dos polinios expuestos, en estrecho contacto con la punta del rostelo, el viscidio bífido con abundantes secreciones. ***Specklinia digitale* (F', G', H')** **F'.** Antera flexionada, cucullada, la punta de dos polinios expuestos. Por debajo, la columna con dos dientes (flechas blancas). La columna se estrecha y encuentra canaliculada (flechas negras). Alas de columna diferenciadas. **G'.** La antera ligeramente más flexionada, y la columna con dos dientes (flechas blancas). **H'.** Antera flexionada (incumbente) cucullada, dos caudículas expuestas, la columna delgada y larga, canaliculada en la porción media (flechas negras) y con alas verticales.

Barras de escala:

W, X, Y, Z, A', B', C', D', E', F', G', H'= 100 µm

Abreviaturas:

* = ápice de antera, **a** = antera, **ac** = cubierta de la antera, **ap** = apéndice, **au** = aurícula, **c** = columna, **cau** = caudícula, **cl** = clinandrio, **dp** = pollinia dehisciente, **h** = hamulus, **l** = labelo, **lo** = lóbulo, **lp** = pétalo lateral, **m** = mentum, **o** = ovario, **p** = polinio, **r** = rostelo, **s** = estomas, **st** = estigma, **t** = tegula, **v** = viscidio, **w** = alas de columna.

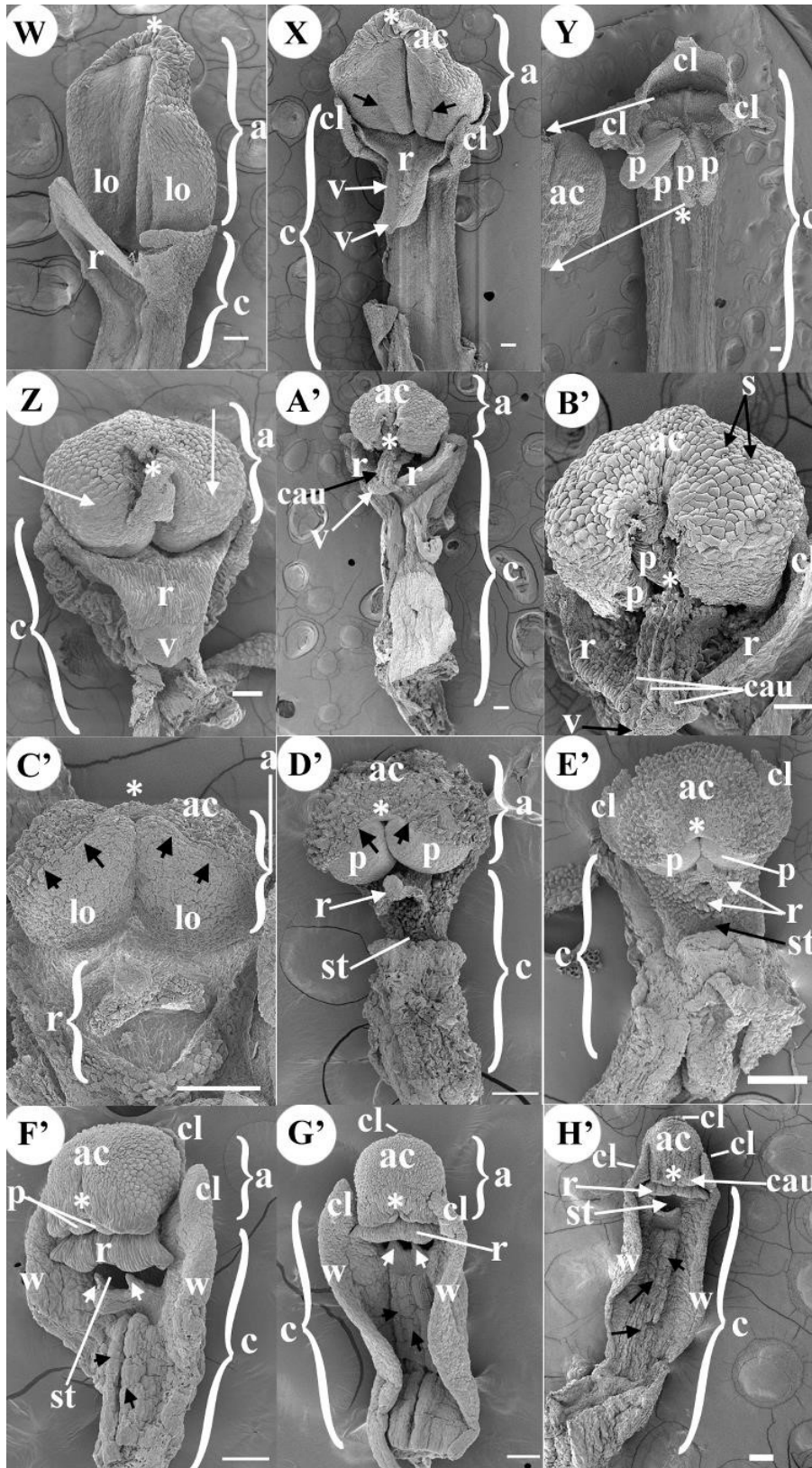


Figura 3. Parte 3

Subtribu Laeliinae: *Laelia speciosa*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: la **antera** es erecta, cuadrada, bilobulada, con ápice trapezoidal. Los lóbulos muestran signos de experimentar una división longitudinal (se observa una línea en la parte media de cada lóbulo). Abajo, una cresta transversal de tejido forma un **rostelo** definido proyectado hacia arriba, como una estructura bien desarrollada con células epidérmicas rectangulares (Figs. 3I' y 4S). Debajo, hay un área compuesta por diferentes tejidos, esta zona corresponde a la superficie incipiente de la región **estigmática**. La **columna** es corta y estrecha, casi del mismo tamaño que la longitud de la antera (Fig. 3I'). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** tiene un crecimiento masivo, está flexionada, su ápice ahora se encuentra aproximadamente a 80° de su posición original; la **cubierta de la antera** es subglobosa, con células redondeadas estriadas. Debajo del ápice de la cubierta de la antera se ven cuatro **caudículas**. En la base de la antera, un **rostelo** transversal se proyecta apicalmente. Debajo hay una gran depresión visible donde se desarrollará la futura superficie **estigmática** (Fig. 3J'). **En la antesis:** la **antera** se flexiona más, su ápice ahora se encuentra aproximadamente a 140° de su posición original, la **cubierta de la antera** es oblonga, con el ápice doblado hacia arriba. La parte superior de la cubierta de la antera tiene la epidermis con células estriadas y abundantes estomas actinocíticos (Figs. 3K' y 5K). Debajo del ápice de la cubierta de la antera, se observan cuatro grandes **caudículas** granuladas, en dos pares (Fig. 7L). Debajo de la base de la antera, el gran **rostelo**, de forma semicircular, con grandes células longitudinales ligeramente estriadas (Fig. 4T) forma un escudo que actúa como barrera morfológica aislando la superficie **estigmática** fértil que se encuentra debajo. La superficie del estigma está cubierta de abundantes secreciones. La **columna** es ancha, se estrecha hacia la antera, los márgenes del **clinandrio** están dentados (Fig. 3K').

Subtribu Laeliinae *Oestlundia ligulata*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: la **antera** es erecta, ovoide, bilobulada, en el ápice se forma un pliegue de tejido, que corresponde a la diferenciación temprana de la parte media de la **cubierta de la antera**. El resto de la epidermis de la cubierta de la antera no se distingue de la epidermis de la antera (Fig. 3L'). En la base de la antera, frente a ella, el **rostelo** se proyecta hacia arriba, dos crestas están presentes en su borde superior cerca del

ápice. Debajo del rostelo, se forma una hendidura transversal a lo largo de la columna. La **columna** tiene dos proyecciones laterales medianas (como dientes) en sus lados que forman el **clinandrio** (Fig. 3L'). El **labelo** es ornamentado, se encuentran dos protuberancias redondeadas en la base que se extienden hacia la punta formando dos **quillas** centrales; a cada lado hay dos quillas accesorias, la punta del labelo está doblada sobre sí misma (Fig. 6E'). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** continúa erecta y bilobulada, su parte superior se diferencia claramente formando la **cubierta de la antera**, que ahora se puede ver cucullada, debajo de los dos lóbulos tiene sus lados externos muy redondeados, con marcadas arrugas a lo largo de su epidermis (Fig. 3M'). **En la antesis:** la **antera** ahora subcúbica continúa casi recta (menos de 40° de su posición original. Fig. 3N'); la **cubierta de la antera** tiene células redondas ligeramente estriadas (Fig. 5L), en el ápice; el borde posee células redondeadas. Solo dos **polinios** son visibles (Fig. 7M). Debajo, en el medio, el **rostelo** es más estrecho a lo largo, en el centro cerca de su borde tiene dos crestas (Figs. 3N' y 4U, V), el tejido debajo tiene una abundante secreción de naturaleza desconocida; el **estigma** ventral es ligeramente cordado, con lóbulos laterales prominentes en los márgenes (Fig. 4U). Dos dientes laterales forman el **clinandrio**. Hacia la base, la **columna** se estrecha (Fig. 3N'). El **labelo** oblongo es alargado y profundamente ornamentado, su base es unguiculada; la **quilla** central es muy verrucosa, flanqueada por tres quillas laterales a cada lado, que se extienden a lo largo de su longitud (Fig. 6F', G').

Subtribu Laeliinae *Prosthechea squalida*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** erecta es oblonga y bilobulada, cada lóbulo tiene forma ovoide, no se puede observar diferenciación en la epidermis de la zona superior de la antera (que se convertirá en la **cubierta de la antera** Fig. 3°); en un primer plano, se observan pequeños estomas actinocíticos que están incrustados dentro de la epidermis estriada (Fig. 5M); debajo del ápice hay un pliegue de tejido (Fig. 3°). En el medio se observa el **rostelo** elipsoide formando una barrera, debajo la **columna** está deprimida, en la parte más profunda se presentan dos pequeñas protuberancias de tejido (Fig. 4W), su superficie es densamente pilosa, cubierta con secreciones de naturaleza desconocida. A cada lado de la columna, un pequeño diente lateral forma el **clinandrio** (Fig. 3O'). El **labelo** tiene tres lóbulos, la punta del lóbulo medio grande está curvada, los márgenes apicales se envuelven entre sí y los lóbulos laterales están curvados. Cerca de la base, debajo

de estos lóbulos laterales se observan abundantes papilas (Fig. 6H'). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** elipsoide se flexiona casi 90° desde su posición original, en medio la **cubierta de la antera** está bien diferenciada; debajo de la cubierta de la antera se encuentran presentes cuatro **polinios**, debajo dos pares de **caudículas** están expuestas (Fig. 3P'); encima de la antera se ve un prominente diente medio del **clinandrio** y en sus lados, está flanqueado por dos dientes laterales. Debajo de la base de la antera, está el **rostelo** transversal y debajo del cual hay un **estigma** cordado (Fig. 3P'). **En la antesis:** detrás de la **antera**, se ve el diente medio prominente del **clinandrio**, está flanqueado por dos dientes laterales (Fig. 3Q'). La **cubierta de la antera** está truncada con forma obovada. Debajo de la cubierta de la antera, hay cuatro **polinios** presentes, con cuatro grandes **caudículas** granuladas expuestas en dos pares (Fig. 7N). Debajo de la base de la antera, se encuentra el **rostelo** transversal en forma de ladrillo (Figs. 3Q' y 4X). Debajo del rostelo, se observa el **estigma** con abundantes fluidos estigmáticos. El **labelo** es unguiculado y trilobulado. Los lóbulos laterales son pequeños y agudos, curvados; debajo de ellos, la porción central está compuesta por abundantes tricomas glandulares, que secretan grandes cantidades de cristales de azúcar (Fig. 6I'-J'). Desde el centro hasta la punta del lóbulo medio, se encuentran presentes tres grandes **quillas** centrales verrucosas y dos o más quillas laterales (Fig. 6I').

Subtribu Laeliinae *Encyclia microbulbon*.

Etapas tempranas del desarrollo tardío: La **antera** es cuadrada, con las esquinas superiores redondeadas. El ápice de la antera está flexionado unos 135° desde el eje de la columna; bajo la **cubierta de la antera** se pueden ver dos **polinios**, en los lados de la antera, hay dos dientes triangulares del clinandrio (Fig. 3R'). La parte media del **rostelo** es aguda, la superficie adaxial tiene células alargadas longitudinales, en el lado abaxial el rostelo es liso (Fig. 4Y). Abajo, en la parte media de la **columna** se presenta una depresión con secreciones (Fig. 3R'). **En las etapas intermedias del desarrollo tardío:** la **antera** se flexiona más, alrededor de 160° desde el eje de la columna, es subcuadrada, con su parte superior bilobulada y las esquinas redondeadas. En el ápice de la **cubierta de la antera** se expone la punta de dos **polinios**. El **rostelo** transversal forma una barrera, a continuación se observa una depresión con pocas secreciones correspondiente a la futura superficie **estigmática**. A los lados de la base de la antera, se encuentran presentes dos dientes de

clinandrio (de forma triangular) (Fig. 3S'). **En la antesis:** el ápice de la **antera** (rectangular obcordada) está a 170° del eje de la columna (Fig. 3T'). En el centro de la parte superior de la **cubierta de la antera** se encuentran presentes abundantes estomas semiactinocíticos (Fig. 5O). Se observan cristales cúbicos rodeando los estomas. Debajo de la cubierta de la antera, en un acercamiento cuatro **polinios** son visibles, y dos pares están expuestos (Fig. 7O). El **clinandrio** tiene dientes triangulares laterales, uno a cada lado de la antera (Fig. 3T'). El **rostelo** transversal es oblongo y la superficie **estigmática** se ve debajo de él (Fig. 4Z). El **labelo** tiene tres lóbulos. Los lóbulos laterales son erectos con puntas libres, el lóbulo medio es circular-ovado con márgenes crenulados, en el centro la superficie es verrucosa, sin quillas (Fig. 6K'-M').

Figura 3 Parte 4 (página siguiente). Etapas tardías del desarrollo (columna y antera) de *Laelia speciosa* (I', J', K') I'. Antera erecta, cuadrada, bilobulada, con ápice trapezoidal. Lóbulos con división longitudinal media cada uno (flechas negras). Columna corta y estrecha. J'. Etapa intermedia tardía, la antera flexionada (ligeramente incumbente), cubierta de la antera subglobosa con células redondeadas estriadas; debajo de ella cuatro caudículas visibles. K'. Antera flexionada (incumbente), la cubierta de la antera es oblonga, con el ápice doblado hacia arriba. Se exponen cuatro caudículas grandes granulosas en dos pares. *Oestlundia ligulata* (L', M', N') L'. Antera erecta (etapa temprana), ovoide, bilobulada, en la parte superior por el ápice se forma un pliegue de tejido, diferenciación temprana de la parte media de la cubierta de la antera. M'. Etapa intermedia tardía, la antera flexionada (incumbente), bilobulada, cucullada. N'. Antera ligeramente flexionada, subcúbica casi recta, dos polinios visibles. *Prosthechea squalida* (O', P', Q'); O'. Antera erecta (etapa temprana), oblonga y bilobulada. P'. Etapa intermedia tardía, la antera flexionada, la cubierta de la antera elipsoide. Bajo la cubierta de la antera cuatro polinios, dos pares de caudículas expuestas (flechas blancas). Q'. Antera flexionada (incumbente), la cubierta de la antera truncada de forma obovada. Debajo, cuatro polinios, con cuatro grandes caudículas granulosas en dos pares. *Encyclia microbulbon* (R', S', T'). R'. Antera flexionada (incumbente) cuadrada con las esquinas superiores redondeadas, bajo la cubierta de la antera se pueden ver dos polinios, S'. Antera más flexionada, subcuadrada con la parte superior bilobulada y las esquinas redondeadas (flechas blancas). En el ápice de la antera, la punta de la cubierta con dos polinios expuestos. T'. Antera flexionada (incumbente), semicuadrada obcordada. Cubierta de la antera con abundantes estomas semiactinocíticos (flechas negras). Debajo de la cubierta de la antera, son visibles cuatro polinios y dos pares de caudículas expuestas.

Barras de escala:

L', M', N', O', P', Q', R', S' = 100 µm

I', J', K' = 1 mm

Abreviaturas:

* = ápice de antera, **a** = antera, **ac** = cubierta de la antera, **ap** = apéndice, **au** = aurícula, **c** = columna, **cau** = caudícula, **cl** = clinandrio, **dp** = pollinia dehiscente, **h** = hamulus, **l** = labelo, **lo** = lóbulo, **lp** = pétalo lateral, **m** = mentum, **o** = ovario, **p** = polinio, **r** = rostelo, **s** = estomas, **st** = estigma, **t** = tegula, **v** = viscidio, **w** = alas de columna.

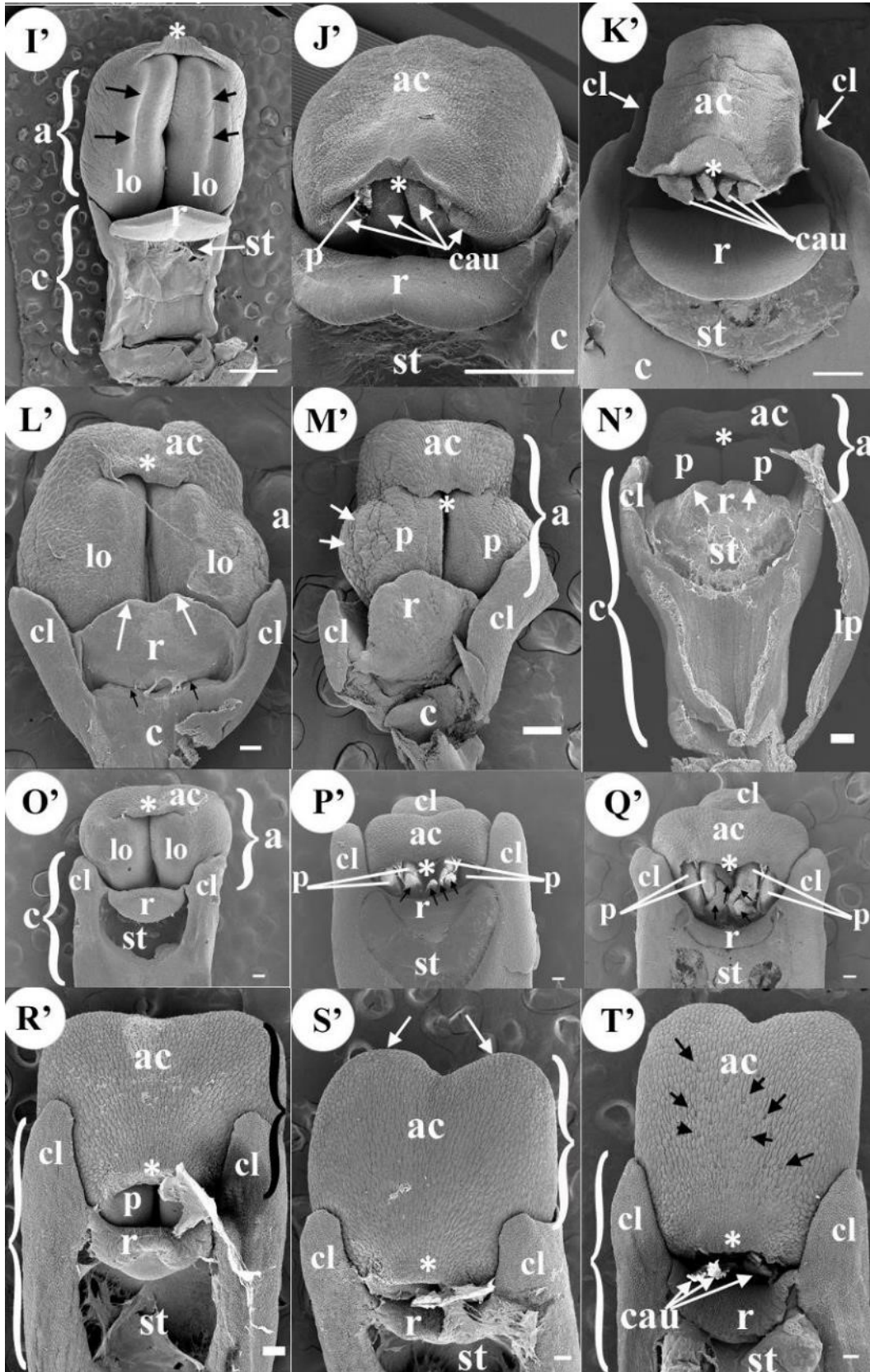


Figura 3. Parte 4

Figura 4 (tres páginas siguientes) Desarrollo del rostelo de *Coelia triptera* (A, B). A. Etapas tempranas del desarrollo tardío, células rectangulares lisas, numerosas conexiones intercelulares (flechas blancas). B. Rostelo en antesis, amplia barrera de células rectangulares. *Bletia purpurea* (C, D). C. Rostelo incipiente temprano. D. Rostelo en antesis (estructura en forma de media luna) de células epidérmicas rectangulares. *Chysis limminghei* (E, F). E. Punta del rostelo temprano con células epidérmicas rectangulares con cutícula estriada. F. Rostelo en forma de escudo formado por células epidérmicas rectangulares dispuestas en empalizada. *Chysis bractescens* (G, H). G. Punta del rostelo temprano proyectándose, con células epidérmicas rectangulares. H. Rostelo en forma de escudo (células epidérmicas rectangulares en empalizada). *Chysis laevis* (I, J). I. Primer plano de uno de los dos apéndices de rostelo subdesarrollado enrollado sobre sí mismo (flecha blanca). J. Rostelo subdesarrollado formado por células epidérmicas rectangulares estriadas dispuestas en empalizada. *Isochilus major* (K, L). K. Rostelo triangular con dos tipos celulares: células alargadas (flechas blancas) y el tipo celular glandular (flechas negras) L. Primer plano de dos tipos celulares de rostelo, el viscidio (flechas negras). *Ponera juncifolia* (M, N). M. Lado derecho del rostelo como escudo en forma de V (flechas blancas) N. Vista en acercamiento del borde del rostelo con células fibrosas. *Stelis ciliaris* (O, P). O. Ápice de la parte superior del rostelo, el viscidio es bífido con células muy fibrosas, en medio el tejido está cubierto con secreciones densas (flechas negras) P. Rostelo con grandes células fibrosas redondas (flechas blancas). *Specklinia digitale* (Q, R). Q. Rostelo con grandes células estriadas longitudinales. R. Acercamiento del rostelo. *Laelia speciosa* (S, T). S. Punta del rostelo temprano con células semirectangulares (flechas blancas), el lado abaxial con células lisas irregulares (flecha negra). T. Acercamiento del rostelo en antesis. *Oestlundia ligulata* (U, V); U. Rostelo transversal en forma de media luna. V. Ápice del rostelo. *Prosthechea squalida* (W, X). W. Rostelo elipsoide temprano, borde con células engrosadas (flecha negra), dos pequeñas protuberancias de estigma (flecha blanca). X. Primer plano de la parte superior del rostelo (flechas blancas), parte inferior con células lisas (flechas negras). *Encyclia microbulbon* (Y, Z) Y. Rostelo puntiagudo temprano en forma de lengua con células estriadas alargadas longitudinales (flechas blancas), el lado abaxial es liso (flechas negras). Z. Acercamiento de las células estriadas en la punta del rostelo.

Barras de escala:

A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, Z = 10 μm

I, M, U, V, W, X, Y = 100 μm

Abreviaturas:

cau = caudícula, p = polinio r = rostelo, st = estigma, v = viscidio

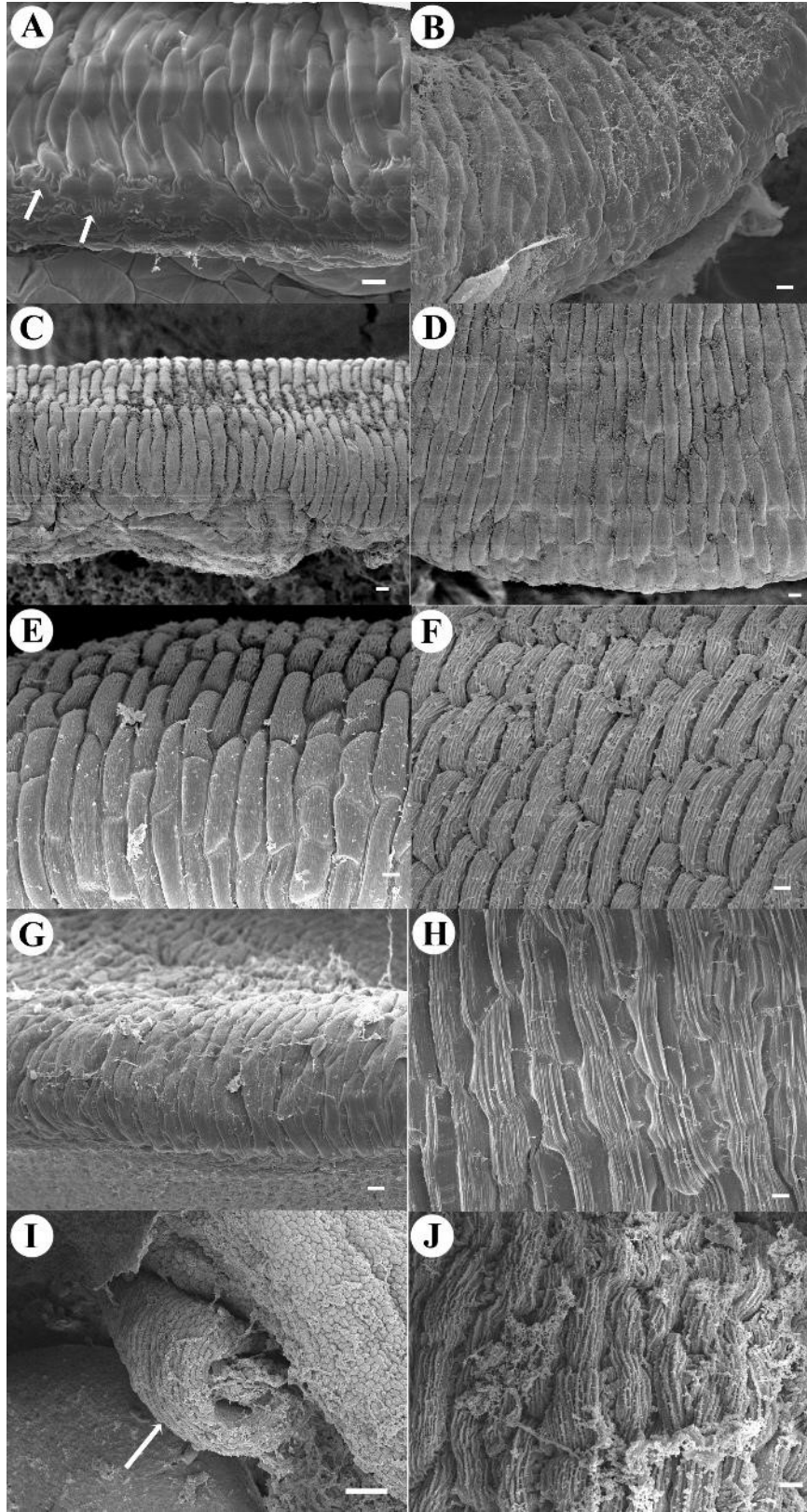


Figura 4. Parte 1

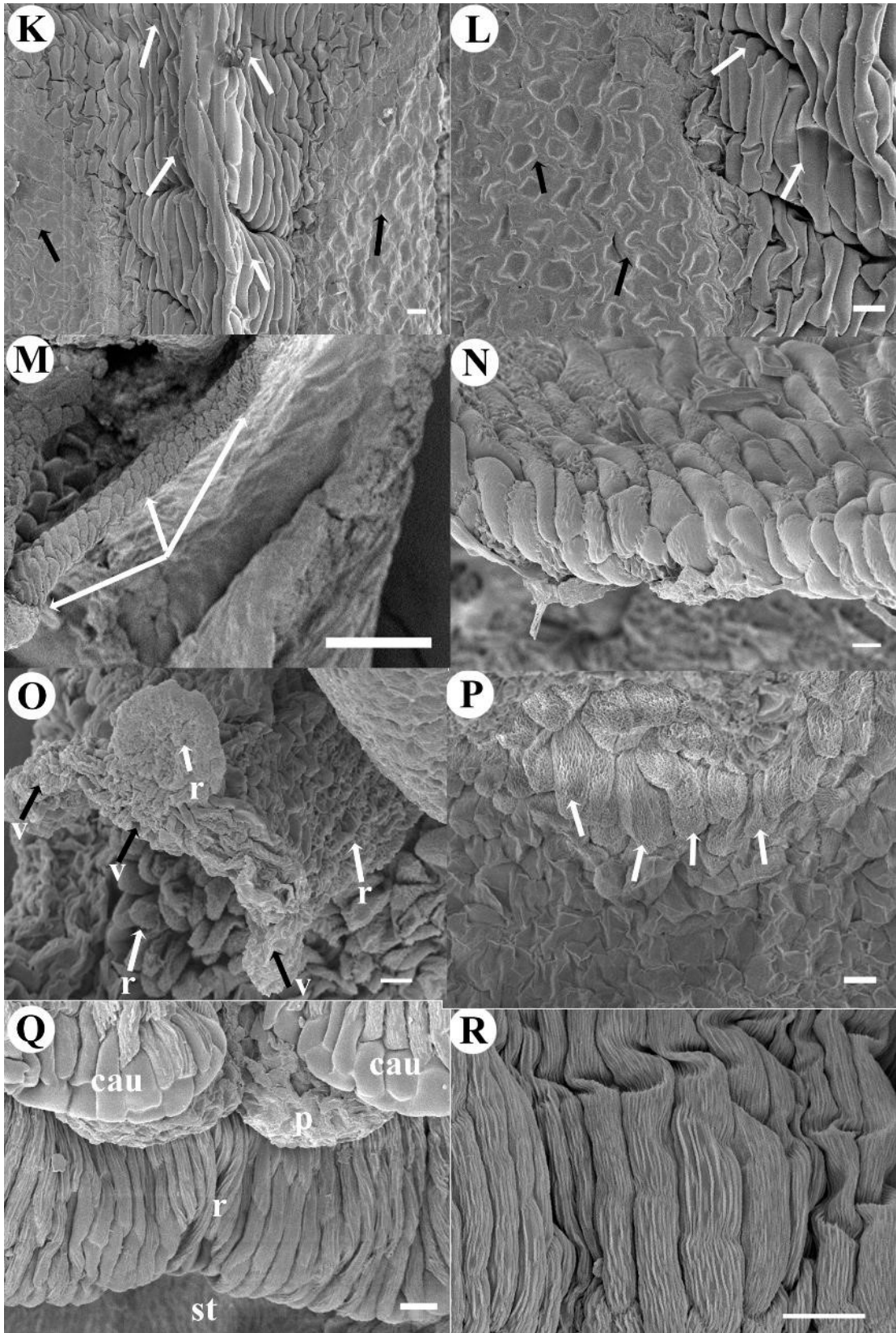


Figura 4. Parte 2

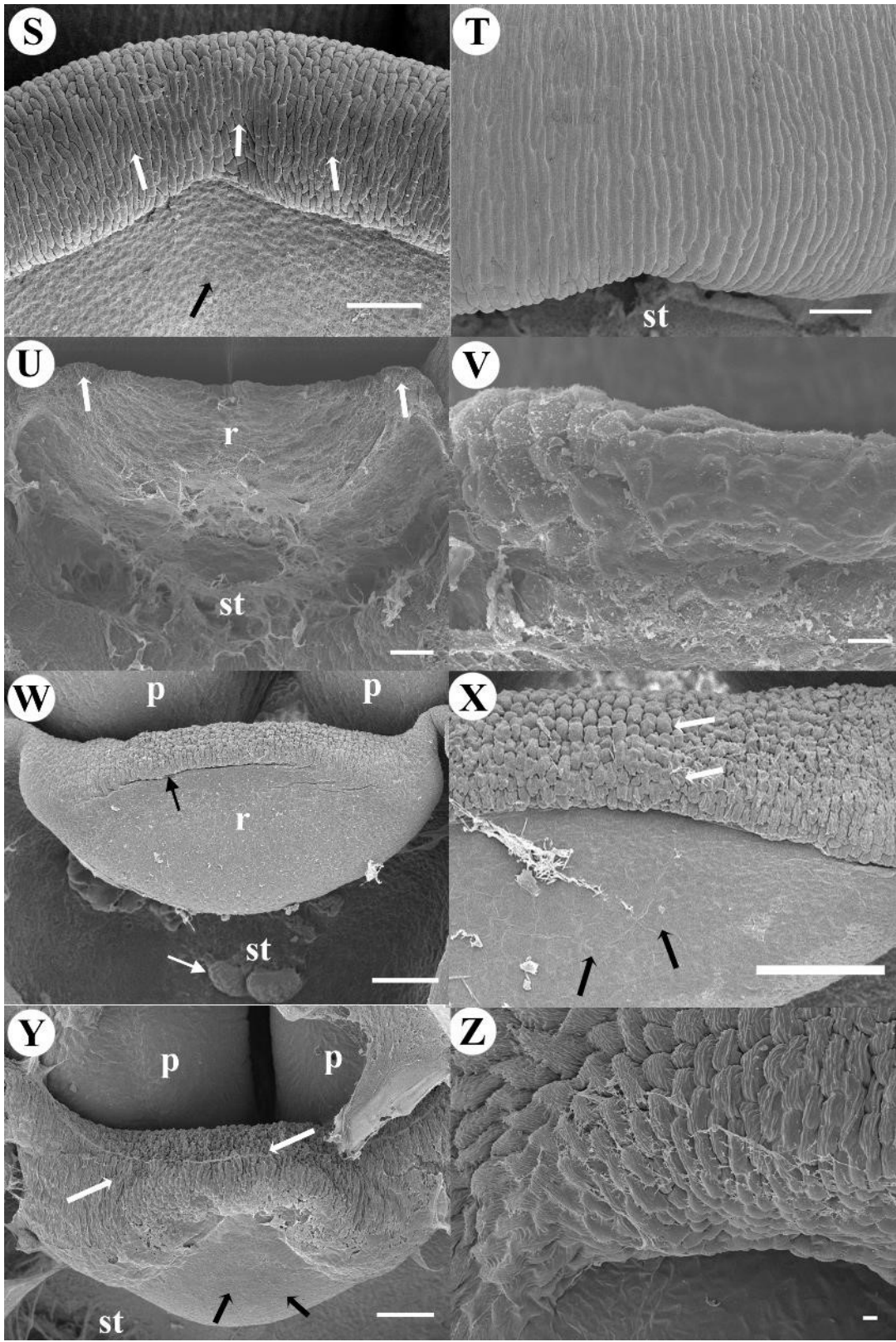


Figura 4. Parte 3

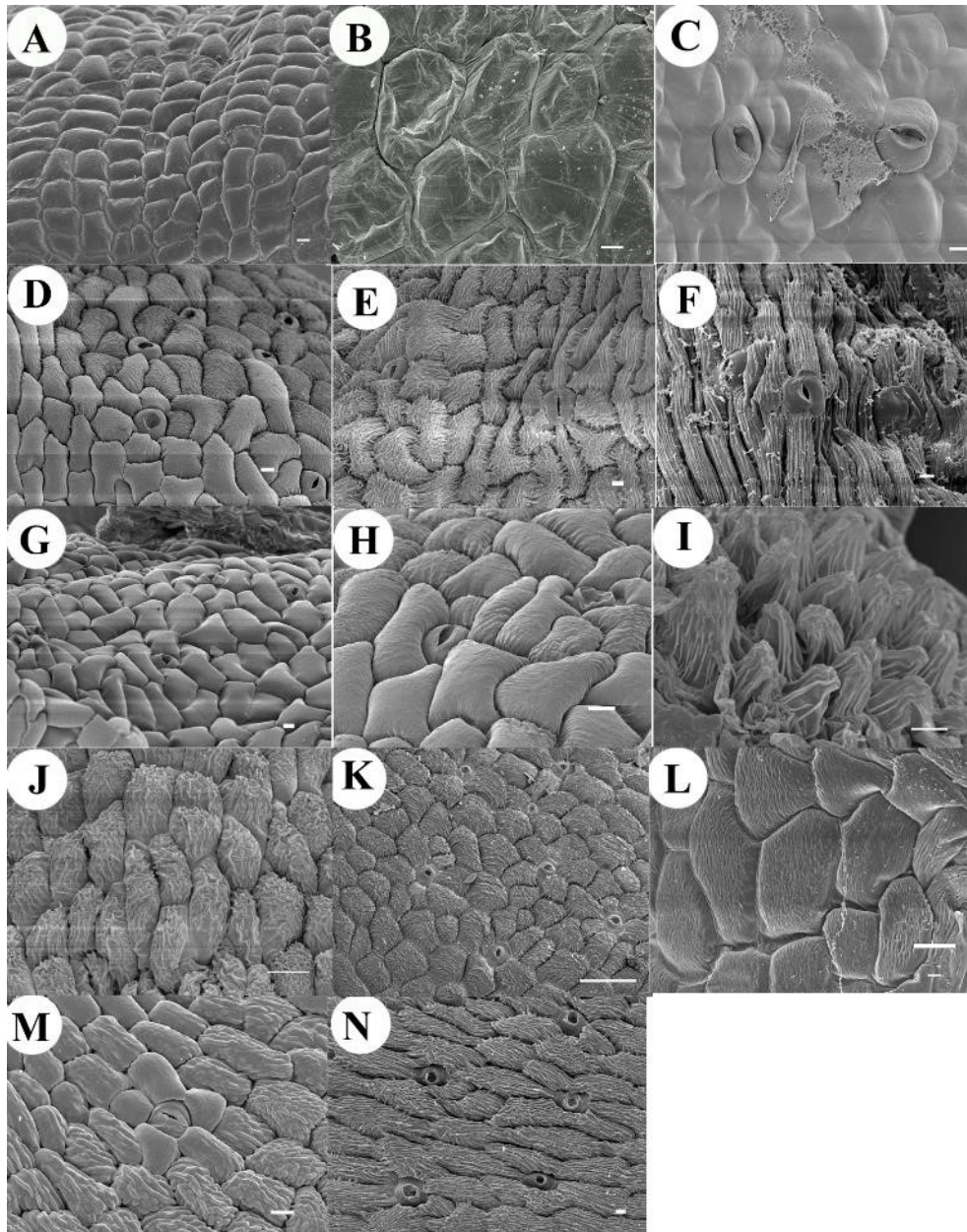


Figura 5 Cutícula de la epidermis de la cubierta de la antera de **A.** *Corallorhiza maculata* con células lisas sin estomas. **B.** *Govenia alba* con células lisas a ligeramente arrugadas sin estomas. **C.** *Coelia triptera* con células lisas que muestran estomas actinocíticos y secreciones. **D.** *Bletia purpurea* con células ligeramente estriadas y estomas actinocíticos. **E.** *Chysis limminghei* con células estriadas conspicuas y estomas actinocíticos. **F.** *Chysis bractescens* con células estriadas longitudinales y estomas actinocíticos. **G.** *Isochilus major* con células lisas y estomas actinocíticos. **H.** *Ponera juncifolia* con células ligeramente corrugadas y estomas actinocíticos. **I.** *Stelis ciliaris* con células estriadas ligeramente corrugadas sin estomas. **J.** *Specklinia digitale* con células densamente estriadas sin estomas. **K.** *Laelia speciosa* con células redondeadas estriadas y estomas actinocíticos. **L.** *Oestlundia ligulata* con células redondas ligeramente estriadas sin estomas. **M.** *Prosthechea squalida* con células estriadas ligeramente anchas y estomas actinocíticos. **N.** *Encyclia microbulbon* con células estriadas conspicuas y estomas semiactinocíticos.

Barras de escala:

A-J, L-N = 10 μ m K = 100 μ m

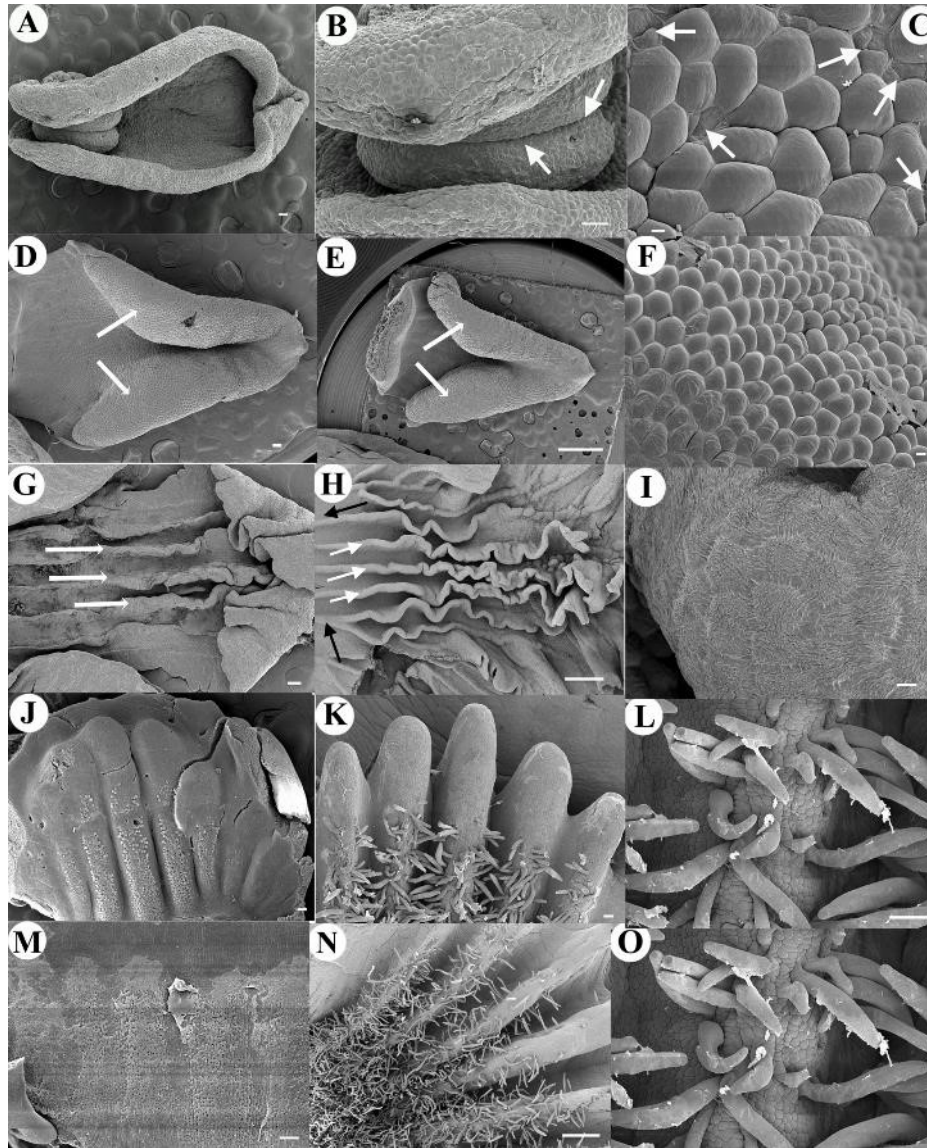


Figura 6 Parte 1 Etapas tempranas del desarrollo tardío y la antesis del labelo de *Corallorhiza maculata* (A, B, C). A. Labelo. B. Protuberancias del labelo formando un canal en medio. C. Acercamiento de las células de las protuberancias, presencia de abundantes poros. *Coelia triptera* (D, E, F). D. Desarrollo del labelo temprano con dos protuberancias (flechas blancas). E. Labelo sus lados abultados en forma de punta de flecha de antesis (flechas blancas). F. Células de la epidermis, simples redondeadas y lisas. *Bletia purpurea* (G, H, I). G. Labelo etapa inicial (tres flechas blancas de las quillas centrales). H. Labelo en la antesis (tres quillas centrales con flechas blancas y 3-4 quillas laterales accesorias desarrolladas con flechas negras). I. Células de la epidermis. *Chysis limminghei* (J, K, L). J. Desarrollo temprano del labelo, cinco quillas centrales con grandes células epidérmicas de las papilas que sobresalen. K. Labelo en antesis, cinco quillas con abundantes tricomas simples. L. Acercamiento de los tricomas. *Chysis bractescens* (M, N, O). M. Desarrollo temprano del labelo, cinco quillas centrales con grandes células epidérmicas de las papilas que sobresalen. N. Labelo en la antesis, cinco quillas con abundantes tricomas simples grandes. O. Acercamiento de los tricomas.

Barras de escala:

C, F, I = 10 μ m,
A, B, D, G, J, K, L, M, O, = 100 μ m
E, H, N, = 1 mm

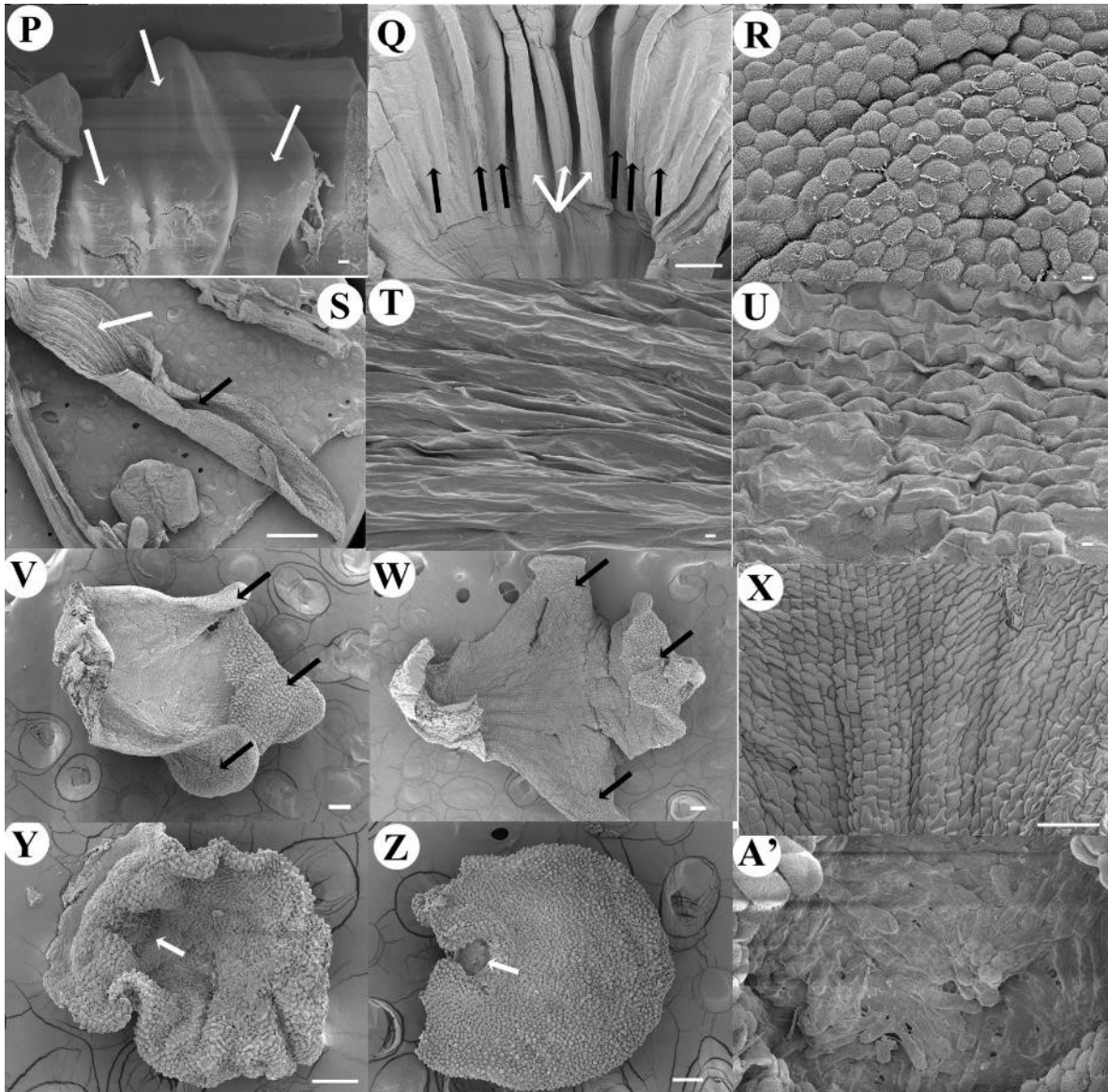


Figura 6 Parte 2 Etapas tempranas del desarrollo tardío y la antesis del labelo de *Chysis laevis* (P, Q, R). P. Desarrollo temprano del labelo con tres quillas centrales prominentes (flechas blancas). Q. Base del labelo en antesis, tres quillas centrales (flechas blancas), cinco quillas accesorias a cada lado del labelo (flechas negras). R. Acercamiento de las células epidérmicas de las quillas. *Isochilus major* (S, T, U). S. Labelo en antesis, acanalado plano (flecha blanca), formando un canal delgado (flecha negra). T. Acercamiento de las células epidérmicas de la parte plana del labelo. U. Acercamiento de las células de la epidermis de la parte conduplicada y del ápice del labelo. *Ponera juncifolia* (V, W, X). V. Desarrollo temprano del labelo trilobulado (flechas negras). W. Labelo en la antesis, ápice del lóbulo ligeramente envuelto (flechas negras). X. Células de la epidermis. *Stelis ciliaris* (Y, Z, A'). Y. Labelo en desarrollo temprano, en la base por en medio hueco (flecha blanca). Z. Labelo en la antesis, hueco en la base (flecha blanca) con tricomas. A'. Acercamiento del hueco de la base con tricomas.

Barras de escala:

R, T, U, A' = 10 μ m

P, V, W, X, Y, Z = 100 μ m Q, S, = 1 mm

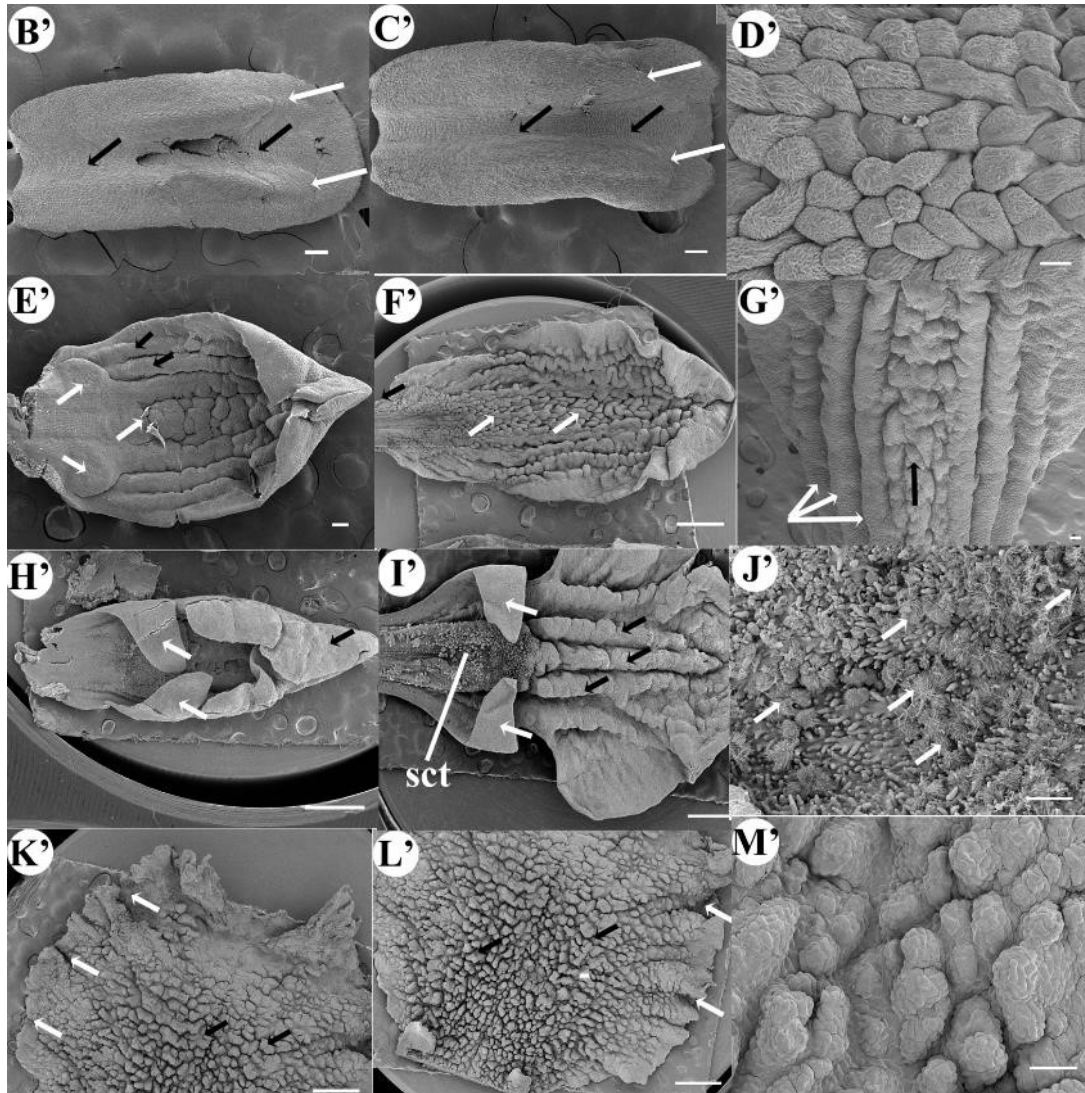


Figura 6 Parte 3 Etapas tempranas del desarrollo tardío y la antesis del labelo de *Specklinia digitale* (B', C', D'). B'. Labelo temprano, dos quillas simples engrosadas (flecha blanca), un canal formado entre ellas (flechas negras). C'. Labelo en la antesis con dos quillas simples engrosadas (flechas blancas) y canal entre ellas (flechas negras). D'. Células en las quillas. *Oestlundia ligulata* (E', F', G'). E'. Labelo temprano con tres quillas centrales (flechas blancas), dos quillas accesorias a cada lado (flechas negras). F'. Labelo en antesis unguiculado en la base (flecha negra), quillas centrales muy verrugosas (flechas blancas). G'. Quilla central muy verrugosa (flecha blanca) además de quillas accesorias flechas negras). *Prosthechea squalida* (H', I', J'). H'. Labelo trilobulado, la punta envuelta sobre sí misma (flecha negra), dos pequeños lóbulos laterales curvados (flechas blancas). I'. Labelo unguiculado en la base, trilobulado, los lóbulos laterales curvados (flechas blancas), la porción central está compuesta por abundantes tricomas glandulares. Desde el centro hasta la punta del lóbulo medio, hay tres grandes quillas centrales verrugosas (flechas negras) y dos o más quillas laterales. J'. Porción central con abundantes tricomas glandulares que secretan gran cantidad de cristales de azúcar (flechas blancas). *Encyclia microbulbon* (K', L', M'). K'- L'. Labelo lóbulo medio, circular-ovado con márgenes crenulados (flechas blancas), el centro de la superficie es muy verrugosa (flechas negras) sin quillas. M'. Acercamiento de las células de la superficie verrugosas.

Barras de escala:

B', C', D', E', G', J', M' = 100 μ m

F', H', I', K', L' = 1 mm

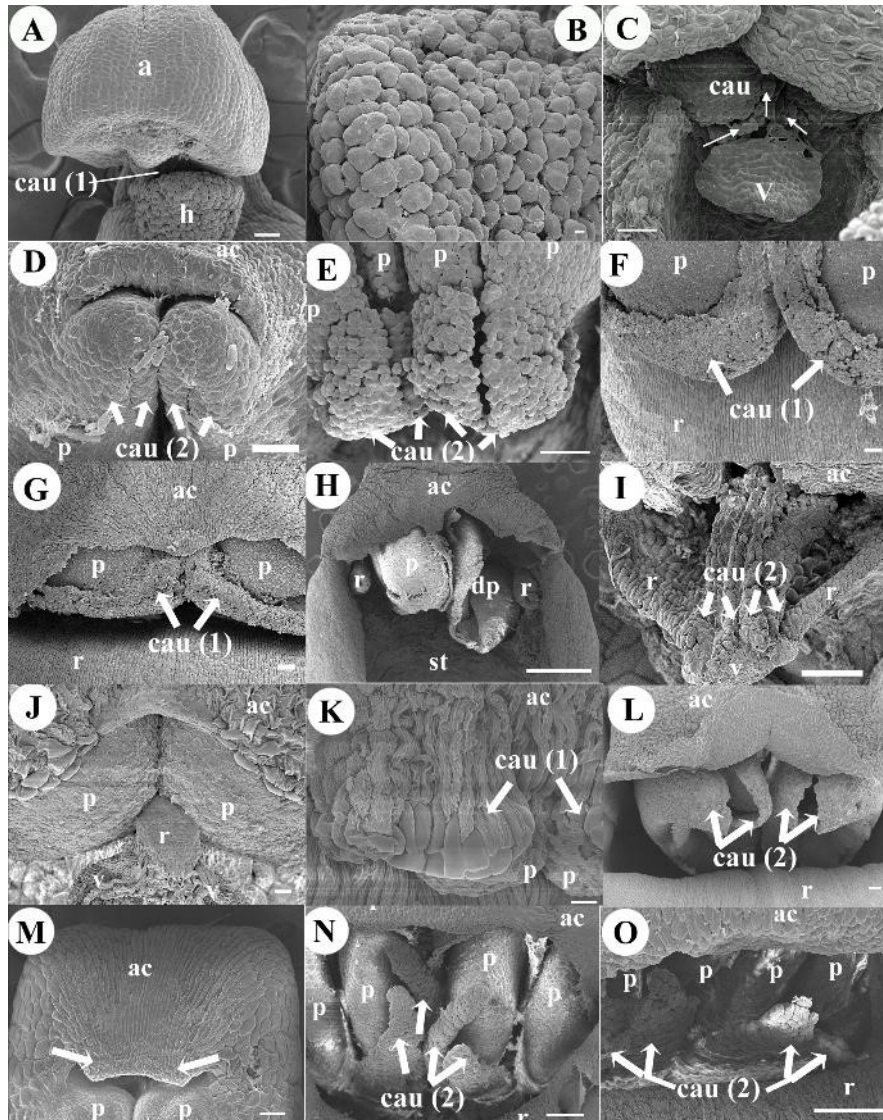


Figura 7 Polinios y caudículas de **A. *Corallorhiza maculata*** una caudícula conectada a hamulus. **B. *Corallorhiza maculata***, células granulosas lisas, muy redondeadas del hamulus. **C. *Govenia alba*** tégula compuesta por una hebra de células granulosas, el viscidio se asemeja a un pequeño escudo, conectado al ápice de los polinios (un par). **D. *Coelia triptera***, dos polinios y dos pares de caudículas con células poliédricas. **E. *Bletia purpurea***, cuatro polinios superiores y dos pares de caudículas con células poliédricas. **F. *Chysis bractescens***, dos polinios y un par de caudículas lineales con células membranáceas. **G. *Chysis limminghei***, dos polinios y un par de caudículas lineales con células membranáceas. **H. *Chysis laevis***, dos polinios, un polinio sin caudículas y otro polinio dehiscente. **I. *Ponera juncifolia***, nótese dos pares de caudículas, polinios cubiertos por la antera. **J. *Stelis ciliaris***, dos polinios y la punta bífida central del rostellum. **K. *Specklinia digitale***, dos polinios y un par de caudículas rectangulares lisas. **L. *Laelia speciosa*** con cuatro grandes caudículas granulosas expuestas en dos pares. **M. *Oestlundia ligulata***, dos polinios y pliegue de tejido en el ápice (flechas blancas) de la cubierta de la antera. **N. *Prosthechea squalida***, cuatro polinios y dos pares de caudículas. **O. *Encyclia microbulbon***, cuatro polinios y dos pares de caudículas.

Barras de escala:

A, C, D, E, F, G, I, M, N, L = 100 μ m. B, J, K = 10 μ m. H = 1 mm

Abreviaturas:

ac = cubierta de la antera, cau = caudícula (masa irregular de células), cau (1) = un par de caudículas, cau (2) = dos pares de caudículas, h = hamulus, p = polinio r = rostellum, st = estigma, v = viscidio.

DISCUSIÓN

***Chysis* y sus caracteres ontogenéticos**

Varios caracteres de las anteras de *Chysis* observados en este estudio (descritos de manera amplia en los resultados y resumidos en la tabla 2) principalmente: la forma de la cubierta de la antera (galeada), la ornamentación de la epidermis de la antera (conspicuamente estriada), la forma y el número de los polinios (ocho desiguales), las caudículas lineares (un par), la ausencia de alas en la columna, además de los caracteres en el labelo (número de quillas centrales 3 o 5, y la presencia de tricomas) no son compartidos con los demás miembros de Bletinae (*Bletia*, *Hexalectris* y *Basiphyllaea*).

En *Bletia*, *Hexalectris* y *Basiphyllaea* (éstos últimos dos géneros recientemente integrados a *Bletia* por Sosa y Chase, 2020), se presentan anteras cuculladas, ornamentación ligeramente estriada de la cubierta de la antera, ocho polinios iguales, dos pares de caudículas, presencia de alas en la columna, tres quillas centrales y cuatro accesorias así como ausencia de tricomas en el labelo.

Por lo que la evidencia ontogenética floral no soporta la inclusión de *Chysis* en Bletinae, siendo contrario a lo propuesto recientemente por Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015), basados en análisis filogenéticos de caracteres moleculares.

De tal modo que, si en los análisis filogenéticos de la tribu, *Chysis* se continua recuperando como miembro de Bletinae, los caracteres de las anteras aquí identificados tendrían que ser definidos como simplesiomórficos.

Antera incumbente en Epidendreae

A pesar de la enorme variación del grado de incumbencia o flexión de la antera que se presenta en Orchidaceae, especialmente en Epidendroideae y Epidendreae (Tabla 2); se han identificado tres vías generales dentro de ésta familia para lograrla, dos de ellas observadas en este trabajo.

Los resultados confirman que los miembros de Calypsoinae estudiados (*Corallorhiza* y *Govenia*) presentan el síndrome vandoide, además de poseer estipes (apéndices) considerados de distinta naturaleza y opuestos: hamulus y tégula respectivamente.

En *Coelia triptera* (incluida recientemente en Calypsoinae), solamente se presenta una de las tres características del síndrome vandoide: la incumbencia temprana de la antera;

y el resto de su morfología y desarrollo ontogenético es más similar al presente en las orquídeas epidendroides más avanzadas, por lo que se considera que representa una vía intermedia entre el síndrome vandoide y la vía de incumbencia simple.

En este estudio, las microfotografías mostraron que en los miembros de Blettiinae (sensu amplio de Chase *et al.*, 2015 con *Chysis* incluida), Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae: la incumbencia se alcanza mediante la vía de la elongación simple del tejido de la antera y su inclinación (inflexión) en las últimas etapas de la ontogenia.

Destaca, que la mayor variación entre los miembros de este grupo fue en el grado de la inflexión que alcanza la antera, desde los 40° hasta los 180° (Tabla 2); ésta variación (discutida a detalle adelante) parece ser el resultado de la morfología asociada con los diversos síndromes de polinización presentes en este grupo, como resultado de la necesidad de alcanzar una posición específica requerida al exponer los polinios para una polinización exitosa.

Biología de la polinización en Epidendreae

En *Chysis* (Blettiinae sensu Chase *et al.*, 2015) se desconocen los polinizadores; sin embargo, se sugiere que debido al color, los caracteres del labelo y las flores ligeramente fragantes, la polinización de las especies de este género puede ser posible por abejas grandes (*Xylocopa*, *Eulaema*) o abejas Euglossinii (Soto-Arenas 2005a, Soto-Arenas y Solano 2007).

Las observaciones de la microscopía electrónica de barrido, mostraron que en las quillas del labelo de *Chysis bractescens* y *C. limminghei* hay abundantes tricomas y papilas, probablemente relacionados con la producción de fragancias florales que podrían ser recolectadas por los cepillos en las extremidades traseras de las abejas, especialmente del grupo Euglossinii.

En *Chysis laevis*, se presentan botones florales que nunca alcanzan la antesis (no abren), y en el caso de las flores observadas se encontró, que la antera coalescente con la columna, la falta de tricomas y papilas en las quillas del labelo, los polinios dehiscentes en la antesis y un rostelo subdesarrollado (ya que sólo se observan dos apéndices vestigiales) probablemente facilitan la autopolinización. Sugiriendo que, la autogamia (por cleistogamia o pseudo-cleistogamia) parece ser el mecanismo común para la producción de frutos en este taxón.

En el resto de Bletiinae, en los géneros *Bletia*, en la mayoría de *Hexalectris* y *Basiphyllea* (ambos géneros ahora también considerados miembros de *Bletia* por Sosa y Chase, 2020), hay registros de autogamia y cleistogamia; algunos informes de la autogamia en *Bletia* destacan la falta de desarrollo (parcial o total) del rostelo que favorece la autopolinización (van der Cingel, 2001; Salazar *et al.*, 2016). También en *Bletia* ha sido reportada la polinización por engaño (Sosa, 2007; Toumi *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2016).

Las características de la antera, columna y labelo de *Bletia purpurea* obtenidas en este estudio, no revelaron desarrollo incompleto del rostelo que facilite la autopolinización, pero tampoco dejan claro que existan adaptaciones específicas en la morfología para llevar a cabo la polinización por engaño reportada en el género.

En Calypsoinae las flores son de pequeñas a medianas, y con diversos polinizadores como polillas Noctuidae en *Tipularia discolor* (Whigham y McWethy, 1980), abejorros en *Calypso* (van der Cingel, 2001; Toumi *et al.*, 2015); en *Cremastra* y *Govenia* la polinización es realizada por abejas (García-Cruz y Sosa, 2005; García-Cruz *et al.*, 2009), también en *Govenia* y *Dactylostalix* se reportaron moscas flotantes (Pansarin, 2008) y, en *Corallorhiza* se registraron moscas Epididae y mosquitos como polinizadores (Freudenstein, 2005b).

En este estudio, se detectó en *Govenia alba* una ligera fragancia y se observaron líneas guía en el labelo; además la columna está pronunciadamente doblada sobre sí misma sugiriendo un mecanismo para lograr una polinización exitosa mediante la posición correcta de colocación de los polinios en la parte posterior del cuerpo del polinizador.

En *Corallorhiza*, el labelo tiene una estructura abultada en su base que forma un canal con abundantes poros en su epidermis, y al igual que en *Govenia*, la columna se dobla pronunciadamente hacia adentro, pero en este género, este carácter sugiere una auto-facilitación (autopolinización) en lugar de una correcta colocación de los polinios en el cuerpo de los polinizadores.

En Ponerinae, especialmente en *Isochilus*, los caracteres florales están asociados a la polinización de colibríes (van der Pijl *et al.*, 1969, Siegel, 2011).

En *I. major* se observó que las pequeñas flores tubulares son de color púrpura, disímiles a los colores rosa y naranja típicos atractores de colibríes que predominan en otras especies de este género. El labelo tiene líneas grises, que pueden ser vistas por las aves como

guía, y los polinios son de color violeta-granate; además al recolectar la muestras también se detectó la ausencia de fragancia.

De modo importante, durante las disecciones de las flores de *I. major*, se observó un mecanismo por el cual se facilita el desprendimiento de la cubierta de la antera, permitiendo que el polinio expuesto sea de fácil acceso al polinizador.

En las flores de *I. major*, la cubierta de la antera se encuentra en estrecho contacto con el labelo por medio de una estructura como garra; en el mecanismo descrito en este estudio se elimina la cubierta de la antera por simple acción mecánica, con solo introducir la aguja de disección, que se asemeja a el pico de las aves, y que, al ser retirada la aguja, y debido al desprendimiento de la cubierta de la antera, los polinios salen adheridos en su superficie, presumiblemente como ocurre en el momento de la polinización por los picos de los colibríes.

En los otros géneros de esta subtribu (*Ponera*, *Nemaconia*, *Helleriella*) se desconocen los polinizadores, pero el tamaño de la flor y los colores rojo y amarillo en el labelo (especialmente en *P. juncifolia*) y sus secreciones sugieren la polinización por pequeñas avispas o abejas.

En las muy diversas Pleurothallidinae (5100 especies. Karremans, 2016), la mayoría de los polinizadores son desconocidos (Karremans, 2010), sin embargo, con base en la morfología floral pareciera que las especies de este grupo son polinizadas principalmente por moscas (Pridgeon *et al.*, 2001). En particular dos géneros de esta subtribu fueron reportados con polinización por engaño, específicamente por el mecanismo de pseudo-copulación (Blanco y Barbosa, 2005).

Las plantas tienen flores en miniatura, con segmentos con gran motilidad y abundantes tricomas y secreciones (Pridgeon *et al.*, 2001; Blanco y Barbosa, 2005; Jersákova *et al.*, 2006, Karremans *et al.*, 2015), estos caracteres, fueron registrados en *Stelis ciliaris* y *Specklinia digitale* que tienen las flores más pequeñas incluidas en este estudio, y que sus síndromes de polinización fueron previamente identificados por una serie de estudios de polinización y morfología (Ignowski *et al.*, 2015; Karremans *et al.*, 2013; Damon y Salas-Robledo, 2007) en los que se reportaron además de dípteros diferentes polinizadores como las abejas.

En Laeliinae (otro grupo muy diverso de Epidendreae con aproximadamente 1500 especies) la polinización se realiza por diversos polinizadores, que van desde: Lepidoptera en *Brassavola* y en los diversos *Epidendrum*, hasta Diptera en algún otro *Epidendrum*, aves en algunas *Encyclia* y también en *Epidendrum*, y predominantemente himenópteros en la mayoría de *Laelia*, *Prosthechea*, *Encyclia* y *Cattleya* (van der Pijl *et al.*, 1969; Borba y Braga, 2003; van den Berg *et al.*, 2009).

En *Laelia* es bien sabido que las flores sin néctar u otra recompensa, emiten solamente fragancia para atraer a los insectos polinizadores; por lo que se considera que este grupo posee polinización por engaño. Los taxones de este grupo son generalmente polinizados por abejas grandes y abejorros (B. Valencia-Nieto, observación personal). Se ha reconocido que *Laelia* está estrechamente relacionada con *Cattleya* pero difiere en el número de polinias, ocho en *Laelia* frente a cuatro en *Cattleya* (Halbinger y Soto-Arenas, 1997; Borba y Braga, 2003) como se reportó también en este estudio.

Las flores grandes de *Laelia* se consideran “flores de garganta”, con un labelo que constituye una plataforma de aterrizaje para el polinizador, en el que los lóbulos laterales se vuelven hacia arriba para encerrar la columna formando una estructura en forma de túnel, por donde entra el polinizador en busca de compuestos fragantes y cuando retrocede el polinio es removido por su dorso o cabeza a los que es fijado por medio del viscidio (Halbinger y Soto-Arenas, 1997). En *Laelia speciosa* en particular, Soto-Arenas y Solano (2007) y B. Valencia-Nieto obs. personal, reportaron polinización por abejorros del género *Bombus*. En las observaciones de la microscopía electrónica de barrido realizadas, se encontró que: no solo la antera se flexiona, sino también que la columna se dobla marcadamente, probablemente para alcanzar una posición adecuada para permitir que los polinizadores que entren en las flores se posicionen de manera precisa para llevar a cabo la remoción de los polinios.

Recientemente, Peraza-Flores *et al.* (2016) segregaron algunos miembros de *Laelia* en el género *Schomburgkia*, sin embargo *L. speciosa* permanece como el tipo y el taxón de *Laelia* más basal.

Entre los taxones de la alianza *Encyclia*, Higgins (2003) registró que las especies de *Prosthechea* producen fragancias y son polinizadas por avispa. En *Prosthechea squalida*,

las observaciones de este trabajo en su labelo, sugieren que se producen abundantes secreciones para atraer a los polinizadores.

En *Encyclia* y *Oestlundia*, la polinización la realizan los himenópteros (diversos tipos de abejas. Dressler, 1993; Higgins, 2003). Se encontró la presencia de cristales cúbicos alrededor de los estomas actinocíticos de la cubierta de la antera en *E. microbulbon*, estos cristales son probablemente ofrecidos como atractores a los polinizadores.

CONCLUSIONES

El estudio de la ontogenia tardía identificó que *Chysis* posee una serie de caracteres únicos de la antera, columna y el labelo no compartidas con el resto de taxones de la subtribu Bletiinae, y que su posición en esta subtribu necesita ser reevaluada.

Los resultados de la ontogenia corroboran que en las subtribus Bletiinae (incluida la extinta Chysinae), Ponerinae, Pleurothallidinae, Laeliinae: la incumbencia de las anteras se logra por elongación simple e inclinación de la antera en las últimas etapas del desarrollo.

También se confirmó que la inflexión de la antera alcanzada por incumbencia temprana en las primeras etapas ontogenéticas, la reorientación del crecimiento y la presencia de estipes (hamulus y tégula) que conforman el síndrome vandoide se encuentra presente en los representantes estudiados de Calypsoinae (excluyendo *Coelia*).

Las observaciones de la ontogenia muestran que *Coelia* solo comparte la incumbencia de anteras tempranas con los demás miembros de Calypsoinae (donde fue transferida recientemente), sin embargo el resto de las características morfológicas corresponden a las de otros miembros más avanzados de Epidendreae; siendo definida su incumbencia como un mecanismo intermedio entre el síndrome vandoide y la inflexión simple de la antera. Las observaciones indican que sus relaciones filogenéticas entre especies deben ser revisadas para comprender mejor el mecanismo de la incumbencia en este género.

Se encontraron varios caracteres ontogenéticos relacionados con los síndromes de polinización y la biología reproductiva entre los miembros estudiados las subtribus de Epidendreae como son: cristales alrededor de los estomas actinocíticos en la cubierta de la antera, así como cristales de azúcar en Laeliinae; antera coalescente con la columna y el rostelo subdesarrollado en las formas cleistógamas de *Chysis laevis*; el mecanismo por el cual se desprende la cubierta de la antera (unida con el labelo por una garra) en *Isochilus*.

LITERATURA CITADA CAPÍTULO I

- Arditti, J. 1992.** Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons. New York.
- Blanco, M.A., Barboza, G. 2005.** Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany* **95**: 763-772. DOI: [10.1093/aob/mci090](https://doi.org/10.1093/aob/mci090)
- Borba, E.L., Braga, P.I.S. 2003.** Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 541-549. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042003000400013>
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification, En: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barret, R.L., Cribb, P.J.(Eds.) Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malasya.
- Chase, M.W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Berg, C., Schuiteman, A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151-174. DOI:[10.1111/boj.12234](https://doi.org/10.1111/boj.12234)
- Damon, A., Roblero, P.S. 2007.** A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* **48**: 1-14. http://www.tropecol.com/pdf/open/PDF_48_1/Damon_n_Pedro.pdf
- Dressler, R.L. 1981.** The orchids, natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Dressler, R.L. 1993.** Phylogeny and classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon.
- Dressler, R.L., Salazar, G.A. 1991.** Viscarium, a term for the glue-bearing area of the rostellum. *Orchid Res. Newslett*, **17**: 11-12.
- Fowler, J.A. 2005.** Wild Orchids of South Carolina. A popular natural history. University of South Carolina Press. South Carolina.
- Freudenstein, J.V. 2005a.** *Calypso*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 93-97

- Freudenstein, J.V. 2005b.** *Corallorhiza*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. Oxford University Press. London. pp. 97-99
- Freudenstein, J.V. 2005c.** *Oreorchis*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. Oxford University Press. London. pp.105-107.
- Freudenstein, J.V. 2005d.** *Tipulara*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. Oxford University Press. London. pp. 107-109.
- Freudenstein, J.V., Harris, E.M., Rasmussen, F.N. 2002.** The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the Vandoid complex. *American Journal of Botany* **89**: 1747-1755. DOI: [10.3732/ajb.89.11.1747](https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1747)
- Freudenstein, J.V., Chase, M. W. 2015.** Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of botany* **11**:665-681. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcu253>
- Freudenstein, J.V., Yukawa, T., Luo, Y. B. 2017.** A reanalysis of relationships among Calypsoinae (Orchidaceae: Epidendroideae): floral and vegetative evolution and the placement of *Yoania*. *Systematic Botany* **42**:17-25. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364417X694944>
- García-Cruz, J., Sosa, V. 2005.** Phylogenetic relationships and character evolution in *Govenia* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, **83**:1329-1339. DOI: <https://doi.org/10.1139/b05-098>
- García-Cruz, J., González-Astorga, J., Sosa, V., Hernández-González, O. 2009.** Genetic diversity in six *Govenia* (Orchidaceae) species with different pollinator attraction strategies. *International journal of plant sciences*, **170**: 894-905. DOI: <https://doi.org/10.1086/600149>
- Hágsater, E., Soto, M.A., Salazar, G.A., Jiménez, M.R., López, R.M., Dressler R.L. 2005.** *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, D.F. 304 pp.
- Halbinger, F; Soto-Arenas, M.A. 1997.** "Laelias of México". *Orquídea* (Mexico City) **15**: 1-160. [http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea\(Mex.\)15.pdf](http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea(Mex.)15.pdf)

- Higgins, W.E. 2003.** *Prosthechea*: a chemical discontinuity in Laeliinae. *Lankesteriana* **7**: 39-41. <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/23010/23230>
- Ignowski, H., de Brito, A.T., Bona, C., Smidt, E.D.C. 2015.** Nomenclatural notes on *Stelis ciliaris* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Phytotaxa*, **218**: 30-38. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.1.2>
- Jersáková, J., Johnson, S. D., Kindlmann, P. 2006.** Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**: 219-235. DOI: [10.1017/S1464793105006986](https://doi.org/10.1017/S1464793105006986)
- Karremans, A.P. 2010.** Phylogenetics of *Stelis* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) and closely related genera, based on molecular data, morphological characteristics and geographical distribution in the Central American and Andean Cordilleras. MSc Thesis, Plant Sciences Group and Biosystematics Group, Wageningen University. <http://edepot.wur.nl/146921>
- Karremans, A.P., Bakker, F. T., Pupulin, F., Solano-Gómez, R., Smulders, M. J. 2013.** Phylogenetics of *Stelis* and closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution*, **299**: 151-176. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0712-7>
- Karremans, A.P., Bogarin, D., Pupulin, F., Luer, C. A., Gravendeel, B. 2015.** The glandulous *Specklinia*: morphological convergence versus phylogenetic divergence. *Phytotaxa* **218**:101-127. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.2.1>
- Karremans, A.P. 2016.** Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana*, **16**:219-241. <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v16i2.26008>
- Kurzweil, H. 1987a.** Developmental studies in orchid flowers I: Epidendroid and Vandoid species. *Nordic Journal of Botany* **7**: 427-442. DOI: [10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x](https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x)
- Pansarin, E.R. 2008.** Reproductive biology and pollination of *Govenia utriculata*: A syrphid fly orchid pollinated through a pollen-deceptive mechanism. *Plant Species Biology* **23**: 90-96. DOI: [10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x)
- Peraza-Flores, L.N., Carnevali, G., van den Berg, C. 2016.** A molecular phylogeny of the *Laelia* alliance (Orchidaceae) and a reassessment of *Laelia* and *Schomburgkia*. *Taxon*, **65**: 1249-1262. <https://doi.org/10.12705/656.3>

- Peter, C.I., Johnson, S. D. 2006.** Anther cap retention prevents self-pollination by elaterid beetles in the South African orchid *Eulophia foliosa*. *Annals of Botany*, **97**: 345-355. DOI:10.1093/aob/mcj041
- Pinheiro, F., Koehler, S., Corrêa, A.M., Salatino, M.L.F., Salatino, A., de Barros, F. 2009.** Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant systematics and evolution*, **283**: 165-177. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0224-2>
- Pinheiro, F., Cozzolino, S. 2013.** *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon*, **62**: 77-88. <http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax/2013/00000062/00000001/art00007>
- Pridgeon, A.M., Solano, R., Chase, M.W. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286-2308. <http://www.amjbot.org/content/88/12/2286.full>
- Rasmussen, F.N. 1982.** The gynostemium of the neottioid orchids. *Opera botanica* **65**:1-96.
- Rudall, P.J., Bateman, R.M. 2004.** Evolution of zygomorphy in monocot flowers: iterative patterns and developmental constraints. *New Phytologist*, **162**: 25-44. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2004.01032.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01032.x)
- Rudall, J.P. 2007.** Anatomy of Flowering Plants. An Introduction to Structure and Development. Cambridge University Press. Cambridge.
- Salazar, G.A. 1990.** *Coelia triptera*. En: Hågsater, E., Salazar, G.A (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 1. Orchids of México Part 1. Asociación Mexicana de Orquideología. Mexico City. Plate 9.
- Salazar, G.A. 2005.** *Isochilus*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp.
- Salazar, G.A., Chavez-Rendon, C., Jiménez-Machorro, R. 2016.** Floral similarity and vegetative divergence in a new species of *Bletia* (Orchidaceae) from Mexico. *Phytotaxa* **275**: 112-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.275.2.3>

- Siegel, C. 2011.** Orchids and hummingbirds: sex in the fast lane. *The Orchid Digest* **75**: 8-17.
https://pdfs.semanticscholar.org/17d9/df36bf47eeb9fd0925cacf981e450e9c72b4.pdf?_ga=2.198704431.1430246362.1499451817-1927011864.1499451817
- Sosa, V. 2002.** *Bletia roezlii*. En: Hágsater, E., Soto M.A, (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 5-6. Orchids of México Part 2 and 3. Herbario Amo. Mexico City. Plate 535.
- Sosa, V. 2007.** A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Blettiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic botany* **32**: 34-42. <http://www.jstor.org/stable/25064226>
- Sosa, V. 2008.** *Bletia nelsonii*. En: Hágsater, E., Soto M.A. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1010.
- Sosa, V., Cameron, K. M., Angulo, D. F., Hernández-Hernández, T. 2016.** Life form evolution in epidendroid orchids: Ecological consequences of the shift from epiphytism to terrestrial habit in *Hexalectris*. *Taxon*, **65**: 235-248.
 DOI: <https://doi.org/10.12705/652.2>
- Sosa, V., Chase, M.W. 2020.** New combinations and a new name in *Bletia* (Blettiinae; Orchidaceae). *Phytotaxa* **456(3)**: 296-298.
- Soto-Arenas, M.A. 2005a.** *Chysis*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 173-177.
- Soto-Arenas, M. 2008a.** *Chysis bractescens*. En: Hágsater, E., Soto M.A. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1012.
- Soto-Arenas, M. 2008b.** *Isochilus alatus*. En: Hágsater, E., Soto M.A. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1030.
- Soto-Arenas, M.A., Solano-Gómez, A.R. 2007.** Ficha técnica de *Chysis bractescens* En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la

Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO.
Proyecto No. W029. México. D.F.
<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Chysisbractescens00.pdf>

- Tuomi, J., Lämsä, J., Wannas, L., Abeli, T., & Jäkäläniemi, A. 2015.** Pollinator Behaviour on a Food-Deceptive Orchid *Calypso bulbosa* and co-flowering Species. *The Scientific World Journal* **2015**:1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/482161>
- Valencia-Nieto, B., Sosa, V., Márquez-Guzmán, J. 2016.** Late stages of anther development and anther attributes in *Microepidendrum* differs from other genera of Epidendrum alliance (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **218**: 35-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.002>
- Valencia-Nieto, B., Sosa, V., & Márquez-Guzmán, J. 2018.** Anther development in tribe Epidendreae: orchids with contrasting pollination syndromes. *PeerJ*, **6**, e4383. DOI: [10.7717/peerj.4383](https://doi.org/10.7717/peerj.4383)
- Van den Berg, C. 2005.** Epidendreae. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp. 162-164.
- 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. *Annals of Botany* **104**: 417-430. DOI: [10.1093/aob/mcp101](https://doi.org/10.1093/aob/mcp101)
- Van Der Cingel, N.A. 2001.** *An Atlas of Orchid Pollination: European Orchids.* CRC Press. USA.
- Van Der Pijl, L., Dodson, C. H., Flowers, O. 1969.** *Orchid Flowers. Their pollination and evolution.* (Fla, CG, ed.). University of Miami Press, Coral Gables, Florida.
- Whigham, D.F., McWethy, M. 1980.** Studies on the Pollination Ecology of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **67**: 550-555. <http://www.jstor.org/stable/2442295>

CAPÍTULO II:

RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA EN EPIDENDREAE

INTRODUCCIÓN

Orchidaceae es una de las dos familias más grandes de plantas con flor, quizá siendo solamente superada por Asteraceae (Chase *et al.*, 2015). Se estima que las orquídeas cuentan con alrededor de poco más de 27850 especies distribuidas en 736-880 géneros; y comprende aproximadamente el 8% de todas las especies de plantas vasculares; de manera sobresaliente alrededor del 75% de sus especies son epífitas de acuerdo a las estimaciones más recientes (Chase *et al.*, 2015; Givnish *et al.*, 2015).

Chase *et al.* (2003), Chase *et al.* (2015), Freudenstein y Chase (2015) y Givnish *et al.* (2015) han delimitado detalladamente la clasificación intrafamiliar de Orchidaceae basados en estudios filogenéticos moleculares reconociendo cinco subfamilias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae.

La subfamilia Epidendroideae es reconocida hoy en día como la más grande de las cinco subfamilias; cuenta con aproximadamente 21 160 especies que equivale a cerca del 76% del total de especies de orquídeas. Considerando esto, esta subfamilia cuenta con muchas de las características florales distintivas y constituye la mayor parte de la radiación de especies de orquídeas (Freudenstein y Chase, 2015).

Como se mencionó en el capítulo I, Epidendroideae es reconocida desde un inicio por poseer anteras incumbentes o flexionadas en la madurez, y a pesar de que esta subfamilia es reconocida en todas las clasificaciones de las Orchidaceae, su circunscripción ha sido controvertida. Los análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN del cloroplasto realizados por van den Berg *et al.* (2000) y van den Berg *et al.* (2005) identificaron varios grupos dentro de Epidendroideae, y sumados a estos estudios hoy en día por Chase *et al.* (2015) son reconocidas 16 tribus, destacando entre ellas como una de las más diversas la tribu Epidendreae.

Los taxones que incluye la tribu Epidendreae han variado sustancialmente desde su descripción original de acuerdo a diferentes estudios (Chase *et al.*, 2003; van den Berg, 2005;

van den Berg *et al.*, 2005; van den Berg, *et al.*, 2009; Freudenstein y Chase, 2015; Chase *et al.*, 2015).

Durante la década pasada y parte de la actual, las filogenias de van den Berg *et al.* (2000), van den Berg *et al.* (2005) y van den Berg *et al.* (2009), basadas en secuencias de cloroplasto (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*) y nucleares (ITS), fueron utilizadas para circunscribir la tribu, considerándola, durante mucho tiempo exclusiva del Neotrópico e incluyendo entre cinco y seis subtribus: Coeliinae, Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae; destacando dos de ellas como monogénicas y basales (Coeliinae y Chysinae).

Coeliinae con un solo género: *Coelia*, fue considerada en estas clasificaciones como la más basal y hermana al resto de las subtribus; este género (como se discutió a detalle en el capítulo I) presenta una morfología floral intermedia entre el síndrome vandoide y la forma morfológica típica que sirve para alcanzar la incumbencia en el resto de Epidendreae (descrita también a detalle en el capítulo I).

Muy recientemente, la última clasificación propuesta de Orchidaceae de Chase *et al.* (2015) derivada de las más recientes filogenias, propuso la inclusión de tres géneros asiáticos en este grupo (*Agrostophyllum*, *Earina* y *Calypso*); la tribu Epidendreae dejó de ser exclusiva del Neotrópico como fue considerada durante mucho tiempo y además, experimentó un reacomodo a nivel de sus subtribus (Freudenstein y Chase, 2015; Chase *et al.*, 2015; Givnish *et al.*, 2016) siendo reconocidas nuevamente seis subtribus pero, desapareciendo de ellas las dos subtribus monogénicas basales, mencionadas anteriormente.

Por una parte, Chysinae fue incluida en un concepto amplio de Bletiinae, cómo habría sido propuesto intuitivamente por Dressler (1981) en su clasificación; y, por otro lado, Coeliinae con su único género *Coelia*, fue incluida en Calypsoinae, que presenta especies con la morfología vandoide de la antera, donde *Coelia* comparte con ellas solamente la inflexión temprana de la antera, que caracteriza una de las tres condiciones de este síndrome (discutido a detalle en el capítulo 1).

ANTECEDENTES

El género, objeto de estudio en este trabajo *Chysis*, cuenta con especies que tienen una morfología tanto vegetativa como floral muy similar, lo que ha llevado a varios autores, entre ellos Allen (1955), Dressler (1981, 1993, 2000) y Soto-Arenas (2005a) a proponer que solamente deben reconocerse dos complejos de especies: el de *Chysis aurea* y el de *Chysis laevis* (este último con una morfología muy variable).

Estos complejos estarían compuestos: el primero, por plantas colgantes con cinco quillas, subiguales y puberulentas en el labelo (Fig. 1F y G); y el otro por plantas cespitosas, ascendentes, que tienen callo liso en el labelo, con tres quillas grandes, centrales y además con pequeñas quillas adicionales laterales (Fig. 1H e I). Este último complejo sería exclusivamente Mesoamericano de acuerdo a Dressler (1993) y Soto-Arenas (2005a).

Dressler (2000) resumió la taxonomía del género conocida hasta ese momento (ocho a diez especies) pero, nuevas especies han aparecido desde entonces (Goaverts-WCSP, 2021) y otros taxones están aparentemente no descritos.

En *Chysis* no se han llevado a cabo estudios filogenéticos, además, sus miembros están poco representados en los herbarios nacionales e internacionales (B. Valencia-Nieto, observación personal).

También destaca que en las filogenias publicadas de la tribu Epidendreae de van den Berg *et al.* (2000); van den Berg *et al.* (2005); Freudenstein y Chase, (2015) y Chase *et al.* (2015), sólo incluyen una especie (*Chysis bractescens*), por lo que se considera que se encuentra subrepresentada en ellas.

Debido a lo anterior, es probable que la inclusión de una muestra más amplia de especies de *Chysis* en los análisis filogenéticos moleculares de Epidendreae sirva de ayuda no solo, en primera instancia para clarificar con una primera aproximación las relaciones entre las especies de este género, sino también, para aclarar la posición de este género, ya sea como miembro de la subtribu Blettiinae o bien dentro de su propia subtribu Chysinae.

Si las especies de *Chysis* son nuevamente recuperadas en la filogenia dentro de la subtribu Bletiinae, los caracteres de las anteras, identificados en el capítulo I podrían definirse como caracteres simplesiomórficos (Sosa *et al.*, 2016).

Para complementar la filogenia molecular de la tribu Epidendreae: este estudio adicionó secuencias de marcadores moleculares de ADN de cloroplasto (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*) nuclear (ITS), de cinco especies de *Chysis* (*Chysis addita*, *Chysis aurea*, *Chysis cf. chironii*, *Chysis laevis* y *Chysis limminghei*) así como también, de ocho especies representantes de las demás subtribus que componen actualmente a Epidendreae y que se utilizaron también para estudiar la ontogenia floral de este grupo.

Se procedió a elaborar una nueva reconstrucción filogenética de la tribu Epidendreae, anexando y utilizando las secuencias anteriores existentes en los repositorios digitales de los análisis filogenéticos previos de la tribu (Apéndice I).

Se discuten los resultados de la reconstrucción filogenética obtenida por medio de análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, con énfasis, primero en el género *Chysis* a nivel de sus especies, así como su posición con respecto al resto de las subtribus; la composición de los otros grupos que integran la subtribu; y por último discutir las tendencias evolutivas de los caracteres ontogenéticos obtenidos en el capítulo I.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras biológicas se obtuvieron de la colección viva mantenida por:

- El Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.
- El Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero” del INECOL, A.C.
- El Herbario AMO del Instituto Chinoín, A.C.
- Dos muestras de una colección viva privada.

Se accedió al material bajo los términos de los permisos científicos MX-JB-008-DF y VER-FLO-228-09-09.

Muestreo. Se tomaron muestras de tejido de hoja de *Corallorhiza maculata* (Raf.) Greene (Calypsoinae), *Govenia superba* (Lex.) Lindl. (Calypsoinae), *Chysis addita* Dressler (Bletiinae), *Chysis aurea* Lindl. (Bletiinae), *Chysis cf. chironii* Archila (Bletiinae), *Chysis*

limminghei Linden y Reichb.f (Bletiinae), *Chysis laevis* Lindl. (Bletiinae), *Ponera juncifolia* Lindl. (Ponerinae) *Stelis ciliaris* Lindl. (Pleurothallidinae), *Specklinia digitale* (Luer) Pridgeon & M.W. Chase (Pleurothallidinae), *Oestlundia ligulata* (La Llave & Lex.) Soto Arenas (Laeliinae), *Prosthechea squalida* (Lex.) Soto Arenas & Salazar (Laeliinae) y *Encyclia microbulbon* Schltr. (Laeliinae).

Cuando los individuos disponibles eran de gran tamaño, se eligieron tres hojas al azar y, en la mayoría de los casos, sólo se consideró una hoja. Se eligieron hojas maduras, sanas, sin la presencia de manchas o decoloración. Se retiraron con una navaja lavada con agua con jabón y cloro. Para cada fragmento la navaja fue esterilizada con etanol (70%) y fuego. Para el mantenimiento previo a su procesamiento, los fragmentos de tejido de hoja fueron colocados en sílice gel Hycl con indicador.

Extracción, purificación y secuenciación de ADN. Se utilizó la metodología de Sosa (2007) y Ruiz-Sánchez *et al.* (2011) que consisten en:

El ADN genómico total se aisló de tejido de hojas secas en gel de sílice usando el método 2X CTAB modificado. El gen *trnL-F* se amplificó y secuenció usando los cebadores *trn-e* y *trn-f*. La región ITS que incluye el gen 5.8S se amplificó con los cebadores 17SE y 26SE o ITS5 e ITS4. Los genes *matK* y *rbcL* se amplificaron y secuenciaron utilizando los cebadores y protocolos de códigos de barras de ADN. Los fragmentos de ADN de doble hebra amplificados se purificaron usando columnas QIAquick (Qiagen, California) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante, y posteriormente se secuenciaron usando kits de secuenciación de ciclo Taq BigDye Terminator (Perkin Elmer Applied Biosystems, California) en un secuenciador de ADN automatizado ABI 310 (Perkin Elmer Applied Biosystems).

Las secuencias de ADN se ensamblaron (mínimo de confianza 85%) y se revisaron los cromatogramas en Sequencher 4.1.4 (Sequencher® version 4.1.4 <https://www.genecodes.com/>).

Base de datos de las secuencias en Gen Bank. Se elaboró una base de datos de las secuencias (Apéndice I) utilizadas en las filogenias previas de Epidendreae realizadas por Freudenstein y Chase, (2015); Chase *et al.* (2015) y Givnish *et al.* (2015) existentes en el

GenBank® (NCBI Resource Coordinators, 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), identificando los marcadores más completos en dicho repositorio que a lo largo de los representantes de la subtribu fueron: *rbcL*, *trnIF*, *matK* e ITS.

Éstas secuencias (Apéndice Ig), fueron descargadas en formato Fasta y se procedió a armar una matriz por cada uno de los marcadores mencionados. A estas matrices se agregaron secuencias de especies elegidas como grupo externo (obtenidas en el mismo sitio), y también se procedió a agregar las secuencias obtenidas de las especies de *Chysis* y las ocho especies utilizadas como muestra de especies representativas de las subtribus que componen Epidendreae y que, fueron seleccionadas para obtener los caracteres de la ontogenia floral en el capítulo 1. En total se obtuvieron cuatro matrices (una por cada marcador) constituidas de 98 taxones cada una.

Alineación de secuencias. Cada una de las matrices obtenidas por cada marcador (*rbcL*, *trnLF*, *matK* e ITS) fue alineada usando el software MEGA X v. 10.2.4 con el algoritmo MUSCLE (Kumar, *et al.*, 2018 <https://www.megasoftware.net/>), posteriormente se revisaron y en caso necesario, realineando manualmente.

Una vez finalizado este proceso se procedió a elaborar dos matrices; una de cloroplasto constituida con los marcadores *rbcL+matK+trnLF* y otra de cloroplasto concatenada con ITS (cloroplasto+ITS).

Selección de modelos. La evaluación de modelos se realizó en jModelTest 2.1.10 v20160303 (Darriba *et al.*, 2012. <https://github.com/ddarriba/jmodeltest2>), para encontrar el mejor modelo de ajuste de acuerdo al criterio de información de Akaike AIC (Akaike, 1974). Para cada uno de los marcadores moleculares se obtuvieron los modelos (*rbcL* = TVM+I+G; *matK* = TVM+G; *trnL-F* = TIM1+G; ITS = TIM3+I+G) y para las matrices combinadas de cloroplasto y cloroplasto+ITS el mejor modelo en ambas fue **GTR+I+G**.

Análisis filogenético. Los análisis de máxima verosimilitud (ML) fueron conducidos utilizando: raxmlGUI 2.0.4 (Edler *et al.*, 2020); se realizaron utilizando los parámetros del modelo GTR+I+G, con ML+rapid bootstrap (1000 repeticiones) para las matrices de datos de ITS, Cloroplasto (*rbcL+matK+trnL-F*) y cloroplasto+ITS.

Los análisis de inferencia Bayesiana (BI) fueron conducidos utilizando: MrBayes 3.2.7a x86_64 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist y Huelsenbeck, 2003; Ronquist *et al.*, 2012. <https://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html>) y MrBayes on XSEDE P(3.2.7a) en CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010. <https://www.phylo.org/>). Estos análisis se realizaron para las matrices de cloroplasto (*rbcL+matK+trnF-L*) y cloroplasto+ITS con 2 corridas y 10000000 de generaciones de mcmc con frecuencia de muestreo de 10000 con burn-in de 25%; las probabilidades posteriores fueron determinadas por regla de 50% consenso de la mayoría de los árboles retenidos después del burn-in.

RESULTADOS

La matriz de datos de ITS incluyó 827 pb, de los cuales 328 (39.66%) son parsimoniosamente informativos; la matriz de cloroplasto (*rbcL+matK+trnLF*) incluyó 4827 pb, de los cuales 919 (19.03%) son parsimoniosamente informativos; y la matriz concatenada de cloroplasto+ITS incluyó 5654 pb de los cuales 1306 (23.09%) son parsimoniosamente informativos.

El clado que incluye las especies de *Chysis* se encuentra bien soportado en los análisis de máxima verosimilitud (ML) siendo recuperado como un grupo monofilético y monogénico si se considera como tribu Chysinae (Figs. 8, 9 y 10) con valores bootstrap (bs): ITS = 95, cloroplasto = 71 y cloroplasto+ITS = 100. *Chysis bractescens* se recupera como la especie más basal y hermana al resto de las especies del género; a su vez *Chysis limminghei* y *Chysis addita* como las especies de más reciente divergencia del grupo (en las reconstrucciones de ITS y cloroplasto+ITS); tanto *Chysis aurea*, *C. laevis* y *C. chironii* varían en su posición dentro de la topología obtenida de este género en los tres árboles.

En la inferencia bayesiana (BI): en el análisis de cloroplasto+ITS (Fig. 11), *Chysis* también se recupera monofilético y monogénico (Chysinae) con probabilidad posterior (pp) = 1; presentando una topología similar a la obtenida por ML, donde *Chysis bractescens* se recupera como la especie más basal y hermana al resto de las especies del género; a su vez, *Chysis limminghei* y *Chysis addita* como las especies de más reciente divergencia del grupo. En el caso del análisis bayesiano de cloroplasto (*rbcL+ matK+trnF-L*. Fig. 12), las especies de *Chysis* se encuentran en un clado con menor pp = 0.88 compuesto por *Basiphyllea hamiltoniana* y *Hexalectris revoluta* (Bletiinae sensu Chase *et al.*, 2015), formando estas dos

un clado basal (pp = 1) hermano al clado, compuesto por las especies de *Chysis*, donde *C. bractescens* pp = 1, continúa siendo hermana al resto de las demás especies del género.

En ML, *Basiphyllea hamiltoniana*, *Hexalectris revoluta* y *Bletia parkinsonii*, son recuperados en un clado con poco soporte (ITS bs = 60, cloroplasto+ITS bs = 3. Figs. 8 y 10) conformado también por las especies de Ponerinae: *Ponera juncifolia*, *Ponera exilis*, *Isochilus major* y *Helleriella guerrerensis*. Mientras que, en el análisis de ML de cloroplasto (*rbcL*+*matK*+*trnF-L*), ambas, *Basiphyllea hamiltoniana* y *Hexalectris revoluta* forman un clado independiente (Bletiinae) muy bien soportado (bs = 100).

Tanto en ML como en BI, en todas las filogenias obtenidas (ITS bs = 88, cloroplasto bs = 94 y pp = 1, cloroplasto+ITS bs = 100 y pp = 1. Figs. 8-12); el clado más basal recuperado de Epidendreae está compuesto por *Agrostophyllum majus* y *Earina autumnalis* (Agrostophyllinae).

El siguiente grupo recuperado en la filogenia obtenida de los análisis de ML, se encuentra un clado (Calypsoinae. Figs. 8-10) con bajo soporte donde *Coelia triptera* se ubica basal, como hermana al resto de las especies de este grupo. *Calypso bulbosa* y *Dactylostalix ringens* se recuperan en un clado con buen soporte (cloroplasto bs = 84, cloroplasto+ITS bs = 86). El siguiente elemento de este grupo, está compuesto por las especies del género *Govenia* que son recuperadas monofiléticas, en un clado con muy buen soporte (cloroplasto y cloroplasto+ITS bs = 100). Por último, se recupera un clado con las especies de los demás géneros incluidos (*Aplectrum*, *Cremastra*, *Corallorhiza*, *Oreorchis*) con soportes disímiles y donde se ubica a *Bletia parkinsonii*.

En la filogenia resultado de la BI las topologías son recuperadas de manera similar a lo anterior (Figs. 11 y 12); en el cloroplasto: *Coelia* se posiciona fuera de este grupo en su propio clado (pp = 1); pero en cloroplasto+ITS, *Coelia triptera* se recupera nuevamente como la especie más basal del grupo (pp = 1), seguida por un clado (pp = 0.99) formado por *Calypso bulbosa* y *Dactylostalix ringens*. El siguiente clado con las dos especies de *Govenia* (pp = 1) y por último un clado (pp = 0.99) con el resto de las especies de los géneros incluidos (*Aplectrum*, *Cremastra*, *Corallorhiza*, *Oreorchis*) con buen soporte (pp = 0.99 y 1) y donde se ubica a *Bletia parkinsonii*

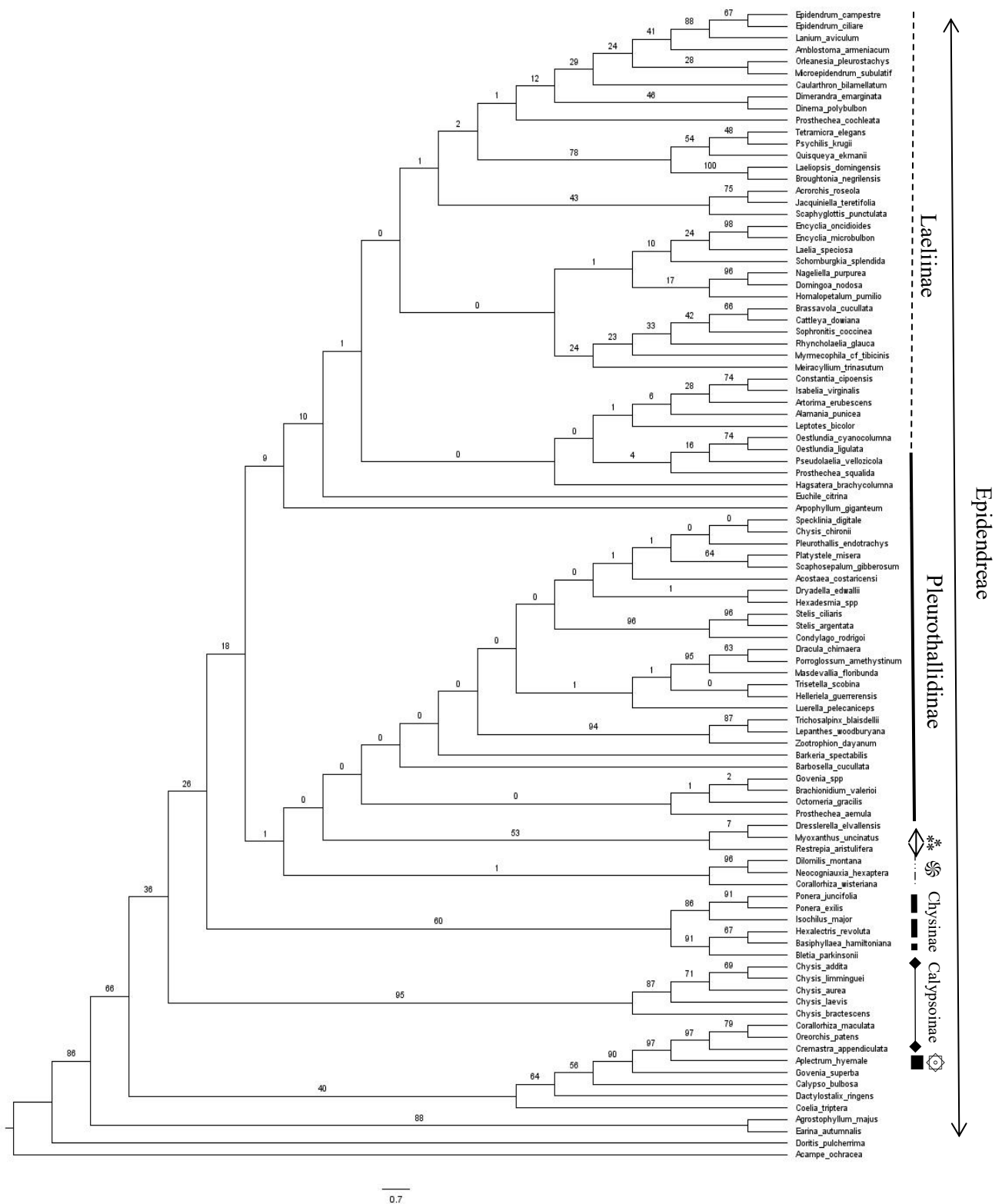


Figura 8. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferida de la matriz de secuencias de ITS de Epidendreae. Los números por encima de las ramas corresponden a los valores de soporte bootstrap no paramétrico. * = Ponerinae, ☞ = Bletinae, ☉ = Agrostophyllinae.

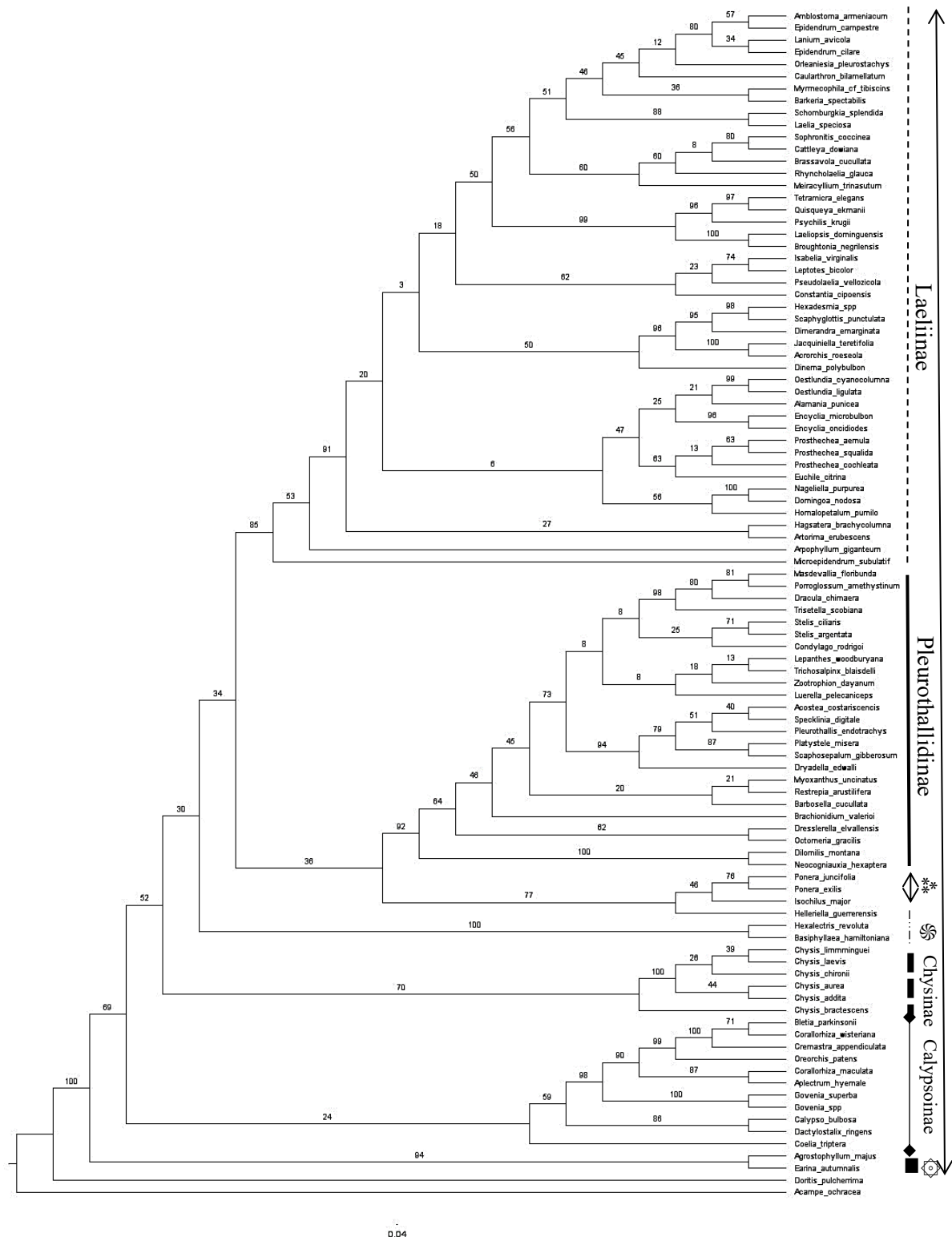


Figura 9. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferida de la matriz de secuencias de cloroplasto (*rbcL*+*matK*+*trnL-F*) de Epidendreae. Los números por encima de las ramas corresponden a los valores de soporte bootstrap no paramétrico. ** = Ponerinae, ☼ = Blettiinae, ⊙ = Agrostophyllinae.

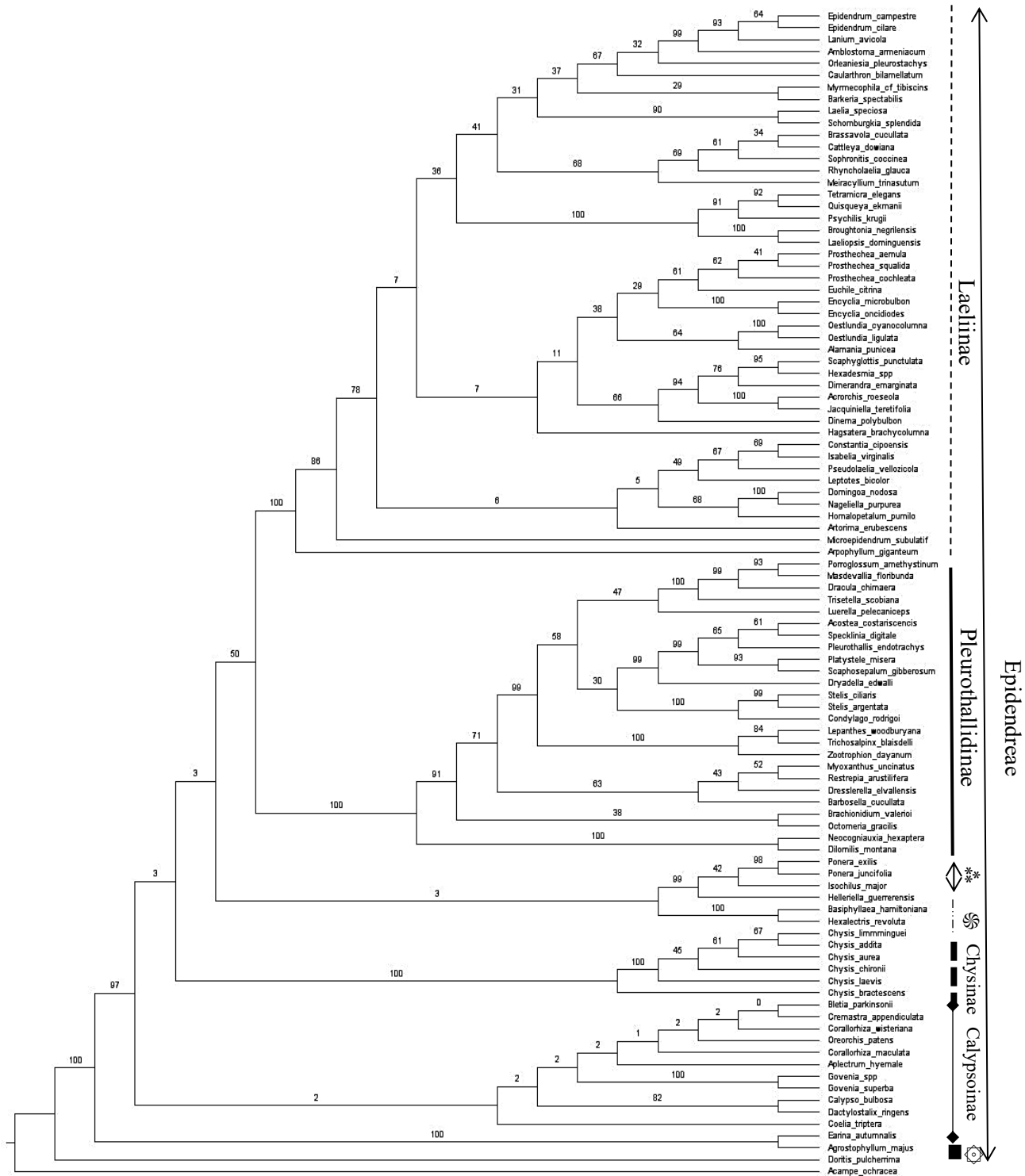


Figura 10. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferida de la matriz de secuencias de cloroplasto+ITS de Epidendreae. Los números por encima de las ramas corresponden a los valores de soporte bootstrap no paramétrico. ** = Ponerinae, ☞ = Bletinae, ⦿ = Agrostophyllinae.

En los análisis de ML y BI de cloroplasto+ITS (Figs. 10 y 11) el siguiente grupo recuperado en la filogenia de Epidendreae es un clado con buen soporte (bs = 100 y pp = 1) compuesto por las especies de orquídeas pleurothallidinas (Pleurothallidinae) incluidas en los análisis: el clado más basal (bs = 100 y pp = 1) y hermano al resto de las especies de este grupo, se encuentra formado por *Dilomilis montana* y *Neocogniauxia hexaptera*, luego, otro clado (bs = 38 y pp = 0.92) está formado por *Brachionidium valerioi* y *Octomeria gracilis*; la rama más apical está formada por *Dracula chimaera* (bs = 99 y pp = 1), junto con *Masdevalia floribunda* y *Porroglussum ametisinum* (bs = 93 y pp = 1).

En las topologías de las filogenias obtenidas por ML y BI de cloroplasto y cloroplasto+ITS (Figs. 9, 10, 11 y 12), el último grupo recuperado lo constituye el clado (bs = 100 y pp = 1) que se encuentra compuesto por las numerosas especies de orquídeas laelinas (Laeliinae) donde: *Arpophyllum giganteum* y *Microepidendrum subulatifolium* se localizan sucesivamente como las especies hermanas al resto de las especies que constituyen este grupo.

En las topologías recuperadas por la ML (Fig. 8-10) se observan los grupos de especies agrupados en alianzas tradicionalmente reconocidas en Laeliinae (van den Berg *et al.*, 2009 y Freudenstein y Chase, 2015): la alianza *Isabella* y *Domingoa*; la alianza *Scaphyglottis*, la alianza *Encyclia*, la alianza *Cattleya*, la alianza *Laelia* y la alianza *Epidendrum* respectivamente; pero en la topología recuperada por BI de cloroplasto+ITS y cloroplasto (Figs. 11 y 12), estos grupos se encuentran ubicados a lo largo de una politomía.

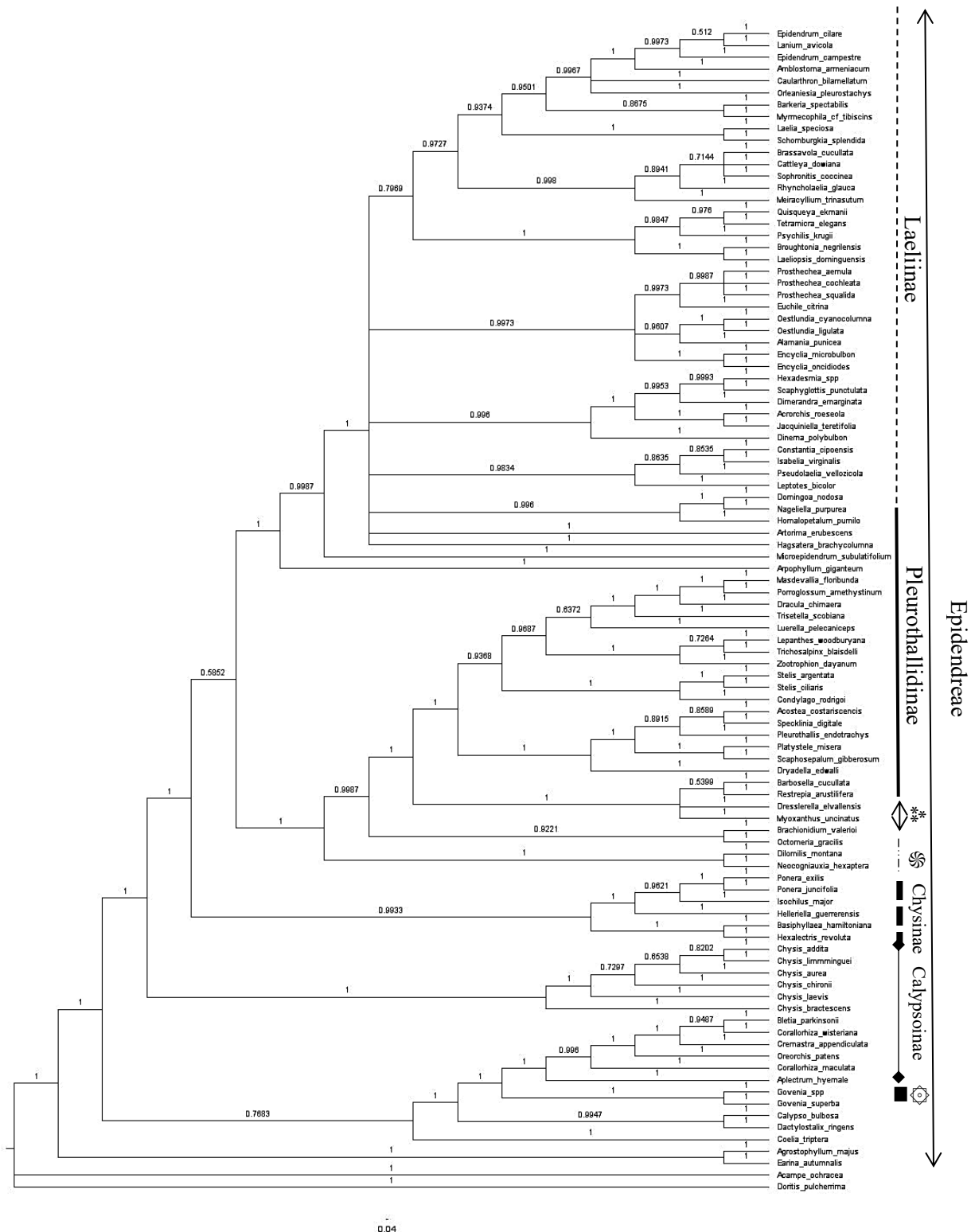


Figura 11. Árbol de consenso de mayoría del 50% recuperado por la Inferencia Bayesiana (BI) de la matriz de secuencias de cloroplasto+ITS de Epidendreae. Los números por encima de las ramas corresponden a los valores de las probabilidades posteriores. ** = Ponerinae, ☞ = Blettiinae, ☞ = Agrostophyllinae.

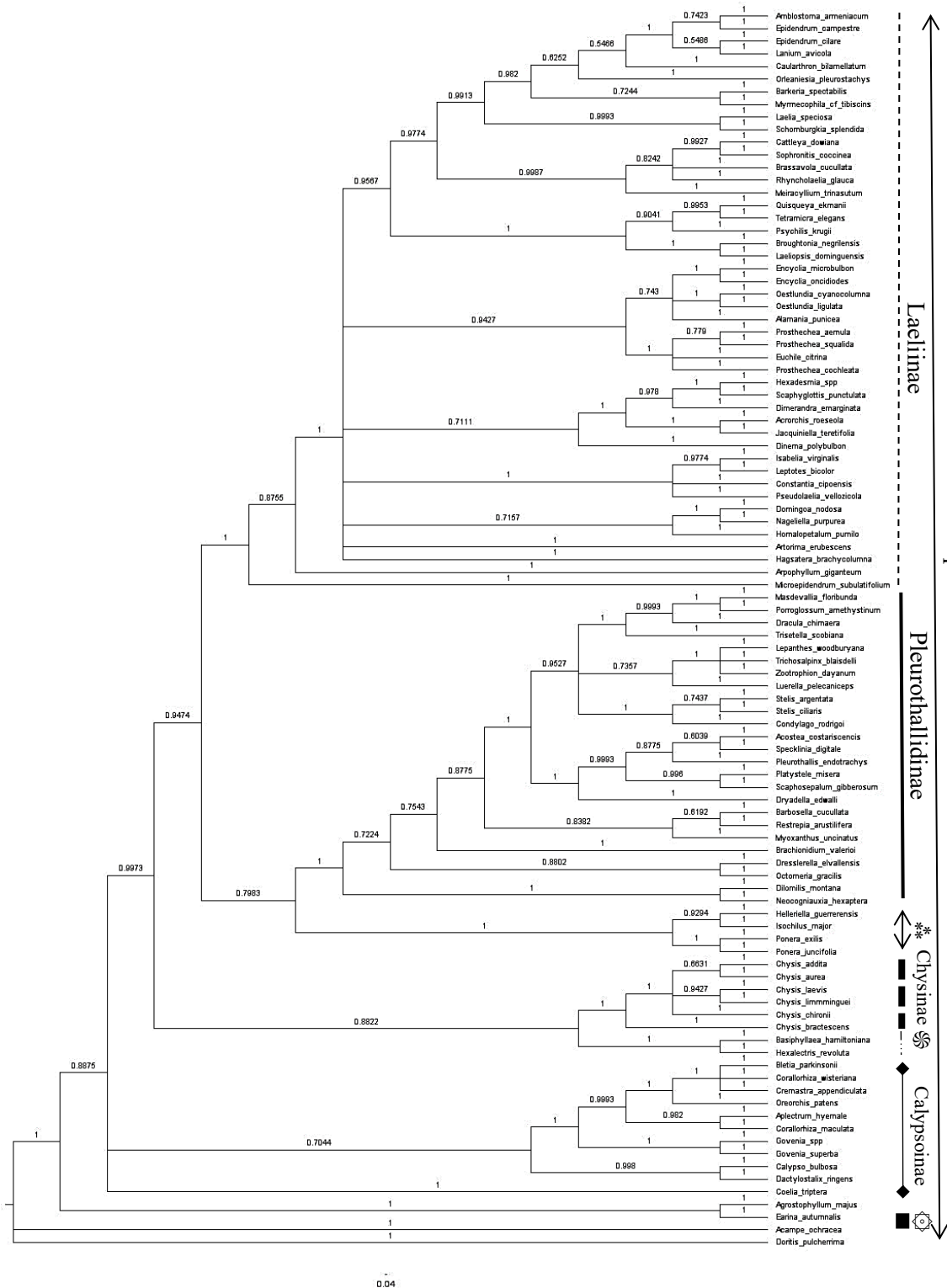


Figura 12. Árbol de consenso de mayoría del 50% recuperado por la Inferencia Bayesiana (BI) de la matriz de secuencias de cloroplasto(*rbcL+matk+trnL-F*). Los números por encima de las ramas corresponden a los valores de las probabilidades posteriores. ** = Ponerinae, ☼ = Blettiinae, ☼ = Calypsoinae

DISCUSIÓN

Filogenia de *Chysis*, tribu Chysinae y su posición en Epidendreae

En los análisis de Freudenstein y Chase (2015) y en la clasificación de Orchidaceae más recientemente publicada de Chase *et al.* (2015), la posición tradicionalmente aceptada del género *Chysis* posicionado en su propia subtribu monogenérica Chysinae, había sido rechazada, y los miembros de este género pasaron a formar parte junto con los géneros *Basiphyllea*, *Hexalectris* y *Bletia* en un concepto más amplio de Bletinae.

De manera importante de mencionar, recientemente para Sosa y Chase (2020), los géneros *Basiphyllea* y *Hexalectris*, así como el total de sus especies son incluidos en *Bletia*; y junto con *Chysis*, son considerados como la subtribu Bletinae.

Sin embargo, como resultado de los análisis filogenéticos elaborados en este trabajo, donde se incluyeron mayor cantidad de especies del género *Chysis* en el muestreo: en cuatro de las cinco topologías de los árboles obtenidas por los análisis de la ML y BI que se realizaron (ITS, cloroplasto y cloroplasto+ITS. Figs. 8-11): *Chysis* se recupera en un clado monofilético y monogenérico con buen soporte (ITS bs = 95, cloroplasto bs = 70, cloroplasto+ITS bs = 100 y pp = 1) y, solamente en el análisis de cloroplasto de la BI (pp = 0.88) se recupera en un clado en conjunto a *Bletia* (*Basiphyllea* y *Hexalectris*) de Bletinae. Por lo que existe suficiente soporte para re-considerar que *Chysis* se encuentra ubicado en su propia subtribu (Chysinae), cómo fue reconocido respectivamente por Chase *et al.* (2003); van den Berg, (2005); van den Berg *et al.* (2005) y van den Berg *et al.* (2009).

En el caso de la inclusión de *Chysis* dentro de Bletinae en la filogenia de Epidendreae de Freudenstein y Chase (2015), dentro de su trabajo mencionan el efecto que se puede presentar en los análisis de supermatriz; donde a menudo se tienen un gran número de datos faltantes, así como la forma en que los conjuntos de datos moleculares se han reunido a lo largo del tiempo (para estudios más pequeños dentro de la subfamilia), esto puede llevar a deficiencias del análisis entre ellas: la formación de terminales sintéticas y que además se dificulta predecir posibles efectos sobre un grupo, o en el análisis *per se*, donde se ha observado que estas deficiencias también pueden tener un efecto importante en los valores de apoyo.

Es probable que debido a esos fenómenos mencionados en el párrafo anterior, y por efecto de la falta de muestra de representantes de especies de *Chysis* incluidas en dicho trabajo (solamente una especie), su posición fuera recuperada de manera errónea en dicha filogenia.

Se observa a nivel de especies en las topologías recuperadas por los análisis filogenéticos de este trabajo (Figs. 8-12) que: *Chysis bractescens* se localiza en la base como hermana al resto de las seis especies del grupo incluidas, resaltando de manera importante que es una de las especies con más amplia distribución del género, desde México hasta Nicaragua (Dressler, 2000; Trópicos MBG, 2021). La siguiente especie del grupo es *Chysis laevis* que tiene la distribución más amplia desde México hasta Costa Rica (Dressler, 2000; Trópicos MBG, 2021), mientras que *Chysis aurea* la especie de distribución más sudamericana (Goaverts-WCSP, 2021), en cuatro de las cinco topologías obtenidas, es recuperada, en la parte intermedia en la reconstrucción filogenética del grupo. En el caso de la topología donde no es recuperada así, la discrepancia de posición, puede deberse a baja resolución de los marcadores de solo cloroplasto en donde se observa en una rama con bajo soporte a lo largo de una politomía. *Chysis limminghei* junto con *Chysis addita* se observan como las especies de más reciente divergencia, siendo ambas exclusivas de México y Guatemala (Trópicos MBG, 2021).

Debido a las posiciones de las especies de *Chysis* (mencionadas en el párrafo anterior) en las reconstrucciones filogenéticas; podría afirmarse que este género tuvo un origen Mesoamericano como fue ampliamente sospechado por Dressler (2000) y Soto-Arenas (2005a). Sin embargo, es importante mencionar que ésta es la primera filogenia del género que ha sido realizada, y solo incluye seis de las trece especies actualmente reconocidas (Goaverts-WCSP, 2021), por lo que a pesar de representar una buena primera aproximación de sus relaciones, será necesario incluir una mayor cantidad de especies en análisis filogenéticos futuros que se realicen del género, para tener una imagen más fina y detallada de las relaciones filogenéticas.

También será necesario elaborar un análisis de los patrones biogeográficos con una mayor representación de las especies que existen dentro de este género.

La subrepresentación en los herbarios y en las bases de datos de secuencias moleculares de las especies de *Chysis*, así como su rareza biológica (muchas especies están descritas basadas en un solo ejemplar y una sola localidad), imposibilitaron conseguir muestras biológicas para la extracción de los marcadores moleculares de mayor cantidad de especies que pudieran ser incluidas en los análisis.

A pesar de esto, este trabajo muestra una primera representación de las relaciones filogenéticas de las especies que constituyen el género y, permite discutir brevemente una aproximación de las tendencias de algunos caracteres morfológicos y ontogenéticos del grupo.

Resto de las subtribus de Epidendreae

Para los demás grupos que componen Epidendreae en los análisis filogenéticos elaborados (Figs. 8-12) se observó que:

En la base de Epidendreae, el grupo hermano al resto, está compuesto por las especies asiáticas *Agrostophyllum majus* y *Earina autumnalis*, formando la tribu Agrostophyllinae, de igual manera que en las filogenias de Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015).

Del mismo modo que Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015), los análisis recuperan al siguiente clado; conformado por las especies de los géneros *Aplectrum*, *Calypso*, *Coelia*, *Corallorhiza*, *Cremastra*, *Dactylostalix*, *Govenia* y *Oreorchis*.

Este grupo es reconocido como la subtribu Calypsoinae, dentro de ella: *Coelia triptera* se localiza en la base, al igual que en las filogenias de Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015); *Calypso bulbosa* y *Dactylostalix ringens* se recuperan en un clado, y, el siguiente elemento de este grupo, está compuesto por las especies del género *Govenia*, que son recuperadas monofiléticas en un clado con muy buen soporte como en las filogenias de Epidendreae de Freudenstein y Chase (2015), y en particular de la subtribu Calypsoinae de Freudenstein *et al.* (2017).

Una particularidad observada en cuatro de las cinco topologías de los análisis elaborados (Figs. 9-12) es, que *Bletia parkinsonii*, se incluye junto a *Corallorhiza wisteriana*, en la parte final de este grupo (Calypsoinae) y se encuentra separada de los géneros

Basiphyllaea y *Hexalectris*, ahora incluidos en *Bletia* (Sosa y Chase, 2020) dónde se le ubica en las filogenias pasadas de Epidendreae de Chase *et al.* (2003); van den Berg (2005); van den Berg *et al.* (2009); Chase *et al.* (2015) y Freudenstein y Chase (2015).

En el análisis de ML de cloroplasto (Fig. 9) con soporte alto (bs = 100), *Basiphyllaea* y *Hexalectris*, ahora considerados ambos géneros y sus especies, dentro del genero *Bletia* (Sosa y Chase, 2020), son recuperados en su propio clado formando la subtribu Bletiinae, al igual que en la filogenia de van den Berg *et al.* (2009). Sin embargo, en los análisis de ML de ITS (Fig. 8) y en el de BI de cloroplasto+ITS (Fig. 11), el grupo Bletiinae (*Basiphyllaea* y *Hexalectris*) se coloca dentro de un clado junto con las especies de *Ponera*, *Isochilus* y *Helleriella* (considerados como la subtribu Ponerinae) al igual que en la filogenia obtenida por van den Berg *et al.* (2005).

Ésta inclusión de las especies de Bletiinae (*Bletia sensu* Sosa y Chase, 2020) junto con los demás miembros de Ponerinae, puede deberse por la reducida muestra de especies de *Bletia* en este trabajo, siendo un fenómeno similar al producido en la subrepresentación de *Chysis* en las filogenias previas de Epidendreae, explicado a detalle anteriormente.

En el caso particular del agrupamiento de *Bletia parkinsonii* dentro de Calypsoinae; podría ser resultado de un error en las secuencias de alguno o todos los marcadores moleculares de esta especie, descargados de las bases de datos del Gen Bank, que se encontraran erróneamente etiquetados como pertenecientes a un miembro de este género y pertenecieran en realidad a otro organismo diferente.

Los análisis muestran a Pleurothallidinae recuperado en la filogenia de Epidendreae como un clado con buen soporte, monofilético, y proporcionan una topología similar a las obtenidas para este grupo por Pridgeon *et al.* (2001), Chase *et al.* (2015); Freudenstein y Chase, (2015) y Karremans, (2016).

Recientemente, este grupo se encuentra bajo intenso estudio, principalmente en algunos de sus géneros más numerosos (*Stelis* y *Specklinia*), donde ha recibido varios reacomodos y delimitaciones (Karremans, 2010; Karremans *et al.*, 2013; Karremans *et al.*, 2015; Karremans, 2016).

Las topologías de la subtribu Pleurothallidinae, obtenidas en este trabajo, al igual que en los análisis de Freudenstein y Chase (2015) y Karremans (2016), el grupo formado por *Dilomilis montana* y *Neocogniauxia hexaptera* se recupera en la base y como hermano al resto de las especies, a pesar de que anteriormente, este grupo de dos especies, había sido considerado externo a esta subtribu por Pridgeon *et al.* (2001).

El último grupo recuperado por las topologías de los análisis (Figs. 8-12): lo constituye el clado bien soportado, que se encuentra compuesto por las numerosas especies de orquídeas laelinas (Laeliinae), donde al igual que en las filogenias publicadas de este grupo por van den Berg *et al.* (2000); van den Berg *et al.* (2009); Freudenstein y Chase (2015), *Arpophyllum giganteum* y *Microepidendrum subulatifolium* se localizan sucesivamente como las especies hermanas al resto.

En el caso particular de *Microepidendrum subulatifolium*, éste taxón problemático ha experimentado distintos reacomodos en su posición dentro de Laeliinae, siendo considerado como cercano a los géneros que componen la alianza *Epidendrum*; sin embargo, los análisis de este trabajo reafirman los resultados previamente obtenidos por Higgins (2006), Angulo *et al.* (2012) y Valencia-Nieto *et al.* (2016) donde es reconocido como un linaje ancestral que no tiene relaciones cercanas con los demás taxones que componen esta subtribu.

Las topologías de los árboles filogenéticos en los análisis de ML, con soportes altos (Figs. 8-10), recuperan los grupos de especies agrupados en las alianzas tradicionalmente reconocidas dentro de la subtribu Laeliinae (van den Berg *et al.*, 2009; Freudenstein y Chase, 2015).

CONCLUSIONES

El género *Chysis* se encuentra bien soportado dentro de la filogenia de Epidendreae y conforma un grupo monofilético que, como ha sido reconocido por diversos autores, debe ser considerado dentro de su propia subtribu: Chysinae, siendo ésta última monogénica.

La composición intraespecífica de *Chysis* en las filogenias obtenidas revela que, como fue ampliamente sospechado y predicho por Dressler (2000) y Soto-Arenas (2005a) este género tiene un origen mesoamericano.

Será necesario en futuras investigaciones de este género la inclusión de una mayor cantidad de especies para poder elaborar una reconstrucción más detallada de las relaciones filogenéticas de este género, y poder llevar a cabo análisis biogeográficos.

Las reconstrucciones filogenéticas de este trabajo, al igual que para la más reciente clasificación de la familia Orchidaceae de Chase *et al.* (2015), recuperan la inclusión de varios géneros asiáticos dentro de Epidendreae, formando grupos claramente distinguibles, por lo que este trabajo reafirma que esta tribu no es exclusiva del Neotrópico como había sido considerada tradicionalmente.

Las topologías recuperadas son similares a las obtenidas por Freudenstein y Chase (2015) y a los límites subtribales establecidos por Chase *et al.* (2015), excepto en el caso de Chysinae, por lo que se propone que esta subtribu debe ser considerada como válida, y las especies del género *Chysis* deben ser separados de la subtribu Bletiinae, compuesta exclusivamente por el género *Bletia*.

Acorde a los resultados de los análisis de este trabajo, como propuesta nueva y más reciente para la tribu Epidendreae, utilizar una composición de siete subtribus dentro de ella, conformada por:

Agrostophyllinae, Calypsoinae, Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae.

LITERATURA CITADA CAPÍTULO II

Akaike, H. 1974. A new look at statistical model identification. IEEE Transaction on Automatic Control 19: 716-729. doi: 10.1109/TAC.1974.1100705.

Allen, P.H. 1955. A revision of the genus *Chysis*. *American Orchid Society Bulletin*, 24, 664-6.

Angulo, D.F., Ruiz-Sanchez, E., Sosa, V. (2012). Niche conservatism in the Mesoamerican seasonal tropical dry forest orchid *Barkeria* (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology*, 26(4), 991-1010. <https://doi.org/10.1007/s10682-011-9528-0>

Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification, En: Dixon, K.W., Kell,

- S.P., Barret, R.L., Cribb, P.J.(Eds.) Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malasya.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Berg, C., Schuiteman, A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151-174. [DOI:10.1111/boj.12234](https://doi.org/10.1111/boj.12234)
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R., Posada, D. 2012.** "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* **9**(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dressler, R.L. 1981.** The orchids, natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Dressler, R.L. 1993.** Phylogeny and classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon.
- Dressler, R.L. 2000.** Mesoamerican orchid novelties 3. *Novon*, 193-200. <https://doi.org/10.2307/3393099>
- Edler, D, Klein, J, Antonelli, A, Silvestro, D. 2021.** raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods Ecol Evol.* 2021; **12**: 373– 377. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>
- Freudenstein, J.V., Chase, M.W. 2015.** Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of botany* **11**:665-681. [DOI: https://doi.org/10.1093/aob/mcu253](https://doi.org/10.1093/aob/mcu253)
- Freudenstein, J.V., Yukawa, T., Luo, Y.B. 2017.** A reanalysis of relationships among Calypsoinae (Orchidaceae: Epidendroideae): floral and vegetative evolution and the placement of *Yuania*. *Systematic Botany* **42**:17-25. [DOI: https://doi.org/10.1600/036364417X694944](https://doi.org/10.1600/036364417X694944)
- Govaerts, R. 2021.** World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew <https://wmsp.science.kew.org/home.do> (Accesado el 1 de abril de 2021).
- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Endara, L. 2015.** Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. In *Proc. R. Soc. B.* **1814**: 20151553. [DOI: 10.1098/rspb.2015.1553](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553)
- Higgins, W.E., 2006.** *Microepidendrum*: a Mexican jewel. *Orchids* **75**, 532–533.

- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755. DOI: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754)
- Karremans, A.P. 2010.** Phylogenetics of *Stelis* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) and closely related genera, based on molecular data, morphological characteristics and geographical distribution in the Central American and Andean Cordilleras. MSc Thesis, Plant Sciences Group and Biosystematics Group, Wageningen University. <http://edepot.wur.nl/146921>
- Karremans, A.P., Bakker, F.T., Pupulin, F., Solano-Gómez, R., Smulders, M.J. 2013.** Phylogenetics of *Stelis* and closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution*, **299**: 151-176. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0712-7>
- Karremans, A.P., Bogarin, D., Pupulin, F., Luer, C.A., Gravendeel, B. 2015.** The glandulous *Specklinia*: morphological convergence versus phylogenetic divergence. *Phytotaxa* **218**:101-127. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.2.1>
- Karremans, A.P. 2016.** Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana*, **16**:219-241. <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v16i2.26008>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010.** "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8. http://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf
- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2018** Jan 4;46(D1):D8-D13. doi: [10.1093/nar/gkx1095](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095). PMID: 29140470; PMCID: PMC5753372.
- Pridgeon, A.M., Solano, R., Chase, M.W. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286-2308. <http://www.amjbot.org/content/88/12/2286.full>

- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P.. 2003.** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, Bret, S., Larget, Liu, L., Suchard., Huelsenbeck, J.P. 2012** MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space, *Systematic Biology*, Volume 61, Issue 3, May 2012, Pages 539–542, <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ruiz-Sanchez, E., Sosa, V., Mejía-Saules, M. T. 2011.** Molecular phylogenetics of the Mesoamerican bamboo *Olmeca* (Poaceae, Bambuseae): Implications for taxonomy. *Taxon*, 60(1), 89-98. <https://doi.org/10.1002/tax.601008>
- Sequencher® version 4.1.4** DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>
- Sosa, V. 2007.** A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Blettiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic botany* **32**: 34-42. <http://www.jstor.org/stable/25064226>
- Sosa, V., Cameron, K.M., Angulo, D.F., Hernández-Hernández, T. 2016.** Life form evolution in epidendroid orchids: Ecological consequences of the shift from epiphytism to terrestrial habit in *Hexalectris*. *Taxon*, **65**: 235-248. DOI: <https://doi.org/10.12705/652.2>
- Sosa, V., Chase, M.W. 2020.** New combinations and a new name in Bletia (Blettiinae; Orchidaceae). *Phytotaxa* **456(3)**: 296-298.
- Soto-Arenas, M.A. 2005a.** *Chysis*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 173-177.
- Tropicos.org.** Missouri Botanical Garden. 11 de mayo de 2021. <http://www.tropicos.org>
- Valencia-Nieto, B., Sosa, V., Márquez-Guzmán, J. 2016.** Late stages of anther development and anther attributes in *Microepidendrum* differs from other genera of Epidendrum alliance (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **218**: 35-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.002>

- Van den Berg, C. 2005.** Epidendreae. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 162-164.
- Van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Soto-Arenas, M.A., Culhan, A., Chase, M.W. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- Van den Berg, C., Goldman, D.H., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Cameron, K. M., Chase, M.W. (2005).** An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, *92*(4), 613-624. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3732/ajb.92.4.613>
- 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. *Annals of Botany* **104**: 417-430. DOI: [10.1093/aob/mcp101](https://doi.org/10.1093/aob/mcp101)

DISCUSIÓN GENERAL

Como ha sido bien recopilado por Fay y Chase (2009), es bien reconocida la intensa labor taxonómica que se ha realizado en la familia Orchidaceae; desde Lineo pasando por Darwin hasta el presente. Sin embargo, se debe recalcar que, durante los últimos veinte años, ésta labor se ha intensificado, debido principalmente; a la integración de los caracteres moleculares, sobre todo con el surgimiento y auge de la metodología cladística, y muy la introducción de los análisis probabilísticos para la generación de hipótesis filogenéticas.

Éstas metodologías (cladísticas y probabilísticas), han permitido plantear diversas preguntas; entre ellas evolutivas, sobre un contexto filogenético, pudiendo ser respondidas sobre un andamiaje matemático, fácilmente reproducible y falseable.

También con las herramientas científicas actuales disponibles, la capacidad de formular diversas preguntas en un contexto filogenético, permite revelar la verdadera complejidad subyacente en diversos ámbitos de esta familia (Fay y Chase, 2009; Givnish *et al.*, 2015); demostrando que puede ser incluso mayor de lo que se llegó a pensar con anterioridad.

Como se ha discutido a detalle en el capítulo I; con la evidencia obtenida durante la última década, son propuestos para la familia Orchidaceae como impulsores de su extraordinaria riqueza de especies: la evolución y fusión de las estructuras relacionadas a la polinización (columna, anteras, polinios y polinarios); así como la especialización en grupos de polinizadores y la polinización por engaño (Freudenstein y Chase, 2015; Givnish *et al.*, 2015; Valencia-Nieto *et al.*, 2016, 2018).

Aunado a lo anterior, también se consideran de relevancia para esta diversificación: la formación de asociaciones con hongos micorrízicos, la distribución predominante en los trópicos (especialmente cordilleras extensas), la fotosíntesis CAM y el epifitismo *per se* (Gravendeel, 2004; Givnish *et al.*, 2015; Freudenstein y Chase, 2015).

El estudio del fenómeno de la incumbencia (directamente relacionado a la polinización) y la tendencia de este carácter en éste grupo de plantas, se centra por diversos autores como Freudenstein (1994b), Freudenstein *et al.* (2002) y Freudenstein *et al.* (2017),

en los grupos hermanos a la tribu Epidendreae, sobre todo en las tribus Vandeeae, Cymbidieae y Arethuseae.

Por lo que de modo importante, se recalca que por medio del presente trabajo, se integra el conocimiento sobre éste fenómeno en la tribu Epidendreae y las subtribus que la componen; considerando taxones recientemente incluidos en ella pertenecientes a la subtribu Calypsoinae, pero; muy particular y especialmente en el género *Chysis*; donde existía un enorme vacío de conocimiento, no solo en la filogenia de sus miembros, sino también en sus caracteres morfológicos, ontogenéticos y moleculares.

Tendencias de los caracteres morfológicos y la filogenia de *Chysis*

Este estudio identificó que *Chysis* posee un buen número de caracteres de la antera; entre ellos, la forma de la cubierta de la antera, la ornamentación de la epidermis de la antera, forma y el número de los polinios, caudículas lineares, la ausencia de alas en la columna y algunos caracteres del labelo (Tabla 2); que no son compartidos con la subtribu Bletinae (*Bletia*), donde Chase *et al.* (2015); Freudenstein y Chase (2015); Sosa y Chase, (2020) colocaron a este género.

Además de los caracteres descritos en el desarrollo floral ya mencionados; los análisis filogenéticos elaborados en este trabajo, por primera vez y de manera importante; incluyeron una mayor muestra de representantes del género (seis de trece especies conocidas), que los estudios previamente publicados.

Los resultados muestran que, *Chysis* se encuentra en su propio clado; y se recupera la monofilia de este grupo en las diversas reconstrucciones filogenéticas. Toda la evidencia obtenida apunta a que *Chysis* debe ser considerada como miembro de su propia subtribu monogénica Chysinae, por lo que su inclusión previa en Bletinae debe ser rechazada.

Dentro de *Chysis*, Allen (1955), Dressler (1981, 1993, 2000) y Soto-Arenas (2005a) propusieron respectivamente el reconocimiento de dos complejos de especies basados principalmente en dos caracteres; el número de quillas en el labelo y la morfología vegetativa.

Los caracteres de la cantidad de quillas y si son o no puberulentas, fueron observados a detalle en la microscopía electrónica de barrido para tres especies, *Chysis bractescens*, *C.*

limminghei y *C. laevis*; presentándose en número de cinco y con abundantes tricomas en las dos primeras especies y tres quillas centrales más seis pequeñas accesorias lisas en la última.

Sin embargo y muy importante, en las reconstrucciones filogenéticas obtenidas, las especies de *Chysis* con estas características compartidas (gel número de quillas y morfología vegetativa); no se agruparon en dos clados como complejos o grupos de especies, sino que; *Chysis bractescens* que posee cinco quillas y plantas colgantes, se recuperó como hermana al resto de las especies, seguida por *Chysis laevis* y luego por *Chysis cf chironii*, donde ambas presentan tres quillas lisas así como plantas cespitosas ascendentes. Mientras que, el siguiente clado muestra a *Chysis aurea* que presenta cinco quillas puberulentas, y por último, *Chysis addita* con tres quillas lisas como hermana a *Chysis limminguei*, que presenta a su vez cinco quillas puberulentas.

Debido a lo anterior, no existe ninguna evidencia que soporte la formación taxonómica de dos complejos o grupos de especies; por lo que el peso, así como la dirección y la tendencia evolutiva que Allen (1955), Dressler (1981, 1993, 2000) y Soto-Arenas (2005a) otorgaron a estos caracteres morfológicos (número de quillas y forma de crecimiento) no son soportados por los resultados obtenidos. Su propuesta de complejos, no refleja las relaciones de filogenia entre las especies de este género recuperados de los análisis elaborados en este trabajo.

Otro aspecto relevante observado en *Chysis*, es que la autogamia por pseudo-cleistogamia, que ha sido reportada en algunas de sus especies (Dressler, 2000 y Soto-Arenas, 2005a), está directamente relacionado con la ausencia del desarrollo o el desarrollo parcial del tejido del rostelo en las flores de las especies donde se presenta; fenómeno que ha sido observado en otras especies sobre todo del género *Guarianthe* de la subtribu Laeliinae.

Es importante mencionar, no obstante de la relevancia de este estudio, que si bien representa una primer aproximación a las relaciones filogenéticas de los miembros de *Chysis*, y, que permite una primera discusión en lo referente a la tendencia evolutiva de sus caracteres morfológicos; serán necesarios análisis filogenéticos del género que incluyan una mayor cantidad de las especies que lo componen, para poder obtener una imagen completa de sus relaciones. Con ello, se requieren elaborar estudios de reconstrucción de caracteres y áreas

ancestrales, para obtener los patrones biogeográficos de surgimiento del grupo y la dirección de sus caracteres morfológicos.

Incumbencia en Epidendreae y sus implicaciones en la clasificación

Durante mucho tiempo la tribu Epidendreae fue considerada exclusiva del Neotrópico (van den Berg *et al.*, 2000; van den Berg, 2005; van den Berg *et al.*, 2005; van den Berg *et al.*, 2009). Bajo ese concepto, la incumbencia en las anteras de todos sus miembros se logra por la elongación simple de la columna en las etapas tardías del desarrollo, a través del mecanismo más sencillo reportado en la literatura (Freudenstein *et al.*, 2002; Valencia-Nieto *et al.*, 2016, 2018).

Sin embargo, los reacomodos taxonómicos recientes que experimentó Epidendreae (Chase *et al.*, 2015; Freudenstein y Chase, 2015), que sumó la inclusión de las subtribus Agrostophyllinae y Calypsoinae, modificaron ese panorama. No solo deja de ser exclusiva del Neotrópico, sino que los nuevos miembros incluidos en ella, presentan el síndrome vandoide, donde la incumbencia se logra a través de reorientación del tejido de las anteras en las etapas tempranas del desarrollo, junto con la superposición de los polinios y la formación de apéndices externos.

Para este trabajo, desafortunadamente no pudieron obtenerse representantes para el estudio del desarrollo ontogenético de la subtribu Agrostophyllinae; no obstante, por la investigación detallada de Freudenstein *et al.* (2002) se sabe que presentan el síndrome vandoide en sus anteras.

Lo que si puede reiterarse con este trabajo, de igual modo que en los resultados obtenidos por Chase *et al.* (2015); es que las reconstrucciones filogenéticas, recuperan a la subtribu Agrostophyllinae (taxones asiáticos) en la base y hermana al resto de las subtribus que componen a Epidendreae; por lo que se confirma el retirar el estatus exclusivo del Neotrópico a la tribu Epidendreae.

Los resultados de las reconstrucciones filogenéticas obtenidos en este trabajo; soportan lo previamente encontrado por Freudenstein y Chase (2015), y Freudenstein *et al.* (2017), donde *Coelia* anteriormente clasificada en su propia subtribu Coeliinae, ahora se localiza como miembro de la subtribu Calypsoinae. Pero, de manera importante, se reporta,

que las observaciones de la microscopía electrónica de barrido de *Coelia triptera*, indican que la incumbencia temprana de la antera está presente. Sin embargo, se carece de estipe del polinio, así como de polinias superpuestas. Por lo que el único carácter del síndrome vandoide que se observó en ella es la antera incumbente temprana.

Esto último, representa un mecanismo intermedio de obtención de la incumbencia, entre el síndrome vandoide y la forma simple presente en el resto de las subtribus de Epidendreae.

Las observaciones mencionadas en el párrafo anterior, contrastan con la hipótesis de Freudenstein *et al.* (2017), que, si bien propuso en su trabajo a *Coelia* como miembro de Calypsoinae; argumentó que las transformaciones de los caracteres en este grupo partieron de la morfología de *Coelia*, y que, conducirían a un viscidio desprendible del rostelo y apéndices del polinio en los demás miembros de esta subtribu.

Pero, en este trabajo, las observaciones de *Coelia triptera* muestran que, el resto de los caracteres de sus anteras son congruentes con las Epidendreae más avanzadas, soportando ésta afirmación, en la presencia de caudículas granulosas (derivadas del polinio, y no de tejido externo como en la tégula y hamulus), la columna erecta y el número de polinios. Además, es de resaltar que, *Coelia* es también el único género epífita exclusivo de Mesoamérica incluido en la subtribu Calypsoinae, compuesta principalmente por geófitos terrestres que incluyen muchos taxones micoheterótrofos y sin hojas.

Toda la evidencia mencionada, apunta a que *Coelia* es un grupo muy antiguo, con una tendencia evolutiva propia que se ha mantenido desde su divergencia temprana. Esto conlleva, a que dicho género resulta muy atractivo, ya que se encuentra sin ser estudiado en sus relaciones filogenéticas y biogeográficas.

Así como también, debe ser importante plantear el estudio de la reconstrucción de sus estados ancestrales, ya que presenta un rasgo remarcable. Cuatro de sus cinco especies tienen flores miniatura y solamente una especie presenta flores de gran dimensión, dejando abierta la posibilidad para realizar un estudio detallado de la evolución de sus caracteres morfológicos y ontogenéticos florales, así como de su filogenia. Y resulta no solo atractivo

para aspectos evolutivos filogenéticos, sino para el estudio de aspectos de la disciplina de la ecología y evolución del desarrollo (eco-evo-devo).

Este estudio encontró también en Calypsoinae, un conjunto de caracteres que difieren entre los dos géneros *Govenia* y *Corallorhiza*. Aunque ambos géneros se caracterizan por una incumbencia temprana de las anteras, característica del síndrome vandoide. *Govenia alba* presenta tégula (apéndice del polinio derivado de la columna) compuesta principalmente por una hebra de células granuladas que conectan al viscidio con el ápice del polinio. Este tipo de apéndice del polinio que consiste en la cutícula dorsal del rostelo; ha sido considerado por Rasmussen (1982), Dressler (1993) y Freudenstein (1994a) como un tipo de estipe opuesto al hamulus presente en *Corallorhiza*.

Ambos géneros han sido clasificados previamente en varias subtribus en Epidendroideae, pero la posición de *Govenia* en Orchidaceae ha sido la más controvertida. Dressler (1981) colocó este género en la subtribu Corallorhizinae en la tribu Maxillarieae de la subfamilia extinta Vandoideae: más tarde, el mismo Dressler (1993) transfirió *Govenia* (subtribu Goveniinae) a la tribu Cymbidieae y Freudenstein (2005e) colocó este género en la tribu Calypsoeae pero sin indicar relaciones con *Earina* (Agrostophyllinae) o *Bletia* (Bletiinae) (García-Cruz y Sosa, 2005).

Los análisis filogenéticos de esta investigación; colocan a *Govenia* en un clado con muy buen soporte dentro de la subtribu Calypsoinae (al igual que Freudenstein y Chase, 2015).

En las observaciones de la microscopía electrónica de barrido, se confirma que, en la mayoría de las subtribus de Epidendreae (Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae), la incumbencia se alcanza por el mecanismo simple de elongación del tejido de la antera en las etapas tardías del desarrollo como se ha reportado previamente por diversos autores (Dressler, 1982, 1993; Arditti, 1991; Freudenstein y Rasmussen, 1996; Freudenstein *et al.*, 2002; Freudenstein y Chase, 2015; y Valencia-Nieto *et al.*, 2016, 2018).

Al igual que lo discutido para el género *Chysis*, no obstante las aportaciones de este trabajo, y lo discutido sobre la tendencia de la incumbencia en Epidendreae. Es necesario

realizar estudios de reconstrucción de caracteres y áreas ancestrales, para obtener la dirección de esta característica y sus patrones biogeográficos.

Biología del desarrollo (Evo-devo) en Epidendreae

Un aspecto, no discutido a detalle en ninguna de las secciones anteriores de este trabajo, es la importancia que estos resultados pueden adquirir si se les posiciona fuera del aspecto exclusivamente de la sistemática y se les coloca a la luz del campo de la llamada Evo-devo (evolución del desarrollo).

Esta disciplina, comienza a integrar los aspectos modernos del desarrollo a nivel genético y el desarrollo tradicional a nivel fenotípico (ontogenias) en el contexto de la filogenia moderna, enfatizando en la diversificación y evolución de los caracteres florales (Mondragón-Palomino y Theißen, 2008, 2009).

En el caso particular de este trabajo, la incumbencia y su relación con el correcto posicionamiento de los polinios a los polinizadores, cobra relevancia, si se quieren entender y buscan abordar efectos epigenéticos estables, que pueden tener un impacto en la adaptación de las flores de las orquídeas (Paun *et. al.* 2010); y se podría expandir el marco de la investigación, si se desea entender procesos de población que conducen a la adaptación y evolución fenotípica de estos caracteres.

Cozzolino y Widmer (2005); Waterman y Bidartondo, (2008), han estudiado en las flores de las orquídeas, la estrategia de polinización por engaño, la interacción que presentan con los polinizadores y la especiación, así como la necesidad de entender los mecanismos moleculares y del desarrollo que subyacen estos procesos.

Por lo que este trabajo, también aporta bases en la descripción ontogenética, que pueden ser retomadas por otros autores para profundizar en el estudio de los genes que subyacen a estas características, y que permitan comprender más sobre los mecanismos de evolución de las flores de las orquídeas.

CONCLUSIONES FINALES

- Existe suficiente evidencia molecular y de la ontogenia floral para proponer que el género *Chysis* sea reconocido nuevamente dentro de su propia subtribu monogénica: Chysinae.

- La separación en dos complejos de especies basados en caracteres del número de quillas del labelo y la anatomía del tallo, que tradicionalmente se usó para los miembros de *Chysis*; no refleja las relaciones filogenéticas entre especies del género.
- Este estudio corrobora que en las subtribus Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae, la incumbencia de la antera se alcanza por la elongación simple del tejido de la antera en las etapas tardías del desarrollo.
- En Calypsoinae (subtribu basal de Epidendreae), la inflexión de la antera se alcanza a través de la morfología presente en el síndrome Vandoide (reorientación del tejido en las etapas tempranas del desarrollo de la antera, la formación de apéndices externos del polinio, y su superposición); excepto en el género *Coelia*, donde solamente se presenta una de las tres características del síndrome.
- La incumbencia en *Coelia* representa un mecanismo intermedio de este fenómeno; una forma entre el síndrome vandoide, presente en las tribus basales de Epidendreae (Agrostophyllinae y Calypsoinae) y la incumbencia simple presente en el resto de las subtribus de Epidendreae (Chysinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae y Laeliinae).
- *Coelia* necesita que sus relaciones filogenéticas sean estudiadas, para poder conocer mejor la tendencia evolutiva de sus caracteres florales; y, particularmente comprender mejor la evolución de la incumbencia en Calypsoinae, así como la importancia del surgimiento de un mecanismo muy simple de esta característica en el resto de las subtribus más avanzadas de Epidendreae; lo que muy probablemente, facilitó la bien conocida y enorme diversificación de especies en dichas subtribus.
- La mayoría de las características clave de la morfología encontradas en la ontogenia floral, están íntimamente relacionados con los diversos síndromes de polinización presentes y con la biología de la reproducción de la tribu Epidendreae.
- Es necesario integrar los resultados de este trabajo en una análisis de reconstrucción de estados ancestrales de Epidendreae, para obtener un marco firme que nos proporcione evidencia sólida sobre la evolución de los caracteres morfológicos y ontogenéticos de

cada una de las subtribus que componen este grupo tan numeroso de especies de orquídeas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaike, H. 1974.** A new look at statistical model identification. *IEEE Transaction on Automatic Control* 19: 716-729. doi: 10.1109/TAC.1974.1100705.
- Allen, P.H. 1955.** A revision of the genus *Chysis*. *American Orchid Society Bulletin*, 24, 664-6.
- Angulo, D.F., Ruiz-Sanchez, E., Sosa, V. (2012).** Niche conservatism in the Mesoamerican seasonal tropical dry forest orchid *Barkeria* (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology*, 26(4), 991-1010. <https://doi.org/10.1007/s10682-011-9528-0>
- Arditti, J. 1992.** Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons. New York.
- Blanco, M.A., Barboza, G. 2005.** Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany* **95**: 763-772. DOI: 10.1093/aob/mci090
- Borba, E.L., Braga, P.I.S. 2003.** Biología reproductiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 541-549. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042003000400013>
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification, En: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barret, R.L., Cribb, P.J.(Eds.) *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malasya.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Berg, C., Schuiteman, A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 151-174. DOI:10.1111/boj.12234
- Cribb, J.P., Chase M.W. 2005.** Epidendroideae En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 3-8.
- Cozzolino S., Widmer A. 2005.** Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?. *Trends in Ecology and Evolution* 20(9): 487-494.

- Damon, A., Roblero, P.S. 2007.** A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* **48**: 1-14.
http://www.tropecol.com/pdf/open/PDF_48_1/Damon_n_Pedro.pdf
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R., Posada D. 2012.** “jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing”. *Nature Methods* 9(8), 772.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dressler, R.L. 1981.** The orchids, natural history and classification. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Dressler, R.L. 1993.** Phylogeny and classification of the Orchid Family. Dioscorides Press. Portland, Oregon.
- Dressler, R.L. 2000.** Mesoamerican orchid novelties 3. *Novon*, 193-200.
<https://doi.org/10.2307/3393099>
- Dressler, R. L., Salazar, G.A. 1991.** Viscarium, a term for the glue-bearing area of the rostellum. *Orchid Res. Newslett*, **17**: 11-12.
- Dressler, R.L. Soto-Arenas, M.A. 2002.** *Govenia greenwoodii*. En: Hågsater, E. and Soto M. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 5-6. Orchids of México Part 2 and 3. Herbario Amo. Mexico City. Plate 589.
- Edler, D, Klein, J, Antonelli, A, Silvestro, D. 2021.** raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods Ecol Evol.* 2021; 12: 373– 377. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>
- Fay, M.F., Chase, M.W. 2009.** Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany*, 104(3), 359-364. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp190>
- Fowler, J.A. 2005.** Wild Orchids of South Carolina. A popular natural history. University of South Carolina Press. South Carolina.
- Freudenstein, J.V. 1994a.** Gynostemium structure and relationships of the Corallorhizinae (Orchidaceae: Epidendroideae). *Plant Systematics and Evolution* **193**: 1-19.
<http://www.jstor.org/stable/23674966>
- Freudenstein, J.V. 1994b.** Character transformation and relationships in *Corallorhiza* (Orchidaceae: Epidendroideae). II. Morphological variation and phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **81**:1458-1467.
<http://www.jstor.org/stable/2445319>

- Freudenstein, J.V. 2005a.** *Calypso* En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp. 93-97
- Freudenstein, J.V. 2005b.** *Corallorhiza* En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp. 97-99
- Freudenstein, J.V. 2005c.** *Oreorchis* En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp.105-107.
- Freudenstein, J.V. 2005d.** *Tipulara* En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp. 107-109.
- Freudenstein, J.V. 2005e.** Calypsoeae in: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1.* Oxford University Press. London. pp. 89-90.
- Freudenstein, J.V., Rasmussen F.N. 1996.** Pollinium development and number in Orchidaceae. *American Journal of Botany* 83: 813-824. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12773.x>
- Freudenstein, J.V., Harris, E.M., Rasmussen, F.N. 2002.** The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the Vandoid complex. *American Journal of Botany* 89: 1747-1755. DOI: [10.3732/ajb.89.11.1747](https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1747)
- Freudenstein, J.V., Chase, M. W. 2015.** Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of botany* 11:665-681. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcu253>
- Freudenstein, J.V., Yukawa, T., Luo, Y.B. 2017.** A reanalysis of relationships among Calypsoinae (Orchidaceae: Epidendroideae): floral and vegetative evolution and the placement of *Yoania*. *Systematic Botany* 42:17-25. DOI: <https://doi.org/10.1600/036364417X694944>

- García-Cruz, J., Sosa, V. 2005.** Phylogenetic relationships and character evolution in *Govenia* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, **83**:1329-1339. DOI: <https://doi.org/10.1139/b05-098>
- García-Cruz, J., González-Astorga, J., Sosa, V., Hernández-González, O. 2009.** Genetic diversity in six *Govenia* (Orchidaceae) species with different pollinator attraction strategies. *International journal of plant sciences*, **170**: 894-905. DOI: <https://doi.org/10.1086/600149>
- Govaerts, R. 2021.** World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew <https://wmsp.science.kew.org/home.do> (Accesado el 1 de abril de 2021).
- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S.P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Endara, L. 2015.** Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. In *Proc. R. Soc. B.* **1814**: 20151553. DOI: [10.1098/rspb.2015.1553](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553)
- Gravendeel, B., Smithson, A., Slik, F.J., Schuiteman, A. 2004.** Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **359**(1450), 1523-1535. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1529>
- Hágsater, E., Soto M.A., Salazar G.A., Jiménez M.R., López R.M., Dressler R.L. 2005.** Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México, D.F. 304 pp.
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M.A. 2005.** *Epidendrum*, En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N.(Eds.). *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*, 236-251. Oxford University Press. UK.
- Halbinger, F; Soto-Arenas, M.A.. 1997.** “Laelias of México”. *Orquídea (Mexico City)* **15**: 1-160. [http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea\(Mex.\)15.pdf](http://www.herbarioamo.org/index_archivos/Orquidea(Mex.)15.pdf)
- Higgins, W.E. 2003.** *Prosthechea*: a chemical discontinuity in Laeliinae. *Lankesteriana* **7**: 39-41. <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/23010/23230>
- Higgins, W.E., 2006.** Microepidendrum: a Mexican jewel. *Orchids* **75**, 532–533.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist F. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**:754-755. DOI: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754)

- Ignowski, H., de Brito, A.T., Bona, C., Smidt, E.D.C. 2015.** Nomenclatural notes on *Stelis ciliaris* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Phytotaxa*, **218**: 30-38. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.1.2>
- Jersáková, J., Johnson, S.D., Kindlmann, P. 2006.** Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**: 219-235. DOI: [10.1017/S1464793105006986](https://doi.org/10.1017/S1464793105006986)
- Karremans, A.P. 2010.** Phylogenetics of *Stelis* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) and closely related genera, based on molecular data, morphological characteristics and geographical distribution in the Central American and Andean Cordilleras. MSc Thesis, Plant Sciences Group and Biosystematics Group, Wageningen University. <http://edepot.wur.nl/146921>
- Karremans, A.P., Bakker, F.T., Pupulin, F., Solano-Gómez, R., Smulders, M.J. 2013.** Phylogenetics of *Stelis* and closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution*, **299**: 151-176. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0712-7>
- Karremans, A.P., Bogarin, D., Pupulin, F., Luer, C.A., Gravendeel, B. 2015.** The glandulous *Specklinia*: morphological convergence versus phylogenetic divergence. *Phytotaxa* **218**: 101-127. DOI:<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.2.1>
- Karremans, A.P. 2016.** Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana*, **16**:219-241. <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v16i2.26008>
- Kocyan A; Endress, P.K. 2001.** Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasiodeae) and their relationships to other Orchidaceae. *International Journal of Plant Sciences* **162**: 847-867. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/320781>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Kurzweil, H. 1987a.** Developmental studies in orchid flowers I: Epidendroid and Vandoid species. *Nordic Journal of Botany* 7: 427-442. [DOI: 10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x](https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x)
- Kurzweil, H. 1987b.** Developmental studies in orchid flowers II: Orchidoid. *Nordic Journal of Botany* 7: 443-451. doi.org/10.1111/j.1756-1051.1987.tb00965.x
- Kurzweil, H. 1988.** Developmental studies in Orchid Flowers III: Neottiid species. *Nordic Journal of Botany* 8: 271-282. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1988.tb01721.x>
- Kurzweil, H. 1993.** Developmental studies in Orchid Flowers VI: Cypripedioid species. *Nordic Journal of Botany* 13: 423-430. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1993.tb00076.x>
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010.** “Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees” in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8. http://www.phylo.org/sub_sections/portal/sc2010_paper.pdf
- Mondragón-Palomino M., Theißen G. 2008.** MADS about the evolution of orchid flowers. *Trends in Plant Science* 13(2):51-59.
- Mondragón-Palomino M., Theißen G. 2009.** Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. *Annals of Botany* 104: 583–594, 2009
- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2018** Jan 4;46(D1):D8-D13. doi: 10.1093/nar/gkx1095. PMID: 29140470; PMCID: PMC5753372.
- Pansarin, E.R. 2008.** Reproductive biology and pollination of *Govenia utriculata*: A syrphid fly orchid pollinated through a pollen-deceptive mechanism. *Plant Species Biology* 23: 90-96. [DOI: 10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x)
- Paun O., Bateman R.M., Fay M.F., Hedren M., Civeyrel L., Chase M.W. 2010.** Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid Orchids (Dactylorhiza: Orchidaceae). *Mol. Biol. Evol.* 27(11): 2465-2473.
- Peraza-Flores, L.N., Carnevali, G., van den Berg, C. 2016.** A molecular phylogeny of the Laelia alliance (Orchidaceae) and a reassessment of Laelia and Schomburgkia. *Taxon*, 65: 1249-1262. <https://doi.org/10.12705/656.3>

- Peter, C.I., Johnson, S.D. 2006.** Anther cap retention prevents self-pollination by elaterid beetles in the South African orchid *Eulophia foliosa*. *Annals of Botany*, **97**: 345-355. DOI:10.1093/aob/mcj041
- Pinheiro, F., Koehler, S., Corrêa, A. M., Salatino, M.L.F., Salatino, A., de Barros, F. 2009.** Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant systematics and evolution*, **283**: 165-177. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0224-2>
- Pinheiro, F., Cozzolino, S. 2013.** *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon*, **62**: 77-88. <http://www.ingentaconnect.com/content/iapt/tax/2013/00000062/00000001/art00007>
- Pridgeon, A.M., Solano, R., Chase, M.W. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286-2308. <http://www.amjbot.org/content/88/12/2286.full>
- Rasmussen, F.N. 1982.** The gynostemium of the neottioid orchids. *Opera botanica* **65**:1-96.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P.. 2003.** MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- 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, *Systematic Biology*, Volume 61, Issue 3, May 2012, Pages 539–542, <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rudall, P.J., Bateman, R. M. 2004.** Evolution of zygomorphy in monocot flowers: iterative patterns and developmental constraints. *New Phytologist*, **162**: 25-44. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01032.x
- Rudall, J.P. 2007.** Anatomy of Flowering Plants. An Introduction to Structure and Development. Cambridge University Press. Cambridge.

- Ruiz-Sanchez, E., Sosa, V., Mejía-Saules, M.T. 2011.** Molecular phylogenetics of the Mesoamerican bamboo *Olmea* (Poaceae, Bambuseae): Implications for taxonomy. *Taxon*, 60(1), 89-98. <https://doi.org/10.1002/tax.601008>
- Salazar, G.A. 1990.** *Coelia triptera*. En: Hágsater, E., Salazar, G.A (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 1. Orchids of México Part 1. Asociación Mexicana de Orquideología. Mexico City. Plate 9.
- Salazar, G.A. 2005.** *Isochilus*, En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp.
- Salazar, G.A., Chavez-Rendon, C., Jiménez-Machorro, R. 2016.** Floral similarity and vegetative divergence in a new species of *Bletia* (Orchidaceae) from Mexico. *Phytotaxa* **275**: 112-126.
DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.275.2.3>
- Siegel, C. 2011.** Orchids and hummingbirds: sex in the fast lane. *The Orchid Digest* **75**: 8-17.
https://pdfs.semanticscholar.org/17d9/df36bf47eeb9fd0925cacf981e450e9c72b4.pdf?_ga=2.198704431.1430246362.1499451817-1927011864.1499451817
- Schlechter, R. 1926.** Das System der Orchidaceen. *Notizblatt des Botanischen Garten and Museums zu Berlin-Dahlem* 88: 563-591.
<https://www.jstor.org/stable/3994326?seq=1>
- Sequencher® version 4.1.4** DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>
- Sosa, V. 2002.** *Bletia roezlii*. En: Hágsater, E., Soto, M. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 5-6. Orchids of México Part 2 and 3. Herbario Amo. Mexico City. Plate 535.
- Sosa, V. 2007.** A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Bletiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic botany* **32**: 34-42. <http://www.jstor.org/stable/25064226>
- Sosa, V. 2008.** *Bletia nelsonii*. En: Hágsater, E., Soto M. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1010.

- Sosa, V., Cameron, K.M., Angulo, D.F., Hernández-Hernández, T. 2016.** Life form evolution in epidendroid orchids: Ecological consequences of the shift from epiphytism to terrestrial habit in *Hexalectris*. *Taxon*, **65**: 235-248. DOI: <https://doi.org/10.12705/652.2>
- Sosa, V., Chase, M.W. 2020.** New combinations and a new name in *Bletia* (Bletiinae; Orchidaceae). *Phytotaxa* **456(3)**: 296-298.
- Soto-Arenas, M.A. 2002.** *Corallorhiza wisteriana*. En: Hágsater, E., Soto M. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 5-6. Orchids of México Part 2 and 3. Herbario Amo. Mexico City. Plate 543.
- Soto-Arenas, M.A. 2005a.** *Chysis*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 173-177.
- Soto-Arenas, M.A. 2005b.** *Ponera*. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp.
- Soto-Arenas, M. 2008a.** *Chysis bractescens*. En: Hágsater, E. and Soto M. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1012.
- Soto-Arenas, M. 2008b.** *Isochilus alatus*. En: Hágsater, E. and Soto M. (Eds.). Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4. Herbario Amo. Mexico City. Plate 1030.
- Soto-Arenas, M.A. and Solano-Gómez, A.R. 2007.** Ficha técnica de *Chysis bractescens* En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Chysisbractescens00.pdf>
- Tropicos.org.** Missouri Botanical Garden. 11 de mayo de 2021. <http://www.tropicos.org>
- Tuomi, J., Lämsä, J., Wannas, L., Abeli, T., Jäkäläniemi, A. 2015.** Pollinator Behaviour on a Food-Deceptive Orchid *Calypso bulbosa* and co-flowering Species. *The Scientific World Journal* **2015**:1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/482161>

- Valencia, N.B., Espinosa-Matias, S., Márquez-Guzmán, J. 2011.** Presencia de estomas en las anteras de especies del género *Barkeria* (Laeliinae, Orchidaceae). *Acta Microscopica* Vol. 20 Supp. B. http://www.actamicroscopica.org/uploads/Suplementos/Vol_20_Supp_B_2011_Memorias_CIASSEM_2011/Proceedings.html.
- Valencia-Nieto, B., Sosa, V., Márquez-Guzmán, J. 2016.** Late stages of anther development and anther attributes in *Microepidendrum* differs from other genera of Epidendrum alliance (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **218**: 35-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.002>
- Valencia-Nieto, B., Sosa, V., & Márquez-Guzmán, J. 2018.** Anther development in tribe Epidendreae: orchids with contrasting pollination syndromes. *PeerJ*, *6*, e4383. DOI: [10.7717/peerj.4383](https://doi.org/10.7717/peerj.4383)
- Van den Berg, C. 2005.** Epidendreae. En: Pridgeon, A.M., Cribb, J.P., Chase, W.M., Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. Oxford University Press. London. pp. 162-164.
- Van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Soto-Arenas, M.A., Culhan, A., Chase, M.W. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0002600686&origin=inward&txGid=7D209B28DA85D652C2FD0CDC9EE9A674.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3a2>
- Van den Berg, C., Goldman, D. H., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Cameron, K. M., Chase, M. W. (2005).** An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, *92*(4), 613-624. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3732/ajb.92.4.613>
- 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. *Annals of Botany* **104**: 417-430. DOI: [10.1093/aob/mcp101](https://doi.org/10.1093/aob/mcp101)

- Van Der Cingel, N.A. 2001.** An Atlas of Orchid Pollination: European Orchids. CRC Press. USA.
- Van Der Pijl, L., Dodson, C. H., Flowers, O. 1969.** Orchid Flowers. Their pollination and evolution. (Fla, CG, ed.). University of Miami Press, Coral Cables, Florida.
- Waterman R.J., Bidartondo M.I. 2008.** Deception above, deception below: linking pollination and micorhyzal biology of orchids. *Journal of Experimental Biology* 59(5): 1085-1096.
- Whigham, D.F., McWethy, M. 1980.** Studies on the Pollination Ecology of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **67**: 550-555.
<http://www.jstor.org/stable/2442295>

APÉNDICE I. Base de datos con los números de acceso de Gen Bank de las secuencias de *rbcL*, *matK*, *trnL-F* e ITS de las especies de la tribu Epidendreae, tomadas de los trabajos de Givnish *et al.* (2015); Freudenstein y Chase, (2015); que se descargaron y utilizaron para la construcción de la matriz de secuencias de este trabajo. La letra N indica que no se encontró ese marcador en las bases de datos el Gen Bank.

	<i>rbcL</i>	<i>trnL</i>	<i>matK</i>	ITS
Agrostophyllinae				
<i>Agrostophyllum majus</i>	AF518054	AF519964	AY368391	AF521080
<i>Earina autumnalis</i>	AF074155	KF591259.1	AF263656.1	AF260149.1
<i>Earina autumnalis</i>	AF074155	KF591259.1	AF263656.1	AF260149.1 / AY008469
<i>Earina deplanchei</i>	N	N	EF079337.1	N
<i>Earina valida</i>	AF518051.1	AY008448	N	AF521077.1
<i>Glomera sp</i>	AF074172	AF519962.1	AF263662.1	AF521079
Calypsoae / Calypsoinae				
<i>Aplectrum hymale</i>	AF074108	AY380935.1 / EU266434	AF263623.1 / EU266416	AY008468
<i>Calypso bulbosa</i>	AF074120 / AF074234	AF519961.1 / AF519960.1	AF263636.1	AF521076
<i>Calypso bulbosa</i>	AF264162 / AF074120	AF519960 / AF519961.1	EF525689 / AF263636.1	AF521076
<i>Corallorhiza_maculata</i>	N	N	N	N
<i>Corallorhiza_wisteriana</i>	EU391361	N	KM598435	EF525685
<i>Cremastra appendiculata</i>	EU391354	EU266439	KM598436	EF525673
<i>Dactylostalis_ringens</i>	KM526772.1	N	KM598437	KM598423
<i>Govenia lilacea</i>	N	AF519916	AY121723.1	AF521056.1
<i>Govenia sp.</i>	AF074175	N	AF263664	EF525672
<i>Govenia sp. (aff. superva)</i>	AF074175	N	N	N

<i>Govenia_sodiroi</i>	N	N	EU490695.1	N
<i>Govenia_superba</i>	AF074175	N	N	N
<i>Govenia_viaria</i>	N	N	EU214357.1	N
<i>Oreorchis_patens / foliosa</i>	EU391355 / KM526773.1	EU266436	EU266418 / JF972945.1	EF525676 / KM526767.1
<i>Tipularia discolor</i>	AF074234	N	EU490712.1 / AF263685.1	KM598422
Coeliinae				
<i>Coelia triptera</i>	AF074132	AF266972	AF263643	EF079362 / AF260151.1
Chysiinae				
<i>Chysis_bractescens</i>	AF074126	AF266971	<u>AY121747</u> / EF079351.1	<u>EF079363</u> / AF260150.1
Bletiinae				
<i>Basiphyllaea_hamiltoniana</i>	AF518026	AF519903	EU490676	AF521050
<i>Bletia patula</i>	N	N	N	N
<i>Bletia sp.</i>	N	N	N	N
<i>Bletia_parkinsonii</i>	AF264156	N	AF263628	DQ445825
<i>Bletia_purpurea</i>	AF074113	AY008451	AF302693.1	N
<i>Hexalectris_revoluta</i>	AF264168	AF519908	AF263665	AY008479
Ponerinae				
<i>Helleriella_guerrerensis</i>	AF518029	AF266961	AF263761	N
<i>Isochilus major</i>	N	AY422381.1	AY396078.1 / EU490696.1	AY008481.1
<i>Isochilus_amparoanus</i>	AY368361	AF266962	AF263762	AF260143
<i>Ponera_exilis</i>	AF518032	AF266965	AF263763	AF260144
Pleurothallidinae				
<i>Acostaea_costaricensis</i>	N	AF265507	AF265457	AF262865
<i>Barbosella_cucullata</i>	N	AF265525	AF265483	AF262815

<i>Brachionidium_valerioi</i>	N	AF291102	AF265488	AF291098
<i>Condylago_rodrigo</i>	N	AF265516	AF265460	AF262829
<i>Dilomilis_montana</i>	AF074150	AF266967	AY368404.1	<u>AF260147.1</u> / AF262915.1
<i>Dracula_chimaera</i>	AF518039	AF265489	AF265444	EF372358
<i>Dresslerella_elvallensis</i>	N	AF265521	AF265477	AF262901
<i>Dryadella_edwallii</i>	N	AF265505	AF265454	AF262824
<i>Lepanthes_woodburyana</i>	AY368362	AF265494	AF265472	AF262890
<i>Luerella_pelecaniceps</i>	N	AF265512	AF265450	AF262810
<i>Masdevallia_infra</i>	AF074189	N	N	AF262785.1
<i>Masdevallia_floribunda</i>	N	AF266966	AY368416	AY008475
<i>Myoxanthus_uncinatus</i>	N	AF265520	AF265478	AF262904
<i>Neocogniauxia_hexaptera</i>	AF518037	AY422444	AF263766	AY429385
<i>Octomeria_gracilis</i>	AY368365	AF265526	AY368421	AF262911
<i>Platystele_misera</i>	N	AF265504	AF265470	AF262823
<i>Pleurothallis_endotrachys</i>	AF074217	AF265508.1	AF265456	AF262859
<i>Porroglossum_amethystinum</i>	N	AF265491	AF265448	AF262804
<i>Restrepia</i> sp. (aff. <i>sanguinea</i>)	AF074225	N	N	N
<i>Restrepia_aristulifera</i>	AY370653	AF265522	AF265481	AF262907
<i>Scaphosepalum_gibberosum</i>	AF518041	AF265503	AF265458	AF262817
<i>Specklinia_digitale</i>	N	N	N	N
<i>Stelis_ciliaris</i>	N	N	N	AF262927.1
<i>Stelis_argentata</i>	N	AF265510	AF265464	AF262878
<i>Trichosalpinx_blaisdellii</i>	N	AF265498	AF265474	AF262887
<i>Trisetella_scobina</i>	N	AF265492	AF265449	AF262808
<i>Zootrophion_dayanum</i>	N	AF265499	AF265452	AF262895
Laeliinae				
<i>Acrorchis_roseola</i>	N	AY422389	AY396086	AY174761

<i>Alamania_punicea</i>	N	AY422452	AF263783	AF260177
<i>Amblostoma_armeniicum</i>	AF518058	AF266993	AF263748	AF260165
<i>Arpophyllum_giganteum</i>	AF074110	AF265527.1 / AF266975	EU214139.1 / AF263768	AF266742.
<i>Artorima_erubescens</i>	N	AY422449	EF065587	EF079374
<i>Barkeria_uniflora</i>	N	N	N	FJ238547.1
<i>Barkeria_whartonia</i>	N	AF266999	EF079287	AF260170
<i>Brassavola_cucullata</i>	N	AF267058	AF263819	AF260218
<i>Broughtonia_negrilensis</i>	AF518069.1	AY422396	AY396093	AY008569
<i>Cattleya_dowiana</i>	AF074122	AY422403	AF263638.1	AF260210.1
<i>Cattleya_dowiana</i>	AF074122	AY422403	AF263638	AF260210
<i>Caularthron_bilamellatum</i>	AF518059.1	AF267001.1	AF263780.1	AF260173.1
<i>Constantia_cipoensis</i>	N	AF267023	AF263796	AY008499 / AF260193.1
<i>Dilomilis_montana</i>	AF074150	AF266967	AY368404.1	AF262915.1 / AF260147.1
<i>Dimerandra_emarginata</i>	N	AY422446	AF263784	AF260179
<i>Dinema_polybulbon</i>	AF518061	AY422412	AF263769	AY429399
<i>Domingoa_nodosa</i>	N	AY422445	AY425794	AY008565
<i>Encyclia sp. (Prosthechea cochleata)</i>	AF074157	N	KF361643.1	AY008545.1
<i>Encyclia sp. (Prosthechea cochleata)</i>	AF074157	N	KF361643.1	AY008545.1
<i>Encyclia_oncidioides</i>	AF518062	AF267013	AF263788	AF260184
<i>Epidendrum_ciliare</i> Gene Bank	N		KM495135.1 / FJ238564.1	AY008503.1
<i>Epidendrum_campestre</i>	AF518060	AF267002	AF263781	AF260174
<i>Euchile_citrina</i>	JN589980.1	AY422409	AY396106	AY008501
<i>Hagsatera_brachycolumna</i>	N	AY422391	AY396088	AY008515

<i>Homalopetalum_pumilio</i>	N	AY422392	AY396089	AY429389
<i>Isabelia_virginalis</i>	N	AF266987	EF079320	EF079375
<i>Jacquiella_teretifolia</i>	N	AY422390	AY396087	AY008519
<i>Laelia_speciosa</i>	AF518070	AF267018	AF263792	AY008578
<i>Laeliopsis_domingensis</i>	N	AY422448	AF263791	AF260187
<i>Lanium_aviculum</i>	N	AF266998	AF263778	AF260169
<i>Leptotes_bicolor</i>	N	AF267014	AF263789	AF260185
<i>Meiracyllium_trinasutum</i>	AF074192	AF266973	EF079317 / AF263670.1	EF079372 / AF260152.1
<i>Microepidendrum_subulatifolium</i>	N	AY422440	AY396138	Y429417
<i>Myrmecophila_cf_tibicinis</i>	N	AF267035	AF263806	AF260203
<i>Nageliella_purpurea</i> (<i>Domingoa</i>)	N	AF266980	AF263771	AF266743
<i>Oestlundia_cyanocolumna</i>	N	AY422442	AY396139	AY429418
<i>Orleanesia_pleurostachys</i>	N	AY422451	AY425800	AY008525
<i>Prosthechea_abbreviata</i>	AF518063	AY422455	AY396125	AF260181
<i>Pseudolaelia_vellozicola</i>	AF518057	AF266994	AY121748	AY008489
<i>Psychilis_krugii</i>	N	AF266981	AF263772	AF260157
<i>Quisqueya_ekmanii</i>	N	AY422447	AY425796	AY008567
<i>Rhyncholaelia_glauca</i>	N	AY422404	AY396101	AY008584
<i>Scaphyglottis_crurigera</i> (<i>Hexadesmia</i>)	AY368360	AY422388	AY368411	AF260180
<i>Scaphyglottis_punctulata</i>	AF518064	AF267011	AF263786	AY174720
<i>Schomburgkia_splendida</i>	N	AY422408	AY396105	AY008573
<i>Sophronitis_coccinea</i>	AF518072	AF267033	AF263804	AY008646
<i>Tetramicra_elegans</i>	N	AY422397	AY396094	AY008566



Anther development in tribe Epidendreae: orchids with contrasting pollination syndromes

Benjamín Valencia-Nieto¹, Victoria Sosa² and Judith Márquez-Guzmán¹

¹Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

²Biología Evolutiva, Instituto de Ecología AC, Xalapa, Veracruz, México

ABSTRACT

Background. Epidendreae is one of the most diverse tribes among the orchids with remarkable variation in life form, floral morphology and pollination syndromes. Its circumscription was recently revised and subtribes Agrostophyllinae and Calypsoinae were transferred into this tribe. One of the principal floral characters utilized in classification of orchids is the incumbency or bending of the column. This study records and compares late stages of anther, column and lip development, and discusses anther characters in fifteen representative taxa of five of the six subtribes in Epidendreae with respect to classification and pollination biology.

Methods. A series of late floral stages were sampled and fixed for examination under scanning electron microscope.

Results. Anther incumbency or bending in this group varies from 90° to almost 180°. Incumbency in the late stages of development is reached in Blettiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae and Laeliinae whereas incumbency is reached early in its development in *Corallorhiza* and *Govenia* of Calypsoinae.

Discussion. Our observations indicate that the position of *Chysis* in subtribe Blettiinae needs revision based on differences in a number floral, and in particular of anther characters; and that *Coelia* only shares the early anther incumbency with Calypsoinae members, but not the rest of floral and anther characters. Anatomical characters such as crystals around the actinocytic stomata on the anther cap and sugar crystals in Laeliinae; lack of rostellum in Blettiinae; coalescent anther with the column, lack of trichomes and papillae on lip keels, and underdeveloped rostellum in *Chysis*; a mechanism by which the anther cap comes off (it is joined with the grooved lip by a claw) in *Isochilus* are all related to pollination syndromes and reproductive biology.

Subjects Developmental Biology, Evolutionary Studies, Plant Science, Taxonomy

Keywords *Chysis*, Incumbency, Epidendreae, Anther, Development, Orchidaceae, Pollination

INTRODUCTION

Epidendroideae is an orchid subfamily with more than 21,000 taxa, the largest in this group with approximately 76%–80% of the total species in the family (*Freudenstein & Chase, 2015; Givnish et al., 2015*). Within this subfamily, the tribe Epidendreae has been recently identified as an example of flowering plant radiations associated with epiphytism and with anther characters related to pollinator specificity (*Freudenstein & Chase, 2015*).

Submitted 18 August 2017
Accepted 29 January 2018
Published 27 February 2018

Corresponding author
Benjamín Valencia-Nieto,
valencianietobenjamin@yahoo.com

Academic editor
David Roberts

Additional Information and
Declarations can be found on
page 34

DOI 10.7717/peerj.4383

© Copyright
2018 Valencia-Nieto et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Valencia-Nieto et al. (2018), Anther development in tribe Epidendreae: orchids with contrasting pollination syndromes. *PeerJ* 6:e4383; DOI 10.7717/peerj.4383

Epidendreae includes one of the largest genera in the Neotropics, the genus *Epidendrum* L. (*Hágsater & Soto-Arenas, 2005; Pinheiro et al., 2009; Pinheiro & Cozzolino, 2013*) and also a diverse group composed of minute plants, the Pleurothallidinae (*Pridgeon, Solano & Chase, 2001; Blanco & Barboza, 2005; Damon & Roblero, 2007; Karremans et al., 2015; Karremans, 2016*). Plants in this tribe display remarkable variation in life form, floral morphology and pollination syndromes (*Van Der Pijl, Dodson & Flowers, 1969; Van den Berg, 2005; Jersáková, Johnson & Kindlmann, 2006; Freudenstein & Chase, 2015*): for instance the showy insect-pollinated laelias and cattleyas (*Halbinger & Soto-Arenas, 1997; Borba & Braga, 2003; Van den Berg et al., 2009*); the fragrant encyclias and prosthecheas, usually bee pollinated and exclusively pollinated by wasps respectively (*Higgins, 2003*); *Chysis* Lindl. with large fusiform bulbs and fleshy-waxy flowers probably pollinated by different bees (*Dressler, 1993; Soto-Arenas, 2005a; Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007; Soto-Arenas, 2008a*); *Isochilus* R.Br. with reed-like stems, inconspicuous bulb base and tiny, racemose tubular hummingbird-pollinated flowers (*Salazar, 2005; Soto-Arenas, 2008b; Siegel, 2011*); the terrestrial *Bletia* Ruiz & Pav. with deceit pollination (*Sosa, 2007; Salazar, Chavez-Rendon & Jiménez-Machorro, 2016*), the mostly autopollinated and mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (*Fowler, 2005; Sosa et al., 2016*), as well as the insect pollinated genera *Calypso* Salisb. and *Govenia* Lindl. (*Whigham & McWethy, 1980; Van Der Cingel, 2001; García-Cruz & Sosa, 2005; Freudenstein, 2005a; Freudenstein, 2005b; Freudenstein, 2005c; Freudenstein, 2005d; Pansarin, 2008; García-Cruz et al., 2009; Tuomi et al., 2015*). According to current classification of Orchidaceae derived from recent

phylogenies, tribe Epidendreae is composed of six subtribes (Agrostophyllinae, Calypsoinae, Bletiinae, Ponerinae, Pleurothallidinae, Laeliinae) (*Van den Berg et al., 2005; Freudenstein & Chase, 2015; Chase et al., 2015; Givnish et al., 2015*) (Table 1). With the recent addition of the Asian *Earina* and the North American *Calypso* the tribe is no longer exclusive of the Neotropics as was previously considered by *Van den Berg et al. (2005)* and *Van den Berg et al. (2000)*.

In orchids in general, including Epidendreae, the most noticeable element of the flower is the labellum, an element of the inner whorl of tepals, showing evident diversity of form and color (*Rudall & Bateman, 2004; Rudall, 2007*). Another striking element is the column, formed by the androecium and stigma/style with a single stamen with pollen grains variously aggregated into pollinia (*Dressler, 1981*). Commonly, the position of the labellum and column are determinant for forcing the pollinator to approach the flower in a certain way so that pollinaria are placed on the pollinator; pollinia may move or change orientation after removal by the pollinator in a way to successfully pollinate the next flower visited (*Van Der Pijl, Dodson & Flowers, 1969; Peter & Johnson, 2005*). The pollinia have reached remarkable complexity in some orchid groups, including Epidendreae (*Dressler, 1993*): they usually have several appendages such as the viscidium (part of the rostellum, the section of the median stigma or tissue separating the anther from the fertile stigma), the sticky pad, a structure that adheres to pollinators (*Dressler, 1993*) and in some species only a liquid on the rostellum, the viscarium allows pollinators to touch pollinaria (*Dressler & Salazar, 1991; Hágsater et al., 2005*). The caudicles are a slender, mealy or elastic extension of the pollinaria, or a mealy portion at one end of the pollinarium, produced within the

Table 1 Subtribes in Tribe Epidendreae, their distribution, diversity and pollination syndromes. The representative taxa studied here are indicated.

Subtribe	Calypsoinae		Bletiinae				
	Agrostophyllinae		Coeliinae	Chysinae	Ponerinae	Pleurothallidinae	Laeliinae
Distribution	Old World	Old and New World	New World	New World	New World	New World	New World
Included and observed in this study.	None	<i>Corallorhiza maculata</i> , <i>Govenia mutica</i>	<i>Coelia triptera</i>	<i>Bletia purpurea</i> , <i>Chysis bractescens</i> , <i>Chysis limminghei</i> , <i>Chysis laevis</i>	<i>Isochilus major</i> , <i>Ponera juncifolia</i>	<i>Stelis ciliaris</i> , <i>Specklinia digitale</i>	<i>Laelia speciosa</i> , <i>Oestlundia ligulata</i> , <i>Prosthechea squalida</i> , <i>Encyclia microbulbon</i>
Pollinia number	8 and 4	4	8	8	4 and 6	2, 4, 6 and 8	2, 4, 6, 8 and 12
Pollinators or pollination syndromes.	Halictid bees and autogamy (<i>Pridgeon et al., 2005</i>)	Bumblebees, hover flies, empididae flies, mosquitoes, bees, facultative autogamy (<i>Whigham & McWethy, 1980; Van Der Cingel, 2001; Freudenstein, 2005a; Freudenstein, 2005b; Freudenstein, 2005c; Freudenstein, 2005d; García-Cruz & Sosa, 2005; Pansarin, 2008; García-Cruz et al., 2009; Tuomi et al., 2015</i>)	Unknown	Various kinds of bees, bumblebees, autogamy (<i>Van Der Cingel, 2001; Fowler, 2005; Soto-Arenas, 2005a; Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007; Sosa, 2007; Sosa et al., 2016; Salazar, Chavez-Rendon & Jiménez-Machorro, 2016</i>)	Hummingbirds, small bees and wasps (<i>Salazar, 2005; Soto-Arenas, 2005a; Siegel, 2011</i>)	Diptera (<i>Pridgeon, Solano & Chase, 2001; Blanco & Barboza, 2005; Jersáková, Johnson & Kindlmann, 2006; Damon & Roblero, 2007; Karremans et al., 2015</i>)	Bees, wasps, birds, butterflies, moths, diptera (<i>Van Der Pijl, Dodson & Flowers, 1969; Dressler, 1993; Halbinger & Soto-Arenas, 1997; Borba & Braga, 2003; Higgins, 2003; Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007; Soto-Arenas, 2008a; Soto-Arenas, 2008b; Van den Berg et al., 2009</i>)

anther and by which the pollinia attach to the viscidium or to pollinators ([Dressler, 1981](#); [Dressler, 1993](#); [Chase et al., 2003](#)). Another important feature of the anther is the anther cap that covers the pollinarium, in most species, this cap drops off the pollinarium following its removal by a pollinator, but in a few species the anther cap embraces the pollinia, for some time before the anther cap drops off ([Dressler, 1981](#); [Peter & Johnson, 2005](#)). Based on phylogenetic research it is considered that the primitive condition of the anther is erect and parallel to the axis of the column as in most Orchidoideae; whereas most Epidendroideae have the derived condition, an erect anther in the early bud development, bending 90° to 120° by column elongation, so that it comes to rest, like a cap, on the apex of the column. The term incumbent is used for this condition ([Dressler, 1981](#); [Dressler, 1993](#); [Chase et al., 2003](#); [Freudenstein & Chase, 2015](#)) and is considered the most important defining character of the subfamily Epidendroideae ([Kurzweil, 1987](#); [Dressler, 1981](#); [Dressler, 1993](#); [Arditti, 1992](#); [Freudenstein, Harris & Rasmussen, 2002](#); [Freudenstein & Chase, 2015](#)).

Here we focus on recording and comparing the late stages in the ontogeny of the anther in representative species of tribe Epidendreae, considering five out of the six subtribes. The incumbent anther has been identified as the key synapomorphy for the subfamily Epidendroideae; however, there are two general ways of reaching the inflexion of the anther in this group, one way by the reorientation of growth in the early ontogenetic stages of the anther (called vandoid morphology), and the other, as the result of elongation of the column and the inflexion of the mature anther during the late stages of development ([Freudenstein, Harris & Rasmussen, 2002](#); [Freudenstein & Chase, 2015](#)). The degree of inflexion varies among species, and reversal has been identified in several bird-pollinated species ([Rasmussen, 1982](#); [Freudenstein, Harris & Rasmussen, 2002](#)). For instance, in *Coeliasia* it has been determined that it exhibits early anther inflexion, which is characteristic of the vandoid morphology; but it lacks superposed pollinia and pollinium stalks, both are also key characteristics of this syndrome ([Freudenstein & Chase, 2015](#); [Freudenstein, Yukawa & Luo, 2017](#)).

[Kurzweil \(1987\)](#) set the bases of the knowledge on column and anther development in this group: his work consisted basically of morphological descriptions, using scanning electron microscopy, of the early stages to anthesis of few species of different genera belonging to subfamily Epidendroideae; and based on differences on column and anther characters he reached taxonomic conclusions. Later [Freudenstein \(1994a\)](#), [Freudenstein \(1994b\)](#) and [Freudenstein, Harris & Rasmussen \(2002\)](#) focused on the incumbency of the anther in the Vandoid orchids, detailing the process by which this group of Epidendroideae orchids develops inflexion, characterizing the vandoid morphology. Recently, [Valencia-Nieto, Espinosa-Matias & Márquez-Guzmán \(2011\)](#) and [Valencia-Nieto, Sosa & Márquez-Guzmán \(2016\)](#) provided detailed descriptions of the late ontogeny of column and anther in representative taxa of subtribe Laeliinae, using this character to hypothesize the phylogenetic position of the controversial genus *Microepidendrum*. Moreover, [Freudenstein & Chase \(2015\)](#) analyzed a few anther characters using the most recent phylogenetic hypothesis to understand patterns of diversification, looking for correlations between changes in specific characters and species diversity focusing in the Vandoid morphology (superposed pollinia, early anther inflexion and cellular pollinium stalk). However, these

anther characters are not present among the most diverse Epidendreae subtribes, and certain flower characteristics have been identified as being related with pollinator specificity, thus creating an opportunity to conduct detailed studies of late anther morphology and analyze these characters.

This study records and compares late stages of anther development in fifteen representative taxa, belonging to five of the six subtribes in Epidendreae. The late ontogeny of the column is observed with emphasis on the lip, column and anther. These characters are discussed in light of classification and pollination syndrome.

MATERIALS AND METHODS

Field study permissions– Biological samples of flowers and buds were obtained from the living collection maintained by the Botanical Garden of the Instituto de Biología, UNAM and the botanical garden “Francisco Javier Clavijero” of the Instituto de Ecología, A.C. (INECOL). Access to the material was obtained under the terms of scientific permits MX-JB-008-DF and VER-FLO-228-09-09. The Mexican species of Orchidaceae are under special protection (Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-2010, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación 30 December 2010, Mexico, DF) and the botanical gardens hold individuals of every collected taxon. Data on vouchers is indicated in [Table S1](#).

Sampling –Representative taxa in the subtribes Calypsoinae, Bletinae, Ponerinae, Pleurothallidinae and Laeliinae of the Epidendreae tribe were selected ([Table 1](#), [Fig. 1](#)). Flowers and buds from the following species were studied: *Corallorhiza maculata* (Raf.) Greene (Calypsoinae, [Fig. 1A](#)), *Govenia alba* A. Rich. & Galeotti (Calypsoinae, [Fig. 1B](#)), *Coelia triptera* (Sm.) Mutel (Calypsoinae, [Fig. 1C](#)), *Bletia purpurea* (Lam.) DC. (Bletinae, [Fig. 1D](#)), *Chysis bractescens* Lindl. (Bletinae, [Fig. 1E](#)), *Chysis limminghei* Linden & Rchb.f. (Bletinae, [Fig. 1F](#)), *Chysis laevis* Lindl. (Bletinae, [Fig. 1G](#)), *Isochilus major* Cham. & Schltld. (Ponerinae, [Fig. 1H](#)), *Ponera juncifolia* Lindl. (Ponerinae, [Fig. 1I](#)), *Stelis ciliaris* Lindl. (Pleurothallidinae, [Fig. 1J](#)), *Specklinia digitale* (Luer) Pridgeon & M.W. Chase (Pleurothallidinae, [Fig. 1K](#)), *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (Laeliinae, [Fig. 1L](#)), *Oestlundialigulata* (La Llave & Lex.) Soto-Arenas (Laeliinae, [Fig. 1M](#)), *Prosthechea squalida* (Lex.) Soto Arenas & Salazar (Laeliinae, [Fig. 1N](#)) and *Encyclia microbulbon* Schltr. (Laeliinae, [Fig. 1](#)).

Fixation and processing of tissues–Three late floral developmental stages were selected: flowers in anthesis and/or large buds prior to anthesis located at the base of inflorescences; intermediate stages of buds not completely developed located in the middle of inflorescences; and early stages of small buds at the apex of inflorescences. When sufficient individuals were available, three plants were randomly chosen, but in some cases only one plant was available. All buds/flowers were fixed in FAA (formaldehyde, 95% ethanol, glacial acetic acid, distilled water 1 : 5 : 0.5 : 3.5, v/v).

Scanning electron microscope (SEM)–Characters were observed under the scanning electron microscope (SEM). Dissected samples were dehydrated in a graded ethanol series (30, 75, 80, 96, 100 and 100% v/v), before critical-point drying with a CPD-030 Bal-tec,

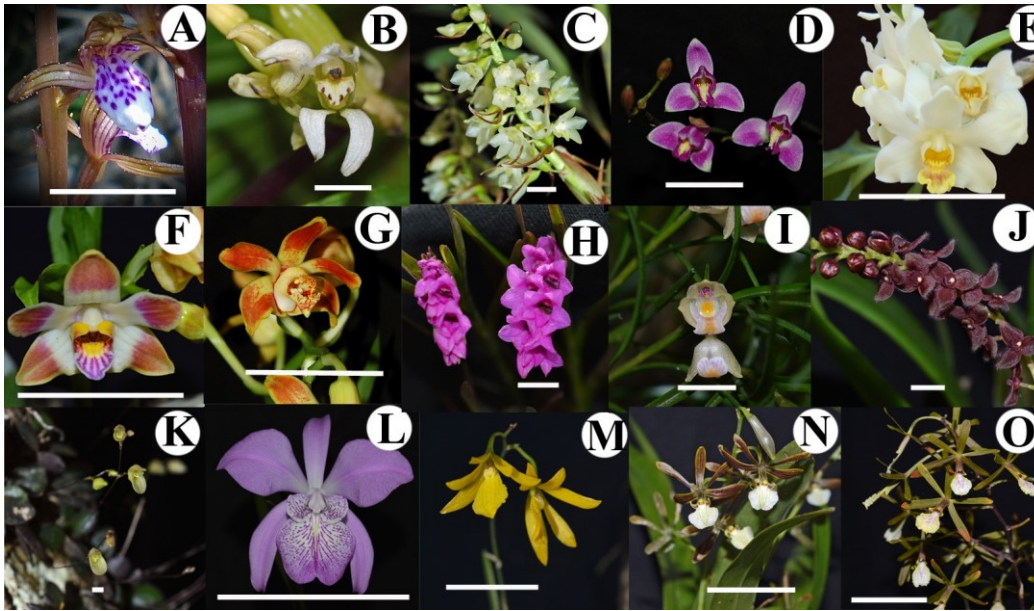


Figure 1 Studied species of Tribe Epidendreae. (A) *Corallorhiza maculata* (Calypsoinae). (B) *Govenia alba* (Calypsoinae). (C) *Coelia triptera* (Coeliinae). (D) *Bletia purpurea* (Bletiinae). (E) *Chysis bractescens* (Bletiinae). (F) *Chysis limminghei* (Bletiinae). (G) *Chysis laevis* (Bletiinae). (H) *Isochilus major* (Ponerinae). (I) *Ponerajuncifolia* (Ponerinae). (J) *Stelis ciliaris* (Pleurothallidinae). (K) *Specklinia digita le* (Pleurothallidinae). (L) *Laelia speciosa* (Laeliinae). (M) *Oestlundia liqulata* (Laeliinae). (N) *Prosthechea squalida* (Laeliinae). (O) *Encyclia microbulbon* (Laeliinae). Scale Bars: A = 1.5 cm. B = 1 cm. C = 1.2 cm. D = 5 cm. E = 9 cm. F = 5.5 cm. G = 6.5 cm. H = 1 cm. I = 5 mm. J = 4.5 mm. K = 3 mm. L = 14 cm. M = 1.4 cm. N = 2 cm. O = 3.5 cm.

Full-size  DOI: [10.7717/peerj.4383/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.4383/fig-1)

and sputter-coating with gold. Observations were performed with a SEM model JSM-5310LV; JEOL, Tokyo.

RESULTS

Table 2 summarizes the main anther, column and lip features for the studied taxa of five of the six subtribes in tribe Epidendreae.

Subtribe Calypsoinae: *Corallorhiza maculata*

Early late stages: Anther is inflected (early incumbency), about 90° to the axis of the column, epidermis is smooth without ornamentation. At its apex, one **caudicle** is in close contact with the apical part of the rostellum, which in this portion is composed of viscidium cells. The narrowed apex of the **column** is slightly bent over itself, the column widens toward the base, the auricle (a small protuberance) is present at the sides (Fig. 2A). **Anthesis:** Anther has grown, remaining sub-globose, operculate shaped and incumbent; it looks as if has experienced marked inflection, but this is the result of the pronounced bending over itself of the apical portion of the column (Figs. 2B–2C). From the middle to the apex, the **column** is pronouncedly bent over itself and it appears as if it were shorter in its length than in the previous developmental stage (Fig. 2C). The column widens

Table 2 Main features (anther, column and lip development characters) observed.

Late develop-ment charac-ters	Subtribes and the key taxa observed on Epidendreae														
	Calypsoinae			Bletiinae				Ponerinae		Pleurothallidinae			Laeliinae		
	<i>Corallo-rhiza maculata</i>	<i>Govenia mu-tica</i>	<i>Coelia triptera</i>	<i>Bletia pur-pura</i>	<i>Chysis brac-tescens</i>	<i>Chysis lim-minghei</i>	<i>Chysis laevis</i>	<i>Isochilus major</i>	<i>Ponera juncifo-lia</i>	<i>Stelis cil-iaris</i>	<i>Speckli-nia digi-tale</i>	<i>Laelia speciosa</i>	<i>Oestlundia ligulata</i>	<i>Prosthechea squalida</i>	<i>Encyclia microbulbon</i>
Column bend-ing (Fig. 2)	Begins straight ends every arched (apical part pronounced bent over it-self)	Begins straight ends arched (api-cal part pro-nounced bent over itself)	Always straight	Begins straight ends arched	Begins straight ends arched	Begins straight ends arched	Begins straight ends arched	Begins straight ends slightly arched	Begins straight ends slightly arched	Always straight	Begins straight ends slightly arched	Begins straight ends slightly arched	Always straight	Always straight	Always straight
Column wings (Fig. 2)	Absent	Present	Absent	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Present	Absent	Absent ^a	Absent	Absent
Incumbent an-ther (degree from the orig-inal position. Fig. 2)	170°	170°	90°	170°	170°	170°	170°	180°	90°	170°	170°	140°	40°	90°	180°
Early inflexing anther (Fig. 2)	Present	Present	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Rostellum (Fig. 3)	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Only ves-tigial and in some cases ab-sent	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present
Anther epider- mis ornamenta-tion (Fig. 4)	Smooth	Smooth	Smooth	Slightly striate	Conspicuously striate	Striate	Striate	Smooth	Smooth to slightly striate	Striate slightly corrugate	Densely striate	Striate	Slightly striate	Slightly striate	Conspicuously striate
Type of stom-ata in anther (Fig. 4)	Absent	Absent	Actino-cytic type	Actino-cytic type	Actino-cytic type	Actino-cytic type	Actino-cytic type	Actino-cytic type	Actino-cytic type	Absent	Absent	Actino-cy-tic type	Absent	Actinocytic typ	Semi-actino-cytic type
Stipe (Fig. 5)	Hamulus	Tegula	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Pollinia num-bers (Fig. 5)	4	4	8	8	8	8	8	4	4	2	2	8	4	4	4
Pollinia form (Fig. 5)	Equal	Equal	Equal	Equal	Une-qual	Une-qual	Unequal	Equal	Equal	Equal	Equal	Unequal	Equal	Equal	Equal
Number of cau-dicles in pairs (Fig. 5)	1	1 (irregular mass of cells)	2	2	1	1	Absent	1	2	Absent	1	2	Absent	2	2
Number of lip keels (Fig. 6)	2	5	0	3 cen-tral 4 accesso-ries	5 central	5 central	3 cen-tral 6-8 accesso-ries	0	0	0	2	3	1 central 6 ac-cessories	3 central	2 central
Lip tricho- mes or papillae (Fig. 6)	Absent	Papillae	Absent	Absent	Tricho-mes	Tricho-mes	Absent	Absent	Absent	Tricho-mes	Absent	-	Absent	Trichomes	Absent
Develop-ment of the column and the lip	Free lip	Free lip but, articulated by a column foot	Free lip but, at-tached to the base by a col-umn foot	Free lip	Free lip but, articulated by a column foot	Free lip but, artic-ulated by a column foot	Free lip but, artic-ulated by a column foot	Free lip but, artic-ulated by a column foot	The lip base at-tached by a column foot, rest free	Free lip	Free lip but, artic-ulated by a column foot	Free lip	Lip partially fused with the column (1/3 from the base)	Lip basally fused to the column	Lip basally connate to the column

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Late develop- ment charac- ters	Subtribes and the key taxa observed on Epidendreae														
	Calypsoinae			Bletiinae				Ponerinae		Pleurothallidinae			Laeliinae		
<i>Corallo-rhizamaculata</i>	<i>Govenia mu- tica</i>	<i>Coelia triptera</i>	<i>Bletia purpu- rea</i>	<i>Chysis brac- tescens</i>	<i>Chysis lim- minghei</i>	<i>Chysis laevis</i>	<i>Isochilus major</i>	<i>Ponera juncifo- lia</i>	<i>Stelis cil- iaris</i>	<i>Speckli- nia digi- tale</i>	<i>Laelia speciosa ligulata</i>	<i>Oestlundia</i>	<i>Prosthechea squalida</i>	<i>Encyclia microbulbon</i>	
Flower diameter (cm)	1.5	1	1.2	5	9	5.5	6.5	1	.5	.45	.3	14	1.4	2	3.5
lip length × wide(mm)	–	–	5–5.5 ×3.8–4.1	–	25–35 × 28–40	17 × 13	25 × 14	–	–	.9 × .7	1.5–2 ×0.6–1	40–70 × 35–50	3–4 × 2	10–14	–
Anther length × wide(mm)	–	–	1 × 1.3	–	3.3 × 3.3	3.3 × 3	2.5 × 2	–	–	.32 × .3	0.35–0.5 ×0.3–0.4	5–6	1.8 × 1.5	0.75 × 1.1	2 × 1.6
Column length × wide(mm)	–	–	1.9–2.1 ×2.3–2.8	–	15–18 × 8–9	9 × 4.2	15 × 7	–	–	.7 × .25	1.3–2 × 0.8	33–36 × 7–9	4–6 × 5.5	6–6.5 ×2.3–2.5	6–9.5 × 2.3
Ovary length × wide(mm)	–	–	6–9 ×4.5–5	–	15–25 × 5-	12–20 ×3–6	15 × 3.2	–	–	–	0.7–2 × 0.4	–	11–15	11–15 × .4–6	21–30 × 1.5

Notes.

^a*Soto-Arenas (2008c)* mentions the presence of procorrect wings in this species, however in our observations what he describes is interpreted as the apical part of the clinandrium.

towards its base, where the two auricles are located, these auricles are prominent, thick and extending along the sides, underneath where the column starts; the ovary has the samewidth (Figs. 2B–2C). We have not documented the rostellum development in this taxon, the Figs. 3A–3B contains *Coelia triptera* rostellum development as only representative of this subtribe. A well differentiated **anther cap** is absent; the cells of the epidermis of the anther are smooth to slightly striated (Fig. 4A). Edges and apex of **lip** are incurved; two lamellae (protuberances) are present at the base of the lip, these are longer than wide, forming a channel in the middle; between the borders where these two protuberances are in contact, in a close-up of the cells of this zone, the presence of abundant pores are observed as in the initial stages (Figs. 5A–5C). Below the apex of the anther, the **hamulus** protrudes in the center as a very conspicuous structure. Behind it, the rest of the rostellum is extending under the basal part of the anther (Fig. 6A). The cells of the hamulus in close-up are smooth, rounded, granulose (Fig. 6B). The apex of the **lip** and its edges are extended.

Subtribe Calypsoinae: *Govenia alba*

Early late stages: the incumbent **anther** is approximately 90° from the axis of the column (early incumbency), is unilobed and sub-quadrate shaped. Epidermal cells are smooth to slightly wrinkled. In the middle, below the apex of the anther, a prominent sub-oval viscidium is visible, connected by means of an acute stipe (tegula). The **column** is erect and about the same width along its entire length. Small wings begin to develop along its sides (Fig. 2D). We have not documented the rostellum development in this taxon, the Figs. 3A–3B contains *Coelia triptera* rostellum development as only representative of this subtribe. **Anthesis: Anther** is inflected approximately 170° to the axis of the column, and grown noticeably with an ovoid shape; in the middle part, it presents a very prominent keel made of uneven conspicuous cells (Figs. 2E–2F); the rest of the epidermis of the anther is made of smooth to slightly wrinkled cells (Figs. 2F and 4B). The **column** is of the same width along its length and pronouncedly bent over itself; on its sides, the broadly rounded, oblong wings are slightly unfolded (Fig. 2E). We have not documented the lip development in this taxon, the Figs. 5A–5C contains *Corallorhiza maculata* as only representative of this subtribe. In the middle of column, underneath the apex of the anther, a peltate viscidium is present, and a **tegula** composed of a strand of granulose cells visible (Fig. 6C).

Subtribe Calyosoinae: *Coelia triptera*

Early late stages: Anther is inflected approximately 35° to the axis of the column (early incumbency), bilobed, and the tip of the anther widens toward the apex; just below the anther apex, two small rounded protuberances are visible; the **anther cap** is not distinguishable from rest of the anther epidermis. The **column** is hexagonal (Fig. 2G). **In the intermediate late stage:** the **anther** is slightly more inflected, about 45° to the axis of the column, remains bilobed with a conspicuous apex, and the two small rounded protuberances are more developed. The cuticle of the epidermis of the anther is composed mainly of rounded, smooth cells, but the **anther cap** is still not distinguishable (Fig. 2H). At the base of the anther, the developing rostellum consists of a transverse structure

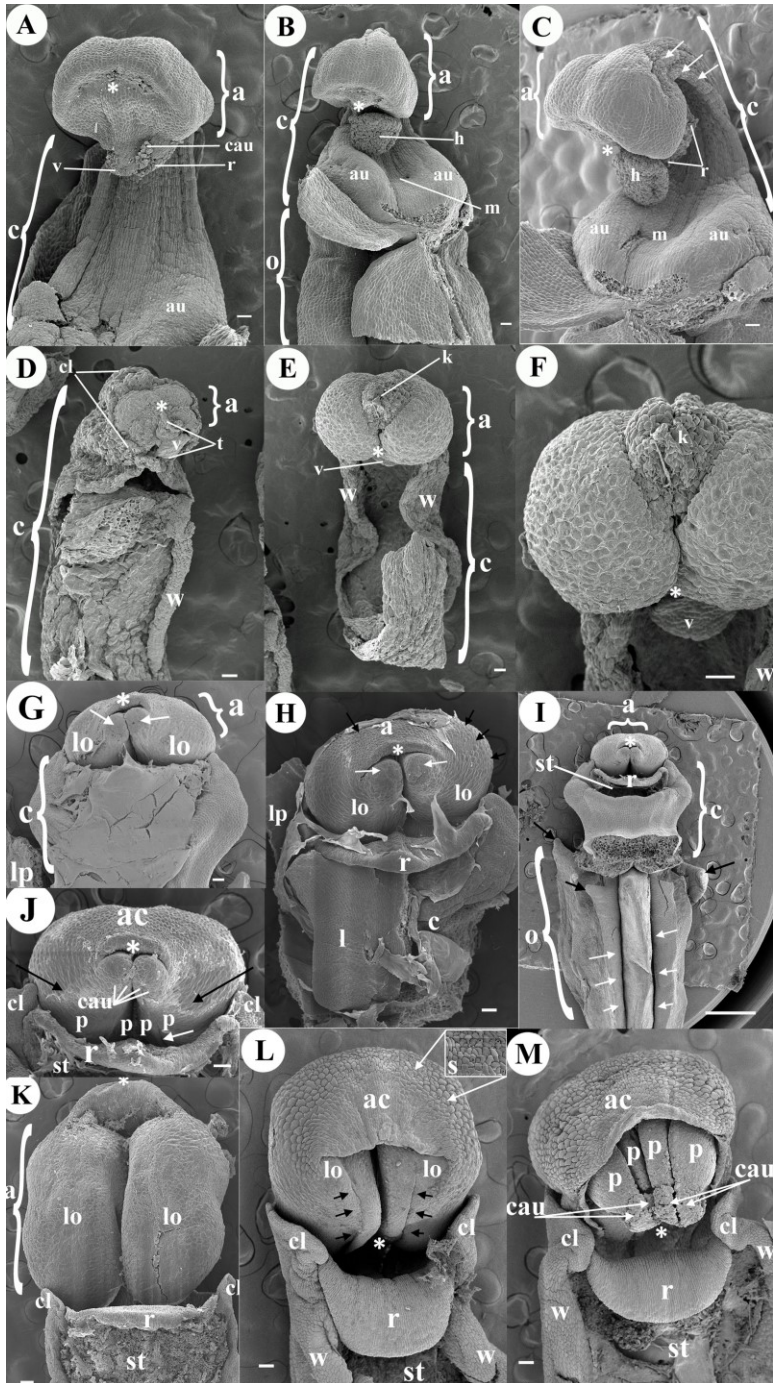


Figure 2 Development micrographs of anther. Late stages of development (column and anther) of *Corallorhiza maculata* (A, B, C). (A) Early incumbent anther. (B) Grown incumbent anther. (C) Lateral view bent over itself column and the incumbent anther. *Govenia alba* (D, E, F) (D) Early incumbent anther, column erect (same width throughout its length) and small developing wings. (E) Grown-up noticeably inflected anther. (F) Prominent keel in the middle of anther, just below the apical part of tegula (viscidium shield). *Coelia triptera* (G, H, I, J) (G) Early incumbent anther (H) Intermediate late stage incumbent anther. (continued on next page...)

Full-size

DOI: 10.7717/peerj.4383/fig-2

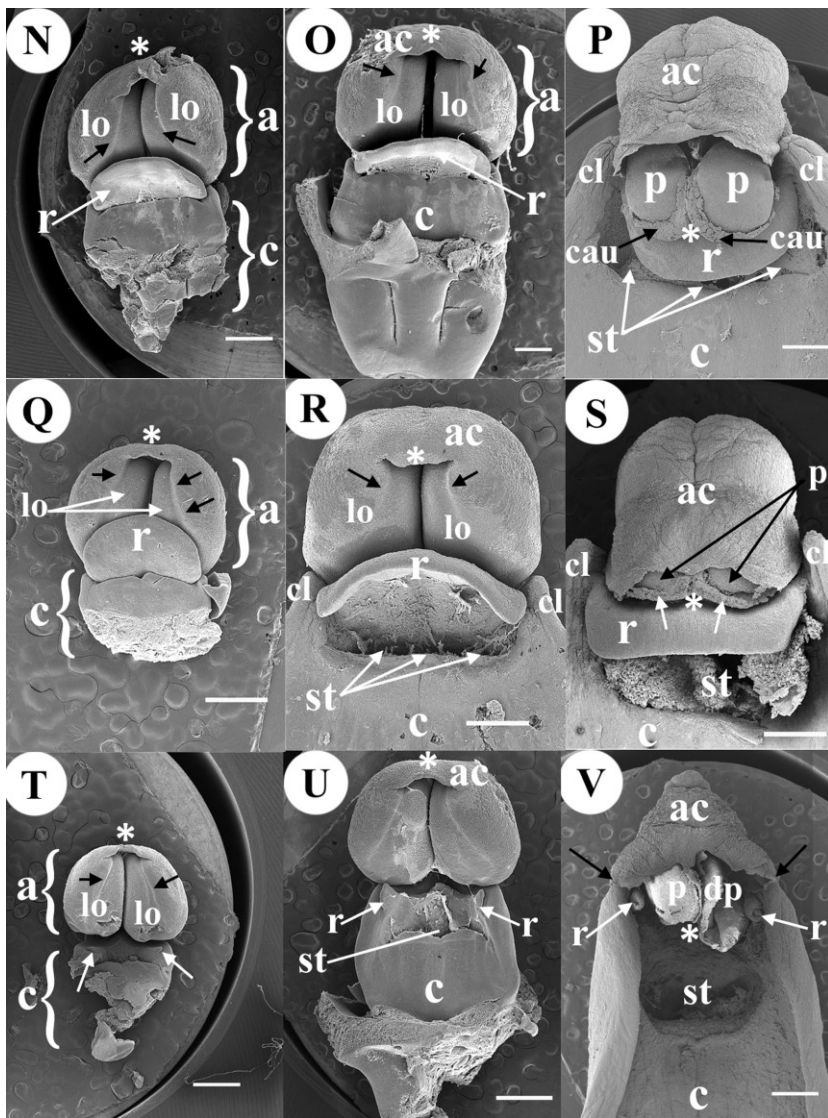


Figure 2 (...continued)

(I) Anther totally inflected, column hexagon-shaped, base joins the ovary which has pointed projections (black arrows) and with large grooves that cross longitudinally (white arrows). (J) Close-up of anther

at anthesis, black arrows point the limit between anther cap and each pollinium respectively (two pairs of granulose caudicles exposed at apex). *Bletia purpurea* (K, L, M); (K) Early erect anther, slightly sub

quadrate, bilobate with a trapezoid apex. (L) Intermediate late stage, anther inflected, the cucullate anther cap with actinocytic stomata embedded in its upper part (white arrows, close-up in the inset and Fig. 4B).

(M) Anthesis, anther inflected, anther cap fully developed, pollinia (four upper visible), caudicles in the apex, at sides column wings. *Chysis bractescens* (N, O, P) (N) Early anther, erect, round shaped, bilobate with longitudinal lines marked on its epidermal tissue (black arrows). (O) Intermediate late stage anther, more quadrate and slightly less erect (apex with some degree of inflection), anther cap visible. (P) Galeate anther totally inflected, cucullate anther cap. A pair of pollinia exposed, with two lamellar caudicles (one pair, black

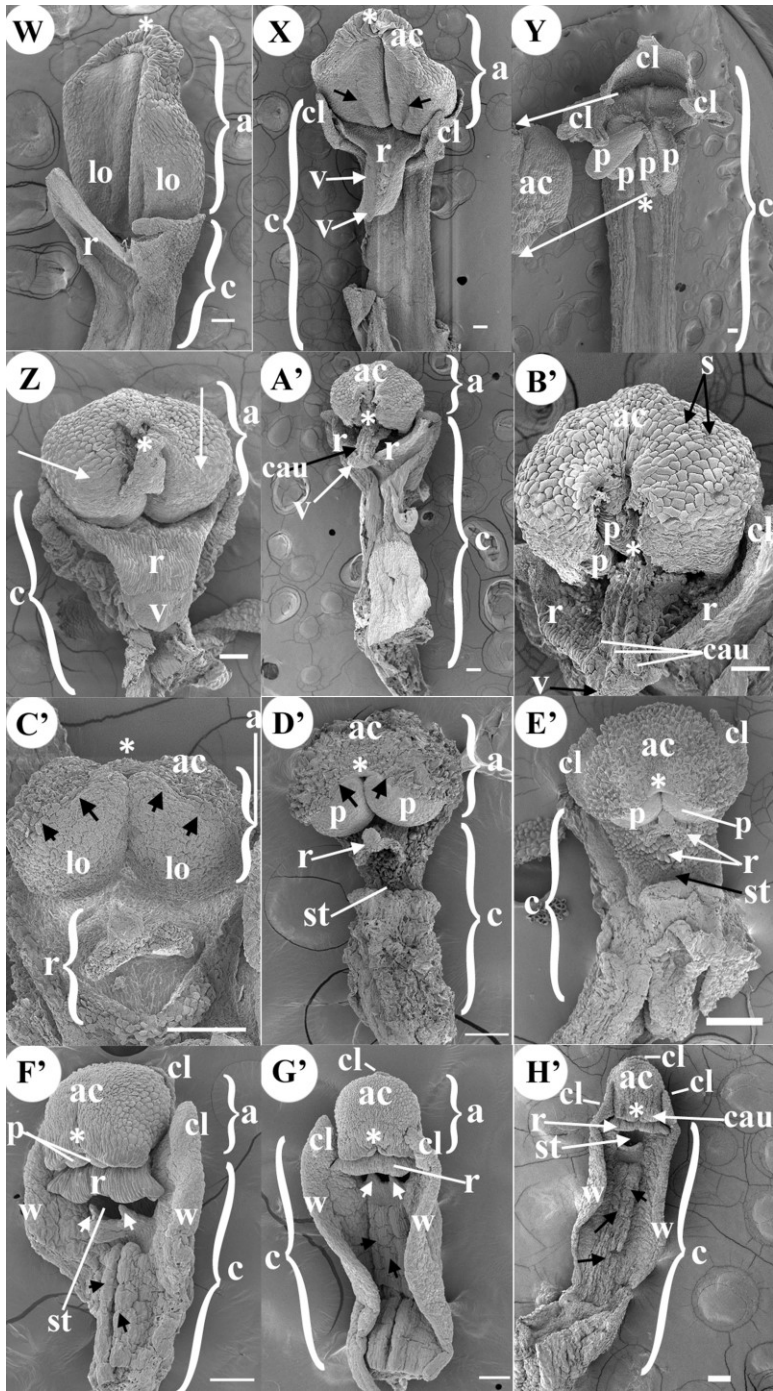


Figure 2 (...continued)

(R) Intermediate late stage anther, more quadrate, slightly less erect (apex with some degree of inflection), cucullate anther cap visible. (S) Galeate anther, totally inflected, cucullate anther cap. A pair of pollinia exposed with two laminar caudicles (one pair, white arrows). *Chysis laevis* (T, U, V); (T) Early erect anther, apex pronounced (trapezoid shaped), half round shaped, bilobate with longitudinal lines marked on its epidermal tissue (black arrows). Two very inconspicuous rostellum primordia (white arrows). (continued on next page...)



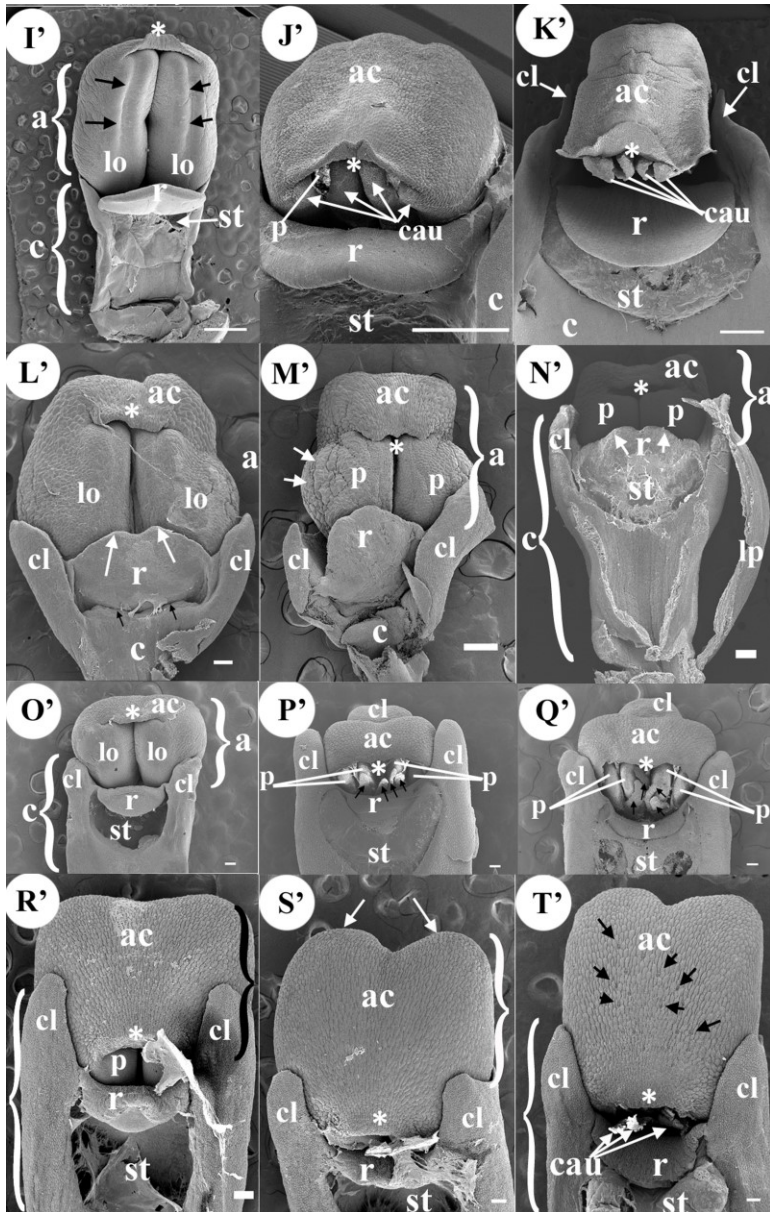


Figure 2 (...continued)

(U) Intermediate late stage anther, slightly less erect (apex with some degree of inflection), bilobate, anther cap visible. Rostellum appendages vestiges underdeveloped (white arrows). (V) Incumbent anther, the anther cap conical shaped (like a hood), coalescent (fused by the sides to the column), dehiscent pollinia, open, without caudicles. No rostellum developed, only two appendixes underdeveloped and rolled on themselves (white arrows). *Isophilus major* (W, X, Y); (W) Early erect anther, semi-rectangular vertical with a pointed apex, bilobulate. Column narrow and slender. (X) Intermediate late stage anther, semi rectangular shaped, pointed apex of conspicuous thickened cells, bilobulate, each locule with longitudinal division (black arrow). (Y) Four elliptical inflected pollinia. Anther cap was not observed in this stage because it was lost during dissection; the lone structure (anther cap) was placed and observed at the side of the column in the slide (white arrows).
[\(continued on next page...\)](#)

Figure 2 (... continued)

Ponera juncifolia (Z, A', B'); (Z) Early erect anther, rounded and bilobed, each lobule ovoid (white arrows). (A') Intermediate late stage anther with caudicles exposed. (B') Anther cap very conspicuous with actinocytic stomata embedded (black arrows). Two pollinia visible in each locule, four long caudicles exposed. *Stelis ciliaris* (C', D', E') (C') Early anther erect bilobed, each lobule ovoid with a small rounded apex, anther cap beginning its differentiation from the tissue of the rest of the anther, a clearly marked line delimits it (black arrows). (D') Intermediate late stage anther, bilobed, anther cap clearly marked (black arrows) below two ovoid pollinia in close contact to upper part of rostellum tip (bifid viscidium, white arrow). (E') Incumbent anther, anther cap with inverted heart shape, two pollinia exposed, in close contact to the tip of rostellum the bifid viscidium with abundant secretions. *Specklinia digitale* (F', G', H') (F') Inflected anther, cucullate, tip of two pollinia exposed. Column beneath with two teeth (white arrows). Below column narrows and canaliculated (black arrows). Column wings differentiated. (G') Anther slightly more inflected, column with two teeth (white arrows). (H') Inflected cucullate anther, two caudicles exposed, column is slim and long, canaliculated in the middle portion (black arrows), and with vertical wings. *Laelia speciosa* (I', J', K') (I') Erect anther, quadrate, bilobed, with a trapezoidal apex. Lobules with median longitudinal division each (black arrows). Column short and narrow. (J') Intermediate late stage inflected anther, anther cap sub-globose with round striated cells. Underneath four caudicles visible. (K') Inflected anther, the anther cap is oblong, with its apex folded up. Four large granulose caudicles are exposed in two pairs. *Oestlundia ligulata* (L', M', N') (L') Early erect anther, ovoid, bilobed, upper part by the apex a pleat of tissue is formed, early differentiation of the mid-part of the anther cap. (M') Intermediate late stage inflected anther, bilobed with anther cucullate. (N') Inflected anther, sub-cubic almost straight, two pollinia visible. *Prosthechea squalida* (O', P', Q'); (O') Early erect anther, oblong and bilobed. (P') Intermediate late stage inflected anther inflected the anther cap ellipsoid. Under anther cap four pollinia, two pairs of caudicles exposed (white arrows). (Q') Inflected anther, anther cap truncate obovate shaped. Under it four pollinia, with four large, granulose caudicles in two pairs. *Encyclia microbulbon* (R', S', T'). (R') Inflected anther quadrate with upper corners rounded, under anther cap two pollinia can be seen, (S') More inflected anther, sub-quadrate with upper part bilobed and corners rounded (white arrows). At the apex of anther cap tip of two pollinia exposed. (T') Inflected anther, obcordate semi-quadrate. Anther cap with abundant semi-actinocytic stomata (black arrows). Below anther cap, four pollinia are visible and two pairs of caudicles exposed. Scale Bars: A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L, M, W, X, Y, Z, A', B', C', D', E', F', G', H', L', M', N', O', P', Q', R', S' = 100 μ m. I, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, I', J', K' = 1 mm. Abbreviations: *, anther apex; a, anther; ac, anther cap; ap, appendage; au, auricle; c, column; cau, caudicle; cl, clinandrium; dp, dehiscent pollinia; h, hamulus; l, lip; lo, lobule; lp, lateral petal; m, mentum; o, ovary; p, pollinium; r, rostellum; s, stomata; st, stigma; t, tegula; v, viscidium; w, column wings. Photo Credit SEM Images: Silvia Espinosa Matías. Figure edition: Benjamín Valencia-Nieto.

with smooth rectangular cells, in the lower layer of this tissue numerous intercellular connections are observed between the walls (Figs. 2H and 3A). No conspicuous clinandrium is observed, the **column** is short. **Anthesis: Anther** is totally inflected; its apex is now located approximately 90° from its original position (the axis of the column. Figs. 2I, 2J). The **column** is hexagonal; at its base it joins to the ovary which has pointed projections; it is very wide, with large longitudinal grooves (Fig. 2I). The well-developed rostellum forms a morphological barrier to separate the fertile stigmatic surface, which is basal (similar to the aperture of a cavern. Figs. 2I, 2J and 3B). The **anther cap** is now clearly distinguishable, shows smooth cuticular rounded cells with few smooth actinocytic stomata with secretions (Fig. 4C). In the initial stages the **lip** is simple, arrowhead shaped without ornamentations or projections on the adaxial face, only with bulging sides like anticline convex folds, converging in the apex (Fig. 5D). By anthesis the **lip** has grown in length and conserves the attributes previously described; and in close-up its cells are rounded and smooth (Figs. 5E–5F). Beneath the anther cap, on the tip of each pollinium, are two pairs of round

caudicles with polyhedral cells (according to the previous description of *Salazar (1990)*; they are granulose. [Figs. 2J, 6D](#)).

Subtribe Bletiinae: *Bletia purpurea*

Early late stages: **Anther** begins its differentiation as an erect structure, it is subquadrate, bilobed, with trapezoidal apex distally. Below the base of the anther, the **column** shows two very small lateral appendages that correspond to initial clinandrium phases ([Fig. 2K](#)), on the middle, a transverse ridge of tissue is beginning its development, corresponding to the initial stages of the rostellum ([Fig. 3C](#)); below the proto-rostellum there is a semicircular area composed of granulose tissue, corresponding to the incipient surface of the stigmatic tissue ([Fig. 2K](#)). **In the intermediate late stage:** the **anther** is round (spherical in three-dimensional view); it is inflected, the apex is located approximately 160° from its original position, the cucullate **anther cap** is now visible, with rounded epidermal cells and abundant actinocytic stomata on its upper part; below the cells are less conspicuous, smaller and rectangular. On the underside of the anther cap, the two lobes show signs of a longitudinal division. At this stage, the **column** is more developed and broadened. The two lateral appendages observed at the column apex sides are now broadened, clearly forming the clinandrium; by the center, the transverse ridge of tissue forms a defined rostellum, now projected as a well-developed tongue shaped structure with rectangular epidermal cells. Underneath is the stigmatic surface, covered by the well-developed rostellum ([Fig. 2L](#)). **Anthesis:** the 170° inflected **anther** looks obtriangular, with rounded edges; a fully developed **anther cap** is composed of an epidermis with irregular striated cells, the actinocytic stomata are less visible but present in the same area of previous stage. ([Fig. 2M](#) and [4C](#)). Underneath the anther cap, fully developed pollinia are exposed, the four upper ones are visible and beneath them are located another four (as previously reported in the genus by *Sosa, 2002* and *Sosa, 2008*); the polyhedral cells developed on the apex of each pollinium are more rounded and thickened, forming the **caudicles** ([Figs. 2M](#) and [6E](#)). The anther is seated in the well-defined clinandrium, the rostellum has a semi-lunate shape, forming a shield separating the pollinarium from the fertile surface of the stigma located below ([Figs. 2M](#) and [3D](#)). The sides of the **column** are spreading, forming the column wings ([Fig. 2M](#)). At initial stages on the **lip**, three central keels can be observed extending longitudinally from the base to the apex ([Fig. 5G](#)). By anthesis, three central and few accessory keels can be observed extending longitudinally from the base to the apex. ([Fig. 5H](#)). The cells of the epidermis of the lip are striated ([Fig. 5I](#)).

Subtribe Bletiinae: *Chysis bractescens*, *Chysis limminghei* and *Chysis laevis*

Early late stages: the **anthers** of the three species begin their differentiation as erect structures, in *C. bractescens* and *C. limminghei* are round and in *C. laevis* more semi-circular or half round, all are bilobed, with each lobule presenting a longitudinal line marked on the epidermal tissue ([Figs. 2N, 2Q, 2T](#)); *C. laevis* shows a tissue in its apex (trapezoid shaped) and in the other two species the apex is not pronounced. At the base of the anther, towards the front, the column of *C. bractescens* and *C. limminghei*, respectively, form an early

developing rostellum, projecting conspicuously upward like a semi-lunate shape, covering about half of its length (Figs. 2N, 2Q and 3E, 3G). However, at the same stage of *C. laevis* only two very inconspicuous projections or rostellum primordia can be observed below the anther (Fig. 2T). No development can be seen of clinandrium appendices in any of the three species; nor stigmatic surface or receptive tissue. In the middle of the **lip** of *C. bractescens* and *C. limminghei* five keels are beginning to develop; some epidermal papillae cells (look bigger and rounded) begin to differentiate and protrude in the middle of each keel (Figs. 5J, 5M). In *C. laevis*, only three wide keels are developing, without different cells protruding on its epidermis (Fig. 5P).

In the intermediate late stage: the **anther** form on *C. bractescens* and *C. limminghei* is more quadrate, slightly less erect, its upper part above the two lobules now has a more defined anther cap (Figs. 2O, 2R). The rostellum is projecting towards the front in *C. bractescens* and *C. limminghei*, but in *C. laevis* the rostellum appendages remain underdeveloped and are only slightly more pointed (Fig. 2U). On *C. limminghei* and *C. laevis*, a transversal cleavage of the tissue has formed; some secretions can be seen in this area, that correspond to the future receptive stigmatic surface. The **column** apex of *C. bractescens* and *C. limminghei* has widened and two small, lateral clinandrium teeth are observed (Figs. 2O, 2R); similarly, the column is widened also in *C. laevis*, but clinandrium appendices or teeth are not present (Fig. 2U). **Anthesis:** the fully developed **anthers** of the three species are inflected, their apex is now located about 170° from its original position (Figs. 2P, 2S, 2V). In *C. bractescens* and *C. limminghei* is galeate shaped, in both, the cucullate **anther cap** (shaped like a helmet with mask) covers almost completely the pollinia, and its epidermal cells have irregular striated cuticle with few actinocytic stomata (Figs. 4E, 4F). Under the anther cap, in the apex of the anther a pair of pollinia is exposed, bearing two laminar **caudicles** composed of a membranaceous zone (as observed by *Soto-Arenas, 2008a* in fresh flowers. Figs. 6F, 6G). Below, the transverse rostellum forms a very conspicuous structure, like a rectangular shield, made up with epidermal cells of rectangular palisade shape (Figs. 2P, 2S and 3F, 3H). Underneath, the cleavage has widened and is covered with a thick layer of secretions. The **column** is very wide, laterally two teeth, one at each side of the column, are observed. Differently, in *C. laevis* the cover of the **anther** is conical, like a hood, coalescent apparently fused by the sides to the **column**; underneath, the pollinia are dehiscent, open, without caudicles (Figs. 2V and 6H); there is no rostellum developed, only two appendices, underdeveloped, rolled on themselves are seen at the sides of the column (Figs. 2V and 3I, 3J). In the middle part of that zone there is a large hollow with secretions on its surface, corresponding to the receptive area of the stigma. The column is elongated and not very wide. The five keels on the **lip** of *C. bractescens* and *C. limminghei* are fully developed, numerous simple trichomes and papillae are present along the middle part of each keel (Figs. 5K, 5L, 5N, 5O); distinctively, in *C. laevis* only three large keels are fully developed and several less conspicuous accessory keels have arisen, four on each side of the lip, and trichomes are not present (Figs. 5Q, 5R).

Subtribe Ponerinae: *Isochilus major*

Early late stages: the **anther** begins its differentiation erect, elongate, bilobed, semi-rectangular vertical, with a pointed apex composed of large conspicuous cells; at the base of

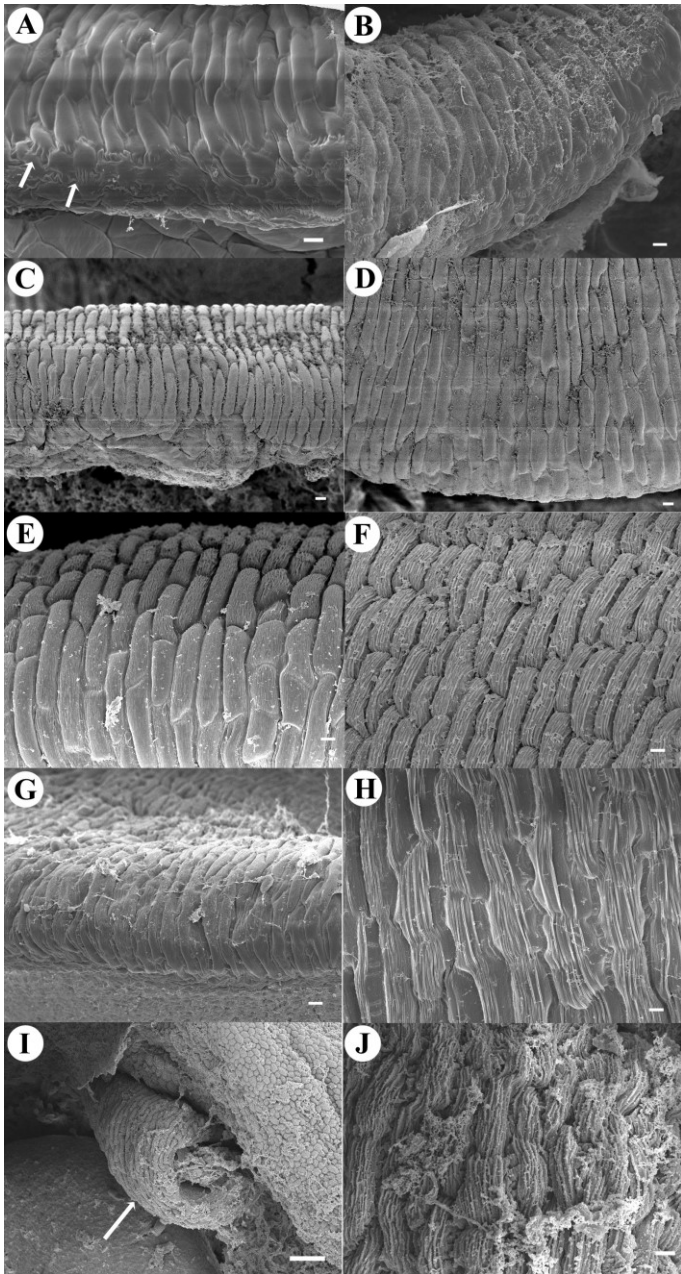


Figure 3 Rostellum micrographs. Rostellum development of *Coelia triptera* (A, B). (A) Early stages, smooth rectangular cells, numerous intercellular connections (white arrows). (B) Rostellum at anthesis, wide barrier of rectangular cells. *Bletia purpurea* (C, D). (C) Early incipient rostellum. (D) Rostellum at anthesis (half-moon shape structure) of rectangular epidermal cells. *Chysis limminghei* (E, F). (E) Tip of early-rostellum with rectangular epidermal cells with striate cuticle. (F) Rostellum shield-like made up with rectangular epidermal cells arranged in palisade. *Chysis bractescens* (G, H). (G) Tip of projecting

early-rostellum with rectangular epidermal cells. (H) Rostellum shield-like (rectangular epidermal cells in palisade). *Chysis laevis* (I, J). (continued on next page...)



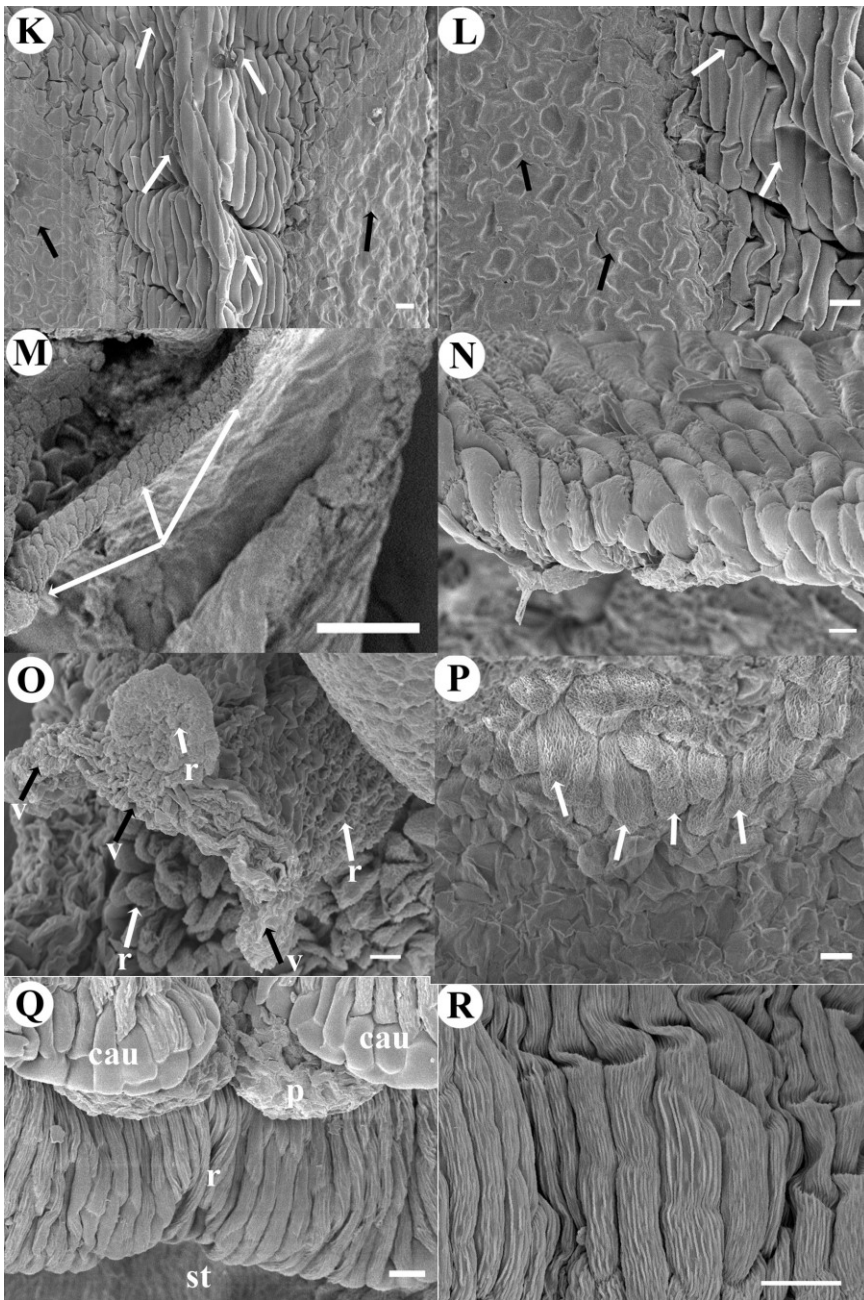


Figure 3 (...continued)

(I) Close-up of one of two appendixes of underdeveloped rostellum rolled on itself (white arrow). (J) Underdeveloped rostellum made up with striated rectangular epidermal cells arranged in palisade. *Isochilus major* (K, L). (K) Triangular rostellum with two cellular types: elongated cells (white arrows), and the glandular cellular type (black arrows) (L) Close-up of two cellular types of rostellum, the viscidium (black arrows). *Ponera juncifolia* (M, N). (M) Right side of v-shaped shield rostellum (white arrows) (N) Closer view of the border of rostellum with fibrous cells. *Stelis ciliaris* (O, P). (continued onnext page...)

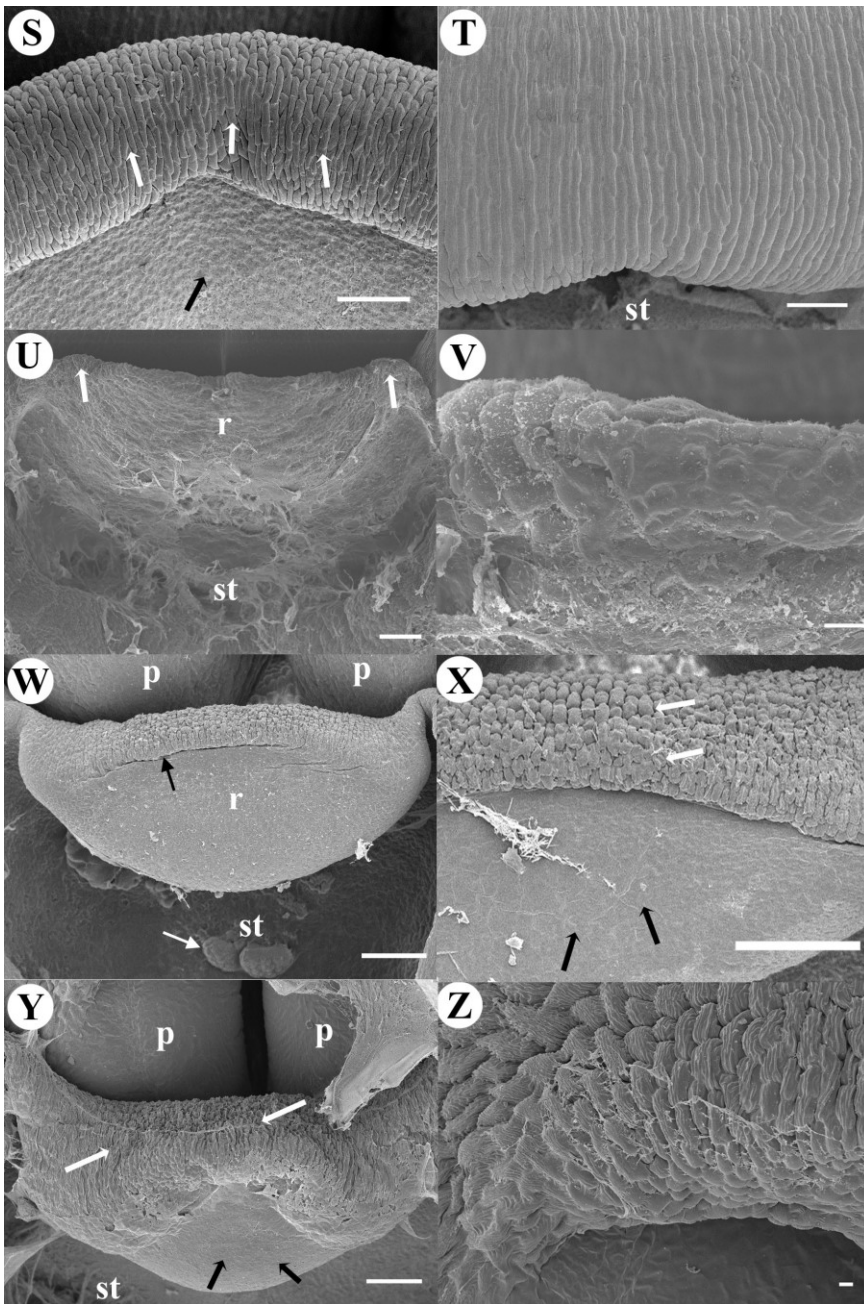


Figure 3 (...continued)

(O) Tip of upper part of rostellum, the viscidium is bifid with very fibrous cells, in the middle the

tissue is covered with a dense secretions (black arrows) (P) Rostellum with big round fibrous cells (white arrows). *Specklinia digitale* (Q, R). (Q) Rostellum with large longitudinal striated cells. (R) Close-up of rostellum. *Laelia speciosa* (S, T), (S) Tip of early rostellum with semi-rectangular cells (white arrows), theabaxial side with smooth irregular cells (black arrow). (T) Close-up of rostellum at anthesis. *Oestlundia ligulata* (U, V); (U) Transverse half-moon shaped rostellum. (V) Rostellum tip. *Prosthechea squalida* (W, X). (continued on next page...)

Figure 3 (... continued)

(W) Early ellipsoid rostellum, border with thickened cells (black arrow) two small bulges of stigma (white arrow).

(X) Close-up of the superior part of rostellum (white arrows), lower part with smooth cells (black arrows).

Encyclia microbulbon (Y, Z) (Y) Early pointy tongue-shaped rostellum with longitudinal elongated striated cells at the tip of rostellum. Scale Bars: A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L, N, O, P, Q, R, S, T, Z = 10 μm . I, M, U, V, W, X, Y = 100 μm . Abbreviations: cau, caudicle; p, pollinium; r, rostellum; st, stigma; v, viscidium.

Photo Credit SEM Images: Silvia Espinosa Matías. Figure edition: Benjamín Valencia-Nieto.

the anther at the front the early developing rostellum is deltoid, projecting conspicuously upward. The **column** is narrow and slender (Fig. 2W). **In the intermediate late stage:** the **anther** has inflected around 45° from its original position, continues semi-rectangular shaped, bilobed, with pointed apex of conspicuous large cells; each lobule has now a line in the middle part (an indication of its undergoing a longitudinal division, Fig. 2X); observations of the **anther cap** epidermis reveals the presence of actinocytic stomata embedded in the smooth epidermal cells (Fig. 4G). On the middle part, in front of the base of the anther, the acute rostellum is now projecting towards the front, it is composed of two cellular types: one, made of longitudinal elongated cells; and at the two sides of the central part, the other cellular type corresponds to glandular tissue made of rounded cells and copious secretions throughout its diameter, which corresponds to the viscidium (Figs. 3K, 3L). At each side of the column, prominent lateral teeth are observed forming the clinandrium. The **column** is very narrow, elongated (Fig. 2X). **Anthesis:** The **anther** is completely inflected around 180° from its original position, has four elliptical pollinia exposed: the **anther cap** was not observed (because it was lost when dissections were made). Clinandrium is three-toothed, two are lateral teeth and one prominent central tooth. The **column** continues narrow and more elongated (Fig. 2Y). The **lip** is long and narrow, at its base is flat channeled, near the median part its very folded over, forming a slender channel extending to the entrance formed by the acute apex, two different cellular types are present on these zones of the epidermis (Figs. 5S–5U).

Subtribe Ponerinae: *Ponera juncifolia*

Early late stages: The **anther** initiates erect, rounded and bilobed, each lobule is ovoid (Fig. 2Z); the cuticle of the epidermis cells of the **anther cap** is almost smooth, with actinocytic stomata embedded along the upper part (Fig. 4H). At the base of the anther, the obtriangular rostellum is projected to the front, and two cellular types are distinguishable on it: those extending from the base to the middle part of the inverted triangle which are slender longitudinal elongated cells; in the apex, the other cellular type is composed of glandular tissue with rounded cells with copious secretions throughout its diameter (as described above in *I. major*) which corresponds to the viscidium (Figs. 2Z, and 6I). Basally, the **column** has a “v” form without visible clinandrium. The **lip** is tri-lobed, without keels or ornamentations; the mid-lobe tip is very folded over upon itself (Fig. 5V). **Anthesis:** the **anther** has inflected about 90° from its original position; the **anther cap** is very conspicuous, with an epidermis of some large smooth cells, and other slightly striated cells and actinocytic stomata embedded (Figs. 2A^f, 2B^f and 4H). In the median zone by the apex, where the anther cap is not obstructing view, two pollinia are visible in each lobule, and four long

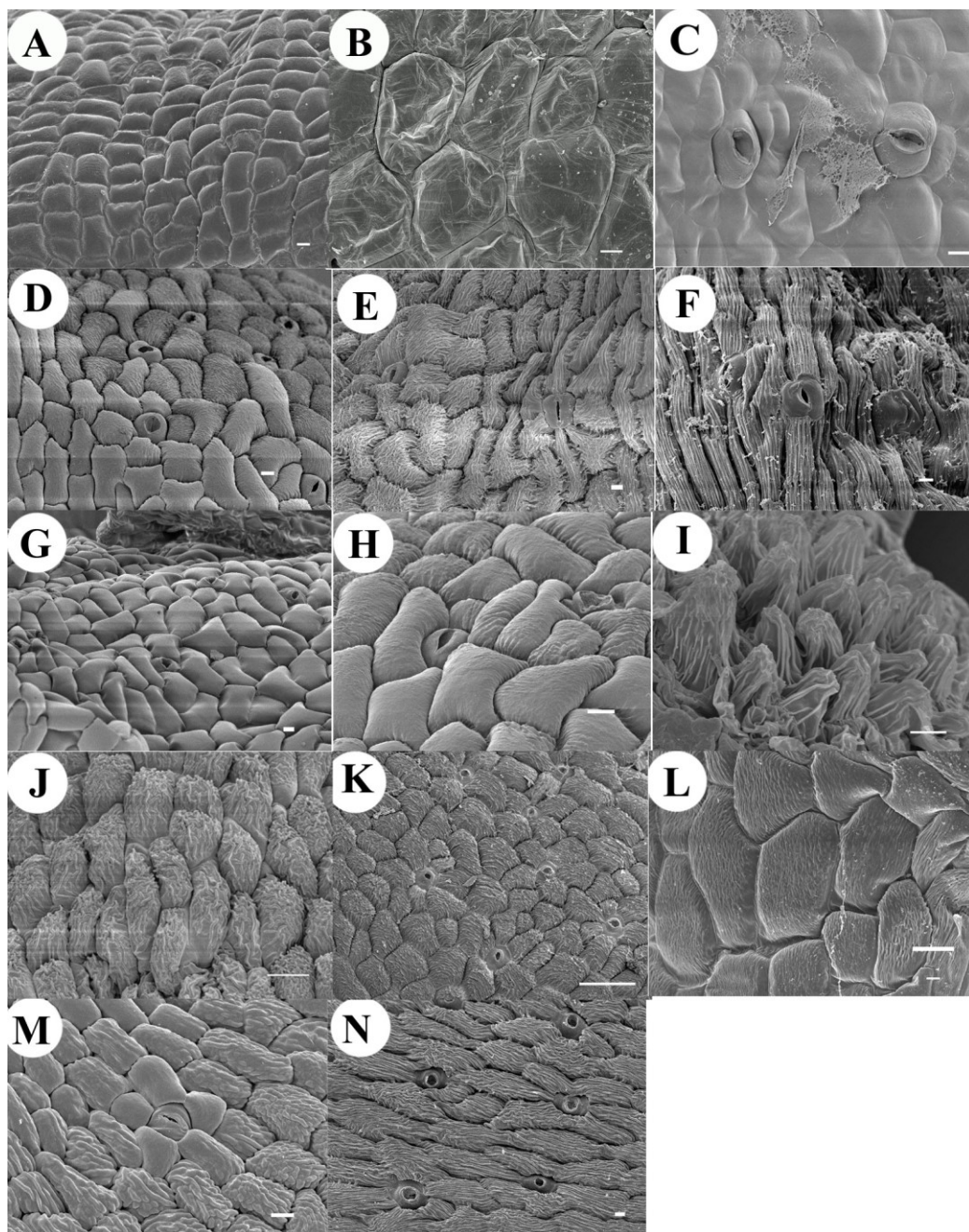


Figure 4 Micrographs of anther cap cuticle. Cuticle of the epidermis of the anther cap of (A) *Coral-lorhiza maculata* with smooth cells without stomata. (B) *Govenia alba* with smooth to slightly wrinkled cells without stomata. (C) *Coelia triptera* with smooth cells showing actinocytic stomata and secretions.

(D) *Bletia purpurea* with slightly striated cells, note the actinocytic stomata. (E) *Chysis limminghei* with conspicuous striated cells and actinocytic stomata. (F) *Chysis bractescens* with longitudinal striated cells and actinocytic stomata. (G) *Isochilus major* with smooth cells and actinocytic stomata. (H) *Ponera junci-folia* with smooth to slightly striated cells and actinocytic stomata. (continued on next page...)

Figure 4 (... continued)

(I) *Stelis ciliaris* with striated slightly corrugated cells without stomata. (J) *Specklinia digitale* with densely striated cells without stomata. (K) *Laelia speciose* with round striated cells and actinocytic stomata. (L) *Oestlundia liqulata* with round slightly striated cells without stomata. (M) *Prosthechea squalida* with slightly cells and semi-actinocytic stomata. Scale Bars: A–J, L–N = 10 μm , K = 100 μm . Photo Credit SEM Images: Silvia Espinosa Matias. Figure edition: Benjamín Valencia-Nieto.

caudicles are exposed, the tip of those **caudicles** are closely in contact with the viscidium (Figs. 2B^f and 6I). The rest of the rostellum forms a well-defined v-shaped shield with the border made of rectangular cells (Figs. 2B^f and 3M–3N). Two small protuberances are seen at the sides of the column forming a small clinandrium (Fig. 2B^f). Tri-lobed **lip** tips are extended and the cells of its middle part are sub-quadrate shaped and striated (Figs. 5X–5Y).

Subtribe Pleurothallidinae: *Stelis ciliaris*

Early late stages: The **anther** is erect, bilobed, each lobule is ovoid with a small rounded apex, the upper part of the **anther cap** is beginning its differentiation, its tissue is clearly marked with a line that delimits the two epidermal cell types (Fig. 2C^f). The epidermis of the anther cap appears corrugated. At the base of the anther, hanging at the center in the mid part on the tip of rostellum, the viscidium forms one bifid appendage, the cells in the tip of this appendage are very conspicuous, and the cells of its exterior border are very conspicuously rounded. Below this area there is a hollowed structure (Fig. 2C^f). The cordate **lip** is not well extended and has crenulated margins, its epidermis has very conspicuous rounded cells, at the base in the center has a hollow structure known as glenion (Fig. 5Y). **In the intermediate late stage:** the **anther** is inflected about 90° from the original position, bilobed, and the **anther cap** has big striated epidermal cells (Figs. 2D^f and 4I). Below the anther cap, two ovoid pollinia are in close contact with the upper part of the bifid rostellum tip (the viscidium), the rest of rostellum has large round cells (Fig. 2D^f). **Anthesis:** the **anther** has inflected approximately 170° from its original position, the **anther cap** has an inverted heart shape (Fig. 2E^f), its epidermis with conspicuous, collapsed, corrugated cells (Fig. 4I). In the center by the apex of the anther, below the anther cap two pollinia are exposed, these two pollinia are in close contact to the upper rostellum and on its tip, whose sides are covered with a dense secretion corresponding to the viscidium (Figs. 3O and 6J). The rest of rostellum has big round cells (Figs. 2E^f and 3P). The stigma is prominent, standing out as the ends of an olive wreath at each side of the anther (Fig. 2E^f). **Lip** is extended cordate, in the base the glenion is full of trichomes embedded with secretions (Figs. 5Z, 5A^f).

Subtribe Pleurothallidinae: *Specklinia digitale*

Only the intermediate late stages and anthesis stage of this species were observed. **In the intermediate late stage:** the apex of the **anther** is 145° from the axis of the column, its form is cucullate, the tips of two pollinia are exposed. Beneath, the crenulated rostellum forms a transverse morphological barrier made of large longitudinal cells. Just under it, there is a hole, the **column** beneath this entrance has two teeth. Below, the column narrows and at center is canaliculate and the clinandrium is a small lobe behind the anther. The column

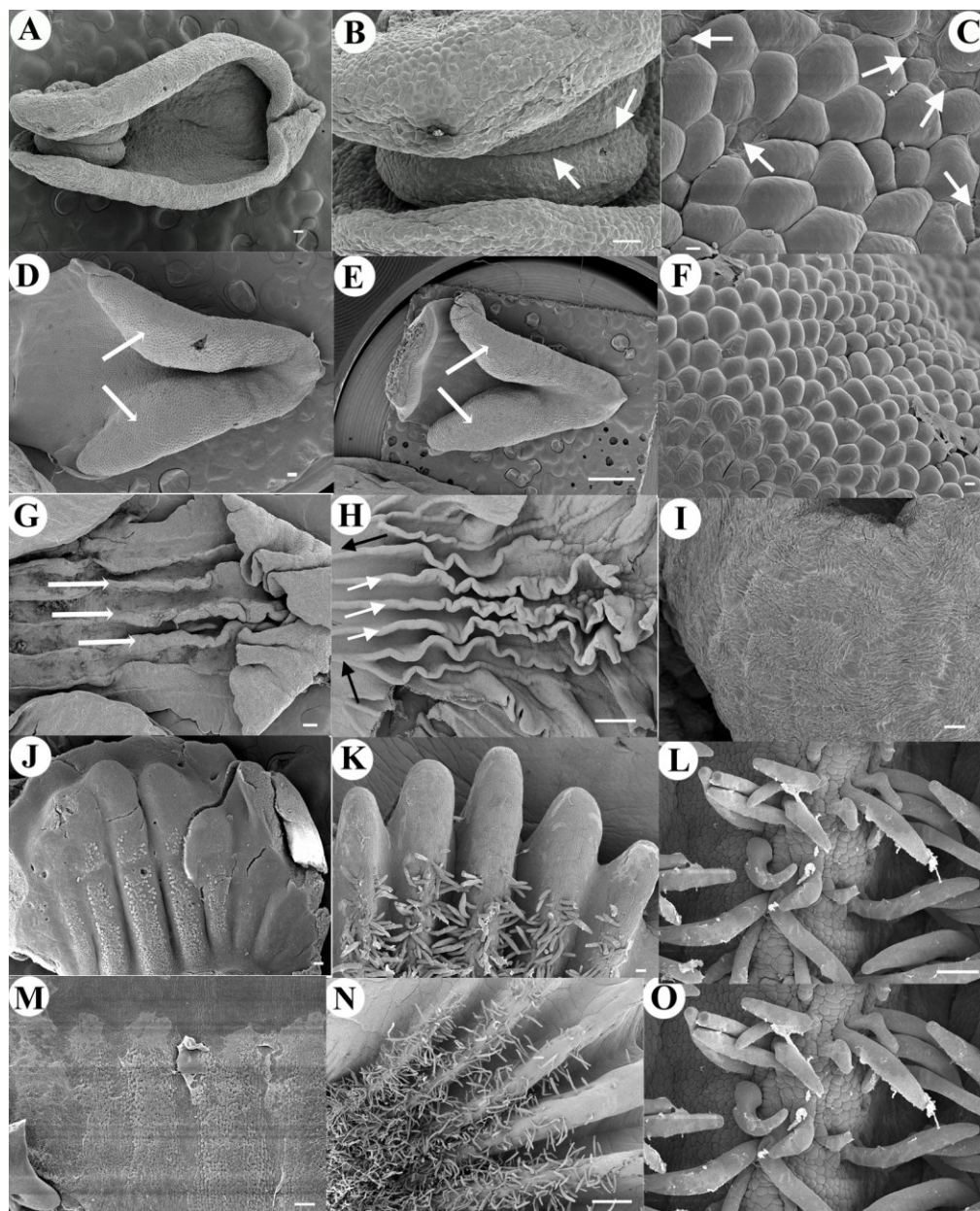


Figure 5 Early and anthesis stages of lip development. *Corallorhiza maculata* (A, B, C). (A) Lip. (B) Protuberances of lip forming a channel in the middle. (C) Close-up of the cells of the protuberances, presence of abundant pores. *Coelia triptera* (D, E, F). (D) Early lip development with two bulges (white arrows). (E) Lip at anthesis arrowhead shaped bulging sides (white arrows). (F) Smooth rounded single epidermis cells. *Bletia purpurea* (G, H, I). (G) Early stage lip (three central keels white arrows). (H) Anthesis lip (three central keels with white arrows and 3–4 lateral accessory keels developed with black arrows). (I) Epidermis cells. *Chysis limminghei* (J, K, L). (J) Early lip development, five central keels with large papillae epidermal cells protruding. (K) Lip at anthesis, five keels with abundant simple trichomes. (L) Close-up of trichomes. *Chysis bractescens* (M, N, O). (M) Early lip development, five central keels with large papillae epidermal cells protruding. (continued on next page...)

Full-size

DOI: 10.7717/peerj.4383/fig-5

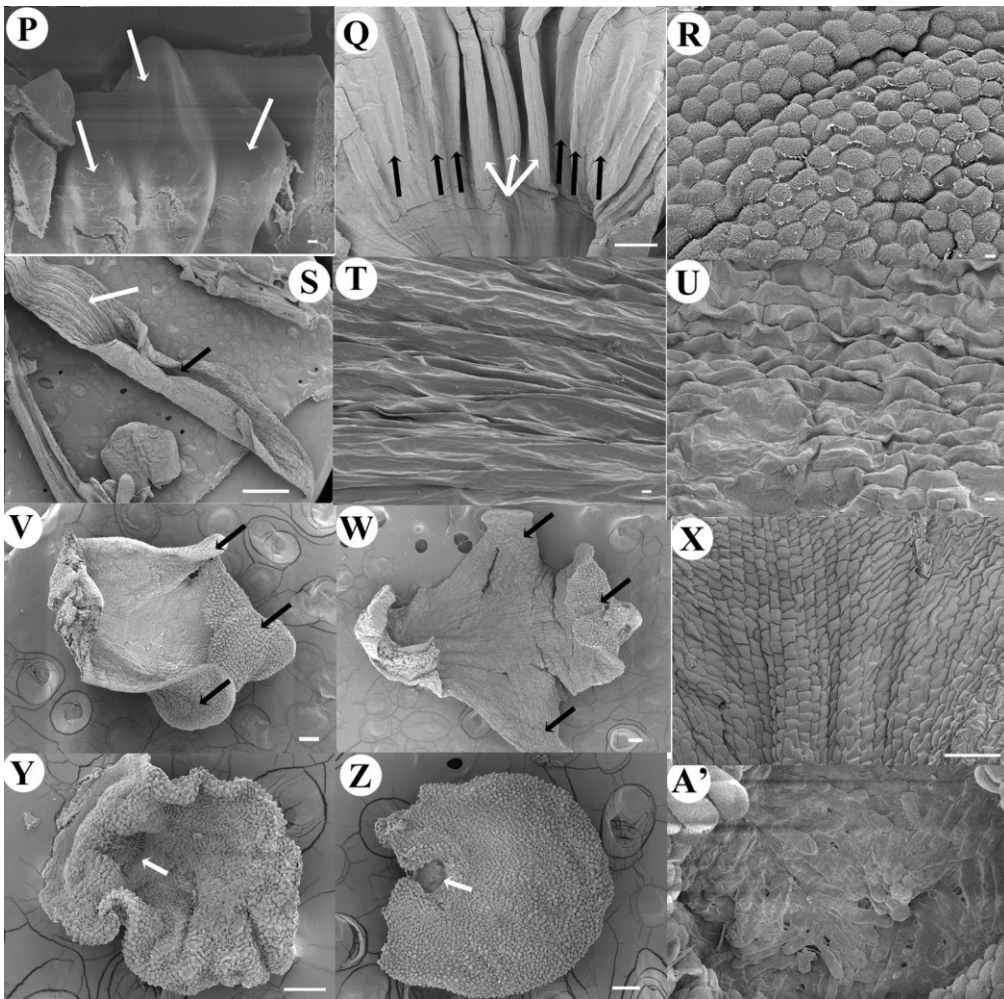


Figure 5 (...continued)

(N) Lip at anthesis, five keels with abundant large simple trichomes. (O) Close-up of trichomes. *Chysislaevis* (P, Q, R). (P) Early lip development with three central keels prominent (white arrows). (Q) Base of the lip at anthesis, three central keels (white arrows), five accessory keels at each side of the lip (black arrows). (R) Close-up of epidermal cells of the keels. *Isochilus major* (S, T, U). (S) Lip at anthesis, flat channeled (white arrow), forming a slender channel (black arrow). (T) Close-up of epidermal cells

of the flat part of lip. (U) Close-up of epidermis cells of the conduplicate part and lip apex. *Ponera juncifolia* (V, W, X). (V) Early lip development, tri-lobed (black arrows). (W) Lip at anthesis, mid-lobe apex slightly wrapped (black arrows). (X) Epidermis cells. *Stelis ciliaris* (Y, Z, A'). (Y) Early lip, at base hollow in the middle (white arrow). (Z) Lip at anthesis, hollow at base (white arrow) with trichomes. (A') Close-up of hollow with trichomes. *Specklinia digitale* (B', C', D'). (B') Early lip, two simple thickened keels (white arrow), a channel formed between them (black arrows). (C') Lip at anthesis with two simple thickened keels (white arrows) and channel between (black arrows). (D') Cells on the keels. *Oestlundia ligulata* (E', F', G'). (E') Early lip with three central keels (white arrows), two accessory keels at each side (black arrows). (F') Lip at anthesis unguiculate to the base (black arrow), central keels highly verrucose (white arrows). (G') Central highly verrucose keel (white arrow) besides accessory keels black arrows).



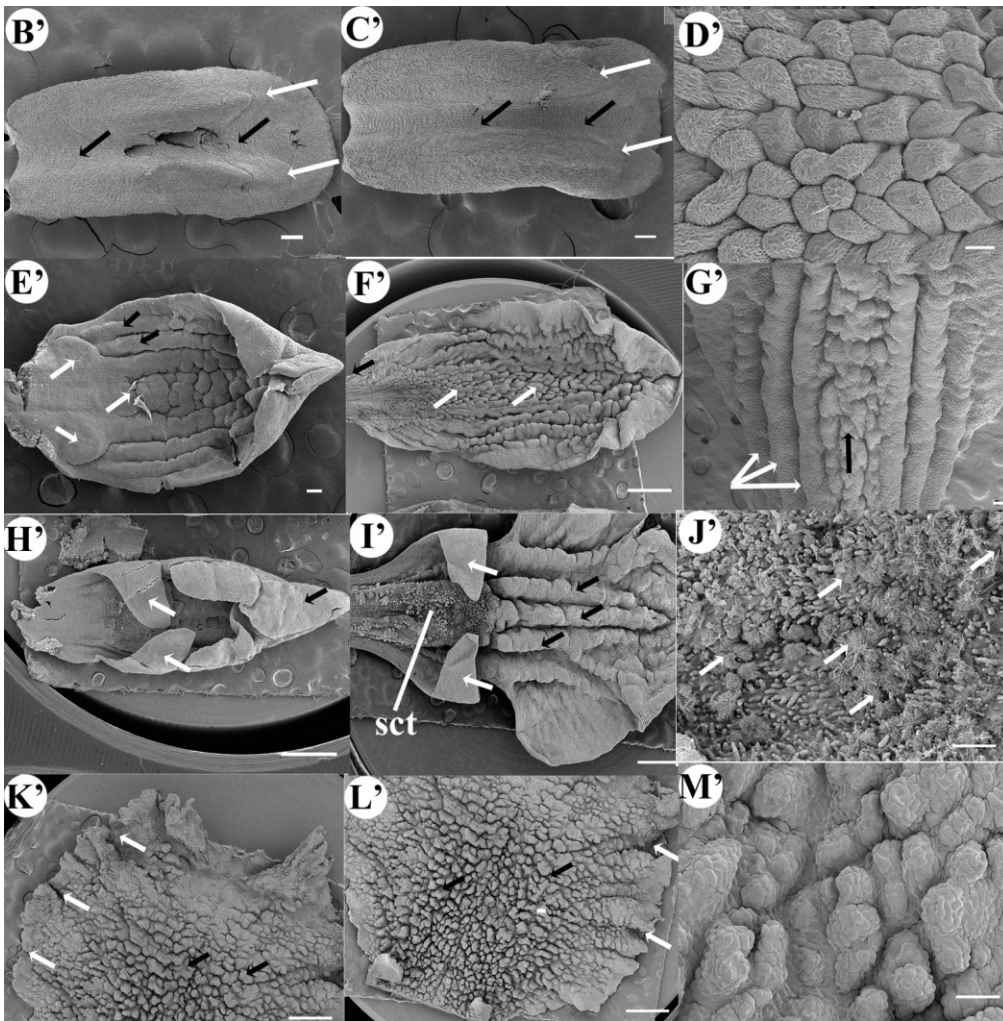


Figure 5 (...continued)

(I^f) Unguiculate lip at the base, tri-lobed, the lateral lobes incurved (white arrows), the central portion is composed of abundant glandular trichomes. From the center to the tip of the mid-lobe, three large central verrucose keels (black arrows) and two or more lateral keels are present. (J^f) Central portion with abundant glandular trichomes secreting large amounts of sugar crystals (white arrows). *Encyclia microbulbon* (K^f. L^f. M^f). (K^f–L^f) Mid-lobe lip, circular-ovate with crenulated margins (white arrows), the center the surface is cells. Scale Bars: C, F, I, R, T, U, A^f = 10 μm, A, B, D, G, J, K, L, M, O, P, V, W, X, Y, Z, B^f, C^f, D^f, E^f, G^f, J^f, M^f = 100 μm. E, H, N, Q, S, F^f, H^f, I^f, K^f, L^f = 1 mm. Photo Credit SEM Images: Silvia Espinosa Matías. Figure edition: Benjamín Valencia-Nieto.

Full-size  DOI: [10.7717/peerj.4383/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.4383/fig-5)

wings are differentiated on the top and their tips are like teeth at each side (Fig. 2F^f). In subsequent stage the anther is slightly more inflected than in the previous stage (near 155°). Rostellum is narrower and not crenulated anymore, forming a transverse morphological barrier made of large longitudinal cells. Just under it, there is a depression where the stigma is located; the column beneath this entrance has two teeth. Below, the column elongates, narrows and is canaliculate. The column wings are slightly more differentiated

and widespread (Fig. 2G^r). The **lip** is simple, narrow, ligulate, slightly arched with two simple thickened keels, extending from the base nearly to the apex (Fig. 5B^r). **Anthesis**: The **anther** is cucullate (Fig. 2H^r), two pollinia with the **caudicles** exposed, the cells on its tips are large and smooth, claw shaped (Fig. 6K). The anther apex is 170° from the axis of the column. In this stage, the epidermis of the **anther cap** has densely striated cells (Fig. 4J). Beneath, the ventral rostellum is forming a transverse morphological barrier made of large longitudinal cells. Just under it there is a hollow with the stigma (Figs. 3Q, 3R). The **column** is slender and long, canaliculate in the middle portion, and with vertical wings; the clinandrium is extended at the sides and along the border of the anther (Fig. 2H^r). The **lip** is simple, ligulate, slightly arched, with two simple thickened keels with slightly striated round cells, extending from the base nearly to the apex (Fig. 5C^r, Fig. 5D^r).

Subtribe Laeliinae: *Laelia speciosa*

Early late stages: the **anther** is erect, quadrate, bilobed, with a trapezoid apex. The lobes show signs of undergoing a longitudinal division (a line in the middle part of each lobe is observed). Below, a transverse ridge of tissue forms a defined rostellum projecting upwardly as a well-developed structure with rectangular epidermal cells (Figs. 2I^r and 3S). Underneath there is an area composed of different tissue corresponding to the incipient surface of the stigmatic region. The **column** is short and narrow, almost the same size as the anther length (Fig. 2I^r). **In the intermediate late stage**: the **anther** has grown massively, is inflected, its apex is now located approximately 80° from its original position; the **anther cap** is sub-globose, with round striated cells. Beneath the apex of the anther cap are visible four **caudicles**. At the base of the anther, a transverse rostellum projects apically. Underneath is a big conspicuous depression where the future stigmatic surface will develop (Fig. 2J^r). **Anthesis**: the **anther** has inflected more, its apex is now located approximately 140° from its original position, and the **anther cap** is oblong, with its apex folded up. The upper part of anther cap has the epidermis with striated cells and abundant actinocytic stomata (Figs. 2K^r and 4K). Beneath the apex of the anther cap, there are four large granulate **caudicles** in two pairs (Fig. 6L). Below the base of the anther, the large semi-circular rostellum, with slightly striated large longitudinal cells (Fig. 3T) forms a shield that acts as a morphological barrier isolating the fertile stigmatic surface underneath it. The stigma surface is covered with abundant secretions. The **column** is broad, narrowing towards the anther, and the clinandrium margins are toothed (Fig. 2K^r).

Subtribe Laeliinae: *Oestlundia ligulata*

Early late stages: the **anther** is erect, ovoid, and bilobed; by the apex a pleat of tissue is formed, corresponding with the early differentiation of the mid-part of the **anther cap**. The rest of the epidermis of the anther cap is not distinguishable from the anther epidermis (Fig. 2L^r). At the base of the anther, in front of it, the rostellum projects upward, two crests are present in its superior border near the apex. Below the rostellum, a transversal slit is formed along the **column**. The column has two median lateral projections (like teeth) at its sides forming the clinandrium (Fig. 2L^r). The **lip** is ornate, two rounded bulges are found at the base, extending along toward the tip forming two central keels; two accessory keels are

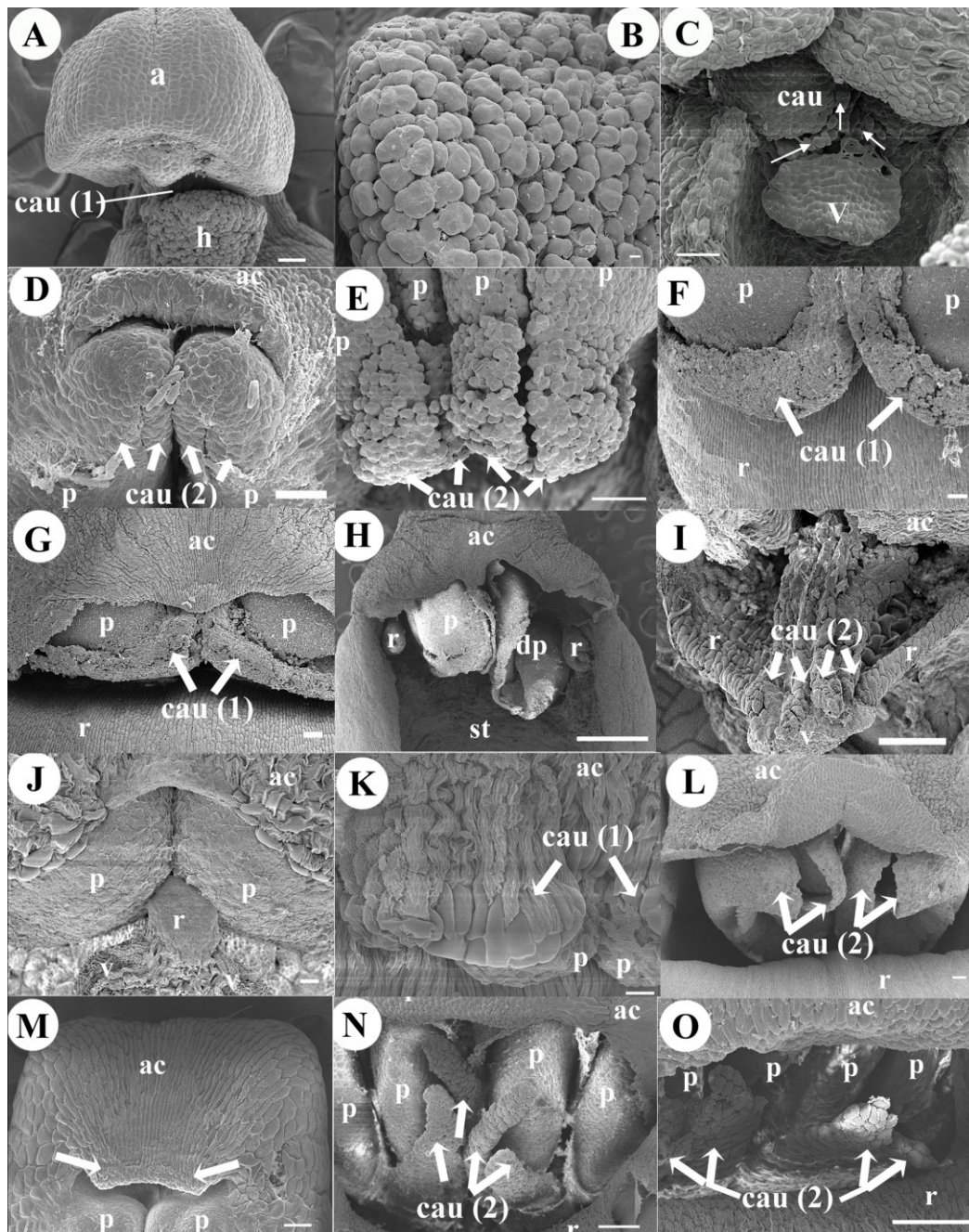


Figure 6 Micrographs of pollinia and caudicles. Pollinia and caudicles of (A) *Corallorhiza maculata* one caudicle connected to hamulus. (B) *Corallorhiza maculata* smooth, very rounded, granulate cells of the hamulus. (C) *Govenia alba* tegula composed by a strand of granulate cells with viscidium resembling a lit-tle shield, connected to the apex of the pollinia (one pair). (D) *Coelia triptera*, two pollinia and two pairs of caudicles with polyhedral cells. (E) *Bletia purpurea*, four upper pollinia and two pairs of caudicles with polyhedral cells. (continued on next page...)



Figure 6 (... continued)

(F) *Chysis bractescens*, two pollinia and one pair of linear caudicles with membranaceous cells. (G) *Chysis limminghei*, two pollinia and one pair of linear caudicles with membranaceous cells. (H) *Chysis laevis*, two pollinia, one pollinium without caudicles and another dehiscent pollinium. (I) *Ponera juncifolia*, note two pairs of caudicles, pollinia covered with anther cap. (J) *Stelis ciliaris*, two pollinia and central bifid tip of rostellum. (K) *Specklinia digitale*, two pollinia and one pair of rectangular smooth caudicles. (L) *Laelia speciosa* with four large granulose caudicles exposed in two pairs. (M) *Oestlundia ligulata*, two pollinia and pleat of tissue in the anex (white arrows) of the anther cap. (N) *Prosthechea squalida* four pollinia and two pairs of caudicles. (O) E, F, G, I, M, N, L = 100 μm . B, J, K = 10 μm . H = 1 mm. Abbreviations: ac, anther cap; cau, caudicle (irregular mass of cells); cau (1), one pair of caudicles; cau (2), two pair of caudicles; h, hamulus; p, pollinium; r, rostellum; st, stigma; v, viscidium. Photo Credit SEM Images: Silvia Espinosa Matías. Figure edition: Benjamín Valencia-Nieto.

present, on each side, the tip of the lip is folded upon itself (Fig. 5E^f). **In the intermediate late stage:** the **anther** continues erect and bilobed, its upper part is differentiated clearly forming the **anther cap**, which now can be seen cucullate, beneath the two lobules has its external sides very rounded, with marked wrinkles along its epidermis (Fig. 2M^f). **Anthesis:** the now sub-cubic **anther** continues almost straight (bent less than 40° from its original position. Fig. 2N^f); the **anther cap** has round, slightly striated cells at the apex (Fig. 4L), and the border possesses rounded cells. Only two pollinia are visible (Fig. 6M). Beneath, in the middle, the rostellum is narrower and has two crests by the center near its border (Figs. 2N^f and 3U, 3V), the tissue under it has an abundant secretion of unknown nature; the ventral stigma is slightly cordate, with lateral lobes prominent to the margins (Fig. 3U). Two lateral teeth form the clinandrium. Towards the base the **column** narrows (Fig. 2N^f). The oblong **lip** is elongated and deeply ornamented, its base is unguiculate; the central keel is highly verrucose, flanked by three lateral keels on each side, extending along its length (Figs. 5F^f, 5G^f).

Subtribe Laeliinae: *Prosthechea squalida*

Early late stages: The erect **anther** is oblong and bilobed, each lobule is ovoid, and no differentiation can be observed on the epidermis of the upper area of the anther (that will develop into the **anther cap** Fig. 2O^f); in a close-up, small actinocytic stomata are observed and are embedded within the striated epidermis (Fig. 4M); below the apex there is a pleat of tissue (Fig. 2O^f). In the middle an ellipsoid rostellum is seen forming a barrier, underneath the **column** is depressed, in the deeper part, two small bulges of tissue are present (Fig. 3W), their surface is densely hairy, covered with secretion of unknown nature. At each side of the column a small lateral tooth is forming the clinandrium (Fig. 2O^f). The **lip** is tri-lobed, the tip of large mid-lobe is incurved, with the apical margins wrapped around each other, and the lateral lobes are incurved. Near the base, below those lateral lobes abundant papillae are observed (Fig. 5H^f). **In the intermediate late stage:** the **anther** has inflected nearly 90° from its original position, in the middle, the ellipsoid **anther cap** is well differentiated; under the anther cap four pollinia are present, underneath two pairs of **caudicles** are exposed (Fig. 2P^f); above the anther a conspicuous mid-tooth of the clinandrium is seen and at its sides, it is flanked by two lateral teeth. Below the base of the anther, a transverse rostellum is present, under which there is a cordate stigma (Fig. 2P^f). **Anthesis:** behind

the **anther**, a prominent mid-tooth of the clinandrium is present and it is flanked by the two lateral teeth of the clinandrium (Fig. 2Q^f). The **anther cap** is truncate with obovate shape. Under the anther cap, four pollinia are present, with four large granulose **caudicles** exposed in two pairs (Fig. 6N). Below the base of the anther, a transverse, brick shaped rostellum is present (Figs. 2Q^f and 3X). Below the rostellum, the stigma with abundant stigmatic fluids is observed. The **lip** is unguiculate and tri-lobed. The lateral lobes are small and acute, incurved; beneath those, the central portion is composed of abundant glandular trichomes, secreting large amounts of sugar crystals (Figs. 5I^f–5J^f). From the center to the tip of the mid-lobe, three large, central, verrucose keels, and two or more lateral keels are present (Fig. 5I^f).

Subtribe Laeliinae: *Encyclia microbulbon*

In the intermediate late stage: the **anther** is quadrate, with the upper corners rounded. The anther apex is inflected about 135° from the axis of the column, under the **anther cap** two pollinia can be seen; at the anther sides, there are two triangular clinandrium teeth (Fig. 2R^f). The middle part the rostellum is acute, the adaxial surface has longitudinal elongated cells, in the abaxial side the rostellum is smooth (Fig. 3Y). Below, in the mid part of the **column** a depression with secretions is present (Fig. 2R^f). In a subsequent stage, the **anther** is more inflected to approximately 160° from the axis of the column, sub-quadrate, with its upper part bi-lobed and the corners rounded. At the apex of the **anther cap** the tip of two pollinia are exposed. The transversal rostellum forms a barrier separating the stigma. Below, a depression with few secretions is observed corresponding to the future stigmatic surface. At the sides on the base of the anther, two triangular clinandrium teeth are present (Fig. 2S^f). **Anthesis:** the apex of the obcordate rectangular **anther** is 170° from the axis of the column (Fig. 2T^f). In the middle of the upper part of the **anther cap** abundant semi-actinocytic stomata are present (Fig. 4O). Cubic crystals are observed surrounding the stomata (Fig. S1). Below the anther cap four pollinia are visible in a closer view, and two pairs of **caudicles** are exposed (Fig. 6O). The clinandrium has lateral triangular teeth, one on each side of the anther (Fig. 2T^f). The transverse rostellum is oblong, and the stigmatic surface is seen under it (Fig. 3Z). The **lip** is tri-lobed. The lateral lobes are erect with free tips, the mid-lobe is circular-ovate with crenulated margins, and in the center the surface is verrucose, without keels (Figs. 5K^f–5M^f).

DISCUSSION

Incumbent anther

Despite the enormous variation in the degree of incumbency or bending of the anther in Orchidaceae, three general pathways of achieving it have been identified, two of them observed in this work. The first pathway described from the distant subfamily Vanilloideae, is the result chiefly of the substantial elongation of the anther connective tissue (Freudenstein, Harris & Rasmussen, 2002); the second pathway is present in the non vandoid epidendroids (where most of this study's samples are placed), in which incumbency takes place on late ontogeny stages as the result of extension and tipping of the mature anthers (Freudenstein, Harris & Rasmussen, 2002; Valencia-Nieto, Sosa &

[Márquez-Guzmán, 2016](#)). The third and, the most variable pathway, the so-called Vandoid morphology or syndrome, is observed in the development of *Corallorhiza maculata* and *Govenia alba* of Calypsoinae (a subtribe recently included in Epidendreae) included in this study. In this pathway, bending is reached in early ontogenetic stages, as the result of changes in direction of growth, that lead the anther to begin its development in a starting position with incumbent orientation (called early anther incumbency) and associated to the superposed pollinia (result of a reorientation of the developing thecae), and also to the presence of pollinium stalks or accessory structures of the pollinia, derived from the rostellum (varying zones and amounts of tissue of this structure) which are different in origin to the caudicles (extensions derived from the pollinia) ([Freudenstein, Harris & Rasmussen, 2002](#)).

Our micrographs showed that in the members of Bletiinae (including *Chysis* formerly considered in its own subtribe), Ponerinae, Pleurothallidinae and Laeliinae the incumbency is reached out by simple elongation of the anther and tipping in late stages in the ontogeny. The only variation among members of this group was the degree of inflection of the anther (see [Table 2](#)). This variation seems to be the result of the morphologies associated with the diverse pollination syndromes in this group, depending on the orientation of the pollinarium needed for successful pollination.

Implications for classification

Two recent phylogenetic studies, one including representative taxa of all orchid groups ([Givnish et al., 2015](#)) and another focused in subfamily Epidendroideae ([Freudenstein & Chase, 2015](#)) were the basis for revising the classification of Orchidaceae ([Chase et al., 2015](#)). In these studies, *Chysis* was retrieved in a clade as the sister group to subtribe Bletiinae, and thus its members were transferred to this subtribe, whereas previously it was considered in its own subtribe Chysinae ([Chase et al., 2015](#)). Based on a number of anther characters observed in this study, such as the shape of the anther cap, the ornamentation of the epidermis of the anther, the form and number of pollinia, linear caudicles, absence of column wings, in addition to characters in the labellum we suggest that further inclusion of species in *Chysis* in molecular phylogenies might help clarify the position of this genus either in subtribe Bletiinae or in its own subtribe Chysinae. If species in *Chysis* are retrieved in Bletiinae the anther characters identified here might be defined as symplesiomorphic characters. However, if *Chysis* is placed in its own subtribe, then the anther characters such as linear caudicles in only one pair, unequal pollinia form, shape of anther cap, absence of column wings and like so the characters of the lip such as the numbers of central and accessory keels (3 or 5) and trichomes in its surface will be the main defining characters of this group.

[Freudenstein & Chase \(2015\)](#) and [Freudenstein, Yukawa & Luo \(2017\)](#) consider *Coelia* a member of subtribe Calypsoinae, although it was previously classified in its own subtribe Coeliinae. Our observations of the column of *Coelia triptera* indicate that early anther incumbency is present, it was already inflected approximately 45°. [Freudenstein, Yukawa & Luo \(2017\)](#) proposed placing *Coelia* in the Calypsoinae, arguing that character transformations that lead to detachable viscidium of the rostellum in this subtribe started

from the morphology of *Coelia*. However, our observations show that this genus lacks a cellular pollinium stalk or stipe, as well as superposed pollinia, and the only character of the vandoid syndrome which was observed is the early incumbent anther. Moreover, the rest of anther characters are congruent with more advanced Epidendreae: like the presence of granulate caudicles (derived from the pollinium), erect column, and the pollinium number. Furthermore, *Coelia* is the only epiphytic genus in a large group composed by terrestrial geophytes including many leafless and mycoheterotrophic taxa, leaving the question open if indeed it should belong in the subtribe Calypsoinae.

Furthermore, a set of characters that our study found to differ between two genera in subtribe Calypsoinae were observed in *Govenia alba* and *Corallorhiza maculata* and they might have implications in classification. Although both genera are characterized by early anther incumbency, characteristic of the Vandoid syndrome, *Govenia alba*, has a tegula (pollen stalk derived from the column) mainly composed of a strand of granulate cells which connect the viscidium to the pollinium apex. This type of pollinium stalk consists of the dorsal cuticle of the rostellum and it has been considered by [Rasmussen \(1982\)](#), [Dressler \(1993\)](#) and [Freudenstein \(1994a\)](#) a type of stipe opposed to the hamulus present in *Corallorhiza maculata*. Both genera have been classified previously in several subtribes in Epidendroideae, but the position of *Govenia* in Orchidaceae has been the most controversial; [Dressler \(1981\)](#) placed this genus on subtribe Corallorhizinae in tribe Maxillarieae of the extinct subfamily Vandoideae; later, [Dressler \(1993\)](#) transferred *Govenia* (subtribe Goveniinae) to tribe Cymbidieae; [Freudenstein \(2005e\)](#) placed this genus in tribe Calypsoeae but, without indicating relationships with the related *Earina* (Agrostophyllinae) or *Bletia* (Bletiinae) ([García-Cruz & Sosa, 2005](#)). Recently, [Freudenstein & Chase \(2015\)](#) and [Freudenstein, Yukawa & Luo \(2017\)](#) placed *Govenia* in subtribe Calypsoinae based on their phylogenetic studies in which this genus resulted the sister group to the remainder genera of the *Corallorhiza* clade.

Pollination biology

In the very diverse Pleurothallidinae (5100 spp. [Karremans, 2016](#)), the majority of pollinators are unknown ([Karremans, 2010](#)); however, it has been indicated based on floral morphology that species in this group are pollinated by flies ([Pridgeon, Solano & Chase, 2001](#)). In addition, two genera in this group were reported as having deceive pollination by pseudocopulation ([Blanco & Barboza, 2005](#)). The plants have minute flowers, with segments with great motility and abundant trichomes and secretions ([Pridgeon, Solano & Chase, 2001](#); [Blanco & Barboza, 2005](#); [Jersáková, Johnson & Kindlmann, 2006](#); [Karremans et al., 2015](#)). These characters, were observed in *Stelis ciliaris* and *Specklinia digitale*, which have the smallest flowers studied here, and furthermore they were previously identified by a number of pollination and morphological studies ([Damon & Roblero, 2007](#); [Karremans et al., 2013](#); [Ignowski et al., 2015](#)) in which different pollinators besides diptera such like bees were reported.

[Karremans et al. \(2013\)](#) reports the pollination by *Drosophila* in the *Specklinia endotrachys* species group; however, this group has a very different morphology to the species included in this study. The endotrachys group presents species that share a

notable reddish-orange color of the perianth parts, especially of the sepals, produce long-lived multi-flowered successive inflorescences, and are larger plants with ten or more flowers open simultaneously, but only one per single inflorescence. Differently,

S. digitale presents much smaller plants, and inflorescences with 4–10 miniature white-to cream-yellowish flowers, its pollinator is also unknown but is related to the sometimes referred as *Pleurothallis grobyi* Bateman ex Lindl group, where [Damon & Roblero \(2007\)](#) reports flies from the families Cecidomyiidae and Phoridae (plus an unidentified species) as pollinators of *Specklinia marginata* closely related to *S. digitalis* in this species group of *Pleurothallis grobyi*, [Damon & Roblero \(2007\)](#) also mention *S. marginata* was visited by bees of the genus *Plebeia*. Interestingly, the morphology of the flowers observed in this study is almost identical to his close related *S. marginata*, the phylogenetic relationship between this species in *Pleurothallis grobyi* can probably reflect similarity in its pollinators group.

In Ponerinae, especially in *Isochilus*, flower characteristics are associated with hummingbird pollination ([Van Der Pijl, Dodson & Flowers, 1969](#); [Siegel, 2011](#)). In *I. major* we observed that the small tubular flowers are purple (rose and orange colors dominate in other species of this genus), that the lips have gray lines, and pollinia are purple-maroon and when collecting samples we also became aware of the absence of fragrance. In addition, during dissections of *I. major* flowers we discovered a mechanism by which the anther cap comes off (it is joined to the grooved lip by a claw), leaving pollinia exposed or being simply removed by only introducing the dissection needle (which resembles the bird beak) and coming out with pollinaria on its surface, presumably as it happens at the time of pollination by hummingbirds. In the other genera of this subtribe (*Ponera*, *Nemaconia*, *Helleriella*) the pollinators are unknown, but flower size, and red and yellow colors (especially in *P. juncifolia*) lines in lip and secretions suggest pollination by small wasps or bees ([Soto-Arenas, 2005b](#)).

It has been identified that pollination in Laeliinae, another highly diverse group of Epidendreae (with approximately 1500 spp.), is carried out by diverse pollinators, ranging from Lepidoptera in *Brassavola* and in the diverse *Epidendrum*, to Diptera in some other *Epidendrum*, birds in some *Encyclia* and *Epidendrum*, and predominantly Hymenoptera in most *Laelia*, *Prosthechea*, *Encyclia* and *Cattleya* ([Van Der Pijl, Dodson & Flowers, 1969](#); [Borba & Braga, 2003](#); [Van den Berg et al., 2009](#)). In *Laelia* it is well known that flowers emit fragrance to attract the pollinating insects, without nectar or other reward; thus, it is considered as deceptive pollination. Taxa in this group are pollinated by large bees and bumblebees. *Laelia* has been recognized as closely related to *Cattleya* but differs, in number of pollinia (eight in *Laelia* vs. four in *Cattleya*, [Halbinger & Soto-Arenas \(1997\)](#) [Borba & Braga \(2003\)](#)) as reported in this study.

Large *Laelia* flowers are considered as “gullet flowers”, with a lip that constitutes a landing platform for the pollinator, in which the lateral lobes are upturned to enclose the column, forming a tunnel-shaped structure, where the pollinator enters in search of nectar, and when it backs away it touches the stigmatic zone and the pollinarium, depositing or removing the later on its back ([Halbinger & Soto-Arenas, 1997](#)). We found in our observations that not only the anther bends, but also that the column bends markedly probably to reach an adequate position for allowing pollinators entering the flowers. In

Laelia speciosa, Soto-Arenas & Solano-Gómez (2007) reported pollination by bumblebees of the genus *Bombus*. Recently, Peraza-Flores, Carnevali & Van den Berg (2016) segregated some members of *Laelia* into *Schomburgkia*, although *L. speciosa* remains as the type and most basal *Laelia*.

Among taxa in the *Encyclia* alliance Higgins (2003) recorded that species in *Prosthechea* produce fragrances and are pollinated by wasps. In *Prosthechea squalida*, our observations of the lip suggest that abundant secretions are produced to attract pollinators, resulting in a reward-based pollination syndrome. In *Encyclia* and *Oestlundia* pollination is accomplished by Hymenoptera (diverse kinds of bees) (Dressler, 1993; Higgins, 2003). We found the presence of cubic crystals around the actinocytic stomata of the anther cap in *E. microbulbon*, probably offered as attractors to the pollinators.

In Bletinae, in a number of species in *Bletia* and in most *Hexalectris* and *Basiphyllea*, marked autogamy and cleistogamy has been recorded; some reports of autogamy in *Bletia* highlight the lack of development (partial or total) of the rostellum favouring self-pollination (Van Der Cingel, 2001; Salazar, Chavez-Rendon & Jiménez-Machorro, 2016). In *Chysis* the pollinators are unknown; however, it has been suggested that due to color and lip characters and fragrant flowers, pollination by large bees or Euglossini bees might be possible (Soto-Arenas, 2005a; Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007). Our observations showed that in the keels of the lip of *Chysis bractescens* and *C. limminghei* there are abundant trichomes and papillae, probably related with production of fragrance that could be collected by the brushes in hind limbs of bees, especially of the Euglossini group. Our observation in *Chysis laevis* found that the coalescent anther with the column, the lack of trichomes and papillae on lip keels, the dehiscent pollinia at anthesis and

an underdeveloped rostellum (only two vestigial appendages observed) probably allow self-pollination. We suggest that autogamy (by cleistogamy or pseudo-cleistogamy) seems to be the common mechanism for fruit production in this taxon.

In Calypsoinae the flowers are small to medium, and diverse pollinators have been reported such like noctuid moths in *Tipularia discolor* (Whigham & McWethy, 1980), bumblebees in *Calypso* (Van Der Cingel, 2001; Tuomi et al., 2015), and in *Cremastra* and *Govenia* pollination is by bees (García-Cruz & Sosa, 2005; García-Cruz et al., 2009), in *Dactylostalix* and *Govenia* hover flies were also reported (Pansarin, 2008); and finally, in *Collarohiza* Epididae flies and mosquitoes were recorded as pollinators (Freudenstein, 2005b). We observed in *Govenia alba* a slight fragrance and guide lines on the lip, the column is pronouncedly bent over itself to accomplish a successful pollination by the incumbence leads to the correct placement of pollinaria on the back of pollinator. In *Corallorhiza maculata*, the lip has a bulging structure on its base forming a channel with

abundant pores on its epidermis, and as in *Govenia*, the column is pronouncedly bending inward, but in this genus this character suggests self-facilitation of pollination rather than correct placement of pollinaria on pollinators.

CONCLUSIONS

Our study corroborated that in the subtribes Bletinae, Ponerinae, Pleurothallidinae, Laeliinae and Chysinae anther incumbency is accomplished by simple elongation and

tipping of the anther in the late stages of development. It also confirmed that inflexion of the anther reached by the reorientation of growth in the early ontogenetic stages of the anther, the vandoid morphology, was found in Calypsoinae (excluding *Coelia*).

Our study identified that *Chysis* possesses a number of characters such as the shape of the anther cap, the ornamentation of the epidermis of the anther, the form and number of pollinia, the linear caudicles, and the absence of column wings not shared with the rest of the taxa in subtribe Bletiinae; and therefore, suggesting that its position in this subtribe may need revision. Our observations discovered that *Coelia* only shares the early anther incumbency with Calypsoinae, where it was transferred recently; however, the rest of the morphological characteristics correspond to those of other members of Epidendreae, suggesting also that its position needs to be revisited.

We found characters such like crystals around the actinocytic stomata on the anther cap as well as sugar crystals in Laeliinae; coalescent anther with the column, lack of trichomes and papillae on lip keels, and underdeveloped rostellum in cleistogamously forms of *Chysis laevis*; a mechanism by which the anther cap comes off (it is joined with the grooved lip by a claw) in *Isochilus major*. All of them related to pollination syndromes or reproductive biology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ma. de los A. Aida Tellez Velasco, Jardín Botánico, IB; UNAM for her help obtaining biological samples and Oscar F. Francke Ballve, IB, UNAM for his English edition of the manuscript. We are grateful to Silvia Espinosa-Matías for her help with the SEM and valuable commentaries for helpful improvement of this study. We also thank “Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México”. This study constitutes partial fulfillment of B. Valencia-Nieto’s Doctor in Science thesis requirements. in the “Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México”.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

Lab and fieldwork were supported by the “Laboratorio de Desarrollo en Plantas”, Facultad de Ciencias, National Autonomous University of Mexico (UNAM) and a scholarship to Benjamín Valencia-Nieto by CONACYT (354898). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

“Laboratorio de Desarrollo en Plantas”, Facultad de Ciencias, National Autonomous University of Mexico (UNAM).
CONACYT: 354898.

Competing Interests

Victoria Sosa is an Academic Editor for PeerJ.

Author Contributions

- Benjamín Valencia-Nieto conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.
- Victoria Sosa conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, reviewed drafts of the paper.
- Judith Márquez-Guzmán conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, reviewed drafts of the paper.

Field Study Permissions

The following information was supplied relating to field study approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

Biological samples of flowers and buds were obtained from plants of the Orchidaceae living collection maintained by the Botanical Garden of the Instituto de Biología, UNAM and the botanical garden “Francisco Javier Clavijero” of the Instituto de Ecología, A.C. (INECOL). We had access to the material under the terms of the scientific permits MX-JB-008-DF and VER-FLO-228-09-09. The Mexican species of Orchidaceae are under special protection (Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-2010, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Diario Oficial de la Federación 30 December 2010, Mexico, DF) and the botanical gardens hold individuals of every collected taxon. Data on vouchers is indicated in the [Supplementary Material](#) (TS1).

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The SEM preparations (cylinders with mounted biological samples gold sputter coated) were just conserved for a year by SEM Laboratory and following their policies, they dismantled it and recovered the gold from preparations for reuse. The biological samples come from plants maintained in the living collections of the Botanical Garden of the Instituto de Biología, UNAM and the botanical garden “Francisco Javier Clavijero” of the Instituto de Ecología, A.C.

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4383#supplemental-information>.

REFERENCES

- Arditti J. 1992.** *Fundamentals of orchid biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Blanco MA, Barboza G. 2005.** Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany* **95**:763–772 DOI [10.1093/aob/mci090](https://doi.org/10.1093/aob/mci090).
- Borba EL, Braga PIS. 2003.** Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**:541–549 DOI [10.1590/S0100-84042003000400013](https://doi.org/10.1590/S0100-84042003000400013).

- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar GA, Van den Berg C, Schuiteman A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**:151–174 DOI [10.1111/boj.12234](https://doi.org/10.1111/boj.12234).
- Damon A, Roblero PS. 2007.** A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* **48**:1–14.
- Dressler RL. 1981.** *The orchids, natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the Orchid Family*. Portland: Dioscorides Press.
- Dressler RL, Salazar GA. 1991.** Viscarium, a term for the glue-bearing area of the rostellum. *Orchid Research Newsletter* **17**:11–12.
- Fowler JA. 2005.** *Wild orchids of South Carolina. A popular natural history*. South Carolina: University of South Carolina Press.
- Freudenstein JV. 1994a.** Gynostemium structure and relationships of the Corallorhizinae (Orchidaceae: Epidendroideae). *Plant Systematics and Evolution* **193**:1–19 DOI [10.1007/BF00983537](https://doi.org/10.1007/BF00983537).
- Freudenstein JV. 1994b.** Character transformation and relationships in *Corallorhiza* (Orchidaceae: Epidendroideae). II. Morphological variation and phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **81**:1458–1467 DOI [10.1002/j.1537-2197.1994.tb15632.x](https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15632.x).
- Freudenstein JV. 2005a.** *Calypso*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 93–97.
- Freudenstein JV. 2005b.** *Corallorhiza*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 97–99.
- Freudenstein JV. 2005c.** *Oreorchis*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 105–107.
- Freudenstein JV. 2005d.** *Tipulara*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 107–109.
- Freudenstein JV. 2005e.** *Calypsoeae*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 89–90.
- Freudenstein JV, Chase MW. 2015.** Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of Botany* **11**:665–681 DOI [10.1093/aob/mcu253](https://doi.org/10.1093/aob/mcu253).

- Freudenstein JV, Harris EM, Rasmussen FN. 2002.** The evolution of anther morphology in orchids: incumbent anthers, superposed pollinia, and the Vandoid complex. *American Journal of Botany* **89**:1747–1755 DOI [10.3732/ajb.89.11.1747](https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1747).
- Freudenstein JV, Yukawa T, Luo YB. 2017.** A reanalysis of relationships among Calypsoinae (Orchidaceae: Epidendroideae): floral and vegetative evolution and the placement of *Yoania*. *Systematic Botany* **42**:17–25 DOI [10.1600/036364417X694944](https://doi.org/10.1600/036364417X694944).
- García-Cruz J, González-Astorga J, Sosa V, Hernández-González O. 2009.** Genetic diversity in six *Govenia* (Orchidaceae) species with different pollinator attraction strategies. *International Journal of Plant Sciences* **170**:894–905 DOI [10.1086/600149](https://doi.org/10.1086/600149).
- García-Cruz J, Sosa V. 2005.** Phylogenetic relationships and character evolution in *Govenia* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**:1329–1339 DOI [10.1139/b05-098](https://doi.org/10.1139/b05-098).
- Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Endara L. 2015.** Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**:20151553 DOI [10.1098/rspb.2015.1553](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553).
- Hágsater E, Soto MA, Salazar GA, Jiménez MR, López RM, Dressler RL. 2005.** *Lasorquídeas de México*. México, D.F.: Instituto Chinoín, 304 pp.
- Hágsater E, Soto-Arenas MA. 2005.** *Epidendrum*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 236–251.
- Halbinger F, Soto-Arenas MA. 1997.** Laelias of México. *Orquídea* **15**:1–160. **Higgins WE. 2003.** *Prosthechea*: a chemical discontinuity in Laeliinae. *Lankesteriana* **7**:39–41.
- Ignowski H, De Brito AT, Bona C, Smidt EDC. 2015.** Nomenclatural notes on *Stelisciliaris* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Phytotaxa* **218**:30–38 DOI [10.11646/phytotaxa.218.1.2](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.218.1.2).
- Jersáková J, Johnson SD, Kindlmann P. 2006.** Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**:219–235 DOI [10.1017/S1464793105006986](https://doi.org/10.1017/S1464793105006986).
- Karremans AP. 2010.** Phylogenetics of *Stelis* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) and closely related genera, based on molecular data, morphological characteristics and geographical distribution in the Central American and Andean Cordilleras. MSc thesis, Plant Sciences Group and Biosystematics Group, Wageningen University. Available at <http://edepot.wur.nl/146921>.
- Karremans AP. 2016.** Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana* **16**:219–241 DOI [10.15517/lank.v16i2.26008](https://doi.org/10.15517/lank.v16i2.26008).
- Karremans AP, Bakker FT, Pupulin F, Solano-Gómez R, Smulders MJ. 2013.** Phylogenetics of *Stelis* and closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **299**:151–176 DOI [10.1007/s00606-012-0712-7](https://doi.org/10.1007/s00606-012-0712-7).
- Karremans AP, Bogarin D, Pupulin F, Luer CA, Gravendeel B. 2015.** The glandulous *Specklinia* morphological convergence versus phylogenetic divergence. *Phytotaxa* **218**:101–127 DOI [10.11646/phytotaxa.218.2.1](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.218.2.1).

- Kurzweil H. 1987.** Developmental studies in orchid flowers I: Epidendroid and Vandoidspecies. *Nordic Journal of Botany* **7**:427–442 DOI [10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x](https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1987.tb00964.x).
- Pansarin ER. 2008.** Reproductive biology and pollination of *Govenia utriculata*: a syrphidfly orchid pollinated through a pollen-deceptive mechanism. *Plant Species Biology* **23**:90–96 DOI [10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2008.00210.x).
- Peraza-Flores LN, Carnevali G, Van den Berg C. 2016.** A molecular phylogeny of the Laelia alliance (Orchidaceae) and a reassessment of *Laelia* and *Schomburgkia*. *Taxon* **65**:1249–1262 DOI [10.12705/656.3](https://doi.org/10.12705/656.3).
- Peter CI, Johnson SD. 2005.** Anther cap retention prevents self-pollination by elaterid beetles in the South African orchid *Eulophia foliosa*. *Annals of Botany* **97**:345–355 DOI [10.1093/aob/mcj041](https://doi.org/10.1093/aob/mcj041).
- Pinheiro F, Cozzolino S. 2013.** *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system forecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon* **62**:77–88.
- Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLF, Salatino A, De Barros F. 2009.** Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* sub-genus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **283**:165–177 DOI [10.1007/s00606-009-0224-2](https://doi.org/10.1007/s00606-009-0224-2).
- Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN. 2005.** *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press.
- Pridgeon AM, Solano R, Chase MW. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallid-inae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**:2286–2308 DOI [10.2307/3558390](https://doi.org/10.2307/3558390).
- Rasmussen FN. 1982.** The gynostemium of the neottioid orchids. *Opera Botanica* **65**:1–96.
- Rudall JP. 2007.** *Anatomy of flowering plants. An introduction to structure and development*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rudall PJ, Bateman RM. 2004.** Evolution of zygomorphy in monocot flowers: iterative patterns and developmental constraints. *New Phytologist* **162**:25–44 DOI [10.1111/j.1469-8137.2004.01032.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01032.x).
- Salazar GA. 1990.** *Coelia triptera*. In: Hágsater E, Salazar GA, eds. *Icones Orchidacearum Fascicle 1. Orchids of México Part 1*. Mexico City: Asociación Mexicana de Orquideología.
- Salazar GA. 2005.** *Isochilus*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 426–429.
- Salazar GA, Chavez-Rendon C, Jiménez-Machorro R. 2016.** Floral similarity and vegetative divergence in a new species of *Bletia* (Orchidaceae) from Mexico. *Phytotaxa* **275**:112–126 DOI [10.11646/phytotaxa.275.2.3](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.275.2.3).
- Siegel C. 2011.** Orchids and hummingbirds: sex in the fast lane. *The Orchid Digest* **75**:8–17.
- Sosa V. 2002.** *Bletia roezlii*. In: Hágsater E, Soto MA, eds. *Icones Orchidacearum Fascicle 5-6. Orchids of México Part 2 and 3*. Mexico City: Herbario Amo.

- Sosa V. 2007.** A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Blettiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic Botany* **32**:34–42
DOI [10.1600/036364407780360175](https://doi.org/10.1600/036364407780360175).
- Sosa V. 2008.** *Bletia nelsonii*. In: Hágsater E, Soto MA, eds. *Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4*. Mexico City: Herbario Amo.
- Sosa V, Cameron KM, Angulo DF, Hernández-Hernández T. 2016.** Life form evolution in epidendroid orchids: ecological consequences of the shift from epiphytism to terrestrial habit in *Hexalectris*. *Taxon* **65**:235–248 DOI [10.12705/652.2](https://doi.org/10.12705/652.2).
- Soto-Arenas MA. 2005a.** *Chysis*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 173–177.
- Soto-Arenas MA. 2005b.** *Ponera*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 432–434.
- Soto-Arenas M. 2008a.** *Chysis bractescens*. In: Hágsater E, Soto MA, eds. *Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4*. Mexico City: Herbario Amo.
- Soto-Arenas M. 2008b.** *Isophilus alatus*. In: Hágsater E, Soto MA, eds. *Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4*. Mexico City: Herbario Amo.
- Soto-Arenas M. 2008c.** *Oestlundia ligulata*. In: Hágsater E, Soto MA, eds. *Icones Orchidacearum Fascicle 10. Orchids of México Part 4*. Mexico City: Herbario Amo.
- Soto-Arenas MA, Solano-Gómez AR. 2007.** Ficha técnica de *Chysis bractescens*. Soto-Arenas MA, compiler. Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chino A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029 México. D.F. Available at <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Chysisbractescens00.pdf>.
- Tuomi J, Lämsä J, Wannas L, Abeli T, Jäkäläniemi A. 2015.** Pollinator behaviour on a food-deceptive Orchid *Calypso bulbosa* and co-flowering species. *The Scientific World Journal* **2015**:Article 482161 DOI [10.1155/2015/482161](https://doi.org/10.1155/2015/482161).
- Valencia-Nieto B, Espinosa-Matias S, Márquez-Guzmán J. 2011.** Presencia de estomas en las anteras de especies del género *Barkeria* (Laeliinae, Orchidaceae). *Acta Microscopica* **20**(Supp. B).
- Valencia-Nieto B, Sosa V, Márquez-Guzmán J. 2016.** Late stages of anther development and anther attributes in *Microepidendrum* differs from other genera of Epidendrum alliance (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **218**:35–43 DOI [10.1016/j.flora.2015.11.002](https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.11.002).
- Van den Berg C. 2005.** *Epidendreae*. In: Pridgeon AM, Cribb JP, Chase WM, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum. Volume 4 Epidendroideae Part 1*. London: Oxford University Press, 162–164.
- Van den Berg C, Goldman DH, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Cameron KM, Chase MW. 2005.** An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**:613–624.

Van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arenas MA, Chase MW. 2009. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* **104**:417–430 DOI [10.1093/aob/mcp101](https://doi.org/10.1093/aob/mcp101).

Van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arenas MA, Culhan A, Chase MW. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**:96–114.

Van Der Cingel NA. 2001. *An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia*. Boca Raton, Rotterdam: CRC Press/AA Balkema.

Van Der Pijl L, Dodson CH, Flowers O. 1969. In: Fla CG, ed. *Orchid Flowers. Their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.

Whigham DF, McWethy M. 1980. Studies on the pollination ecology of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **67**:550–555 DOI [10.1002/j.1537-2197.1980.tb07683.x](https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1980.tb07683.x).