



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

ESTUDIO DE LA ANATOMÍA FOLIAR DE LA SUBTRIBU  
PONERINAE (ORCHIDACEAE, EPIDENDROIDEAE)  
EN UN CONTEXTO FILOGENÉTICO.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

LILIANA CERVANTES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de octubre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** de la alumna **CERVANTES MARTÍNEZ LILIANA** con número de cuenta **9027581-4** con la tesis titulada **"Estudio de la anatomía foliar de la subtribu Ponerinae (Orchidaceae, Epidendroideae) en un contexto filogenético"**, realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA VICTORIA SOSA ORTEGA  
Vocal: DR. EDUARDO ALBERTO PÉREZ GARCÍA  
Secretario: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ  
Suplente: DRA. NELLY DIEGO PÉREZ  
Suplente: DRA. TERESA TERRAZAS SALGADO

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

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de enero de 2009.



Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

## RECONOCIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** (UNAM) la oportunidad otorgada para cursar mis estudios de Maestría.

Dichos estudios y el desarrollo del presente manuscrito fueron posibles gracias al apoyo financiero que me otorgó (No. 202644) el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT).

De la misma forma, agradezco de manera especial, por su apoyo, disposición y orientación durante el desarrollo de esta tesis a los miembros del Comité Tutorial: Dr. Gerado **Adolfo Salazar Chávez** (Director de Tesis), Instituto de Biología, Dra. **Teresa Terrazas Salgado** Instituto de Biología, UNAM. y la Dra **María Victoria Sosa Ortega**, Instituto de Ecología, A. C. (INECOL), Xalapa , Veracruz.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater que nuevamente me recibió para continuar con mi formación académica. Al posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Biología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me brindó durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Gerardo A. Salazar Chávez por seguir compartiendo conmigo su pasión por las orquídeas, su conocimiento y amistad.

A la Dra. Teresa Terrazas Salgado a quien agradezco de manera especial, por sus enseñanzas, tiempo, dedicación y entusiasmo para realizar este trabajo.

A la Dra. María Victoria Sosa Ortega, por formar parte de mi comité tutorial, sus preguntas y sugerencias, enriquecieron de forma sustancial este trabajo.

A la Dra. Nelly Diego Pérez y al Dr. Eduardo Alberto Pérez García por aceptar ser miembros del jurado y revisar el manuscrito de la tesis, el cual fue mejorado con sus sugerencias.

A la Dra. Lidia Cabrera por el apoyo incondicional que me brindó en todos los aspectos, por escucharme y compartir su conocimiento.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar por su apoyo, paciencia y calidez que tuve en todo momento en el Laboratorio de Biología Molecular. A la M. en C. Berenit Mendoza Garfias por su ayuda en la preparación y procesamiento de las muestras observadas en el Microscopio electrónico de barrido del Instituto de Biología, así como las interminables charlas que teníamos durante estas sesiones.

A mis profesores Gerardo Salazar, Helga Ochoterena, Hilda Flores, Gerardo Ponce de León, Javier Caballero, Susana Magallón, Fernando Cervantes, Fernando Chiang, Eduardo Pérez y Mariana Hernández, por sus valiosas enseñanzas.

A Carmen Loyola por la paciencia y profesionalismo que tuvo para tomar fotos de mis plantas y los consejos que me dio para sentirme bien. También agradezco a Gerardo Salazar y Marco López por sus fotos.

Al curador del herbario AMO, Luis Sánchez Saldaña y Rolando Jiménez por facilitarme ejemplares vivos para obtener el material básico para mi estudio, tanto para hacer la anatomía y la extracción de ADN y por brindarme su invaluable amistad.

A M. en C. Carolina Granados y M. en C. Coyolxhauqui Figueroa, mis amigas y compañeras de muchas vivencias, gracias por enseñarme, apoyarme, luchar y aprender conmigo.

A mi madre por su infinita ayuda, paciencia y comprensión en los momentos difíciles y por darme siempre aliento y fuerzas para iniciar y terminar logros en mi vida.

A mi hermana y colega Angélica Martínez, por apoyarme en todo lo que hago, por estar pendiente de todo lo que me sucede y todo lo que soy.

A José Luis Padilla Roldán en especial, por compartir su vida conmigo, por enseñarme otras cosas y formas de ver la vida, por regresarme la esperanza. Gracias.

A toda mi familia, mi “banda de incondicionales” que a pesar de todo y por todo siguen ahí, recordándome que estamos siempre juntos aquí y en la eternidad.

A mis compañeras del Instituto de Biología, Paty, Oris, Lucía, Mary por su amistad y apoyo brindado en todo momento.

# CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
MORFOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE PONERINAE .....	1
JUSTIFICACION DE ESTE TRABAJO .....	5
OBJETIVOS .....	8
ESTRUCTURA DE LA TESIS .....	8
LITERATURA CITADA .....	9
<b>CAPÍTULO 1. ANATOMÍA FOLIAR DE ALGUNOS REPRESENTANTES DE PONERINAE</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	14
MORFOLOGÍA DE LA HOJA .....	14
ANATOMÍA DE LA LÁMINA FOLIAR .....	15
CORTES ANATÓMICOS .....	23
ANATOMÍA DE LAS VAINAS FOLIARES .....	29
<b>DISCUSIÓN</b> .....	30
CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LA SUBTRIBU PONERINAE.....	30
CARACTERÍSTICAS COMPARTIDAS CON OTROS REPRESENTANTES DE ORCHIDACEAE.....	32
<b>CONCLUSIONES</b> .....	35
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	36

<b>CAPÍTULO 2. ESTUDIO ANATÓMICO DE LAS MARCAS FOLIARES DE PONERINAE.</b>	39
<b>RESUMEN</b> .....	39
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	40
<b>RESULTADOS</b> .....	41
MORFOLOGÍA DE LA MARCA EN LA LÁMINA FOLIAR MADURA.....	41
MICROMORFOLOGÍA DE LA MARCA .....	44
REGIÓN DE ABSICIÓN ENTRE LA LÁMINA Y LA VAINA FOLIAR .....	47
VAINAS FOLIARES .....	49
DESARROLLO DE LAS HOJAS EN EL TALLO DE PONERINAE .....	50
<b>DISCUSIÓN</b> .....	54
POSICIÓN DE LAS MARCAS .....	54
FORMACIÓN DE LA MARCA Y LA PROMINENCIA MEDIA .....	54
LA ZONA DE ABSICIÓN Y LA LÍNEA DE ABSICIÓN .....	56
COMPARACIÓN DE LA MARCA Y LA ZONA DE ABSICIÓN. ....	58
<b>CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	60
<b>CAPÍTULO 3. IMPORTANCIA FILOGENÉTICA DE LA ANATOMÍA FOLIAR DE LA SUBTRIBU PONERINAE</b> .....	61
<b>RESUMEN</b> .....	61
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	61
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	64
MUESTREO TAXONÓMICO.....	64
MÉTODOS ANATÓMICOS .....	64
MÉTODOS MOLECULARES .....	64
SELECCIÓN Y CODIFICACIÓN DE LOS CARACTERES ESTRUCTURALES .....	68
ANÁLISIS CLADÍSTICOS .....	68
<b>RESULTADOS</b> .....	69
CARACTERES ESTRUCTURALES .....	69
CARACTERES MOLECULARES .....	72
ANÁLISIS CLADÍSTICOS .....	72



OPTIMIZACIÓN DE LOS CARACTERES ESTRUCTURALES EN EL ÁRBOL FILOGENÉTICO COMBINADO .....	76
<b>DISCUSIÓN</b> .....	83
RELACIONES EN LA SUBTRIBU PONERINAE E IMPLICACIONES TAXONÓMICAS .....	83
<b>CONCLUSIONES</b> .....	85
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	86
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	90
<b>APÉNDICE 1.</b> Especies estudiadas de la subtribu Ponerinae, Bletiinae y Laeliinae. ....	91

## ÍNDICE DE CUADROS

### INTRODUCCIÓN GENERAL

<b>Cuadro 1.</b> Especies de Ponerinae, distribución, tipos de vegetación y altitud. El asterisco (*) indica .....	2
---	---

### CAPÍTULO 1

<b>Cuadro 1.1.</b> Características de las células epidérmicas. Imágenes de MEB .....	19
<b>Cuadro 1.2.</b> Características de los aparatos estomáticos en la subtribu Ponerinae, <i>B. purpurea</i> y <i>E. nocturnum</i> . ....	21
<b>Cuadro 1.3.</b> Grosor de la cutícula y dimensiones de las células adaxiales y abaxiales. ....	24

### CAPÍTULO 2

<b>Cuadro 2.1.</b> Especies de la subtribu Ponerinae, número de marcas, posición de las marcas en la lámina foliar y forma de la prominencia media. ....	43
---	----

### CAPÍTULO 3

<b>Cuadro 3.1.</b> Reactivos y cantidades utilizadas en la amplificación de las regiones ITS y <i>trnH<sup>GUG</sup>-psbA</i> .....	67
<b>Cuadro 3.2.</b> Programas de PCR utilizados en la amplificación de las regiones ITS y <i>trnH<sup>GUG</sup>- psbA</i> . ....	67

<b>Cuadro 3.3.</b> Síntesis de los 13 caracteres y estados de carácter de la subtribu Ponerinae, <i>B. purpurea</i> y <i>E. nocturnum</i> . .....	71
<b>Cuadro 3.4.</b> Datos morfológicos codificados. ....	72
<b>Cuadro 3.5.</b> Características de los grupos de datos analizados en el presente estudio. ....	76

## INDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN GENERAL

<b>Figura 1.</b> Distribución, aspecto de las plantas, raíces, vainas foliares verrucosas, inflorescencias y flores en la subtribu Ponerinae. ....	7
--	---

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.1.</b> Variación en forma y textura de las láminas foliares en la subtribu Ponerinae. ...	15
<b>Figura 1.2.</b> Formas de las células epidérmicas. Imágenes de MEB. ....	16
<b>Figura 1.3.</b> Curvatura y ornamentación de las paredes periclinales. Imágenes de MEB. ....	18
<b>Figura 1.4.</b> Aparatos estomáticos.....	20
<b>Figura 1.5.</b> Ceras epicuticulares en las láminas foliares. Imágenes de MEB. ....	22
<b>Figura 1.6.</b> Células epidérmicas, mesofilo y haces vasculares. Cortes transversales. ....	25
<b>Figura 1.7.</b> Inclusiones celulares. Microscopía de luz. ....	28
<b>Figura 1.8.</b> Anatomía de las vainas foliares en las especies estudiadas. Cortes transversales .	30

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 2.1.</b> Estructura de la marca en láminas foliares de especies de Ponerinae .....	44
<b>Figura 2.2.</b> Marca y prominencia media en la superficie abaxial. ....	45
<b>Figura 2.3.</b> Modificaciones celulares en las marcas de las láminas foliares. Imágenes de MEB .....	46
<b>Figura 2.4.</b> Láminas foliares de Ponerinae con marca y sin marca. ....	47
<b>Figura 2.5.</b> Región de abscisión. Imágenes de MEB .....	48
<b>Figura 2.6.</b> Anatomía de las vainas foliares en Ponerinae. Cortes transversales .....	50
<b>Figura 2.7.</b> Disposición de las hojas en el tallo de <i>Ischilus carnosiflorus</i> .....	51
<b>Figura 2.8.</b> Comparación de la marca y la región de abscisión .....	53

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 3.1.</b> Parte de uno de los árboles más parsimoniosos resultante del análisis de una región ADN nuclear (ITS), y tres regiones de los plástidos (el intrón <i>trnL</i> , el espaciador <i>trnL-F</i> , el gen y los espaciadores de <i>matK</i> y <i>rbcL</i> ) que muestra la posición de la subtribu Ponerinae.	63
<b>Figura 3.2.</b> Comparación entre los cladogramas obtenidos para las 11 taxones estudiados ...	74
<b>Figura 3.3.</b> Optimización ACCTRAN de los caracteres. A) Tipo de tallo. B) Verrugas de las vainas foliares. C) Forma de las flores. D) Marcas en la lámina foliar.....	78
<b>Figura 3.4.</b> Optimización ACCTRAN de los caracteres. A) Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie adaxial. B) Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie abaxial. C) Tipo de aparato estomático. D) Forma de los estomas .....	79
<b>Figura 3.5.</b> Optimización ACCTRAN de los caracteres. A) Forma del poro estomático. B) Nivel de los estomas. C) Fibras no vasculares. D) Drusas. E) Cristales lenticulares. ....	81
<b>Figura 3.6.</b> Distribución de los cambios de los estados de carácter .....	82

## RESUMEN

La subtribu Ponerinae es un grupo de orquídeas neotropicales, perteneciente a la tribu Epidendreae (Epidendroideae). Comprende 22 especies y cuatro géneros (*Helleriella*, *Isochilus*, *Nemaconia* y *Ponera*). En este estudio, se examinó la estructura anatómica foliar de nueve especies de la subtribu Ponerinae más *Bletia purpurea* y *Epidendrum nocturnum* de las subtribus Bletiinae y Laeliinae respectivamente, para evaluar el potencial de los caracteres anatómicos para reconstruir las relaciones filogenéticas del grupo. Para estudiar los atributos de la superficie foliar, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (MEB) y para observar los tejidos internos se utilizó microscopía de luz. Se exploraron las relaciones filogenéticas de estas especies, mediante análisis cladísticos de secuencias de ADN, provenientes del genoma nuclear y del cloroplasto: el espaciador interno transcrito (ITS) y del cloroplasto, el espaciador intergénico *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*. Adicionalmente, se analizaron 13 caracteres estructurales. Se analizaron los cambios evolutivos de los caracteres estructurales, posiblemente ocurridos en la subtribu Ponerinae, en el marco de la hipótesis filogenética resultante del análisis combinado. Algunos de estos se discutieron como el tipo de tallo, las marcas en la lámina foliar y la forma de las flores.

Anatómicamente, los representantes de Ponerinae fueron más similares a *Bletia purpurea* que a *Epidendrum nocturnum*. La marca es una depresión de algunas hileras de células que solo afecta el tejido epidérmico y la prominencia media es un levantamiento del nivel de la lámina que bordea un área triangular. Ambas se originan por una presión de la región de abscisión de una vaina precedente sobre la lámina siguiente en desarrollo.

En la mayoría de los análisis, Ponerinae se obtuvo como un grupo monofilético cuyos linajes corresponden a la clasificación intragenérica previa. Prácticamente todos los caracteres estructurales se recuperaron como sinapomorfías en varios niveles.

**Palabras clave:** Ponerinae; Orchidaceae; anatomía foliar, marca; filogenia; ITS; *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*.

## ABSTRACT

The subtribe Ponerinae is a group of Neotropical orchids that belongs to the Epidendreae tribe (Epidendroideae). It comprises 22 species and four genera (*Helleriella*, *Isochilus*, *Nemaconia* and *Ponera*). In this study, the foliar anatomical structure of nine species from this subtribe in addition to *Bletia purpurea* and *Epidendrum nocturnum*, from the subtribes Bletiinae and Laeliinae, respectively, were examined for the evaluation of the character potential in the reconstruction of phylogenetic relationships of the group. To study the attributes of the foliar surface we used the Scanning Electron Microscopy (SEM) and to observe the internal tissues we used the Light Microscopy. The phylogenetic relationships of the species cited above were explored, through the cladistics analysis of DNA sequences from nuclear and chloroplast genome: the internal transcribed spacer (ITS) and the *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* intergenic spacer. Additionally, 13 structural characters were analyzed. The evolutionary change of structural characters, that possible occurred in the subtribe Ponerinae, were analyzed under the phylogenetic hypothesis obtain from the combine analysis. Some of these characters, like stem type, foliar blade mark, and flower shape, were discussed. Anatomically, the representatives of Ponerinae were more similar to *Bletia purpurea* than *Epidendrum nocturnum*. The mark is a depression of some rows of cells, that only affect the epidermal tissue. The medial prominence is an elevation of the blade surface that surrounds a triangular area. Both of them are originated by oppression of the abscission region of a preceding sheath on the next developing blade. In most of the cladistics analysis Ponerinae was obtained as a monophyletic group, and their internal lineages match the previous intrageneric classification. Practically, all the structural characters were recovered as synapomorphies at various taxonomical levels.

**Key words:** Ponerinae; Orchidaceae; foliar anatomy, mark; phylogeny; ITS; *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

La subtribu Ponerinae es un grupo de orquídeas epífitas ampliamente distribuido en América tropical, comprende 22 especies, repartidas en los géneros *Isochilus*, *H.*, *Nemaconia* y *Ponera*. Diecinueve de esas especies se localizan en México (Soto, 2005). La distribución geográfica de la subtribu, con todos los géneros en México y Guatemala y una baja diversidad en Sudamérica (Fig. 1) sugiere que podría ser un relictos de la flora boreotropical terciaria de Norteamérica, junto con Coeliinae, Blettiinae y Chysiinae (Soto y Salazar, 2004). Los miembros de Ponerinae habitan principalmente selvas lluviosas tropicales, bosques húmedos de encino, pino-encino, pino-encino-*Liquidambar* y bosque mesófilo de montaña, en un intervalo altitudinal que va desde 0 a 2800 m s.n.m (Cuadro 1).

Actualmente la subtribu forma parte de la tribu Epidendreae en la subfamilia Epidendroideae (Chase *et al.*, 2003), clasificación fundamentada en el estudio filogenético molecular realizado por van den Berg *et al.*, (2000 y 2005), donde el clado de Ponerinae se encontró apoyado fuertemente (PB=100) siendo hermano de Blettiinae.

## MORFOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE PONERINAE

Las especializaciones vegetativas y florales de esta subtribu son muy pocas en comparación con otras subtribus de Epidendreae, como Laeliinae y Pleurothallidinae, que presentan un gran número de especies, gran variedad de formas de crecimiento, de adaptaciones a diferentes ambientes y de síndromes de polinización.

Las especies de Ponerinae son plantas cespitosas con crecimiento simpodial de apariencia graminoide y presentan raíces muy gruesas y carnosas que forman la mayor parte de la biomasa de la planta. Tienen tallos tipo caña envueltos totalmente con vainas que con el tiempo se vuelven escariosas y caedizas y hojas a lo largo de éstos. Las plantas de *Ponera* son las más pequeñas y delicadas de los miembros de la subtribu, luego se encuentran las de *Isochilus* y *N. dressleriana* y por último las más robustas y grandes pertenecen al resto de las nemaconias y las especies de *Helleriella*, cuyos tallos llegan incluso a ser colgantes debido al peso de las hojas. Los tallos son simples en *Isochilus* y *Ponera*, pero en *Helleriella* y *Nemaconia* el crecimiento es más complejo porque pueden presentar simpodios erectos que se originan en los módulos viejos cuando se han caído las hojas. (Fig. 1P).

**Cuadro 1.** Especies de Ponerinae, distribución, tipos de vegetación y altitud. El asterisco (\*) indica las especies estudiadas

<b>Especie</b>	<b>Distribución</b>	<b>Tipos de vegetación</b>	<b>Altitud m s.n.m</b>
* <i>Helleriella guerrensis</i> Dressler & Hágsater	Gro. Oax.	Bosque mesófilo de montaña	1800-2400
<i>Helleriella nicaraguensis</i> A.D. Hawkes	Gua.: El Salv.; Nic.; Hond.; C.R.	Pino-encino- <i>Liquidambar</i> , bosque mesófilo de montaña	1250-2200
* <i>Isochilus alatus</i> Schltr.	Oax., Chis; Gua.; Hond.; El Sal.; Pan.	Pino-encino- <i>Liquidambar</i> , bosque mesófilo de montaña	800-1800
<i>Isochilus. aurantiacus</i> Hamer & Garay	Oax., Chis; Gua.; El Salv.; Hond.; Nic.	Bosque mesófilo de montaña y bosque seco de pino-encino- <i>Arbutus</i> .	1800-2800
<i>Isochilus bracteatus</i> (Llave & Lex.) Espejo ex. Salazar y Soto-Arenas	Sin., Dgo., Nay., Jal., Col., Mich., edo. de Méx., Mor., Gro. y Oax.	Pino-encino húmedo, vegetación secundaria derivada de bosque mesófilo de montaña	1250-2400
* <i>Isochilus carnosiflorus</i> Lindl.	Tab., Ver., Oax., Chis., Cam., Q.Roo; Gua.; Bel; El Sal.; Hond.; Nic.; C.R.	Selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia inundable	80-1460
<i>Isochilus chiriquensis</i> Schltr.	Chis.; Pan.	Pino-encino, encino y bosque mesófilo de montaña	1950-2500
* <i>Isochilus langlassei</i> Schltr.	Gro. Oax.	Pino-encino húmedo y bosque mesófilo de montaña	1100-2625
* <i>Isochilus latibracteatus</i> A. Rich. & Galeotti	Ver., Pue., Gro., Oax., Chis.; Gua.; Hond.; Nic.; C.R.?	Selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia, bosque de encino y pino encino	(60)700-1900
<i>Isochilus oaxacanus</i> Salazar & Soto Arenas	Ver., Pue., Oax.	Bosque mesófilo de montaña	1900-2750
<i>Isochilus unilateralis</i> Robins.	Hgo., Qro., S.L.P., Tam.	Bosque de encino, pino-encino y bosque mesófilo de montaña	1100-1900

* <i>Nemaconia dressleriana</i> (Soto Arenas) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	Mor.	Bosque de pino-encino	1900-2250
<i>Nemaconia glomerata</i> (Correll) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	Oax., Chis; Gua.; El Salv.	Bosque mesófilo de montaña - <i>Liquidambar</i> y bosque mesófilo de montaña	1400-2300
* <i>Nemaconia graminifolia</i> (Knowles & Westc.) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	Ver., Oax., Chis.	Bosque de pino-encino	1400-1980
<i>Nemaconia longipetala</i> (Correll) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	Edo. de Méx., Gro., Oax.	Bosque de pino-encino y mesófilo de montaña	2250
<i>Nemaconi pellita</i> (Rchb. f.) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	Chis.; Gua.; El Salv.	Bosque de encino húmedo y mesófilo de montaña	1800-2700
* <i>Nemaconi striata</i> (Lindl.) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	Ver., Tab., Pue., Oax., Chis., Camp., Q.Roo; Bel; Gua.; Nic.; C.R.; Bol.; Bras.; Per.	Selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia, bosque de pino encino	(0) 120-1400
<i>Ponera exilis</i> Dressler	Jal., Col., Gro., Mich., Mor., Edo. de Méx.	Bosque de pino-encino y encino húmedo y bosque mesófilo de montaña	1900-2700
* <i>Ponera juncifolia</i> Lindl.	Ver., Pue., Hgo., Oax., Chis; El Salv.	Bosque de pino-encino y bosque mesófilo de montaña	1600-2150



La producción de nuevos brotes a partir de las yemas de renuevo y/o de reserva en la mayoría de las orquídeas terrestres y epífitas casi siempre es anual, pero parece que las plantas de *Isochilus* y *Ponera*, no siguen este patrón convencional de crecimiento. En estas plantas, frecuentemente se producen más de un brote en sucesión al año, pero la periodicidad con la que normalmente se producen no se conoce. Por tal motivo, y aunado a que una planta puede presentar varios frentes de crecimiento, se pueden observar brotes de varias edades, proporcionando a la planta un aspecto prolífico. Por otro lado, generalmente la floración ocurre en los brotes que van madurando, debido a que cada módulo tiene crecimiento determinado.

Las hojas se localizan a lo largo de los tallos, son dísticas, arqueadas o rectas, lineares, lanceoladas o elípticas y generalmente quilladas en el envés. Presentan en todas las especies, excepto en las especies de *Helleriella*, una o dos marcas transversales aproximadamente a la mitad de la lámina foliar; la marca proximal tiene por encima un área cóncava-convexa más o menos de forma triangular. Las láminas foliares se encuentran articuladas a vainas foliares tubulares, ya sea lisas o verrucosas. En *Isochilus* hay una densidad heterogénea de verrugas a lo largo de las vainas del tallo; las vainas basales tienen verrugas conspicuas y abundantes (al igual que las catáfilas que envuelven el rizoma) y las verrugas disminuyen gradualmente en tamaño y densidad hacia el ápice del tallo. En *Nemaconia* y *Ponera* generalmente todas las vainas del tallo son lisas, o si son verrucosas mantienen más o menos la misma densidad y tamaño de las verrugas.

En *Isochilus* y *Ponera* la inflorescencia es apical, simple, dística o subsecunda y en las especies de *H.* y *Nemaconia* es apical y/o lateral y la disposición de las flores es en espiral. Las inflorescencias laterales se originan a lo largo de los tallos, en los nudos de las hojas que ya se han caído y los tallos continúan floreciendo por varios años (Soto, 2005). En *Isochilus* las flores son pequeñas, sucesivas o simultáneas, tubulares, de color blanco, rosado, lila, magenta, o anaranjado. Mientras que en *Helleriella.*, *Nemaconia* y *Ponera*, las flores son campanuladas subglobosas, amarillentas o verdosas con las venas o manchas de color púrpura. En *Isochilus* las brácteas florales inferiores son semejantes a láminas foliares, mientras que en los demás géneros, son ovadas, triangular-ovadas o suborbiculares (Fig. 1. I, F)

Los sépalos laterales están unidos entre sí en mayor o menor grado y forman un mentón; en *Isochilus* el sépalo dorsal está unido a los laterales y éstos están unidos entre sí a su vez hasta  $\frac{3}{4}$  partes de su longitud. En *Helleriella* y *Nemaconia* los sépalos laterales están

unidos en la base y al pie de columna y en *Ponera* los segmentos florales están libres. La superficie exterior de los sépalos puede ser lisa, verruculosa, escamosa o con tricomas. El labelo es unguiculado con callo inconspicuo o ausente y lámina entera o lobada, con glándulas de néctar en la base. En *Isochilus* la base del labelo forma un nectario sigmoideo prominente y en el resto de los géneros el labelo es fuertemente arqueado formando un nectario somero (Fig. L, C). La columna es semiterete o claviforme, tridentada, sin alas o con alas inconspicuas, con la antera apical e incumbente. El polinario está constituido por cuatro polinios obovoides unidos por caudículas granulosas.

Actualmente la delimitación de los géneros y especies en la subtribu Ponerinae es clara. En *Isochilus* ha existido cierta confusión en la distinción de las especies, ya que varios de los taxa ahora reconocidos se consideraban anteriormente sinónimos de *I. linearis* R. Br. (Salazar, 2005). Quizá el motivo principal por el que ocurría esto es porque las flores de las especies de *Isochilus* son bastante homogéneas y las diferencias entre las especies se encuentran principalmente en el porte general de las plantas (i.e. tamaño y agregación de los módulos y posición de las hojas con respecto al tallo), las inflorescencias (qué tan compactas o laxas son) y otras características tales, como la relación entre largo/ancho de la hoja, el color de las flores y su disposición (díptica o subsecunda) y la forma del nectario, que permiten identificar con relativa facilidad a los taxa (Salazar, 2005).

## JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO

Tradicionalmente la delimitación de la subtribu Ponerinae, como la de muchos otros grupos de orquídeas (i.e. la Oncidiinae. Dressler 1981; Spiranthinae; Garay, 1982; Burns-Balogh, 1986) se ha fundamentado exclusivamente en caracteres florales. El carácter morfológico utilizado para definir Ponerinae históricamente ha sido la presencia de un pie de columna prominente, pero este carácter se presenta también en otros géneros epidendroides, como *Domingoa*, *Nidema* y *Scaphyglottis*, pertenecientes a la subtribu Laeliinae (van den Berg *et al.*, 2005).

Las flores de las orquídeas están adaptadas para la polinización y probablemente se modifican fácilmente durante el curso de su evolución en respuesta a la presión de selección ejercida por el polinizador. Por lo tanto, las flores adaptadas al mismo tipo de polinizador pueden tener apariencia general muy similar, por lo que no es prudente seleccionar un solo

carácter floral para emitir juicios sobre las relaciones de los taxa, especialmente cuando dicho carácter está involucrado en la polinización (Williams, 1974). Entonces, es necesario considerar todas las fuentes posibles de información y no restringirse a determinados tipos de caracteres.

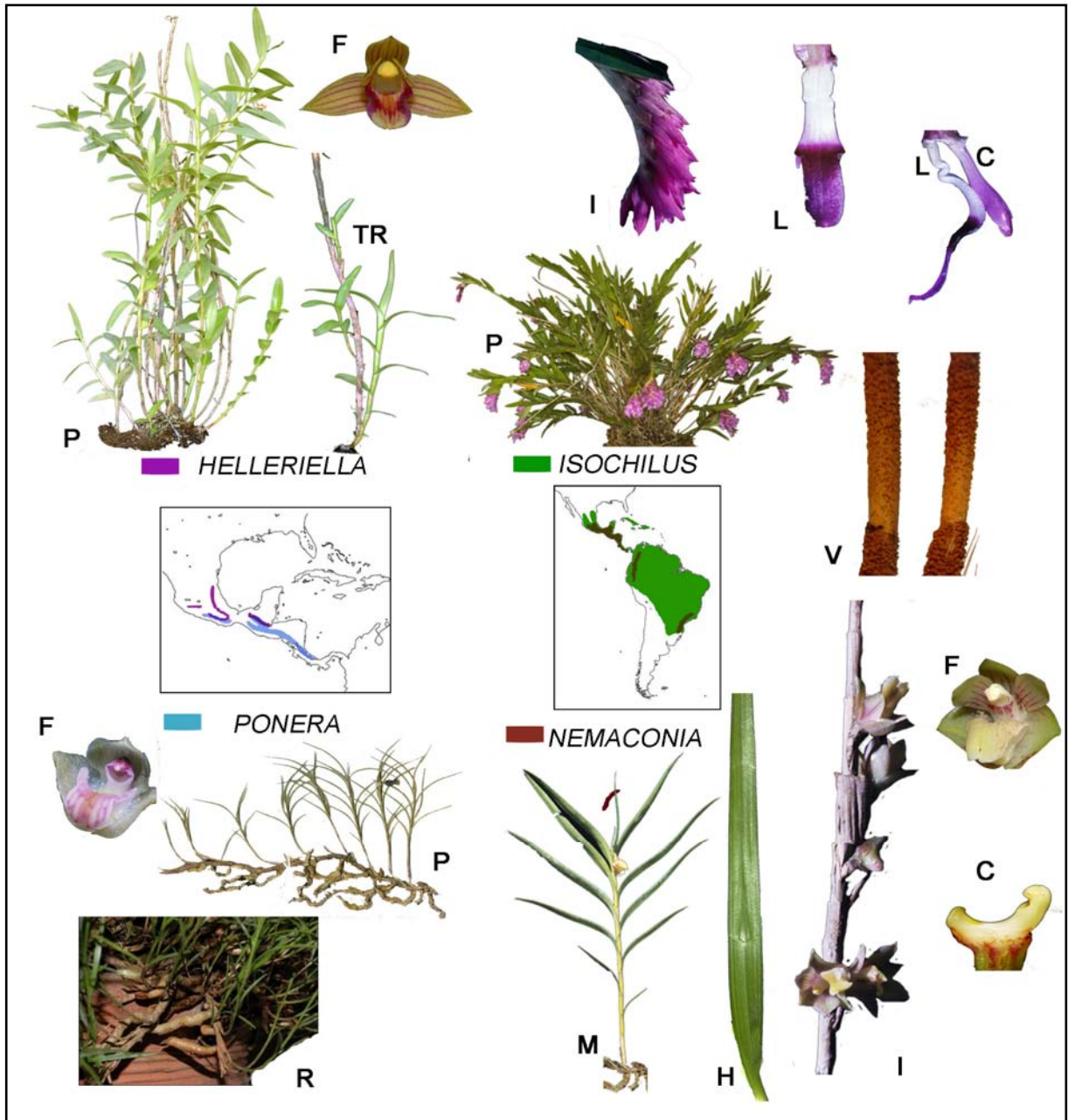
El estudio de la forma y estructura interna de los tejidos y órganos vegetales es una fuente clásica de datos utilizada en la sistemática de varios grupos de plantas. Estos datos anatómicos con frecuencia son de gran utilidad para resolver las relaciones filogenéticas, ya que ayudan a establecer la homología de los caracteres y a interpretar su polaridad (Stuessy, 1990). En la familia Orchidaceae el estudio de la anatomía vegetativa puede ser útil a distintos niveles jerárquicos (Pridgeon, 1999).

Los caracteres anatómicos de la hoja potencialmente útiles para la determinación de las relaciones taxonómicas en las orquídeas incluyen atributos de la superficie de las hojas como grosor de la cutícula, presencia y tipo de tricomas, distribución de los estomas, y caracteres internos como la presencia o ausencia, tipo y número de haces vasculares, presencia de hipodermis, grosor de la pared de las células hipodérmicas, presencia de células con engrosamientos espiralados en el mesofilo, arreglo del mesofilo, presencia y tipo de estegmatas (Williams, 1974 ; Pridgeon, 1987; Pridgeon, 1999).

Como se mencionó anteriormente el 90% de las especies de la subtribu Ponerinae se distribuyen en México y la mayoría de éstas se encuentran cultivadas en la colección de plantas vivas del Herbario AMO y en la colección particular del Dr. Gerardo Salazar y disponibles para su estudio.

A pesar de que los géneros y las especies de la subtribu Ponerinae se pueden reconocer fácilmente por medio de sus características vegetativas y florales, no se han realizado estudios estructurales de otra índole, por ejemplo sobre morfología comparativa, anatomía, biología reproductiva, entre otros. Por lo tanto, en este estudio se examinaron los caracteres anatómicos de la hoja, con el objetivo de explorar otro tipo de caracteres diagnósticos de la subtribu, realizando la caracterización anatómica de algunas especies de la subtribu. Debido al escaso conocimiento acerca de la naturaleza de las marcas en la lámina foliar, también se estudiaron desde el punto de vista anatómico, comparándolas con la anatomía de la región de absición, porque es la única estructura parecida a simple vista a la marca. Finalmente se determinaron los caracteres variables a través de las especies

estudiadas para optimizarlos en una filogenia molecular y conocer los cambios evolutivos dentro de la subtribu.



**Figura 1.** Distribución, aspecto de las plantas, raíces, vainas foliares verrucosas, inflorescencias y flores en la subtribu Ponerinae. Abreviaturas. C= columna, F= flor, H= hoja, I = inflorescencia, L= labelo, M= módulo, P= plantas, R= raíces, TR= tallo ramificado, V= vainas.

En este trabajo las preguntas que se quieren responder son las siguientes: 1) ¿Los caracteres macromorfológicos y anatómicos de la hoja apoyan el reconocimiento de los géneros? 2) ¿La marca foliar presenta características de una región de abscisión? 3) ¿Existen caracteres anatómicos foliares que constituyan sinapomorfias de grupos de especies monofiléticas en la subtribu Ponerinae? 4) ¿Cómo han cambiado las características anatómicas de la hoja en este clado?

## OBJETIVOS

a) Realizar la caracterización anatómica foliar de especies pertenecientes a los cuatro géneros de la subtribu Ponerinae y un representante de Bletiinae y otro de Laeliinae con fines comparativos.

b) Determinar la anatomía de las marcas presentes en la lámina foliar y compararla con la anatomía de la línea de abscisión en los diferentes géneros que comprenden la subtribu.

c) Analizar los cambios en la anatomía foliar de los miembros de la subtribu Ponerinae en el marco de la filogenia molecular y discutir la posible secuencia de cambios evolutivos ocurridos en este linaje.

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para responder a cada uno de los objetivos planteados, este estudio se dividió en tres capítulos separados, pero complementarios. En cada capítulo se presenta un resumen, introducción, métodos, resultados, discusión y conclusiones y al final se presenta una discusión y conclusiones generales. El capítulo 1 hace referencia a la anatomía de las láminas foliares de nueve especies de la subtribu y con fines comparativos se incluyó una especie del linaje hermano representado por *B. purpurea* y otra especie más lejanamente relacionada que pertenece a la subtribu Laeliinae, *E.nocturnum*. En este sentido, se realizaron observaciones de la superficie foliar en el MEB y además de los tejidos internos en microscopía de luz.

En el capítulo 2, nuevamente se retomó la anatomía de las láminas foliares, pero enfocándose en los cambios anatómicos que ocurren en la transición de los tejidos de la marca y fuera de la influencia de la marca, comparándola con la anatomía de la región de abscisión. Así se pudo evaluar si existía algún parecido entre los tejidos de la marca y la región

de abscisión. A la luz de estos resultados se realizó una propuesta del mecanismo de formación de las marcas y su área asociada, denominada aquí prominencia media.

En el capítulo 3, se examinaron las relaciones filogenéticas de la subtribu Ponerinae, utilizando dos regiones de ADN, una del genoma del cloroplasto (*trnH<sup>GUG</sup>-psbA*), otra del genoma nuclear (región ITS) y los caracteres que resultaron variables entre los representantes de la subtribu, los cuales se optimizaron en dicha filogenia para analizar y discutir las vías más parsimoniosas de su evolución.

#### LITERATURA CITADA

- Baker, M.A. 1972. Foliar anatomy of the Laeliinae (Orchidaceae). Tesis de doctorado. Washington University, St. Louis Missouri.
- Burns-Balogh, P. 1986. Sinopsis de la tribu Spiranthinae en México. *Orquídea (Mexico City)* 10: 47-96.
- Chase, M. W, J. V. Freudestein, K. M. Cameron y R. L. Barrett. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. En: Dixon K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (Eds.). *Orchid Conservation. Natural History*. Publications, Kota Kinabalu, Sabah.
- Dressler, R. 1981. *The Orchids. Natural History and Classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, U.S.A. 305 p.
- Garay, L. A. 1982. A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets of Harvard University* 28: 277-425.
- Hammer, F. 1981. *Las Orquídeas de El Salvador*. Vol. 3. The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota Florida, E. U. A.
- Pridgeon, A. M. 1987. Diagnostic anatomical features in Orchidaceae. *Abstracts XIV international Botanical Congress*. Berlin (West), Germany.
- Pridgeon, A. M. 1999. Anatomy. En: Pridgeon, A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F.N. Rasmussen (Eds.) *Genera Orchidacearum: General Introduction, Apostasoideae, Cypripedioideae*. Vol. 1. Oxford University Press. 24-32.
- Salazar, G. A. 2005. *Isochilus*. En: Pridgeon A.M., P.J. Cribb, M.W. Chase y F.N. Rasmussen (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendroideae*. 1. Vol. 4. Oxford University Press.

- Soto Arenas, M. A. y G.A. Salazar. 2004. Orquídeas. En: A. J. García, M. J. Ordóñez y M. Briones-Salas (Eds.) *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-Wordlife, México, D.F.
- Soto Arenas, M. A. 2005. Ponerinae. En: Pridgeon A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F. N. Rasmussen (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendroideae*. 1. Vol. 4. Oxford University Press. New York.
- Soto Arenas, M. A. 2008. *Isochilus alatus*, *I. bracteatus*, *I. langlassei*, *I. oaxacanus*. En: E. Hágsater y M.A. Soto Arenas (Eds.). *Orchids of Mexico*, part. 4 *Icones Orchidacearum*, fasc. 10. pl. 1030-1033. Herbario AMO, México, D.F.
- Stuessy, T. F. 1990. *Plant taxonomy. The Systematic Evaluation of Comparative Data*. Columbia University Press, New York.
- van den Berg, C., W. E. Higgins, R. L. Dressler, W. M. Whitten, M. A. Soto Arenas, A. Culham y M. W. Chase. 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., D. H. Goldman, J. V. Freudenstein, K. M. Cameron y M. W. Chase. 2005. An overview of phylogenetics relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92 (4): 613-624.
- Williams, N. H. 194. The value of plant anatomy in orchid taxonomy. En: M. Ospina (Ed.), *Proceedings of the Seventh World Orchid Conference*. Medellín, Colombia.

## CAPÍTULO 1.

### ANATOMÍA FOLIAR DE ALGUNOS REPRESENTANTES DE PONERINAE.

#### RESUMEN

En este capítulo se presenta la descripción macromorfológica de nueve especies de la subtribu Ponerinae y anatómica de la lámina foliar y las vainas de estas especies y de *B. purpurea* y *E. nocturnum* y se identifican los caracteres anatómicos variables así como los que posiblemente distinguen a la subtribu y a los géneros. Las muestras se prepararon para observarse en microscopio electrónico de barrido y microscopio de luz. Las células epidérmicas de ambas superficies son de forma cuadrada, rectangular o poligonal con paredes anticlinales rectas, con la curvatura de la pared periclinal plana, convexa (de domos bajos y altos) o cóncava. Los aparatos estomáticos se encuentran en la epidermis abaxial, son de tipo anomocítico, y superficiales en la mayoría especies estudiadas, en *B. purpurea* son diacíticos y en *Nemaconia* son tetracíticos y hundidos. La superficie externa de la cutícula se encuentra revestida por dos estructuras de ceras epicuticulares, las costras y las placas. El mesofilo es homogéneo, excepto en *Nemaconia* y *E. nocturnum* que tienen mesofilo esponjoso y en empalizada. Se presentan fibras no vasculares solitarias en el mesofilo de la hoja en los miembros de la subtribu Ponerinae, mientras que en *B. purpurea* no existen y en *E. nocturnum* las fibras están agrupadas en haces. Los haces vasculares son colaterales y se encuentran en la parte media del mesófilo en un solo estrato en Ponerinae y en *B. purpurea*, pero en *E. nocturnum* existen varios estratos. En las especies estudiadas se presentan inclusiones minerales de oxalato de calcio, incluyendo formas como rafidios, drusas, prismas y lenticulares y de silicatos en forma de estegmata.



## INTRODUCCIÓN

La subtribu Ponerinae es un grupo de orquídeas epífitas exclusivamente neotropical perteneciente a la tribu Epidendreae dentro de la subfamilia Epidendroideae (Chase *et al.*, 2003). Los límites y relaciones de la subtribu reconocidos por diferentes taxónomos han variado considerablemente debido a la escasez de caracteres morfológicos que la definan. Los géneros que ahora conforman Ponerinae han sido ubicados anteriormente en Laeliinae (Dressler, 1993); sin embargo, un estudio filogenético molecular reciente (van den Berg *et al.*, 2000) mostró que Ponerinae es un grupo monofilético hermano de Bletiinae.

La delimitación de la subtribu Ponerinae actualmente incluye 22 especies y cuatro géneros, distribuidos desde México hasta Sudamérica, aunque su centro de diversidad se encuentra en México (Soto, 2005). Las plantas de Ponerinae son cespitosas con apariencia graminoide, raíces masivas que forman la mayor parte de la planta y tallos delgados como cañas, envueltos completamente por vainas articuladas a las láminas de las hojas por una línea de dehiscencia. Las flores son pequeñas, tubulares o campanuladas, presumiblemente polinizadas por abejas o colibríes.

Se han realizado varios trabajos sobre la anatomía de los diferentes grupos de orquídeas, los cuales tratan de anatomía puramente descriptiva o aquellos en que las características anatómicas se utilizan para discutir relaciones filogenéticas en todos los niveles de la jerarquía taxonómica: a nivel subfamiliar (e.g. Møller y Rasmussen, 1984), tribal (e.g. Spiranthoideae. Stern *et al.*, 1993), subtribal (e.g. Caladeniinae. Pridgeon, 1994) y genérica (e.g. *Maxillaria*. Holtzmeier *et al.*, 1998). Sin embargo, la información sobre la anatomía foliar de la subtribu Ponerinae es escasa y no existen trabajos anatómicos completos y detallados. Solo hay algunos reportes dispersos, principalmente de *Isochilus*. Möbius (1887), Baker (1972), Williams (1979), y Møller y Rasmussen (1984) publicaron datos anatómicos de la hoja, Weltz (1897) del tallo y Pridgeon *et al.* (1983) y Porembski and Barthlott (1988) de la raíz. Pero ninguno de los autores antes mencionados, documentaron la presencia de las marcas en las láminas foliares. Österreich (1965) y Hamer (1981) si lo hicieron e incluso el segundo autor mostró esquemas de las hojas de *Isochilus* donde se observan las marcas y las áreas triangulares asociadas a éstas y posteriormente Soto (2005) confirmó la presencia de ambas estructuras.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fué realizar la caracterización anatómica foliar de los géneros de la subtribu Ponerinae y un representante de Bletiinae y otro de Laeliinae para compararlos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron hojas de nueve especies de la subtribu Ponerinae, *B. purpurea* (Bletiinae) y *E.nocturnum* (Laeliinae) de material obtenido de ejemplares vivos mantenidos en cultivo (Apéndice 1).

Se colectaron tallos con hojas, los cuales por un lado se prensaron y secaron para observar las ceras epicuticulares intactas y por otro lado se fijaron en FAA (formaldehído 10%, alcohol 50%, agua destilada 35% y ácido acético 5%), al menos durante 24 h para seccionar fragmentos de 1 cm de longitud de la porción media de la lámina y de la vaina foliar para conservarlos en etanol al 50%. Estos fragmentos se destinaron a dos procedimientos, uno para microscopía electrónica y otro para microscopía de luz. En el primer procedimiento, los fragmentos de las láminas se deshidrataron en una serie gradual de etanol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%) y se sumergieron en acetona, colocándolos por aproximadamente 3 min en un sonicador y manteniéndolos así por 48 h. Luego se colocaron en xilol por un período mínimo de 24 h, para disolver las ceras epicuticulares. Los fragmentos secos y los deshidratados se secaron a punto crítico, se montaron en portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de doble cara de carbono y se cubrieron con una fina capa de oro para observarlos bajo un microscopio electrónico de barrido Hitachi F-2460N operado a 15 kV.

En el segundo procedimiento para microscopía de luz se siguió la microtecnia convencional de inclusión en parafina (Johansen, 1940). Una vez incluidos las muestras se cortaron transversalmente con un micrótopo rotatorio y se observó que los tejidos se rompían completamente. Por esta razón, con esta técnica solo se hicieron cortes paradermales de 20  $\mu\text{m}$  de grosor, los cuales posteriormente se tiñeron con safranina-verde rápido y se montaron con resina sintética

Los cortes transversales se hicieron con las muestras fijadas en FAA, colocadas en medio de un dos fragmentos de zanahoria como medio de soporte, en el micrótopo rotatorio,

obteniendo cortes de 50-60  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes que se separaron con un pincel y se colocaron en frascos para deshidratarlos y teñirlos también con safranina-verde rápido por decantación, y por último montarlos con resina sintética. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de luz Olympus BX51.

Para la descripción y análisis de la ornamentación de la pared periclinal de las células epidérmicas se utilizó la terminología de Atwood y Williams (1979); para la curvatura de la pared periclinal se usó la de Barthlott y Hunt (2000); para la topología de los aparatos estomáticos la de Metcalfe y Chalk (1979) y para las ceras epicuticulares la utilizada por Barthlott *et al.* (1998).

## RESULTADOS

### MORFOLOGÍA DE LA HOJA DE PONERINAE

En Ponerinae cada tallo tiene de 10 a 20 hojas dísticas en toda su longitud. Las hojas están constituidas por una vaina tubular articulada a la lámina por una región de abscisión bien definida a través de la cual se desprenden.

Las láminas foliares en la subtribu Ponerinae son caedizas. En *Isochilus* y *Ponera* se caen alrededor de un tercio a un medio de las hojas localizadas en la base de los tallos y el resto permanece durante más tiempo, pero en *H. guerrerensis* y *Nemaconia* pueden llegar a caerse hasta tres cuartas partes de las láminas a lo largo del tallo, permaneciendo sólo en la porción apical; en este último caso, las inflorescencias laterales se presentan en los nudos de las hojas que se han caído a lo largo del tallo.

Las vainas foliares más viejas, es decir las que se encuentran localizadas hacia la base del tallo son escariosas, se deshacen en fibras y se caen, mientras que las vainas más recientes son foliáceas con una lámina foliar reducida. Algunas veces las venas de las vainas se encuentran muy resaltadas formando quillas, y otras son casi lisas. No obstante, en casi todos los miembros de la subtribu, la superficie de las vainas foliares presenta verrugas en diferentes densidades y tamaños. Las láminas foliares son conduplicadas con la mayoría de las superficies adaxiales más o menos presentes en el mismo plano, orientadas hacia la parte apical del tallo, con la nervadura media conspicua y varias nervaduras secundarias menos evidentes, todas hundidas en el haz y prominentes a veces formando quillas en el envés.

Las formas, tamaños y texturas de las láminas presentan cierta variación entre los representantes de la subtribu (Fig. 1.1). Las más pequeñas pertenecen a *Ponera*, las cuales son arqueadas lineares, subcoriáceas. Las intermedias de tamaño son las de *Isochilus* cuyas láminas son ascendentes y rígidas, lineares, estrechamente lanceoladas o elípticas, generalmente de color verde. Sin embargo, en *I. chiriquensis* la lámina de las hojas superiores está coloreada de púrpura. Las láminas más largas son las de *Nemaconia*, arqueadas, linear-lanceoladas y cartáceo-coriáceas y las más anchas, coriáceo-carnosas, arqueadas y elípticas son las de *Helleriella* (Soto, 2005).



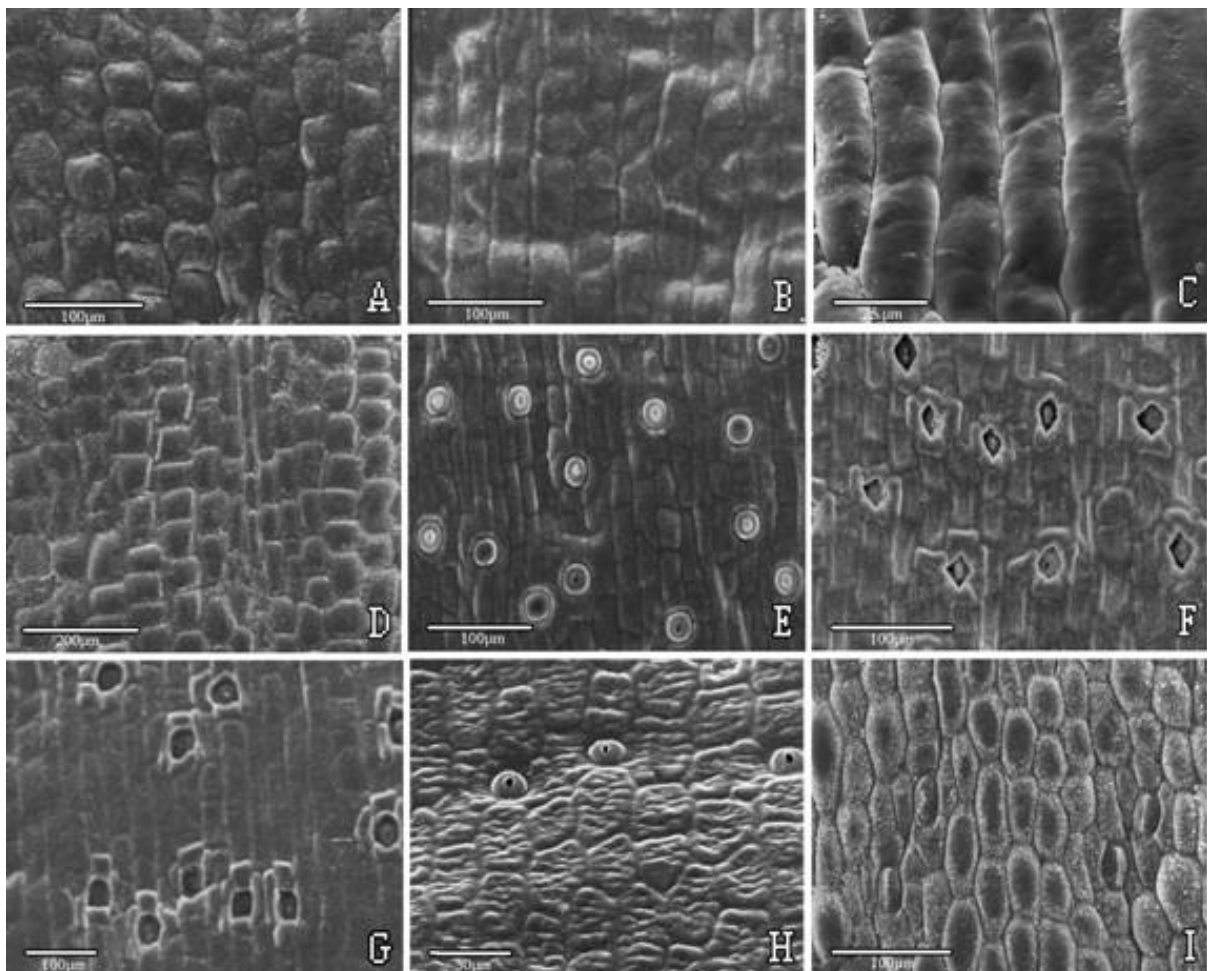
**Figura 1.1** Variación en forma y textura de las láminas foliares en la subtribu Ponerinae. **A** *I. chiriquensis*. **B** *I. langlassei*. **C** *I. unilaterales*. **D** *I. major*. **E** *I. bractetaus*. **F** *I. alatus*. **G** *I. latibracteatatus*. **H** *I. aurantiacus*. **I** *P. juncifolia*. **J** *P. exilis*. **K** *N. dressleriana*. **L** *N. striata*. **M** *N. graminifolia*. **N** *H. guerrerensis*.

## ANATOMÍA DE LA LÁMINA FOLIAR

### Formas de las células epidérmicas

Las células epidérmicas de la superficie adaxial y abaxial no tienen espacios intercelulares entre sí y están organizadas en evidentes hileras paralelas al eje longitudinal de las hojas, con las paredes anticlinales rectas, aunque en la abaxial a veces se pierde la continuidad de las células por la presencia de los estomas.

La mayoría de las células de la superficie adaxial de *Isochilus* y *B. purpurea*, son de forma cuadrada, con alguna que otra de forma rectangular o poligonal (Fig. 1.2 A, B, D). En ambas superficies de *Ponera juncifolia* y la superficie abaxial de *Isochilus*, la mayoría de las células son rectangulares o poligonales y algunas de forma cuadrada dispersas (Fig. 1.2 C, E). Las células son de forma rectangular y poligonal en la superficie abaxial de *H. guerrerensis* y *Nemaconia* (Fig. 1.2 F-G) y sólo poligonales en la superficie adaxial. Se presentan células epidérmicas poligonales en ambas superficies de *E. nocturnum* y en la superficie abaxial de *B. purpurea* (Fig. 1.2 H-I).



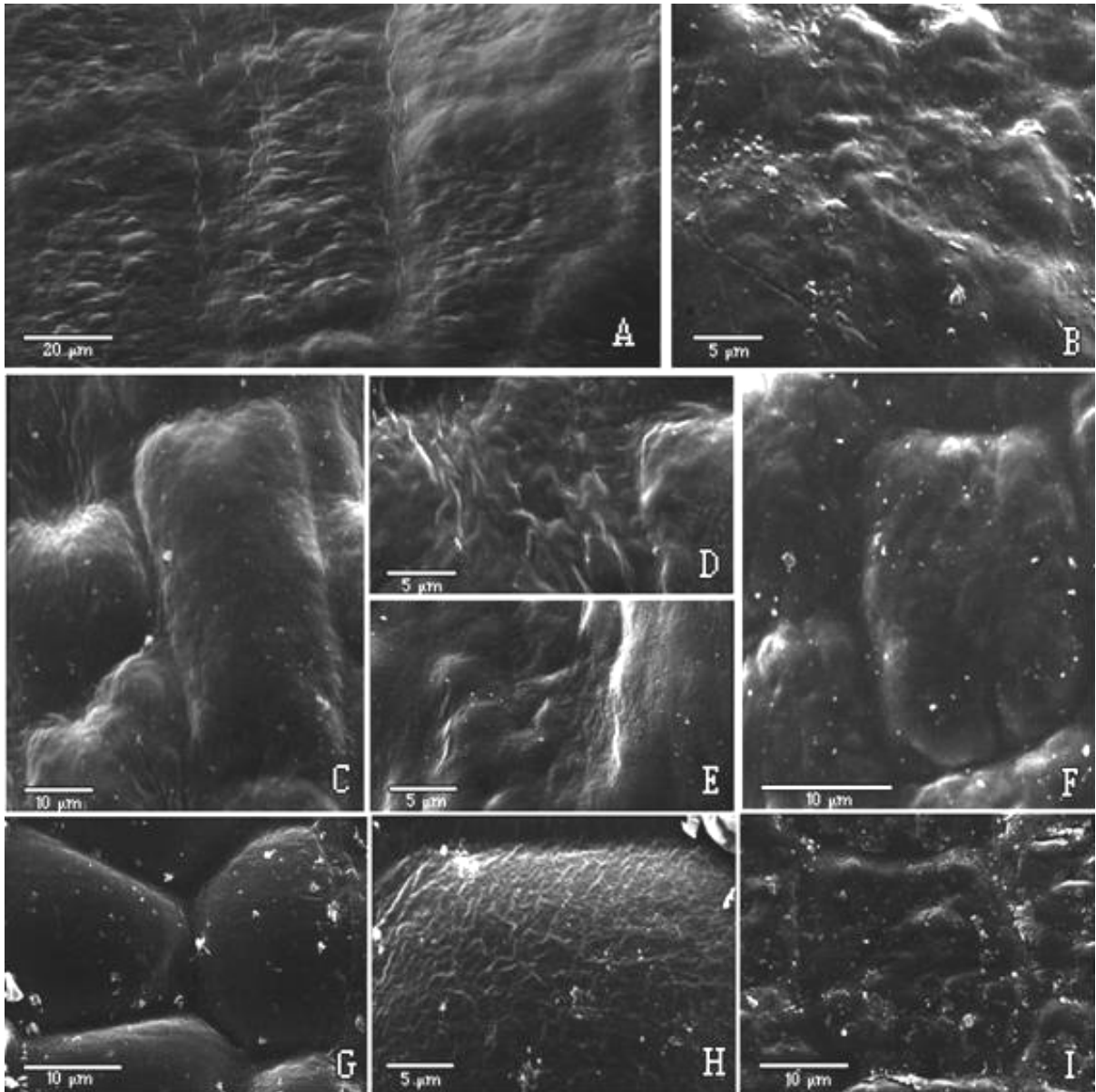
**Figura 1.2.** Formas de las células epidérmicas. Imágenes de MEB. **A-D.** Epidermis adaxial. Células cuadradas y/o rectangulares. **A.** *I. carnosiflorus*. **B.** *I. langlassei*. **C.** *Ponera juncifolia*. **E-I.** Epidermis abaxial. **E-G.** Células rectangulares. **E.** *I. langlassei*. **F.** *N. dressleriana*. **G.** *N. graminifolia*. **H-I.** Células poligonales. **H.** *E. nocturnum*. **I.** *B. purpurea*. Escala: A, B, E, F, G, I= 100 µm; C= 25 µm; D= 200 µm; H= 25 µm.

## **Pared periclinal**

La pared periclinal de las células epidérmicas es plana, convexa (de domos bajos y altos) o cóncava. Son planas en ambas superficies de *H. guerrerensis* (Fig. 1.3. A) y la superficie adaxial de *Nemaconia*. Son convexas de domos bajos en ambas superficies de *Isochilus* (Fig 1.3. C, F), de *P. juncifolia*, en la superficie abaxial de *Nemaconia* y, la adaxial de *B. purpurea* en cuya superficie abaxial las paredes periclinales son también convexas, pero de domos altos. En *E. nocturnum* las paredes periclinales son cóncavas en ambas superficies epidérmicas (Fig. 1.3. I) y solo en la superficie abaxial de *N. dresslerianna*.

## **Ornamentación de la pared periclinal**

Las paredes periclinales de las células epidérmicas en las especies de la subtribu Ponerinae y *E. nocturnum* son rugosas en ambas superficies epidérmicas. En las especies estudiadas de Ponerinae las arrugas o pliegues no tienen ningún patrón particular, es decir, se encuentran distribuidas sin dirección específica (Fig. 1.3. B, D, E). Pero en *E. nocturnum* los pliegues tienden a ser más amplios y perpendiculares al eje longitudinal de las hojas (Fig. 1.3. I). En *B. purpurea* las paredes periclinales de ambas superficies epidérmicas son irregularmente reticuladas, cuya red en algunas áreas está delimitada y en otras es abierta (Fig. 1.3. H). En el Cuadro 1 se presenta una síntesis de las variantes epidérmicas en cuanto a su forma, pared periclinal y anticlinal, así como la ornamentación en ambas superficies.



**Figura 1.3.** Curvatura y ornamentación de las paredes periclinales. Imágenes de MEB. **A-B.** *H. guerrerensis*. **A.** Paredes periclinales planas, superficie adaxial. **B.** ornamentación rugosa. **C-D.** *I. latibracteatus*. **C.** Paredes periclinales convexas de domos bajos. **D.** Ornamentación rugosa. **E-F.** *I. carnosiflorus*. **E.** Paredes periclinales convexas de domos bajos, superficie adaxial. **F.** Ornamentación rugosa. **G-H.** *B. purpurea*. **G.** Paredes periclinales convexas de domos bajos, superficie adaxial. **H.** Ornamentación irregularmente reticuladas, superficie abaxial. **I.** *E. nocturnum*, paredes periclinales cóncavas, rugosas con pliegues horizontales, superficie adaxial. Escala: A= 20 µm; B, D, E, H= 5 µm; F, G, I= 10 µm.

**Cuadro 1.1.** Características de las células epidérmicas observadas en MEB: forma celular, curvatura de la pared periclinal y ornamentación en las dos superficies epidérmicas

ESPECIE	CURVATURA DE LAS PAREDES PERICLINALES ADAX./ABAX.	ORNAMENTACIÓN DE LA SUPERFICIE ADAXIAL Y ABAXIAL
<i>H. guerrerensis</i>	Planas	Rugosas, sin patrón definido
<i>Isochilus</i> spp.	Convexas de domos bajos	Rugosas, sin patrón definido
<i>Nemaconia</i> spp.	Planas/ convexas de domos bajos, excepto <i>N. dressleriana</i> que es plana/ cóncava	Rugosas, sin patrón definido
<i>P. juncifolia</i>	Convexas de domos bajos	Rugosas, sin patrón definido
<i>B. purpurea</i>	Convexas de domos bajos/ convexas de domos altos	Irregularmente reticuladas
<i>E.nocturnum</i>	Cóncavas	Rugosas, con pliegues horizontales

### Aparatos estomáticos

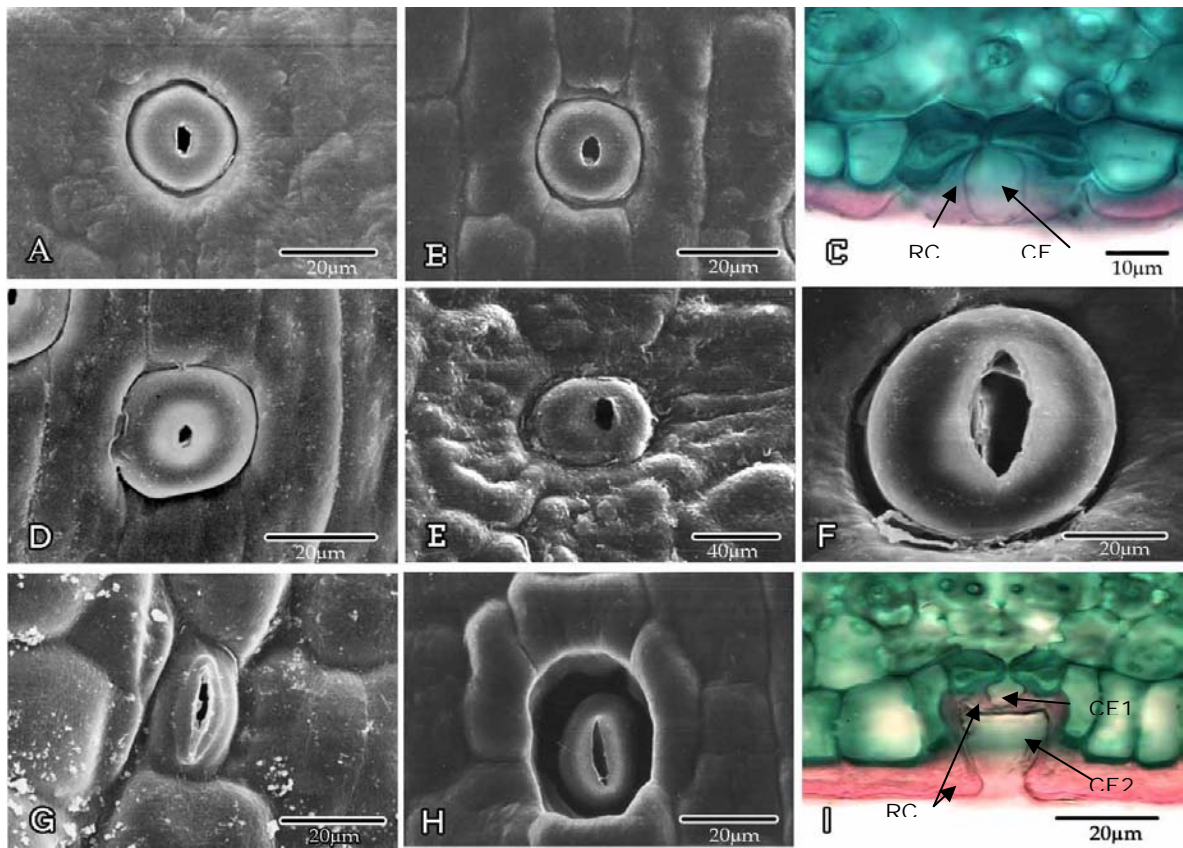
Los aparatos estomáticos sólo se encuentran en la epidermis abaxial, son de tipo anomocítico, ubicados al nivel de las otras células epidérmicas, en *H. guerrerensis* (1.4. F) *Isochilus* (1.4. A-B), *P. juncifolia* (1.4. D), *E.nocturnum* (1.4. E) y la forma de los estomas es circular con el poro estomático elíptico. *B. purpurea* tiene aparatos estomáticos diacíticos, células subsidiarias reniformes, las cuales tienen las paredes anticlinales rectas y las periclinales convexas, estomas elípticos y el poro estomático linear (1.4. G).

En los cortes transversales se observa que las células oclusivas están al mismo nivel que las células epidérmicas adyacentes, son reniformes, aproximadamente del mismo alto que las células epidérmicas con unos rebordes cuticulares depositados sobre éstas, generalmente curvados y casi completamente cerrados en la punta polar del estoma formando una cámara estomática en forma de cántaro (Fig. 1.4. C).

*Nemaconia* presenta estomas encriptados, tetracíticos, de forma elíptica con el poro estomático linear. Las células subsidiarias son rectangulares con las paredes anticlinales onduladas. (Fig. 1.4. H). En los cortes transversales, se observa que las células oclusivas se localizan por debajo del nivel de las células epidérmicas contiguas, también son reniformes



muy pequeñas, ca. 1/3 del alto de las células subsidiarias. Los aparatos estomáticos presentan dos cámaras estomáticas, la más pequeña equivalente a la que tienen los estomas de todos los demás géneros y otra, por encima de ésta, mucho más amplia, tapizada completamente por la cutícula y separada por los rebordes cuticulares curvados que están sobre las células oclusivas. La cutícula se extiende sobre las epidermis y las células subsidiarias formando los rebordes cuticulares bien desarrollados que sobresalen hacia la cavidad estomática (Fig. 1.4. I).



**Figura 1.4.** Aparatos estomáticos. C,I. Cortes transversales, el resto imágenes de MEB. A-F. Anomocítico, al mismo nivel que la epidermis, circular, con poro elíptico. A. *I. carnosiflorus*. B-C. *I. latibracteatus*. D. *P. juncifolia*. E. *E. nocturnum*. F. *H. guerrerensis*. G. Diacítico, *B. purpurea*. H-I Tetracítico, estomas encriptados. H. *N. graminifolia*. I. *N. striata*. Abreviaturas. RC=Rebordes cuticulares. CE1= cámara estomática. CE2 =segunda cámara estomática. Escala: 20 μm, excepto C=10 μm, E= 40 μm.

**Cuadro 1.2.** Características de los aparatos estomáticos en la subtribu Ponerinae, *B. purpurea* y *E. nocturnum*.

ESPECIE	FORMA ESTOMA	FORMA DEL PORO	CÉLULAS SUBSIDIARIAS		
			NÚMERO/ FORMA	PARED PERICLINAL	PARED ANTICLINAL
<i>H. guerrensis</i>	Circular	elíptico	-	-	-
<i>Isochilus</i> spp.	Circular	elíptico	-	-	-
<i>Nemaconia</i> spp.	Elíptico	linear	4/rectangulares	plana	ondulada
<i>P. juncifolia</i>	Circular	elíptico	-	-	-
<i>B. purpurea</i>	Elíptico	linear	2/reniformes	plana	recta
<i>E.nocturnum</i>	Circular	elíptico	-	-	-

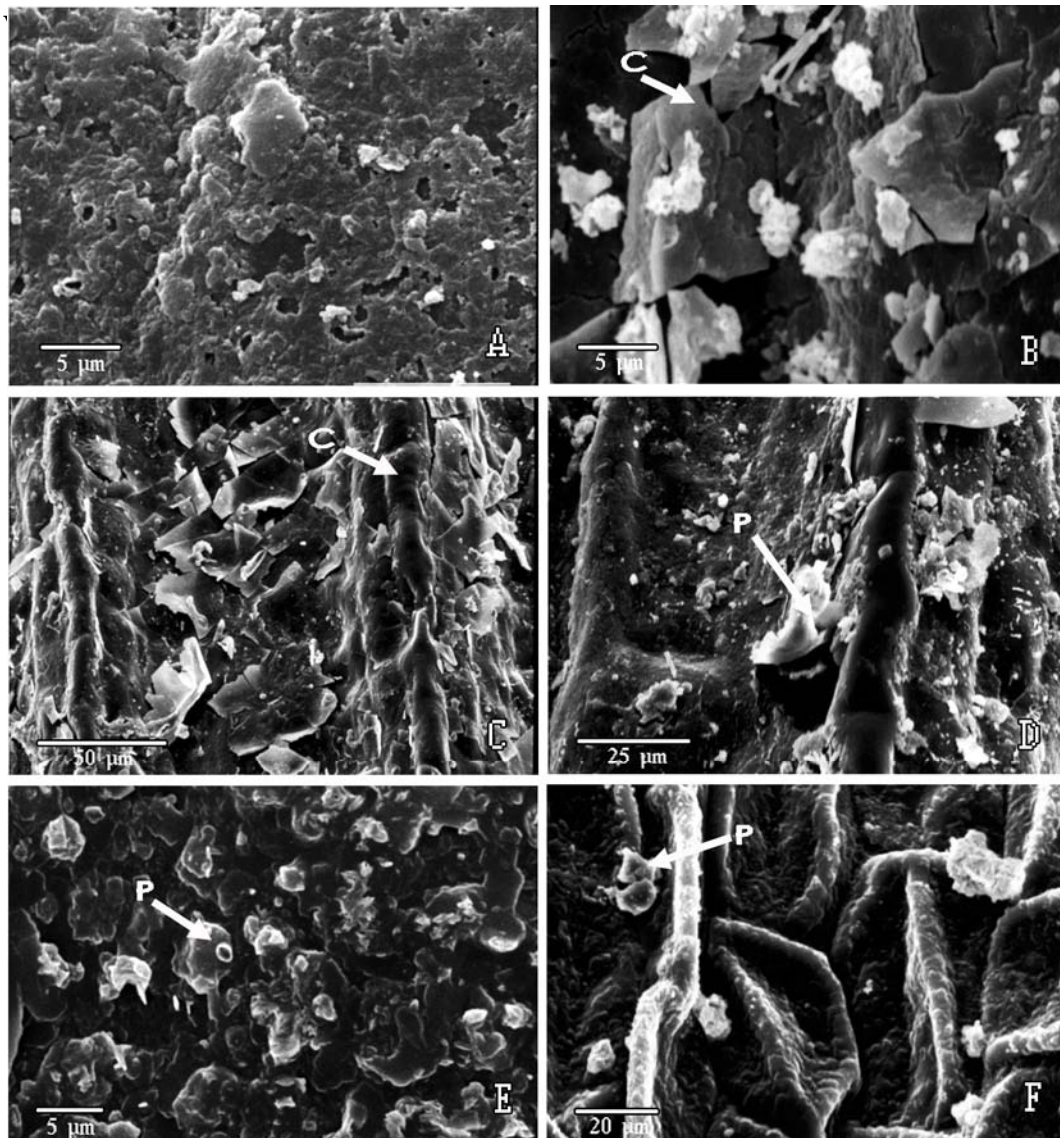
### Ceras epicuticulares

La superficie externa de la cutícula generalmente se encuentra revestida por ceras epicuticulares. En el material estudiado se reconocieron dos arreglos de las ceras epicuticulares: costras y placas (Fig. 1.5.).

Las costras parecidas a hojuelas se consideran como cubiertas de grosor considerable (más de 1  $\mu\text{m}$ ) y tamaño variable con ornamentación más o menos prominente y dispuestas de manera paralela a la superficie epidérmica (Barthlott *et al.*, 1998). Las costras se observan en ambas superficies epidérmicas de todos los representantes de la subtribu Ponerinae, *B. purpurea* y *E. nocturnum*, como una capa más o menos continua con la superficie irregular, rugosa (Fig. 1.5. A). En algunas especies como *I. alatus*, *I. latibracteatus*, *N.graminifolia* y *B. purpurea* la cubierta de las costras es casi lisa, sin ornamentación y fracturada en algunas áreas de la muestra (Fig. 1.5. B, C).

Las placas son los cristaloides de cera más comunes en las plantas que se proyectan desde la superficie celular, generalmente con una forma, tamaño y orientación característica (Barthlott *et al.*, 1998). Las placas se encuentran en todas las especies estudiadas en ambas superficies epidérmicas, localizadas encima de las costras y son estructuras planas, de forma poligonal o redondeadas, con los bordes redondeados y rara vez con los bordes rectos (Fig. 1.5. D, F). Generalmente las placas se encuentran paralelas a la superficie o parcialmente inclinadas y algunas veces se aglomeran, proporcionando el aspecto de un líquen foliáceo

(Fig. 1.5. E). En cuanto a su abundancia y distribución, las placas varían desde escasas y aisladas (Fig. 1.5. G) hasta numerosas y agregadas (Fig. 1.5. C-E).



**Figura 1.5.** Ceras epicuticulares en las láminas foliares. **A.** *N. striata*, costras en la superficie adaxial. **B.** *I. alatus*, costras en la superficie adaxial. **C.** *N. graminifolia*, costras fracturadas en la superficie adaxial. **D.** *N. graminifolia*, placas en la superficie adaxial. **E.** *N. striata*, placas en superficie adaxial. **F.** *B. purpurea*, placas en superficie abaxial. Abreviaturas. C= costras. P= placas. Escala: A, B, E= 5  $\mu\text{m}$ ; C= 50  $\mu\text{m}$ ; D= 25  $\mu\text{m}$ ; F= 20  $\mu\text{m}$ .

## CORTES ANATÓMICOS

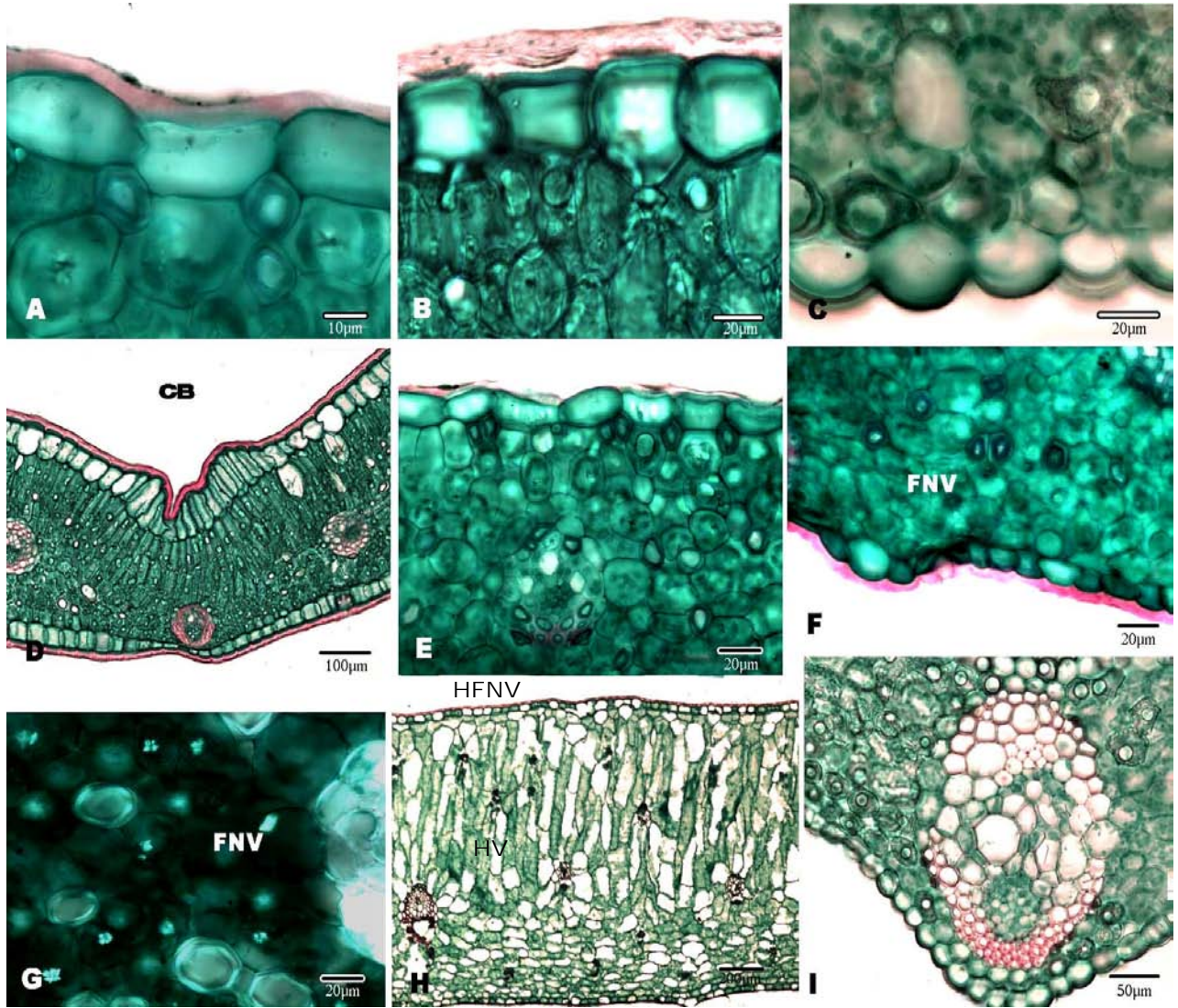
**Cutícula.** En la subtribu Ponerinae la cutícula varía desde lisa hasta muy verrucosa (ver ornamentación pared periclinal). Es más o menos de igual grosor en ambas superficies epidérmicas (Cuadro 4). *Isochilus*, *P. juncifolia* y *B. purpurea* tienen la cutícula de ambas superficies epidérmicas más delgada (Fig. 1.6. A) que las especies de *E. nocturnum*, *H. guerrerensis* y *Nemaconia* (Fig. 1.6. B). La cutícula de la superficie abaxial de *E. nocturnum*, *H. guerrerensis* y *N. dressleriana* es más gruesa que en la adaxial. Una situación contraria se encuentra en *N. graminifolia* y *N. striata* cuyas cutículas abaxiales son más gruesas que las adaxiales (Cuadro 4).

**Epidermis.** En sección transversal las células de todas las especies estudiadas son de forma rectangular o cuadrada en ambas superficies epidérmicas (Fig. 1.6. A-B; Cuadro 4), con paredes anticlinales rectas de igual grosor y las paredes periclinales externas ligeramente más engrosadas, convexas o planas. Las especies de *Isochilus* presentan las células más pequeñas, mientras que *H. guerrerensis* tiene las células más grandes, pero ningún miembro de la subtribu Ponerinae tiene células epidérmicas tan grande como *B. purpurea* (Cuadro 1.3). Las células de la epidermis adaxial son más grandes que en la superficie abaxial, excepto en *B. purpurea* donde es a la inversa (Cuadro 3). En *B. purpurea* las células epidérmicas en la superficie abaxial tienden a ser algo elípticas porque tienen las paredes periclinales convexas de domos altos (Fig. 1.6. C).

En la superficie adaxial se presentan células buliformes, en la zona correspondiente a la vena de mayor diámetro, las cuales son células rectangulares, anticlinalmente alargadas, presentes en *N. graminifolia*, *N. striata* y *P. juncifolia* (Fig. 1.6.D).

**Cuadro 1.3.** Grosor de la cutícula y dimensiones de las células adaxiales y abaxiales.

Especie	Cutícula adaxial ( $\mu\text{m}$ )	Cutícula abaxial ( $\mu\text{m}$ )	Alto/ancho de las células adaxiales ( $\mu\text{m}$ )	Alto/ancho de las células abaxiales ( $\mu\text{m}$ )	No. fibras no vasculares por $\text{mm}^2$
<i>H. guerrerensis</i>	8.0 $\pm$ 1.80	7.5 $\pm$ 1.3	29.7 $\pm$ 3.81 43.4 $\pm$ 7.42	33.2 $\pm$ 3.49 44.6 $\pm$ 5.93	17
<i>I. alatus</i>	4.4 $\pm$ 1.54	4.7 $\pm$ 0.58	13.2 $\pm$ 4.26/ 25.3 $\pm$ 1.63	15.0 $\pm$ 3.16/ 24.4 $\pm$ 4.12	276
<i>I. carnosiflorus</i>	4.1 $\pm$ 1.06	3.3 $\pm$ 0.70	16.2 $\pm$ 3.01 32.5 $\pm$ 4.53	10.9 $\pm$ 1.28 22.1 $\pm$ 1.90	310
<i>I. langlassei</i>	4.0 $\pm$ 0.50	3.2 $\pm$ 0.68	16.6 $\pm$ 2.47 27.7 $\pm$ 3.52	12.52 $\pm$ 1.69 18.9 $\pm$ 2.08	517
<i>I. latibracteatus</i>	4.5 $\pm$ 0.72	4.5 $\pm$ 0.86	13.1 $\pm$ 2.58 26.4 $\pm$ 3.20	10.6 $\pm$ 1.26 20.3 $\pm$ 2.92	517
<i>N. dressleriana</i>	7.2 $\pm$ 0.67	6.3 $\pm$ 0.87	24.9 $\pm$ 1.82 32.7 $\pm$ 5.23	26.5 $\pm$ 2.18/ 6 $\pm$ 2.27	52
<i>N. graminifolia</i>	10.7 $\pm$ 1.09	11.5 $\pm$ 2.09	23.8 $\pm$ 3.19 27.0 $\pm$ 3.94	30.2 $\pm$ 3.30 28.8 $\pm$ 2.42	155
<i>N. striata</i>	7.8 $\pm$ 1.19	8.9 $\pm$ 1.57	19.7 $\pm$ 2.54 27.9 $\pm$ 3.26	22.4 $\pm$ 3.37 27.1 $\pm$ 3.07	94
<i>P. juncifolia</i>	4.8 $\pm$ 1.04	5.0 $\pm$ 1.25	25.6 $\pm$ 3.66 34.8 $\pm$ 5.84	13.0 $\pm$ 2.55 24.7 $\pm$ 3.16	172
<i>B. purpurea</i>	4.8 $\pm$ 1.18	4.5 $\pm$ 1.48	47.9 $\pm$ 11.32 56.2 $\pm$ 7.23	61.6 $\pm$ 17.70 58.0 $\pm$ 18.53	-
<i>E. nocturnum</i>	7.2 $\pm$ 1.59	6.3 $\pm$ 0.90	26.9 $\pm$ 6.32 47.0 $\pm$ 7.83	22.01 $\pm$ 5.04 37.0 $\pm$ 7.30	-



**Figura 1.6.** Células epidérmicas, mesofilo y haces vasculares. **A.** *I. latibracteatus*, células rectangulares y cutícula delgada (adax.). **B.** *N. dressleriana*, células cuadradas con cutícula muy gruesa (adax.). **C.** *B. purpurea*, células elípticas con cutícula delgada (abax.). **D.** *N. striata*, células buliformes. **E.** *I. latibracteatus*, mesofilo esponjoso. **F.** *P. juncifolia*, fibras no vasculares dispersas en el mesofilo. **G.** *N. striata*, fibras no vasculares, luz polarizada. **H.** Mesofilo bifacial con parénquima empalizada conspicuo, dos estratos de haces vasculares y cuatro estratos de haces de fibras no vasculares. **I.** *B. purpurea*, haz vascular colateral de la vena de mayor grosor. Abreviaturas: CB= células buliformes. FNV= fibras no vasculares. HFNV= haces de fibras no vasculares. HV= haces vasculares. Escala: A= 10 µm; B, C, E, F, G= 20 µm; D= 100 µm; H= 200 µm; I= 50 µm.

**Mesofilo.** Es homogéneo, excepto *Nemaconia* y *E. nocturnum* que tienen mesofilo bifacial. El parénquima de las especies de la subtribu Ponerinae y *B. purpurea* es compacto y está formado por 5 a 10 estratos de células clorenquimatosas de paredes delgadas (Fig. 1.6. E-F). Los primeros 2 ó 3 estratos adaxiales a veces tienen células más grandes que los demás estratos. El parénquima en empalizada de *Nemaconia* tiene una a dos capas de células alargadas anticlinalmente que ocupa un tercio de todo el mesofilo en *N. graminifolia* y *N. striata* (Fig. 1.6. D) y algo más cortas en *N. dressleriana*.

El mesofilo de *E. nocturnum* consta de cinco a seis estratos de parénquima en empalizada laxo, que ocupa poco más de la mitad del mesofilo y conformado por 10 a 13 estratos de parénquima esponjoso que decrece hacia la epidermis abaxial (Fig. 1.6. H).

**Fibras no vasculares.** Las fibras no vasculares sólo están presentes en los miembros de la subtribu Ponerinae y en *E. nocturnum*, pero no en *B. purpurea*. En Ponerinae estas fibras son solitarias y se distribuyen generalmente debajo de la epidermis adaxial y están dispersas en el mesofilo sin alcanzar la epidermis abaxial (Fig. 1.6. E-F), excepto en *Isochilus* donde las fibras no vasculares se localizan en todo el mesofilo. Las fibras no vasculares tienen forma angular y paredes lignificadas que varían de moderadamente gruesas a muy gruesas (Fig. 1.6. G), con lumen de reducido a amplio y de un tamaño que puede alcanzar incluso el de las células del parénquima. La frecuencia de estas fibras es muy variable entre las especies de la subtribu; por ejemplo, son abundantes (172-517/ mm<sup>2</sup>) en las especies de *Ponera* e *Isochilus*, pero menos abundantes (< 155/ mm<sup>2</sup>) en *H. guerrerensis* y en *Nemaconia* (Cuadro 1.3).

En *E. nocturnum* las fibras no vasculares forman cuatro estratos de haces más o menos del mismo tamaño alternando entre cada par; dos hacia la superficie adaxial que están inmersos en el parénquima en empalizada, y dos más cerca de la superficie abaxial, éstos últimos incluidos en el parénquima esponjoso (Fig. 1.6. H). Las fibras que los conforman son más pequeñas y presentan paredes gruesas y el lumen angosto.

**Haces vasculares.** Los haces vasculares de todas las especies estudiadas son colaterales. En los representantes de la subtribu Ponerinae y en *B. purpurea* hay desde 15 hasta 40 haces vasculares por lámina foliar, incluyendo el haz central (que es generalmente más grande que todos los demás). Todos los haces están distribuidos en la parte media del

mesófilo y en un solo estrato. Cada haz vascular tiene una vaina de fibras agrupadas en los polos adaxial-abaxial del haz (Fig. 1.6. I), con células xilemáticas entremezcladas con parénquimáticas hacia el centro del haz y células del floema concentradas, asociadas al polo abaxial de fibras.

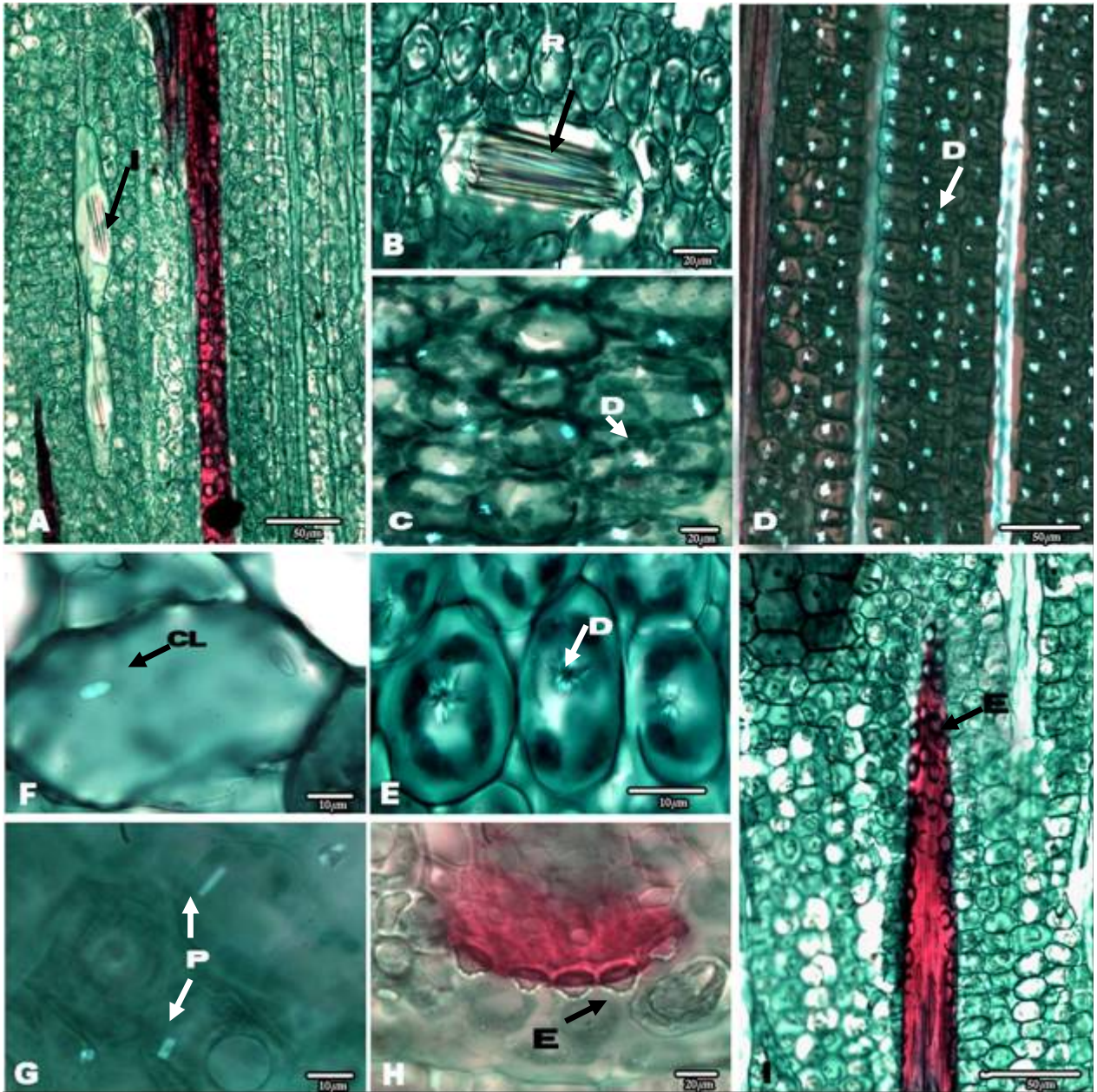
En *E.nocturnum* existen dos estratos de haces vasculares en la parte media del mesófilo, el primero está inmerso en el parénquima en empalizada y tiene haces vasculares pequeños (aproximadamente 70  $\mu\text{m}$  de diámetro) todos casi del mismo tamaño. El segundo estrato está localizado en la transición del parénquima en empalizada al esponjoso y presenta haces vasculares que se alternan en tamaño, unos pequeños y otros más grandes (50 a 140  $\mu\text{m}$  de diámetro) Fig. 1.6. H.

**Inclusiones celulares.** En las especies estudiadas se presentan inclusiones celulares de oxalato de calcio, incluyendo formas como rafidios, drusas, prismas y lenticulares, así como silicatos en forma de estegmata. Los rafidios se encuentran en todas las especies estudiadas, dispersos en el mesófilo, como idioblastos (Fig. 1.7. A). En las especies de *Nemaconia* y en *P. juncifolia*, los idioblastos son muy notables cuando se observan en los cortes transversales, mientras que en el resto de las especies éstos son pequeños y escasos, y sólo se observan en los cortes paradermales, ubicándolos mediante luz polarizada (Fig. 1.7. B).

Las drusas existen en Ponerinae, pero no en *B. purpurea* y *E.nocturnum*. En Ponerinae las drusas son muy abundantes, se localizan en todas y cada una de las células del mesófilo (Fig. 1.7. C-E). Los cristales lenticulares se encuentran en *H. guerrerensis*, *N. striata*, *P. juncifolia* en abundancia moderada y en *E. nocturnum* son muy abundantes (Fig. 1.7. F).

*B. purpurea* tiene unos cristales de forma intermedia entre los prismas y los estiloides, ya que son cristales con las puntas romas como las de los prismas pero son más alargados y estrechos que las formas convencionales de los prismas. Dichos cristales son escasos y únicamente se observan en las células del parénquima que rodean a los haces vasculares (Fig. 1.7. G). En todas las especies bajo estudio se encontraron estegmatas cónicos, en las células asociadas a fibras de los dos polos del haz vascular (Fig. 1.7. H-I).





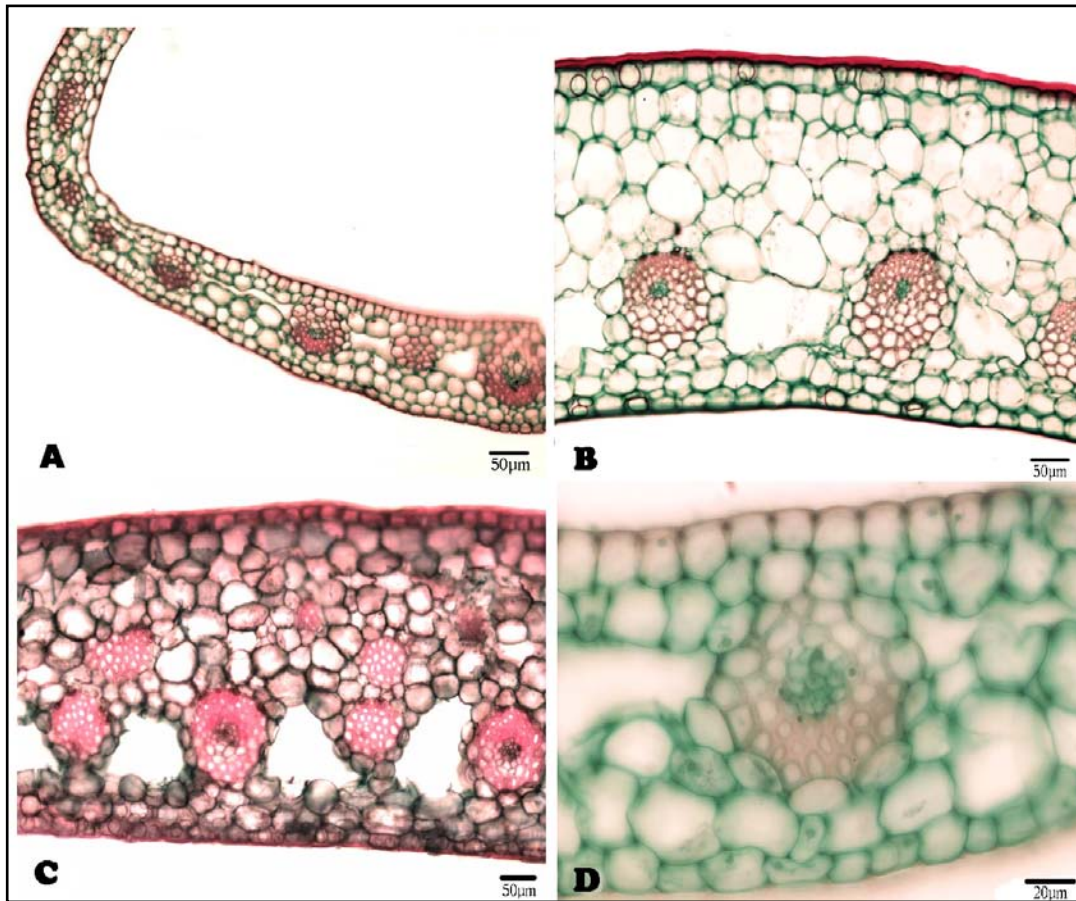
**Figura 1.7.** Inclusiones celulares. Microscopía de luz. **B, E, F, G,** cortes transversales. **A, C, D, I** cortes paradermales. **A** *I. langlassei*, idioblastos con rafidios. **B.** *I. latibracteatus*, detalle de rafidios en luz polarizada. **C.** *I. alatus*, abundantes drusas observadas en luz polarizada. **D.** *H. guerrerensis*, drusas en luz polarizada. **E.** *I. latibracteatus*, detalle de drusas. **F.** *E. nocturnum*, cristal lenticular en luz polarizada. **G.** *B. purpurea*, cristales en luz polarizada. **H.** *I. langlassei*, detalle de estegmata. **I.** *I. carnosiflorus*, estegmata en las fibras vasculares. Abreviaturas: CL= cristal lenticular, D= drusas, E= estegmata, P= prismas, R= rafidios. Escala: A, D, F= 50  $\mu\text{m}$ ; B, C, E, G, H= 20  $\mu\text{m}$ .

## ANATOMÍA DE LAS VAINAS FOLIARES

En los cortes transversales de las vainas foliares, los tejidos y su organización son muy semejantes a los de la lámina foliar. Las células epidérmicas son de forma rectangular o cuadrada y el mesofilo consta de 6 a 15 estratos celulares y presentan drusas como inclusiones celulares, excepto en *Nemaconia*, *H. guerrerensis*, *B. purpurea* y *E. nocturnum*. En el mesofilo de la mayoría de las especies se observan espacios lisesquizógenos de varios tamaños, entre los haces vasculares, excepto en *I. alatus*, *I. langlassei* y *P. juncifolia*. (Fig. 1.8. A).

Los haces vasculares se presentan en la parte media del parénquima, en un solo estrato en las especies de Ponerinae, en *B. purpurea* se localizan hacia la superficie abaxial (Fig. 1.8 C) y en *E. nocturnum* hay dos estratos de haces, uno de haces vasculares alternando con haces de fibras no vasculares y otro exclusivamente de haces de fibras no vasculares (Fig. 1.8. D).

En todas las especies estudiadas los haces vasculares de las vainas foliares tienen un casquete de cuatro o cinco estratos de fibras en el polo abaxial, asociado a un haz de células floemáticas y el resto del haz lo conforman una mezcla de células del xilema y de parénquima (Fig. 1.8.E).



**Figura 1.8.** Anatomía de las vainas foliares en las especies estudiadas. **A.** *N. dressleriana*. **B.** *B. purpurea*, haces vasculares hacia la superficie abaxial. **C.** *E. nocturnum*, dos estratos de haces. **D.** *I. carnosiflorus*, haz vascular con un casquete de fibras. Escala: A, B, C= 50 µm; E= 20 µm.

## DISCUSIÓN

Anatómicamente las hojas de la subtribu Ponerinae son relativamente homogéneas, pero existen un conjunto de características que permiten la distinción entre los géneros, pero no entre especies. *B. purpurea* y *E. nocturnum* son en su anatomía foliar distintivas de los miembros de la subtribu Ponerinae.

CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LA SUBTRIBU PONERINAE. Las fibras no vasculares y la presencia de drusas son dos características que se encontraron en todos los miembros estudiados de la subtribu Ponerinae y se esperaría que también estén presentes en

las especies restantes. Ambos caracteres podrían interpretarse como sinapomorfias del grupo. Las drusas son cristales comunes en dicotiledóneas, pero raros en las monocotiledóneas. Particularmente en las orquídeas los reportes de drusas son pocos, y solo se han hallado de manera escasa o moderadamente abundantes en el mesofilo de las hojas de la mayoría de las especies de *Dendrobium* sección *Rhizobium* (Stern *et al.*, 1994) y de algunas especies de los géneros *Aspasia*, *Miltonia*, *Miltoniodes*, *Notylopsis*, *Odontoglossum*, *Oncidium* y *Sigmatostalix* (Sandoval, en prep. ). La presencia de una drusa en cada una de las células del mesofilo de los representantes de Ponerinae, representa un hallazgo nuevo a nivel de la familia Orchidaceae.

Las fibras no vasculares son solitarias, intercaladas en el mesofilo y tienen un diámetro amplio (15-40  $\mu\text{m}$ ). En las orquídeas generalmente las fibras no vasculares están ausentes o se encuentran agrupadas formando paquetes de fibras, llamados haces de fibras no vasculares, los cuales son de diferente tamaño, forma y posición en el mesofilo (Pridgeon, 1994; Holltzmeier *et al.*, 1998; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001). Sin embargo, existen reportes escasos de fibras no vasculares solitarias distribuidas en todo el mesofilo, en las hojas de las especies orquidoides *Litrostachys pertusa* y *Cystorchis aeschernomii* y las epidendroides *Angraecum subulatum* (Olatunji y Nengim, 1980) y *Aranda* (Arditti, 1992)

*Isochilus* y *P. juncifolia* comparten la presencia de células con paredes periclinales convexas de domos bajos y los aparatos estomáticos anomocíticos, superficiales, con el poro estomático elíptico. Al parecer, la única característica que distingue a *Isochilus* de *P. juncifolia* es la presencia de fibras no vasculares inmersas en todo el mesofilo, pero para confirmar si es una característica constante tendrían que realizarse más observaciones.

El género *Nemaconia* y *H. guerrerensis* comparten las células epidérmicas adaxiales de forma poligonal y las células epidérmicas de mayor tamaño. Sin embargo, *Nemaconia* se distingue de *H. guerrerensis* y de los demás géneros, por la presencia de los estomas encriptados, tetracíticos y el parénquima en empalizada de dos a tres estratos. Estos estomas sólo se habían descrito en *N. striata* (Rasmussen, 1987), y en este trabajo también se hallaron en otras dos especies del género, y a reserva de encontrarlas en las especies restantes del grupo, se sugiere que los estomas hundidos son una sinapomorfia para el género.

*B. purpurea* y *E. nocturnum* son diferentes a los miembros de la subtribu Ponerinae, pero también comparten características con éstos. *B. purpurea* como representante del linaje hermano de Ponerinae, presenta varias características comunes, como las formas de las células epidérmicas y del mesofilo, el arreglo de los haces vasculares y la presencia de la estructura de cera epicuticular costra. No obstante presenta características distintivas que son las células epidérmicas abaxiales de forma poligonal con la pared periclinal convexa de domos altos con ornamentación irregularmente reticulada, los aparatos estomáticos diacíticos y cristales de forma intermedia entre los prismas y los estiloides. *E. nocturnum* difiere por la presencia de células epidérmicas poligonales en ambas superficies, con paredes periclinales cóncavas, rugosas con pliegues horizontales y el mesofilo bifacial con un parénquima en empalizada muy desarrollado con varios estratos de haces de fibras no vasculares y vasculares.

CARACTERÍSTICAS COMPARTIDAS CON OTROS REPRESENTANTES DE ORCHIDACEAE. Algunas de las características que se encontraron en las especies estudiadas de la subtribu Ponerinae son comunes en la mayoría de los representantes de la familia Orchidaceae, como la forma de las células epidérmicas (Pridgeon, 1994; Morris, 1996; Stern y Judd, 2001; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001), la localización de los estomas en la superficie abaxial de las hojas, la presencia de rafidios (Morris, 1996; Holttzmeier *et al.*, 1998; Pridgeon, 1994; Sandoval-Zapotitla, 2001; Stern *et al.*, 1993; Stern, 1997) y de estegmatas (Møller y Rasmussen, 1984).

En la familia Orchidaceae a pesar de que los estudios donde se han examinado las ceras epicuticulares son escasos, Barthlot y Frolich (1983, en Salazar 1998), al estudiar la cera epicuticular de cerca de 1000 especies, concluyen que la familia se caracteriza por la ausencia de cristaloides de cera epicuticular y que cuando se presentan son cristaloides no orientados en forma de bastones o escamas. Salazar (1998) examinó la cera epicuticular de *Mormodes* sección *Coryodes* encontrando que las especies con hojas no glaucas tienen una cubierta lisa y continua de cera epicuticular. Sobre esta cera hay gránulos poco definidos. Las hojas glaucas de dichas especies tienen una estructura más compleja, que consiste tanto de escamas (denominadas aquí costras) no orientadas como de escamas verticales. En la subtribu Ponerinae, *B. purpurea* y *E. nocturnum* se encontraron dos estructuras de ceras epicuticulares

(costras y placas), pero existe diversidad en su abundancia y distribución en las dos superficies epidérmicas, lo cual no se cuantificó en este estudio.

Se hallaron varios tipos de cristales de oxalato de calcio (rafidios, drusas, prismas y los intermedios entre los estiloides y prismas) en esta subtribu que es relativamente pequeña en especies, si se compara con otras subtribus que comprenden la subfamilia Epidendroideae, donde se han encontrado menos tipos de cristales (i.e. Pleurothallidinae. Pridgeon, 1982; Catasetinae. Stern y Judd, 2001; Oncidiinae. Stern y Carlswald, 2006). En las orquídeas no se han registrado estiloides y sólo hay un reporte de prismas en los tallos de *Plathythelys vaginata* (Stern *et al.*, 1993). Los cristales lenticulares incluidos en las células del mesofilo de *H. guerrerensis*, *N. striata*, *P. juncifolia* y *E. nocturnum*, no se habían reportado en algún otro grupo de orquídeas hasta el momento.

A continuación se discuten algunas de las características anatómicas foliares en el contexto de su posible papel funcional y ecológico.

**Cutícula.-** Entre las principales funciones de la cutícula se mencionan: el control de la transpiración junto con los estomas, el control de la ganancia y pérdida de agua, iones, solutos orgánicos polares y gases, el transporte de compuestos lipofílicos con baja volatilidad y actuar como una barrera contra el ataque de patógenos (Martín y Juniper 1970; Jeffrey, 2006). La cutícula usualmente es más gruesa en plantas que viven en hábitats secos y expuestas a altas intensidades de luz (Martín y Juniper 1970).

Las plantas de *Nemaconia* habitan en lugares secos (*N. dressleriana*) o desde ambientes secos hasta muy húmedos (*N. striata*) y tienen las cutículas más gruesas que todas las especies estudiadas; mientras que *H. guerrerensis* crece en bosques mesófilos de montaña donde hay una gran cantidad de humedad ambiental casi todo el día y durante muchas horas. Por otra parte, *E. nocturnum* vive en una amplia gama de hábitats, desde bosques tropicales húmedos, hasta manglares y sabanas. Los hábitats de las últimas dos especies son menos restrictivos en la disponibilidad de humedad y presentan cutículas menos gruesas que en *Nemaconia*. Todas estas especies tienen plantas robustas con muchas hojas perennes, con gran área foliar expuesta a la desecación por lo que requieren una protección adicional (como la cutícula), para resistir a los períodos de sequía y así maximizar el área foliar y minimizar la evapotranspiración. En cambio, las especies restantes tienen cutículas más delgadas. *Isorchilus* y *Ponera* son plantas cespitosas, más delicadas y de tallos pequeños, con hojas igualmente

más delgadas con menor superficie foliar expuesta a la desecación. *B. purpurea* es la única especie terrestre estudiada con hojas decíduas durante la época seca y cormos subterráneos que funcionan como órganos de almacenamiento.

**Ceras epicuticulares.-** Las ceras epicuticulares le confieren a la hoja la capacidad de reducir la pérdida de agua por evaporación, controlar la transpiración y el intercambio de gases, controlar la temperatura bajo insolación, atenuar la radiación solar de onda corta, proteger contra la congelación, repeler el agua y evitar la fijación de algunos microorganismos y contaminantes (Barthlott, 1990; Jeffree, 2006). La conservación del agua en la planta o la repelencia de ésta por la superficie epidérmica, dependen de la condición hidrofílica o hidrofóbica de la superficie y la generación de cierta irregularidad en la superficie, debido a la presencia de las ceras epicuticulares. Las ceras epicuticulares ofrecen distintos ángulos de contacto entre la superficie foliar y las gotas de agua (Barthlott, 1990). En *H. guerrerensis* e *I. alatus*, que habitan lugares con humedad relativa constante y elevada durante casi todo el día, es posible que la abundante cera epicuticular en la superficie abaxial, no desempeña un papel relevante en la conservación del agua sino tiene la función antagonista, que es repeler el agua para evitar que las hojas estén permanentemente mojadas. Por otro lado, en *Nemaconia*, *B. purpurea*, y *E. nocturnum* las ceras epicuticulares tal vez actúan como una barrera que evita la pérdida de agua por evaporación.

*Ponera* crece en bosque de pino-encino a veces muy fríos y presenta costras de abundancia moderada en ambas superficies epidérmicas, que pueden actuar para conservar el agua o para proteger de la congelación.

**Aparatos estomáticos.-** Constituyen el mecanismo homeostático que regula la absorción de CO<sub>2</sub> y la pérdida de agua, mediante la apertura y cierre del poro estomático (Bidwell, 1979). Todas las especies de la subtribu Ponerinae presentan características xeromórficas como los rebordes cuticulares encima de las células oclusivas, frecuentemente encontradas en los estomas de las orquídeas (Rasmussen, 1987), pero además en *Nemaconia* hay rebordes cuticulares sobre las células subsidiarias y la presencia de estomas encriptados, los cuáles evitan la pérdida de agua de la planta por evapotranspiración.

**Parénquima en empalizada.-** Una de las modificaciones en los tejidos internos de las hojas de las plantas xerófitas, es el desarrollo del parénquima en empalizada, que se

considera como una adaptación a la alta radiación a la que está sometida las plantas y por lo tanto, protege a los tejidos internos (Shields, 1950). En *Nemaconia* el parénquima en empalizada no está tan desarrollado como en *E.nocturnum*, ya que esta última crece en los claros de las selvas en ambientes muy soleados en ramas muy expuestas a la luz.

**Fibras no vasculares.-** Entre las funciones que se le han adjudicado al esclerénquima en las hojas de las orquídeas resaltan dos. Holltzmeier *et al.* (1998) propusieron que cuando hay escasez de tejido almacenador de agua y esclerénquima abundante, éste reduce el daño a los tejidos durante el estrés hídrico principalmente cuando los haces de fibras están confinados a los estratos superiores e inferiores de la hoja. Pero si los haces de fibras no vasculares están dispersos en el mesofilo, entonces proporcionan además soporte adicional en las especies donde el tejido almacenador de agua es abundante. Por tales motivos, parece que en los miembros de la subtribu Ponerinae, las fibras no vasculares podrían tener ambas funciones, porque se localizan debajo de la superficie epidérmica adaxial y están dispersas en el mesofilo. Las hojas de *Ponera* e *Isochilus* tienen más fibras no vasculares que las de los demás géneros, presuntamente para proporcionarles sostén a las hojas que son más delgadas y finas.

**Inclusiones celulares.-** Debido a que hay una gran diversidad de formas y distribución de los cristales de oxalato de calcio, existen varias hipótesis respecto a su función en las plantas y aunque la evidencia todavía no es satisfactoria, ésta se ha ido acumulando para apoyar como posibles funciones: la regulación del calcio, la protección o defensa contra los herbívoros y la detoxificación de metales, principalmente de aluminio y ácido oxálico (Prychid y Rudall, 1999; Webb, 1999; Franceschi y Nakata, 2005;). Sin embargo, en la subtribu Ponerinae no se conoce el o las posibles funciones de los cristales de oxalato de calcio, lo que resultaría interesante estudiar por la abundancia de las drusas en las células del mesofilo.

## CONCLUSIONES

Las fibras no vasculares dispersas en el mesofilo y las drusas presentes en tal abundancia (una por cada célula del mesofilo) se registran por primera vez para la subfamilia Epidendroideae y tal vez son las sinapomorfias de la subtribu Ponerinae. Los miembros de la subtribu Ponerinae comparten más características anatómicas con *B. purpurea* que es el representante de su grupo hermano que con *E.nocturnum* que resultó ser la especie más



diferente. *P. juncifolia* es más parecida a *Isochilus* que a *Nemaconia*, pero no existen características anatómicas foliares contundentes que la separen de *Isochilus*.

## LITERATURA CITADA

- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley and Sons, Inc. E. U. A. 691.
- Baker, M.A. 1972. Foliar anatomy of the Laeliinae (Orchidaceae). Tesis de doctorado. Washington University, St. Louis Missouri.
- Barthlott, W. 1990. Scanning electron microscopy of the epidermal surface in plants. En: D. Claugher (Ed.), *Scanning Electron Microscopy in Taxonomy and functional morphology*. The Systematics Association Special Volume No. 41. Clarendon Press. Oxford.
- Barthlott, W., Ch. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen y H. Wilhelmi. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of Linnean Society* 126: 237-260.
- Barthlott, W. y D. Hunt. 2000. Seed-diversity in the Cactaceae subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research*. Vol 5.
- Bidwell, R.G.S. 1979. *Fisiología vegetal*. 2ª edición. A.G.T. Editor. México, D.F. 349-374.
- Chase, M. W, J. V. Freudestein, K. M. Cameron y R. L. Barrett. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. En: Dixon K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett and P. J. Cribb (Eds.). *Orchid Conservation*. pp. 69-89. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.
- Dressler, R. 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchids Family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Franceschi, R. V. y P. A. Nakata. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annu. Rev. Plant. Biol* 56: 41-71.
- Holltzmeier, M. A., L. Stern y W. S. Judd. 1998. Comparative anatomy and systematics of Sengha's cushion species of *Maxillaria*. *Botanical Journal of Linnean Society* 127: 43-82.
- Jeffree, E. C. 2006. The fine structure of the plant cuticle. En: Riederer, M. y C. Muller (Eds.) *Biology of the Plant Cuticle*. Oxford, Reino Unido.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. MacGraw-Hill. New York.
- Martin, J. T. y B. E. Juniper. 1970. *The Cuticles of Plants*. Edward Arnold Ltd. Edimburgo.

- Metcalf, C.R. y L. Chalk. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons*. I. Oxford University Press. New York.
- Möbius, M. 1887. Über den anatomischen Bau der Orchideenblätter und dessen Bedeutung für das System dieser Familie. *Jahrbücher (Pringsheim) für wissenschaftliche Botanik* 18: 530-607.
- Møller, J. D. y H. Rasmussen. 1984. Stigmata in Orchidales: character state distribution and polarity. *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 53-76.
- Olantunji, O.A. y R.O. Nengim. 1980. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in Orchidaceae. *Botanical Journal of Linnean Society* 80: pp. 357-370.
- Pridgeon, A.M. 1982. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 69: 921-938.
- Pridgeon, A. M. 1994. Systematic leaf anatomy of Caladeniinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 114: 31-48.
- Prychid, J. Ch. y P. Rudall. 1999. Calcium oxalate in Monocotyledons: A review of their structure and Systematics. *Annals of Botany* 84: 725-739.
- Rasmussen, H. 1987. Orchid stomata-structure, differentiation, function, and phylogeny. En: J. Arditti (ed.) *Orchid Biology: Reviews and perspectives*, IV. pp. 105-138. Cornell University Press. Ithaca y Londres..
- Salazar, G. A. 1998. Sistemática de *Mormodes* sección Coryoides (Orchidaceae, Catasetinae). Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM.
- Sandoval-Zapotitla, E. y T. Terrazas. 2001. Leaf anatomy of 16 taxa of the *Trichocentrum* clade (Orchidaceae: Oncidiinae). *Lindleyana* 16:81-93
- Shields, M. L. 1950. Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. *The Botanical Review* 16(8): 399-432.
- Soto, A. M. 2005. Ponerinae. En: Pridgeon A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F. N. Rasmussen (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendroideae*. 1. Vol. 4. Oxford University Press.
- Stern, W. L., M. W. Morris y M. S. Judd. 1993. Comparative vegetative anatomy and Systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 113: 161-.
- Stern, W. L., M. W. Morris y M. S. Judd. 1994. Anatomy of the thick leaves in *Dendrobium* section *Rhizobium* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Science* 155(6): 716-729.

- Stern, W. L. y W. S. Judd. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 125: 211-227.
- Stern, W. L. y B. S. Carlswald. 2006. Comparative vegetative anatomy and systematics of the Oncidiinae (Maxillarieae, Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 152: 91-107.
- van den Berg, C., W.E. Higgins, R.L. Dressler, W.M. Whitten, M.A. Soto Arenas, A. Culham y M.W. Chase. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15: 96-114.
- Webb, M.A. 1999. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *The Plant Cell* 11: 751-761.
- Williams, N. H. 1979. Subsidiary cells in the Orchidaceae: their general distribution with special reference to development in the Oncidieae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 41-66.

## CAPÍTULO 2.

### ESTUDIO ANATÓMICO DE LAS MARCAS FOLIARES DE PONERINAE.

#### RESUMEN

En este estudio se examinó la estructura macromorfológica y anatómica de las marcas y la prominencia media, presentes en la lámina foliar de todas las especies de Ponerinae, excepto en *H. guerrerensis*. Se tomaron láminas foliares de nueve especies de la subtribu que tienen una marca, dos, o que no la presentan como es el caso de *H. guerrerensis* y de dos especies pertenecientes a subtribus cercanamente relacionadas (*B. purpurea*: Blettinae y *E. nocturnum*: Laeliinae) y se prepararon para observarlas con el microscopio electrónico de barrido y de luz. Los cambios anatómicos encontrados en el área correspondiente a las marcas y la prominencia media sólo ocurrieron en la superficie epidérmica e incluyen una depresión transversal al eje principal de la hoja y un levantamiento del nivel de la lámina que bordea un área triangular, en el caso de las marcas y la prominencia media respectivamente. En ambos casos, los cambios anatómicos observados son, el acortamiento del tamaño de las células, la pérdida de la forma de las células y/o la presencia de células paredes anticlinales onduladas u oblicuas. Por otra parte, se hipotetiza el posible mecanismo de formación de dichas estructuras como el resultado de una presión de la región de absición y la muesca de una vaina precedente sobre la lámina subsiguiente durante el desarrollo de las hojas. Anatómicamente la marca se parece a la región de absición entre la vaina y la lámina foliar en las etapas tempranas de la diferenciación de la segunda, pero que en las etapas tardías es completamente diferente porque las hileras de células se comprimen totalmente y suceden una serie de modificaciones en los tejidos internos, como la formación de espacios en el parénquima entre los haces vasculares, originados por lisis y esquizogenia, los cuáles al parecer promueven la dehiscencia de la hoja.

# INTRODUCCIÓN

La lámina de la hoja de todas las especies de Ponerinae, excepto *H. guerrerensis*, tienen una o más marcas transversales rectas o en forma de cuña, localizadas aproximadamente a la mitad de la lámina o hacia el ápice. Además, en *Isochilus* y *Nemaconia* las marcas frecuentemente están asociadas a una área más o menos triangular, cóncavo-convexa, localizada por encima de las marcas.

La existencia de estas marcas ha pasado desapercibida en estudios anatómicos previos; por ejemplo Baker (1972) describió la anatomía foliar de 39 especies de la subtribu Laeliinae, donde antes se incluían las especies ahora consideradas como Ponerinae, en el cual incluyó a *Isochilus linearis* y (*Ponera*) *Nemaconia striata*, pero no mencionó nada referente a dichas marcas. Algunos trabajos taxonómicos como los de Österreich (1965) y Hamer (1981) han notado la existencia de las marcas, y consideraron que la forma y posición de las áreas asociadas a las marcas parecen ser específicas de cada especie de *Isochilus*. Recientemente Soto (2005) mencionó la presencia de las marcas y el área asociada a éstas en la descripción de la subtribu, indicando que podrían ser una sinapomorfía de Ponerinae.

No existen información sobre la naturaleza de las marcas de la lámina foliar, por lo que en este capítulo las preguntas a responder son las siguientes: 1) ¿qué son las marcas en las hojas? y 2) ¿cómo se originan las marcas y el área cóncavo-convexa?. El objetivo es determinar la anatomía de las marcas presentes en la lámina foliar en los diferentes géneros que comprenden la subtribu, así como investigar y proponer el posible mecanismo de formación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron hojas de nueve especies de la subtribu Ponerinae, a partir de material obtenido de ejemplares vivos mantenidos en cultivo en el Herbario AMO y en la colección particular del Dr. Gerardo A. Salazar (Apéndice 1).

Se colectaron tallos con hojas, se fijaron en FAA (formaldehído 10%, alcohol 50%, agua destilada 35% y ácido acético 5%) al menos durante 24 h y se cortaron los siguientes fragmentos de aproximadamente un centímetro de largo: 1) Fragmentos de tallos con la porción de las vainas foliares que incluyeran la región de abscisión y otros de las vainas foliares sin la región de abscisión, preservándolos en GAA (glicerina-etanol-agua destilada,

1:1:1), para reblandecer los tejidos. 2) Fragmentos de la lámina de las hojas en la zona de las marcas y la prominencia media y fuera de éstas. Estos se procesaron para microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz. Los fragmentos de las láminas con la marca, sin la marca y de las vainas foliares con la región de la abscisión se deshidrataron en una serie gradual de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%) y se sumergieron en acetona, colocándolos por aproximadamente 3 min en un sonicador y manteniéndolos así por 48 h, colocándolos luego en xilol por un lapso mínimo de 24 h para disolver las ceras epicuticulares. Los fragmentos deshidratados se secaron a punto crítico, se montaron en portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de doble cara de carbono y se cubrieron con una fina capa de oro para observarlos bajo un microscopio electrónico de barrido Hitachi F-2460N operado a 15 kV.

Debido a que las hojas que se utilizaron para observar la región de abscisión en el MEB se tomaron a diferentes alturas del tallo de la planta, se consiguió una secuencia de diferenciación de la región de abscisión, pudiendo detectar desde las etapas iniciales de diferenciación hasta las más avanzadas y observar los cambios ocurridos en las superficies epidérmicas adaxial y abaxial.

Las muestras de la lámina con y sin la marca y de las vainas foliares con y sin región de abscisión se cortaron transversalmente con un micrótopo rotatorio, obteniendo cortes de 50-60  $\mu\text{m}$  de grosor, se deshidrataron con etanol de gradación creciente y se tiñeron con safranina-verde rápido (Ruzin, 1999) y por último fueron montados con resina sintética. Las preparaciones se observaron en un microscopio de luz Olympus BX51.

## RESULTADOS

### MORFOLOGÍA DE LA MARCA EN LA LÁMINA FOLIAR MADURA

La hoja comprende dos regiones que son la vaina foliar tubular y la lámina, ambas separadas por la región de abscisión. La lámina de las hojas de *Isochilus*, *Nemaconia* y *Ponera*, tienen una o dos marcas, localizadas a diferentes alturas, denominadas aquí marca proximal y marca distal. De las especies estudiadas *H. guerrerensis*, *B. purpurea* y *E. nocturnum* no tienen marca (Fig. 1 A), *Isochilus langlassei*, *I. latibracteatus*, *N. dresslerianna* y *P. juncifolia* tienen una sola marca y el resto de las *Nemaconias* e *I. alatus* e *I. carnosiflorus* presentan dos marcas (Cuadro 1).

Las marcas se perciben mejor por el envés de las hojas, aunque a veces son difíciles de visualizar en ambas superficies y solo se observan cuando se mueven las hojas para cambiar la incidencia de la luz y algunas veces son más evidentes en ejemplares de herbario que en hojas frescas. En las láminas foliares de las dos especies de *Ponera* es difícil observar la marca, debido en parte a que las láminas son muy delgadas y la mayoría de las veces sólo se nota es una leve constricción de la lámina.

La marca proximal tiene forma de cuña (Fig. 2.1. C-F) y casi siempre está acompañada de una pequeña área cóncava en el haz y convexa en el envés, localizada por encima de la marca y asociada a la vena media, llamada aquí prominencia media. La prominencia media es una área de forma básicamente triangular en las especies de *Nemaconia* (Fig. 1E), deltada en *Isochilus alatus* e *I. carnosiflorus* (Fig. 2.1. F) y angostamente triangular en el resto de las especies de *Isochilus* (Fig. 2.1. A, D). En *Ponera*, la forma de la prominencia media es difícil de distinguir claramente porque las hojas son muy delgadas, siendo a veces algo elíptica y otras veces irregular (Fig. 2.1. B).

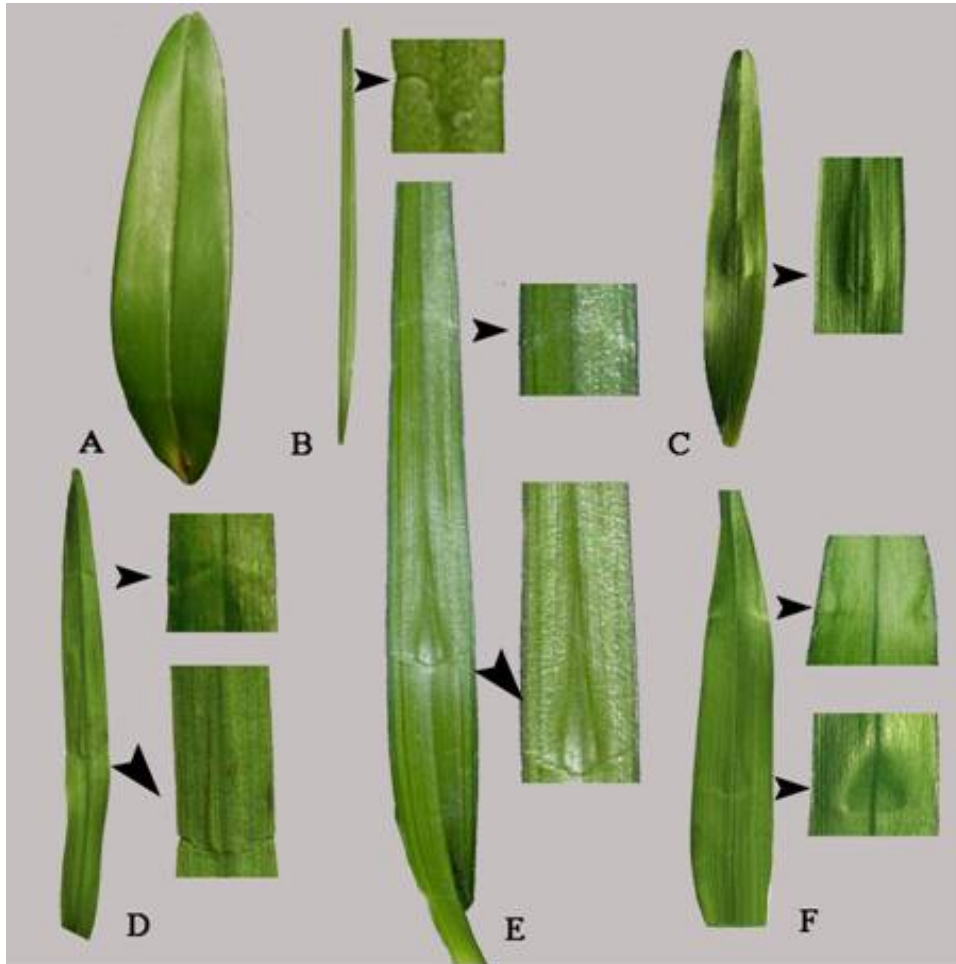
La marca distal tiene forma de cuña invertida en la mayoría de las especies de *Isochilus* y en todas las especies de *Nemaconia* y es mucho más difícil de distinguir que la marca proximal, pero en las hojas cercanas al ápice del tallo es posible observarla mejor (2.1. D-E). La marca distal de *Isochilus alatus* es diferente en su forma, casi solo se puede observar en material fresco, comprende un pequeño triángulo a cada lado en los márgenes de la hoja, ambos a la misma altura de la lámina (Fig. 2.1. F).

En las especies de *Isochilus* y *Nemaconia* (excepto *N. glomerata*) la marca proximal siempre se encuentra en el tercio medio de la lámina, y la distal en el caso de presentar dos marcas, siempre se localiza en el tercio distal. En *Ponera* la marca se localiza en el tercio distal de la lámina (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Especies de la subtribu Ponerinae, número de marcas, posición de las marcas en la lámina foliar y forma de la prominencia media. El asterisco (\*) indica las especies estudiadas anatómicamente.

Especie	No de marcas	Posición		Forma prominencia media
		Marca proximal	Marca distal	
* <i>H. guerrerensis</i> Dressler y Hágsater	0	-	-	-
* <i>I.s alatus</i> Schltr.	2	Tercio medio	Tercio distal	deltada
<i>I. aurantiacus</i> Hamer & Garay	1	Tercio medio	-	angostamente triangular
<i>I. bracteatus</i> (Llave y Lex.) Espejo ex. Salazar y Soto-Arenas	2	Tercio medio	Tercio distal	angostamente triangular
* <i>I. carnosiflorus</i> Lindl.	2	Tercio medio	Tercio distal	deltada
<i>I. chiriquensis</i> Schltr.	2	Tercio medio	Tercio distal	angostamente triangular
* <i>I. langlassei</i> Schltr.	1	Tercio medio	-	angostamente triangular
* <i>I. latibracteatus</i> A. Rich. y Galeotti	1	Tercio medio	-	angostamente triangular
<i>I. unilateralis</i> Robins.	1	Tercio medio	-	angostamente triangular
* <i>N. dressleriana</i> Soto Arenas	1	Tercio medio	-	triangular
<i>N. glomerata</i> Correll	2	Tercio proximal	Tercio distal	triangular
* <i>N. graminifolia</i> Knowles y Westc.	2	Tercio medio	Tercio distal	triangular
<i>N. longipetala</i> Correll	2	Tercio medio	Tercio distal	triangular
<i>N. pellita</i> Rchb. f.	2	Tercio medio	Tercio distal	triangular
* <i>N. striata</i> (Lindl.) van den Berg, Salazar y Soto Arenas	2	Tercio proximal y medio	Tercio distal	triangular
<i>P. exilis</i> Dressler	1	Tercio distal	-	elipsoide o irregular
* <i>P. juncifolia</i> Lindl.	1	Tercio distal	-	elipsoide o irregular



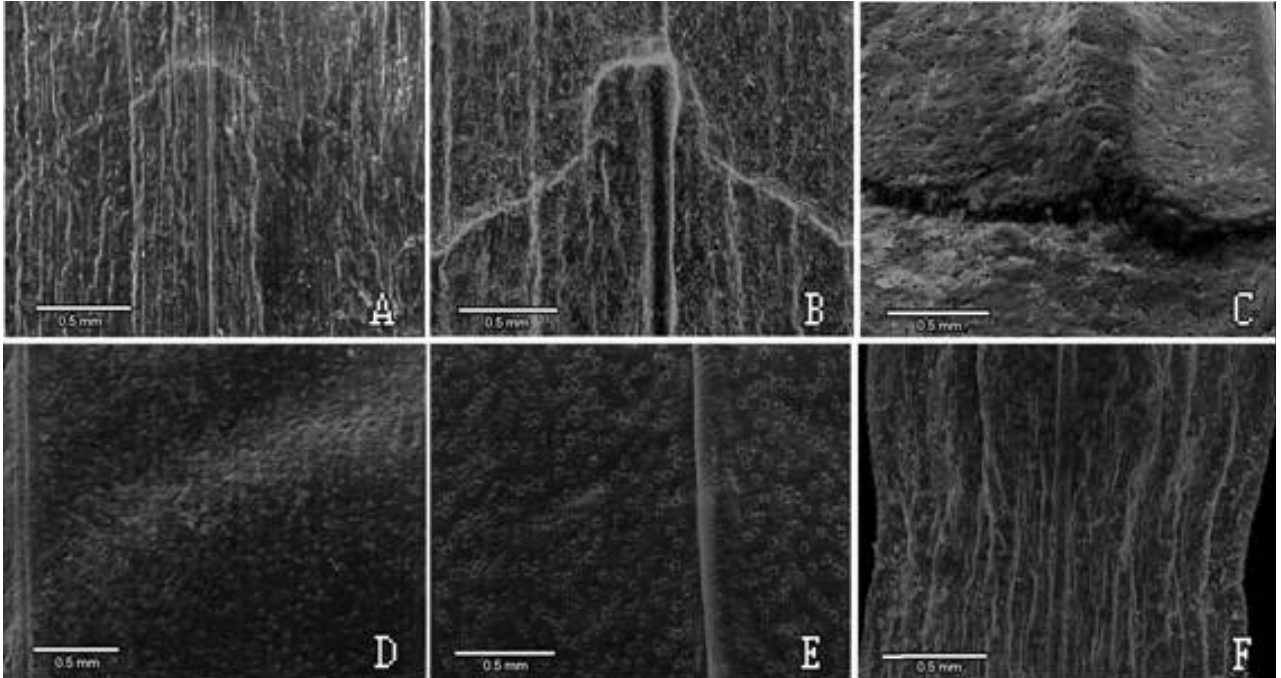


**Figura 2.1.** Estructura de la marca en láminas foliares de especies de Ponerinae. **A.** *H. guerrerensis*, lámina foliar sin marca. **B.** *Ponera juncifolia*, marca proximal. **C.** *I. aurantiacus*, marca proximal. **D.** *I. bracteatus*, con marca proximal y distal en forma de cuña. **E.** *N. striata*, con marca distal en forma de cuña invertida y la prominencia media triangular. **F.** *I. alatus*, con marca distal formada por dos triángulos.

#### MICROMORFOLOGÍA DE LA MARCA

Como ya se observó a nivel macromorfológico las marcas y la prominencia media en algunos casos se distinguen fácilmente y en otros apenas se visualizan. Esto también ocurre a nivel micromorfológico en las observaciones realizadas con ayuda del microscopio electrónico de barrido (Fig. 2.2). Si las marcas se observan a bajos aumentos en el MEB (45 ×), la marca proximal generalmente se aprecia de manera clara (Fig. 2A-C) o se observa como una leve depresión en *Ponera*, al igual que las marcas distales de todas las especies que las

presentan (Fig. 2.2. D-E). En *Ponera juncifolia* además se presentan algunos plegamientos de la lámina foliar en sentido paralelo a las venas y a los lados de la prominencia media que se localizan en el área circundante a la marca y la prominencia media (Fig. 2.2. F).



**Figura 2.2.** Marca y prominencia media en la superficie abaxial. **A-C.** Proximales, evidentes **A.** *I. langlassei*. **B.** *N. dressleriana*. **C.** *N. striata*. **D-E.** Distal poco evidente sin prominencia media. **D.** *I. carnosiflorus*. **E.** *N. graminifolia*. **F.** Marca con constricción de la lámina y prominencia media, *P. juncifolia*. Escala: 0.5 mm.

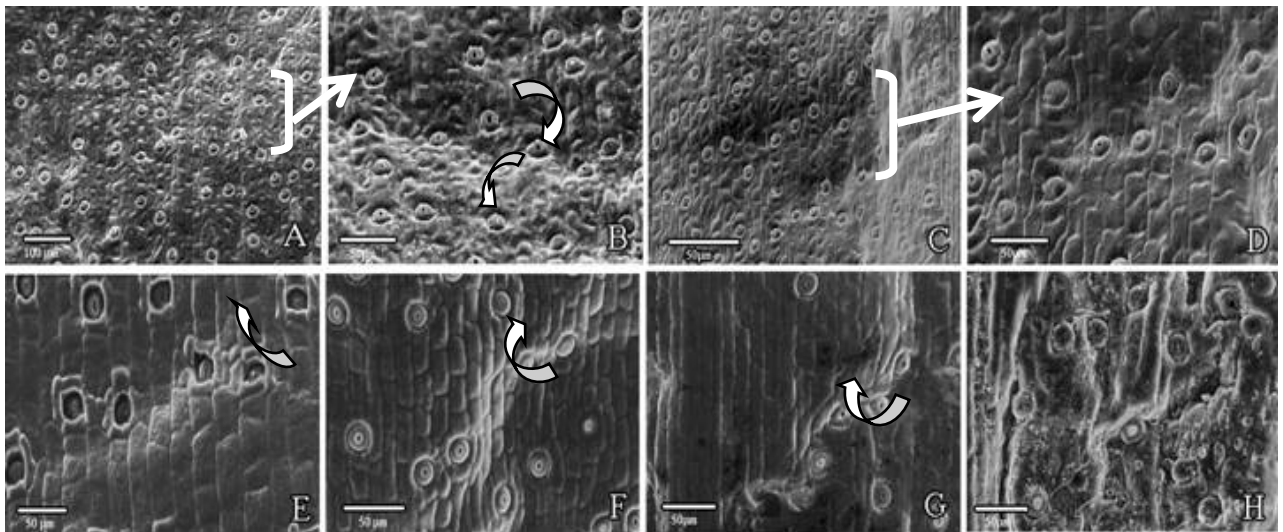
La marca es una depresión lineal de la lámina foliar en superficie abaxial, que abarca algunas hileras de células epidérmicas desde la vena media hasta los márgenes (Fig. 2.2. A-C). La prominencia media en la superficie abaxial es una elevación de la lámina foliar en el área circundante a la vena media, provocando que de la lámina sobresalga una forma más o menos definida de triángulo o elipse (Fig. 2.2. A-C).

A mayores aumentos se observaron los cambios en la forma de las células epidérmicas localizadas en la marca y la prominencia media (Fig. 2.3.). Se observó que las células epidérmicas ubicadas dentro de la depresión que constituye la marca son más cortas que las células fuera de la marca, además de presentar las paredes anticlinales algo onduladas u oblicuas cuando la profundidad de la depresión en la marca es leve o gradual (Fig. 2.3. D-E).

Si la depresión de la marca afecta pocas hileras (i.e. menos de 5) todas las células presentan los cambios antes mencionados (Fig. 2.3. A-B), pero si involucra más hileras los cambios ocurren sólo en las hileras ubicadas al inicio y final de la depresión (Fig. 2.3. C-F).

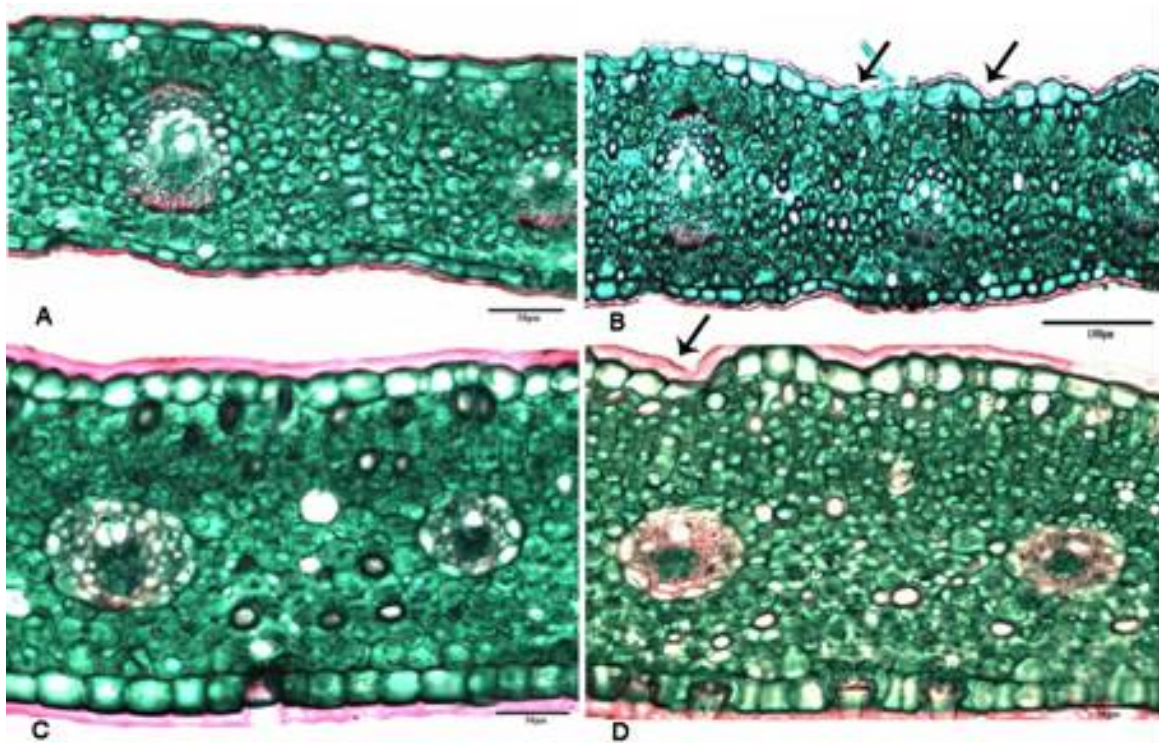
En la prominencia media la elevación de la lámina también puede ser somera y entonces las células son más cortas y las paredes anticlinales son onduladas u oblicuas, pero si la elevación es mayor y abrupta, se observa un cambio drástico de la forma de las células (Fig. 2.3. G), en las hileras de células que se levantan del nivel general de la lámina foliar.

En *P. juncifolia*, esta modificación de la forma celular también sucede a lo largo de los plegamientos y toda el área circunvecina a la prominencia media y la marca, debido a que la constricción de la lámina provoca que las células se compriman y cambien su forma (Fig. 2.3. D-E).



**Figura 2.3.** Modificaciones celulares en las marcas de las láminas foliares. **A.** *I. carnosiflorus*, marca proximal. **B.** Acercamiento de la depresión de pocos estratos de la lámina foliar. **C.** *I. alatus*, marca distal. **D.** Acercamiento de la depresión involucrando varios estratos de células. **E.** *N. graminifolia*, células con paredes anticlinales onduladas al inicio de la depresión en la marca distal. **F.** *I. langlassei*, elevación gradual en la prominencia media. **G.** *I. alatus*, elevación súbita en la prominencia media. **H.** *P. juncifolia*, células sin forma, en la prominencia media. Las flechas indican la depresión en la marca y la elevación en la prominencia media. Escala: 50  $\mu\text{m}$ , excepto A= 100  $\mu\text{m}$ .

Al revisar los cortes transversales de zona de depresión de la marca y la elevación de la prominencia media y compararlos con cortes de la parte media de la hoja (donde no hay marcas), no se encontró ninguna alteración en los tejidos internos de la hoja (Fig. 2.4.), por lo que la presencia de la marca y la prominencia media sólo incide a nivel superficial en la forma de las células epidérmicas como se mencionó anteriormente.

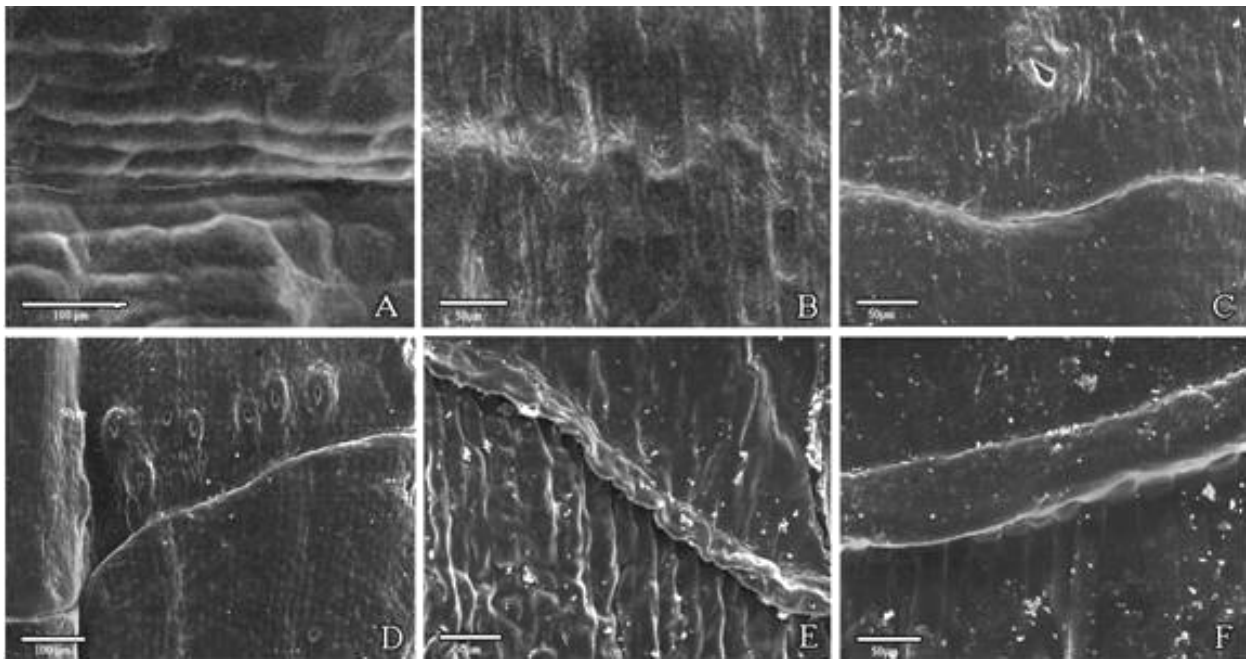


**Figura 2.4.** Láminas foliares de Ponerinae con marca y sin marca. **A-B.** *I. latibracteatus*. **A.** Parte media de la hoja, sin marca. **B.** Con marca. **C-D.** *N. graminifolia*. **C.** Parte media de la hoja, sin marca. **D.** Con marca. Las flechas indican la depresión en la superficie de la lámina foliar. Escala: A, C, D, 50  $\mu\text{m}$ ; B= 100  $\mu\text{m}$ .

#### REGIÓN DE ABSICIÓN ENTRE LA LÁMINA Y LA VAINA FOLIAR

En las etapas tempranas de diferenciación de la región de abscisión se aprecia un hundimiento de algunas hileras celulares en la superficie adaxial y en la superficie abaxial, se observa que en esta zona las hileras de células epidérmicas pierden su linearidad, además de registrarse un leve levantamiento de la lámina foliar (Fig. 2.5. A-B).

En las etapas avanzadas de la diferenciación de la región de abscisión se altera un mayor número de hileras celulares por hundimiento de la superficie adaxial y hay una compresión de algunas hileras, provocando la formación de un surco en la región de abscisión como una hendidura entra la vaina y la lámina foliar en la superficie adaxial (Fig. 2.5. C-D). Por otro lado, en la superficie abaxial se observa un levantamiento cada vez más conspicuo hasta conformar un cordón de varias hileras de células, de las que no es posible distinguir las paredes (Fig. 2. 5. E-F).



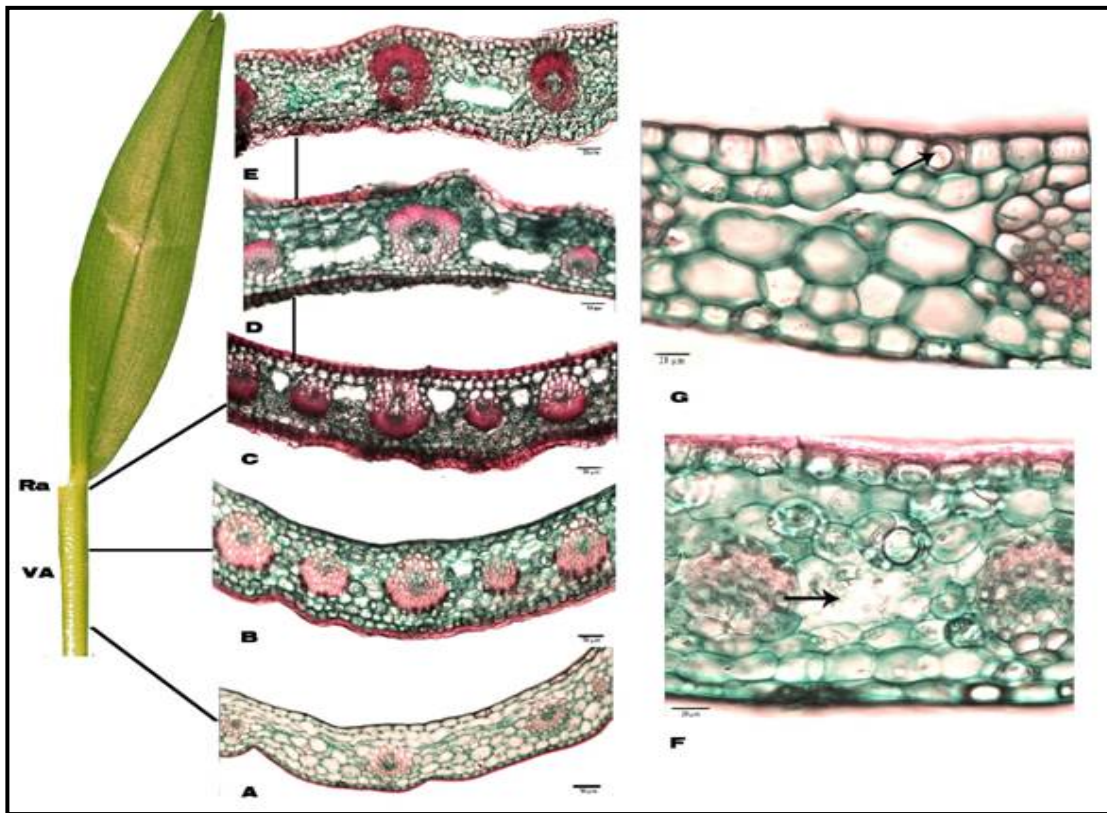
**Figura 2.5.** Región de abscisión. **A-B.** Etapa temprana de diferenciación. **A.** *P. juncifolia* superficie adaxial, hundimiento. **B.** *N. graminifolia* superficie abaxial, levantamiento. **C-F.** Etapas avanzadas de diferenciación. **C.** *I. latibracteatus* superficie adaxial, hendidura. **D.** *I. carnosiflorus* superficie adaxial, hendidura. **E.** *I. latibracteatus* superficie abaxial, cordón de células. **F.** *N. striata* superficie abaxial, cordón de células. Escala: A, D= 100 50  $\mu\text{m}$ ; B, C, E, F=50  $\mu\text{m}$ .

## VAINAS FOLIARES.

La anatomía de la lámina foliar y las vainas es semejante, excepto en el mesofilo de las vainas foliares existen espacios lisoesquizógenos y los haces vasculares tienen un solo casquete de fibras vasculares y no dos como en los haces vasculares de la lámina foliar (ver capítulo I, sección Anatomía de las vainas foliares).

Es importante resaltar que en la mayoría de las especies estudiadas, se encuentran espacios lisoesquizógenos en el mesofilo a todo lo largo de la vaina y en otros casos dichos espacios se restringen a la región de abscisión. Dependiendo del grado de maduración de la hoja, los espacios son de diferente tamaño y abundancia en la región de abscisión (Fig. 2.6. A-C) y llegan a agrandarse tanto que forman cavidades amplias. En las hojas viejas, amarillentas de *I. carnosiflorus*, ya casi por caer, abarcan incluso el área correspondiente a dos o tres hileras de células que previamente existían entre los haces vasculares (Fig. 2.6. D-E). Estos espacios son el producto de la separación y lisis de las células del parénquima, son de tamaño variable y de forma irregular (Fig. 2.6. B-E). La lisogenia es el mecanismo principal mediante el cual se forman dichos espacios, mientras que la esquizogenia al parecer actúa en algunos casos, previo a la lisogenia y fue común en casi todos los espacios encontrados en *Nemaconia dressleriana* (Fig. 2.6. F-G).

En las regiones de abscisión observadas no se manifestó otra modificación anatómica que nos informara sobre la formación de la línea de abscisión, aún en las hojas basales que mostraban como indicio de senescencia el amarillamiento de las láminas foliares y que se presumía en poco tiempo caerían.

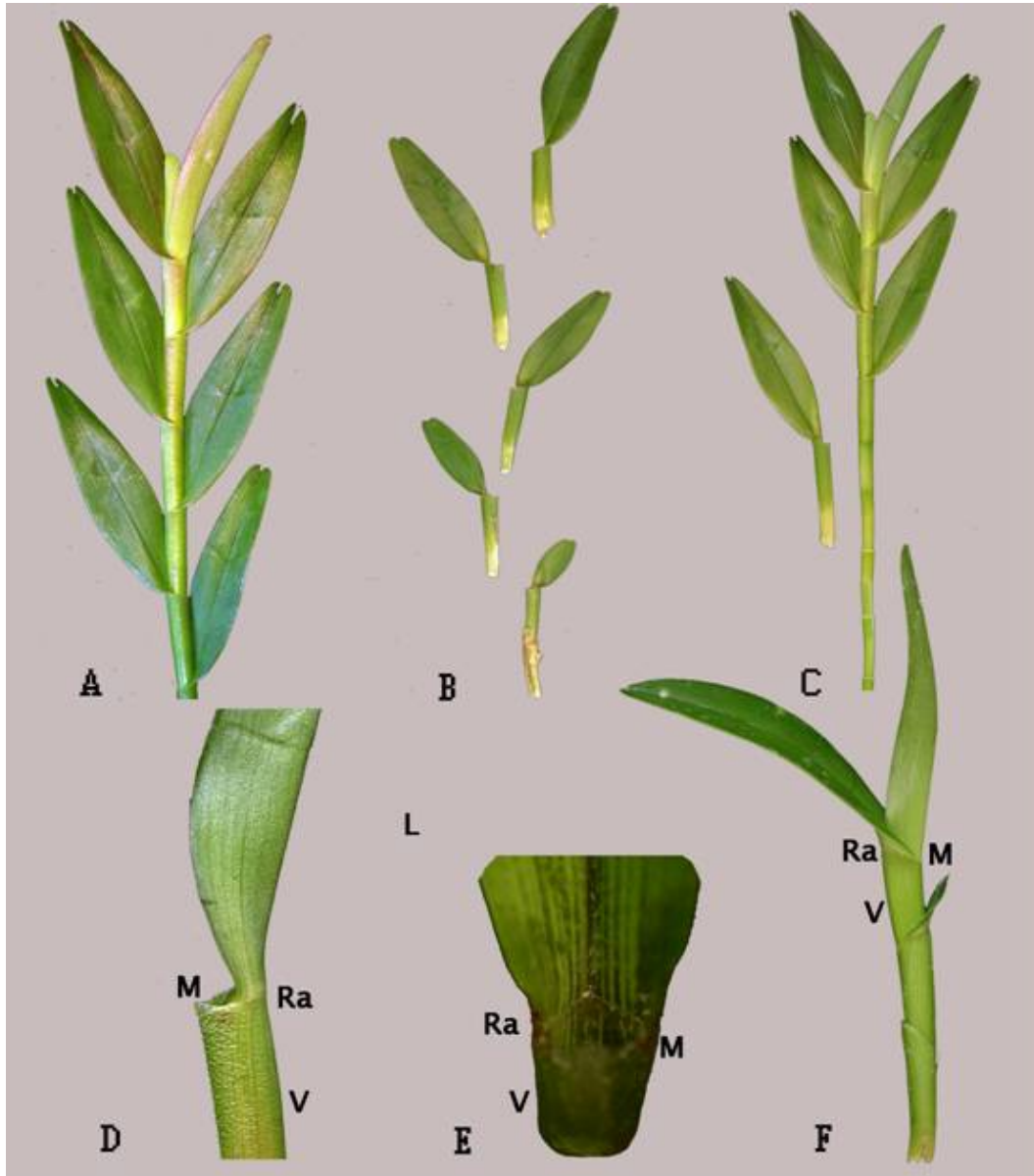


**Figura 2.6.** Anatomía de las vainas foliares en Ponerinae. **A-D** y **F.** *I. carnosiflorus*. **E.** *I. alatus*. **G.** *N. dressleriana*. **A-C.** Hojas maduras. **A.** Mesofilo sin espacios lisoesquizógenos. **B.** Espacios lisoesquizógenos en formación. **C.** Espacios lisoesquizógenos más grandes. **D-E.** Hojas amarillentas. Corte de la región de abscisión con espacios lisoesquizógenos muy desarrollados. **F.** Espacio formado por esquizogenia. **G.** Espacio formado por lisogenia. Abreviaturas. VA=vaina foliar. Ra= región de abscisión. Escala: 50  $\mu\text{m}$ , excepto G, F= 20  $\mu\text{m}$ .

#### DESARROLLO DE LAS HOJAS EN EL TALLO DE PONERINAE.

Para investigar posibles mecanismos de formación de las marcas foliares se disectaron las hojas en toda la longitud del tallo para examinar la disposición de las vainas y las láminas foliares en diferentes estados de desarrollo hasta aproximarse al meristemo apical.

En las plantas de Ponerinae las hojas se localizan a todo lo largo del tallo en un arreglo dístico (Fig. 2.7. A, F). Las vainas foliares envuelven completamente al tallo y son parcialmente imbricadas, de tal manera que la vaina foliar más proximal está envolviendo cerca de la tercera parte basal de la longitud de la vaina foliar subsiguiente (Fig. 2.7. B). Por lo tanto, la longitud de cada una de las vainas foliares es equivalente a la mayor parte de dos entrenudos (Fig. 2.7. C).



**Figura 2.7.** Disposición de las hojas en el tallo de *Isochilus carnosiflorus*. **A.** Hojas dísticas con las vainas foliares envolviendo todo el tallo. **B.** Disección de las vainas foliares, mostrando que la vaina inferior envuelve parcialmente a la superior. **C.** Cada vaina mide aproximadamente lo largo de dos entrenudos. **D.** Vista lateral de la hoja formada por lámina, vaina, región de absición y la porción libre de la lámina denominada "muesca". **E.** Vista frontal de la hoja. **F.** Hojas a lo largo del tallo de *H. guerrerensis*. Abreviaturas. L= lámina foliar. Ra= región de absición. M= muesca. V= vaina foliar.

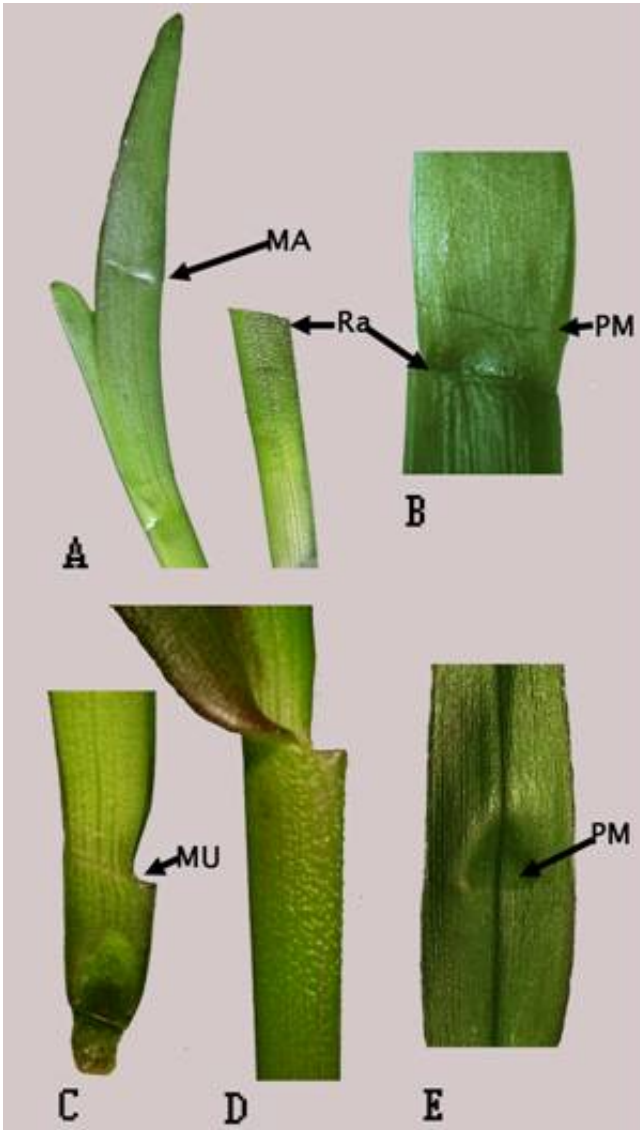


La lámina foliar está unida a la vaina por la mitad o un poco más del margen apical de la vaina y la porción libre de ésta última forma una pequeña muesca que al parecer se relaciona con la formación de la prominencia media durante el desarrollo de la hoja (Fig. 2.7. D-F). La hoja desde muy temprano en su desarrollo está diferenciada en la vaina que es tubular y la lámina foliar que es conduplicada, pero en ese punto no es posible distinguir la zona de abscisión, la cual se diferencia conforme crece la hoja.

Las vainas y sus respectivas láminas foliares se forman sucesivamente, más allá del ápice del tallo para proteger al meristemo, localizado en el ápice del tallo. La hoja más reciente que se está formando se produce por dentro de la vaina foliar de la hoja anterior, emergiendo del lumen de ésta hasta que rebasa la vaina y entonces la lámina se abre.

Al revisar con detalle la disposición de las hojas en diferentes estados de desarrollo se observó que la forma de la marca en la superficie abaxial de las hojas distales que aún están conduplicadas, corresponde aproximadamente a la forma de la línea de abscisión de la hoja anterior, que es una línea oblicua perpendicular al eje principal de la hoja (Fig. 2.8. A-B) y que al abrirse la lámina la marca adquiere la forma característica de cuña (Fig. 2.8. E). Cuando existen dos marcas en la lámina foliar, la marca distal concuerda con la forma de la línea de abscisión de la segunda hoja anterior y la proximal con la de la hoja inmediata anterior. Esto siempre es más fácil de observar en la hoja conduplicada antes que la lámina se extienda.

Por otro lado, la amplitud de las muescas es aproximadamente la misma en la mayoría de las hojas que se encuentran a lo largo del tallo, pero las hojas distales que apenas se están desarrollando presentan muescas menos amplias que las anteriores (Fig. 2.8. C-D). Durante el desarrollo de la hoja la muesca es angosta y se va ampliando, y la presión sobre la lámina foliar produce una prominencia media triangular.



**Figura 2.8.** Comparación de la marca y la región de abscisión. **A.** Región de abscisión al lado de la marca. **B.** Región de abscisión abajo de la marca. **C.** Muesca angosta de una hoja joven. **D.** Muesca amplia en una hoja más tardía. **E.** Lámina expandida mostrando la prominencia media. Abreviaturas. MA= marca. Ra= región de abscisión. MU= muesca. PM= prominencia media.

## DISCUSIÓN

POSICIÓN DE LAS MARCAS.- La posición y el número de marcas en la lámina madura así como la forma de la prominencia media son constantes dentro de una especie (i.e. las láminas de *I. langlassei* siempre tienen una marca en el tercio medio y la forma de la prominencia media siempre es angostamente triangular (Cuadro 2.1). Sin embargo, no permiten identificar cada una de las especies como lo sugirió Hamer (1981), porque puede haber más de una especie con el mismo número de marcas en la misma posición y la misma forma de la prominencia media. Lo anterior resulta significativo porque implica que existe un proceso de formación de la marca y de la prominencia media preciso, mediante el cual las marcas siempre se originan en el mismo lugar de la lámina foliar. Las marcas se presentan siempre en la misma área de la lámina, tanto en hojas silvestres y cultivadas, por lo tanto no se modifica por las condiciones de estrés o las condiciones favorables del ambiente.

FORMACIÓN DE LA MARCA Y LA PROMINENCIA MEDIA.- Las observaciones realizadas de la posición y desarrollo de las hojas permiten especular un posible proceso de formación de las marcas y la prominencia media en las láminas foliares.

Como se mencionó, hay una gran similitud entre la forma de la marca y la región de absición de una hoja previa, así como entre la prominencia media y la muesca de la lámina foliar. Cabe la posibilidad de que la marca sea una impresión de la región de absición de una hoja anterior sobre la lámina de la hoja en desarrollo, causada por una simple presión durante el desarrollo de la hoja que afecta únicamente la epidermis de la lámina foliar. No se encontraron modificaciones anatómicas en los tejidos internos, como cambios en la forma de las células o el número de estratos en el mesofilo, ni en el número de haces vasculares.

La presión antes mencionada se ejerce porque en algún momento la abertura de la vaina no es suficiente para que la lámina foliar que está emergiendo a través de ella pase libremente y entonces la región de absición oprime a la nueva lámina foliar, dejando impresa su "huella" sobre ésta. Después la abertura de la vaina foliar se ensancha y libera a la lámina foliar, la cual prosigue su crecimiento en largo y ancho, pero con la marca ya impresa.

Esto resulta fácil de entender si se piensa que el tallo y la hojas (vainas y láminas foliares) que forman el brote están creciendo simultáneamente en longitud y en amplitud, pero que en las especies que presentan la marca, dicha sincronización se pierde en algún

momento, porque la parte apical de la vaina, es decir la región de abscisión, no se ensancha tan rápido como la lámina foliar que está emergiendo a través suyo.

En *H.guerrerenensis* la abertura apical de la vaina siempre es más ancha que la nueva lámina foliar que se está desarrollando y surgiendo a través de ella de tal manera que nunca se ejerce una presión y además como en *E.nocturnum* la lámina que emerge a través de la vaina es angosta y es hasta que está fuera de la vaina que se ensancha. En cambio, en las especies que tienen las marcas, las láminas foliares casi emergen de la vaina del ancho final.

En la formación de una sola marca sobre una lámina está involucrada la zona de abscisión únicamente de la hoja inmediatamente anterior y en el caso en el que se presentan dos marcas, están involucradas las zonas de abscisión de las dos hojas anteriores. En el último caso, la marca distal se forma por una presión de la primera región de abscisión por la que pasa la hoja que está desarrollándose y ya que la amplitud de la porción apical de la lámina que está emergiendo aún es poca, la presión es leve, luego que la vaina se amplía la hoja se alarga hasta alcanzar la siguiente región de abscisión y debido a que la lámina foliar ya adquirió mayor anchura la presión de la región de abscisión es más intensa para formar la marca proximal que generalmente está más marcada que la distal.

Por otro lado, la porción apical de la vaina que está libre de la lámina foliar, a la que se denominó aquí "muesca", es la que tiene que ver con la formación de la prominencia media durante el desarrollo de la hoja. Cuando la hoja emerge a través de la vaina de la hoja anterior, la zona de la vena media de la lámina pasa a través de la muesca, en la cual también se está ejerciendo presión. En la forma triangular de la prominencia media se observa como es que la abertura de la porción apical de la vaina y también de la muesca va creciendo conforme emerge la lámina foliar en desarrollo. Cuando la muesca es pequeña, la presión ejercida sobre la lámina en este punto forma el ápice del triángulo de la prominencia media y después al crecer la muesca la presión traza una línea oblicua paralela al eje principal de la hoja en desarrollo; cuando se desdobra la lámina foliar delimita un área triangular.

Existen algunas excepciones en las formas de la marca y de la prominencia media, como en *I. alatus*, cuyas marcas apicales son dos triángulos en los márgenes de la lámina foliar, en las cuales sólo ocurrió una leve presión de la región de abscisión que apenas marcó los bordes de la lámina. En *Ponera juncifolia* la presión parece mayor, provocando una compresión de toda la lámina y formando las constricciones y los plegamientos de la lámina, mostrado en la figura 2F.

Este mecanismo de formación de las marcas parece ser tan preciso que aquéllas siempre se originan en las mismas regiones de la lámina foliar, por lo que la constancia en la impresión de la marca depende de algunos factores como son el largo de los entrenudos y el largo y ancho de la lámina foliar. El largo de los entrenudos y por ende el de las vainas es más o menos constante a lo largo de los tallos de las plantas de Ponerinae, por lo que la presión de la porción apical sobre una nueva lámina foliar siempre se hace aproximadamente a la misma altura de la lámina foliar.

La constancia en la posición y forma de las marcas y la prominencia media tiene que ver con el proceso de morfogénesis de las hojas, el cual implica todos los aspectos, desde la diferenciación del primordio foliar hasta su maduración. Sinha (1999) y Dengler (2001) la dividen en tres fases (1) iniciación del primordio de la hoja; (2) morfogénesis primaria, término utilizado para describir el proceso de desarrollo que establece la forma básica, la simetría y las principales subregiones de la hoja y (3) expansión y morfogénesis secundaria, fase donde se completa el incremento en área y volumen foliar. Por lo tanto, existen diferentes procesos de morfogénesis, entre las especies que presentan la marca y las que no. Es decir, las hojas en desarrollo de las especies con marca, casi completan la fase de morfogénesis secundaria antes de liberarse de las vainas a través de las cuales se elargan, porque casi emergen de la amplitud de la lámina madura. En cambio, las hojas en desarrollo de *H. guerrerensis* y *E. nocturnum* solo sufren morfogénesis primaria, durante el lapso que se encuentran dentro de las vainas y cuando se liberan crecen en área y volumen foliar.

Para consolidar estos resultados y entender mejor si las marcas presentes en la lámina foliar se forman por la presión de una hoja previa sobre la lámina en desarrollo, se requiere realizar un trabajo de morfometría del desarrollo de la hoja para ver la correspondencia entre las fases en las que se libera la lámina en desarrollo de la vaina y por eso unas especies tienen marca y otras no, el cuál no se llevó a cabo en este trabajo.

**LA ZONA DE ABSICIÓN Y LA LÍNEA DE ABSICIÓN.** La absición es la separación activa de una hoja a partir de una rama, sin lesionar la planta (Esau, 1982) y es la culminación de una serie de eventos que incluye múltiples cambios en la estructura celular, metabolismo y expresión génica. Esto resulta en la disolución de la lámina media y la hidrólisis de las paredes celulares y la subsecuente separación de las células en la zona de absición (Rubinstein, 1964; Tansley, 2001).

En la mayoría de las plantas la abscisión ocurre en una área bien definida, que comprende células morfológicamente distintas llamada región de abscisión (Gawady y Avery, 1950; Rubinstein y Leopold, 1964; Tansley *et al.*, 2001). Las células de la zona de abscisión son típicamente más pequeñas que las células de regiones adyacentes, cuadradas, con un denso citoplasma y los elementos traqueoidales son menos desarrollados, con menor depositación de lignina (Addicott, 1982; Tansley *et al.*, 2001). Sin embargo, en otros casos las células de la región de abscisión son iguales a las células fuera de tal región, es decir, no hay diferenciación. La zona de abscisión se diferencia muy temprano en el desarrollo de la hoja y normalmente permanece detenida en esta condición hasta que se presentan los estímulos apropiados que fomentan la diferenciación de la línea de abscisión (Tansley *et al.*, 2001).

Dentro de la región de abscisión el proceso de separación de la lámina de la vaina, está restringido a una estrecha banda de células usualmente referida como la línea de abscisión (Gawady y Avery, 1950; Addicott, 1982). Los estudios microscópicos de gran variedad de hojas han demostrado que existen una serie de cambios anatómicos involucrados en la formación de la línea de abscisión, como son 1) rompimiento de las células; 2) división celular, donde las células resultantes secretan las enzimas necesarias para la hidrólisis de las paredes celulares; 3) diferenciación celular y 4) rompimiento de las células vasculares (Leinwenber y Hall, 1959; Webster, 1970).

La región de abscisión que separa la vaina de la lámina foliar de las hojas de Ponerinae, se diferencia durante el proceso de maduración de la hoja y está directamente asociada con el grado de senescencia foliar. Al examinar varias regiones de abscisión a lo largo de tallos para observarlas en el MEB, se logró captar una secuencia de formación de la región de separación de la lámina foliar. Las hojas más jóvenes muestran regiones de abscisión en etapas tempranas de diferenciación, donde hay un leve hundimiento de algunos estratos celulares en la superficie adaxial y en la superficie opuesta un somero levantamiento. Hay un mayor hundimiento-invaginación de las capas celulares en etapas subsecuentes al observar regiones de abscisión cada vez más cercanas a la base del tallo (es decir, hojas más viejas).

Pero en los cortes de la región de abscisión de las especies estudiadas se observaron algunas de las modificaciones que suceden durante la formación de la línea de abscisión y se concluye que en este grupo de orquídeas, no existe.

Lo que sí se observó en las preparaciones anatómicas de las vainas fue una secuencia gradual en la mayoría de las especies, desde fases con mesofilo consolidado y espacios

lisoesquizógenos reducidos hasta aquellas con espacios lisoesquizógenos amplios, los cuales se forman por dos mecanismos: lisogenia y esquizogenia. En la lisogenia los espacios se forman porque las células mueren dejando un espacio, mientras que la esquizogenia ocurre cuando los espacios se forman por crecimiento diferencial y separación de las células adyacentes a través de la lámina media (Evans, 2003). Ambos mecanismos ocurren en las especies de Ponerinae.

Si no existe una línea de absición, entonces ¿cómo es que se separa la lámina foliar de la vaina? Muy probablemente las cavidades lisoesquizógenas constituyen zonas de debilidad estructural en la región de absición, facilitando el desprendimiento de la lámina foliar. Lo que se observó en la región de absición de las hojas amarillentas (senescentes) de *I. carnosiflorus* y que quizá también suceda en las otras especies, fue que los espacios esquizolisogénos localizados entre los haces vasculares crecen, transformándose en cavidades mucho más amplias que en los cortes de las regiones de absición de las hojas que no tenían aún indicios de senescencia como amarillamiento de la lámina foliar.

COMPARACIÓN DE LA MARCA Y LA ZONA DE ABSICIÓN. Las observaciones realizadas de la marca y la región de absición permiten señalar que son parecidas en las primeras etapas de diferenciación, en el sentido que ambas involucran un hundimiento-levantamiento de algunos estratos celulares. Este hundimiento-levantamiento se presenta en las superficies epidérmicas opuestas; esto es, en la marca el hundimiento es en la superficie abaxial ,mientras que en la región de absición es en la adaxial. Además, en la última continúan los cambios hasta que las hileras de células se invaginan por completo en la superficie adaxial, hasta sobresalir en un cordón de células en la superficie abaxial.

Una vez que se ha diferenciado totalmente la región de absición, ésta permanece así hasta que la senescencia foliar desencadena la absición (Addicott, 1982; Essau, 1982). En otras plantas se ha observado que esto es promovido por la interacción de varias hormonas entre las que se encuentran el etileno, ABA, auxinas y citoquininas (Rubinstein y Leopold, 1964; Tansley *et al.*, 2001).

En cambio, la marca y la prominencia media de la lámina foliar se forman por un simple mecanismo de presión de la región de absición y de la porción libre de la lámina foliar (muesca) de una vaina anterior, debido al crecimiento desigual de la vainas y las láminas

foliares en desarrollo y al estrechamiento de la abertura de la vaina a través de la cual emerge la lámina foliar.

Otro tipo de marcas foliares, donde la forma y el mecanismo de formación es diferente, pero que también ocurre durante el desarrollo del brote se presenta en plantas como los agaves, donde las hojas se encuentran imbricadas durante el crecimiento de la planta de manera que los bordes de cada una de las láminas foliares se graba sobre la hoja más externa y al abrir se observan las marcas en cada una de las láminas de la planta (Cervantes, obs. pers.). En algunas cactáceas existen unas marcas próximas a las areolas que parecen formarse también por algún tipo de presión durante el desarrollo de la planta, pero que todavía no han sido estudiadas con detalle (T. Terrazas, com. pers. 2008)

## CONCLUSIONES

Las marcas y la prominencia media de las hojas de *Ischilus*, *Nemaconia* y *Ponera* son el resultado de una presión de la región de absición y la muesca de una vaina precedente sobre la lámina foliar en expansión, ocasionando una depresión transversal al eje principal de la hoja y un levantamiento del nivel de la lámina que bordea un área triangular. La diferenciación de la región de absición comienza también con una depresión similar pero que al final se transforma en una invaginación total de los estratos celulares involucrados, acompañada de modificaciones en los tejidos internos, lo que no sucede en la marca y prominencia media.

Las marcas y la prominencia media no tienen las características de una región de absición, ni de una línea de absición, principalmente porque no hay cambios anatómicos substanciales en los tejidos internos de la lámina foliar. Si nos apegamos al concepto de absición que es la separación de células, tejidos u órganos del resto del cuerpo de la planta nunca ocurre la absición de las secciones de las láminas foliares a partir de donde se localizan las marcas. Por el contrario, en la región de absición entre la vaina y la lámina foliar, si se presentan modificaciones en los tejidos internos de la vaina foliar, representados principalmente por la aparición o modificación de la dimensión de los espacios lisoesquizogénos, lo que al final produce la separación de la lámina de la vaina foliar.



## LITERATURA CITADA

- Addicott, F. T. 1982. *Abscission*. Berkeley, CA, E. U. A: California University Press.
- Baker, M.A. 1972. Foliar anatomy of the Laeliinae (Orchidaceae). Tesis de doctorado. Washington University, St. Louis Missouri.
- Dengler, N. y H. Tsukayat, 2001. Leaf Morphogenesis in Dicotyledons: Current Issues. *International Journal of Plant Sciences* 3: 459-464.
- Esau, K. 1982. *Anatomía de las plantas con semilla*. Hemisferio Sur S.A. 317-322. Argentina.
- Evans, E.D. 2003. Aerenchyma formation. Tansley review. *New Phytologist*.161: 35-49
- Gawadi, A. G y G.S. Avery. 1950. Leaf abscission and the so called abscission layer. *American Journal of Botany* 37: 172- 180.
- Hammer, F. 1981. *Las Orquídeas de El Salvador*. Vol. 3. The Marie Selby Botanical Gardens, Sarasota Florida, E. U. A.
- Leinwenber, C. L. y W. C. Hall. 1959. Foliar abscission in cotton. III Macroscopic and microscopic changes associated with natural and chemically induced leaf-fall. *Botanical Gazette* 1: 9-16.
- Österreich, Ch. H. 1965. Beitrag zur systematic der Zentraz-Amerikanischen Orchideengattung. *Ischilus. Die Orchidee* 16: 62-68.
- Rubinstein, B. y A. C. Leopold. 1964. The nature of leaf abscission. *The Quarterly Review of Biology* 4: 356-372.
- Ruzin, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, Inc. Oxford, Reino Unido.
- Sinha, N. 1999. Leaf development in Angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 414-446.
- Soto, A. M. 2005. Ponerinae. En: Pridgeon A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F. N. Rasmussen (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendroideae*. 1. Vol. 4. Oxford University Press. Reino Unido.
- Tansley, J., E. Taylor y C. A. Whitelaw. 2001. Signals in Abscission. *New Phytologist* 2: 323-339.
- Webster, D.B. 1970. An morphogenetic study of leaf abscission in *Phaseolus*. *American Journal of Botany* 4: 443-451.

# CAPÍTULO 3.

## IMPORTANCIA FILOGENÉTICA DE LA ANATOMÍA FOLIAR DE LA SUBTRIBU PONERINAE.

### RESUMEN

En este trabajo se infirieron las relaciones filogenéticas de algunas especies de la subtribu Ponerinae mediante análisis cladísticos de secuencias de ADN de una región nuclear (ITS) y una región no codificante de los plástidos (espaciador intergénico *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*) así como datos estructurales, realizándolos para cada conjunto de datos por separado y en combinación. Como grupos externos se incluyeron un representante de Blettinae (*B. purpurea*) y Laeliinae (*E.nocturnum*). También se realizó la optimización de todos los caracteres estructurales en el marco de la filogenia combinada. En la mayoría de los análisis, Ponerinae resultó un grupo monofilético cuyos linajes corresponden a la clasificación intragenérica previa, que incluye a los géneros *Isochilus*, *Helleriella*, *Nemaconia* y *Ponera*. Cada uno de estos clados, incluyendo la subtribu se definen por algunos caracteres morfológicos.

### INTRODUCCIÓN

La subtribu Ponerinae es un grupo de orquídeas epífitas y litófitas exclusivamente neotropical, perteneciente a la tribu Epidendreae, dentro de la subfamilia Epidendroideae (Chase *et al.*, 2003). Como resultado de los análisis filogenéticos moleculares recientes (van den Berg *et al.*, 2000 y 2005), la circunscripción de la subtribu y las relaciones de los géneros que la componen han cambiado considerablemente. Originalmente el carácter morfológico utilizado para definirla había sido la presencia de un pie de columna prominente, pero este carácter es homoplásico y presenta una gradación, desde pies de columna inconspicuos hasta bien desarrollados (Dressler, 1993).

Pfitzer (1887) reconoció en Laeliinae dos series de taxa, una llamada Ponerae que incluía a géneros con pie de columna como *Arpophyllum*, *Isochilus*, *Ponera*, *Scaphyglottis* y otra llamada Cattleyeae, con representantes sin pie de columna, entre los que estaban *Brassavola*, *Laelia*, y *Meiracyllium*. Schlechter (1926) reconoció estos mismos grupos, separando en la

subtribu Ponerinae a los miembros con un pie de columna bien desarrollado (e.g *Domingoa*, *Isochilus Poner*a y *Scaphyglottis*) y manteniendo en la subtribu Laeliinae los representantes sin pie de columna (e.g *Barkeria*, *Cattleya*, *Encyclia* y *Epidendrum*).

Baker (1972) realizó un estudio anatómico de las hojas de 39 géneros de Laeliinae (incluyendo dos especies que ahora pertenecen a Ponerinae) y sugirió un esquema de relaciones entre los géneros, destacando dos principales grupos o “complejos” de especies que poseen un pie de columna bien desarrollado, el complejo *Domingoa* y el complejo *Scaphyglottis*.

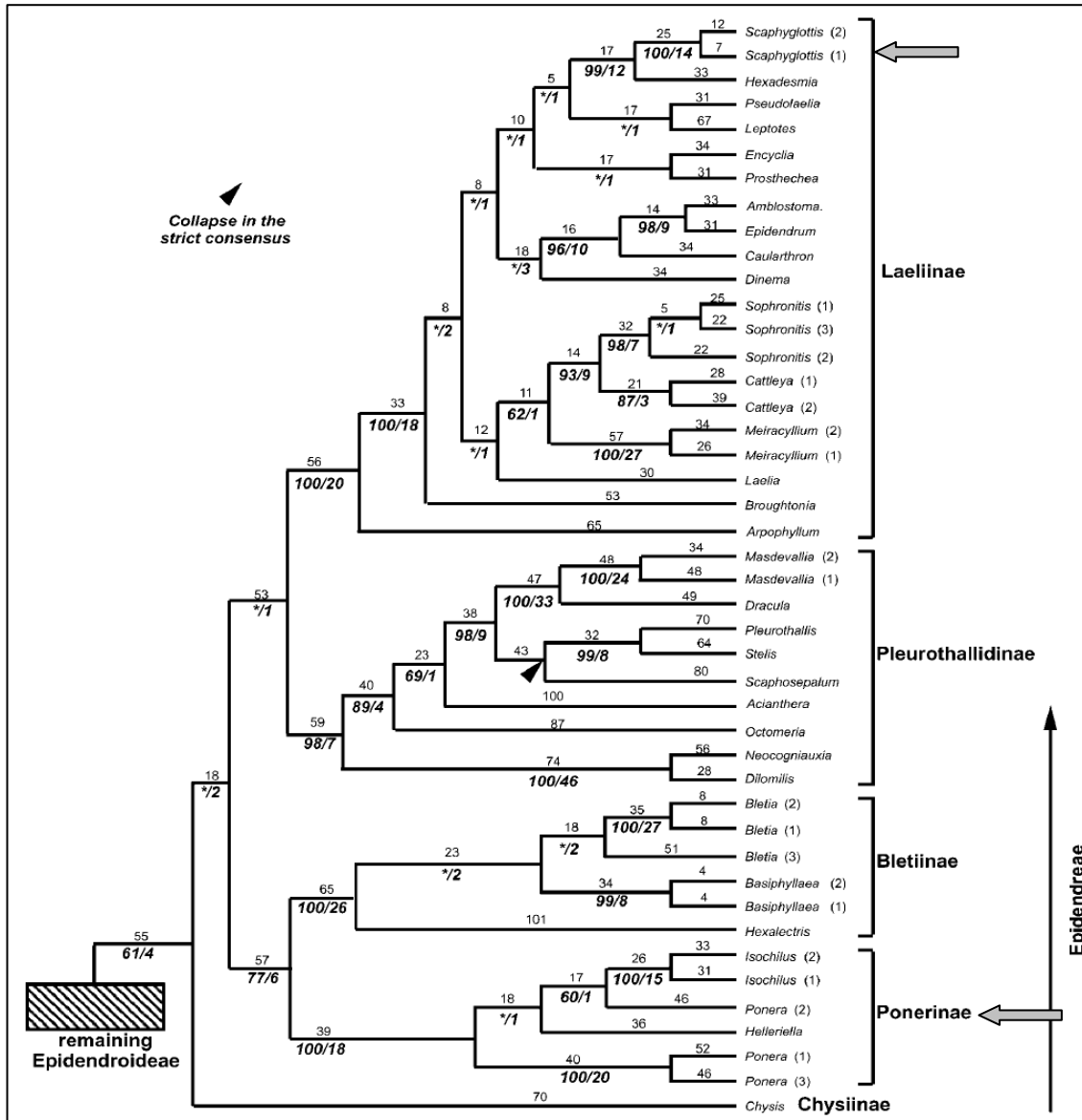
Dressler (1993) incluyó en Epidendreae las subtribus Sobraliinae, Arpophyllinae, Meiracylliinae, Coeliinae, Laeliinae y Pleurothallidinae, ubicando los géneros que actualmente comprenden Ponerinae en la subtribu Laeliinae.

Szlachetko (1991) propuso la subtribu Isochiliinae para un solo género, *Isochilus*. Posteriormente, Szlachetko (1995) dividió Laeliinae *sensu* Dressler (1993) en tres subtribus: Epidendrinae, Laeliinae y Ponerinae. En la última subtribu colocó los géneros con un pie de columna prominente como *Helleriella*, *Hexisea*, *Homalopetalum*, *Nidema*, *Orleanesia*, *Ponera*, *Reichenbachanthus* y *Scaphyglottis* y ubicó a *Isochilus* en Laeliinae. Un estudio filogenético molecular (van den Berg *et al.*, 2000) mostró que Ponerinae como la delimitaron Pfitzer (1887), Schlechter (1926) y Szlachetko (1995) es polifilética, ya que algunos géneros que también poseen un pie de columna conspicuo, como *Domingoa*, *Homalopetalum*, *Jacquiiniella* y *Scaphyglottis* se agrupan con representantes de la subtribu Laeliinae. De acuerdo con van den Berg *et al.* (2000 y 2005), Ponerinae es un grupo monofilético que se restringe a los géneros *Helleriella*, *Isochilus*, *Nemaconia* y *Ponera* (Fig. 3.1.). Sin embargo, las relaciones hacia el interior de la subtribu no han sido examinadas en detalle.

Análisis moleculares recientes (van den Berg *et al.*, 2000 y 2005; Soto *et al.*, 2007) indican además que *Ponera* es parafilética, ya que *Ponera exilis* Dressler forma el grupo hermano de *Isochilus*, con el que comparte la arquitectura vegetativa. Las especies previamente incluidas en *Ponera* que no son muy similares a *P. exilis* y *P. juncifolia* (la especie tipo de *Ponera*) han sido atribuidas a un género distinto, *Nemaconia* (Soto *et al.*, 2007).

En este estudio se explorarán las relaciones filogenéticas de la subtribu Ponerinae mediante análisis cladísticos de secuencias de ADN no codificantes, incluyendo una región nuclear (los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal nuclear; Baldwin *et al.*,

1995) y otro de los plástidos (el espaciador intergénico *trnHGUG-psbA*), además de caracteres morfológicos de las plantas y caracteres anatómicos de la hoja. También, se discute la posible secuencia de cambios evolutivos de algunos caracteres anatómicos foliares en los miembros de la subtribu Ponerinae, mediante la optimización en los árboles filogenéticos resultantes.



**Figura 3.1.** Parte de uno de los árboles más parsimoniosos resultante del análisis de una región ADN nuclear (ITS), y tres regiones de los plástidos (el intrón *trnL*, el espaciador *trnL-F*, el gen y los espaciadores de *matK* y *rbcl*) que muestra la posición de la subtribu Ponerinae. Tomado de van den Berg *et al.* (2005). Los números sobre las ramas indican la longitud de las mismas y los números bajo las ramas señalan las proporciones bootstrap > 50, seguidas del apoyo de Bremer. La flecha en gris indica los grupos que tienen pie de columna conspicuo.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MUESTREO TAXONÓMICO

Se estudiaron individuos de nueve especies de la subtribu Ponerinae. A partir de material obtenido de ejemplares vivos mantenidos en cultivo en los invernaderos del herbario AMO y la colección particular del Dr. Gerardo Salazar (Apéndice 1). Se estudiaron los especímenes herborizados de la subtribu Ponerinae en las colecciones del Herbario AMO (Instituto Chinoín) y el Herbario Nacional de México (MEXU). *B. purpurea* (Bletiinae) y *E.nocturnum* (Laeliinae) fueron usados como grupos externos en los análisis cladísticos.

## MÉTODOS ANATÓMICOS.

Los métodos que se llevaron a cabo para obtener las muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB) y para microscopía de luz se detallan en Materiales y Metodos del Capítulo 1 ((pág. 12-13). En MEB se observaron las características superficiales de la epidermis foliar de ambas superficies epidérmicas como la forma de las células epidérmicas, la curvatura y ornamentación de las paredes periclinales, las ceras epicuticulares y la distribución, tipo y forma de los aparatos estomáticos. Mientras que en los cortes anatómicos se examinaron características externas e internas de la lámina foliar como la cutícula, forma y tamaño de las células epidérmicas, tipo de parénquima, arreglo del esclerénquima, distribución y arreglo de los haces vasculares y tipo de inclusiones celulares.

## MÉTODOS MOLECULARES

### **Selección de caracteres moleculares**

La información molecular utilizada consistió de secuencias de ADN de dos compartimentos del genoma de la planta: 1) la región nuclear del espaciador interno transcrito (ITS) de la familia multigénica ribosomal nuclear, incluyendo ITS1, el gen 5.8S e ITS2 (Soltis y Soltis, 1998). Los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2 no son incorporados en los ribosomas, pero tienen que ver con el proceso de maduración de los ARN ribosomales (Baldwin, 1995; Soltis y Soltis, 1998); y 2) la región del cloroplasto del espaciador intergénico *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*, que separa los genes que codifican la producción del

ARN de transferencia de la histidina y la proteína D1 del centro de reacción del fotosistema II (Shaw *et al.*, 2005).

La región de ITS sola y en conjunto con otras regiones nucleares y del cloroplasto ha sido ampliamente utilizada para reconstruir las relaciones filogenéticas a distintos niveles de la jerarquía taxonómica de la familia Orchidaceae (revisado en Cameron, 2007), por ejemplo a niveles tribal (e.g. Epidendreae: van den Berg *et al.*, 2000; Cranichidae: Salazar *et al.*, 2003), subtribal (e.g. Pogoniinae: Cameron y Chase, 1999; Pridgeon y Chase, 2001) y genérica (e.g. *Dignathe*: Sosa *et al.*, 2001; *Cymbidium*: Zhang *et al.*, 2002). El espaciador intergénico *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* es una de las regiones del genoma de los plástidos que presenta más variación, siendo útil para explorar las relaciones intergenéricas e interespecíficas (Shaw *et al.*, 2005), pero que no se ha utilizado antes en Orchidaceae.

## **Extracción de ADN**

El ADN total fue extraído de tejido fresco con una modificación del procedimiento del 2× CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987). Se molió cerca de 0.1 g de tejido fresco con nitrógeno líquido hasta la pulverización. El tejido fue transferido a un microtubo de 1.5 ml agregándole 500 µl de tampón de CTAB con 4% de 2-mercaptoetanol, previamente calentado a 65°C, homogenizando la mezcla con un minipistilo. La mezcla fue incubada a 65 °C durante 15 a 20 minutos. La extracción se realizó con 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) durante 15 minutos, mezclando suavemente varias veces.

El extracto fue centrifugado a 9, 000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos. La fase acuosa superior fue transferida a un microtubo limpio, sin tomar la fase aceitosa ni los sólidos. La precipitación se realizó adicionando lo equivalente al volumen del extracto de 2-propanol preenfriado a -20°C, invirtiendo el microtubo suavemente varias veces hasta observar enturbiamiento de la mezcla. El extracto se dejó reposar durante 72 horas a -20°C. y posteriormente, se centrifugó a 13, 000 RPM durante 5 min. Se descartó el alcohol y el precipitado fue lavado añadiéndole 500 µl de etanol al 70% y centrifugándolo a 13, 000 RPM durante 3 minutos. El alcohol fue descartado y el precipitado limpio fue secado mediante centrifugación al vacío durante 4 minutos y resuspendido en 50 µl de tampón TE (bajo en

EDTA). El extracto de ADN fue evaluado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para confirmar la obtención ADN de alto peso molecular.

### **Amplificación y secuenciación de las regiones de ADN de interés**

La amplificación de las regiones de ADN se efectuó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), usando una mezcla comercial (Taq PCR Core Kit, QIAGEN) en reacciones de 25  $\mu$ L. La mezcla de reacción usada para las dos regiones de ADN amplificadas se muestra en el Cuadro 1. El espaciador intergénico *trnHGUG-psbA* fue amplificado utilizando los “primers” *trnHGUG* F (Tate y Simpson, 2003) y *psbA* R (Sang *et al.*, 1997). La región ITS se amplificó utilizando los “primers” 17SE y 26SE (Sun *et al.*, 1994) y en la mayoría de los casos se requirieron además los “primers” internos ITS2 e ITS3 (White *et al.*, 1990). Los programas de PCR empleados en la amplificación de cada región se indican en el Cuadro 3.1.

Los productos de PCR fueron purificados con columnas de sílica QIAquick (QIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante y evaluados en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

La reacción de secuenciación se realizó con el “Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). La mayoría de las reacciones de secuenciación se llevaron a un volumen total de 10  $\mu$ L incluyendo 2  $\mu$ L de “Big Dye”, tampón de secuenciación 2.5 $\times$ , 0.5  $\mu$ L de primer (10 pM/ $\mu$ L), 1.5-2.5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 3-4  $\mu$ L de producto de PCR. El producto de la reacción de secuenciación fue purificado por medio de columnas CENTRI-SEP (Princeton Separations) con el protocolo propuesto de la empresa que las manufactura. Los productos ya limpios se secaron por centrifugación al vacío a 60°C durante 20 a 30 min. Las secuencias fueron analizadas en un secuenciador automático “3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

**Cuadro 3.1.** Reactivos y cantidades utilizadas en la amplificación de las regiones ITS y *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )
ADN total	Variable
H <sub>2</sub> O	18.375
PCR buffer 10X	2.5
Suero de albúmina bovina	1
dntPs-Mix 10 mM de cada uno	0.5
<i>trnH<sup>GUG</sup></i> F 10 pmol/ $\mu\text{l}$	0.25
<i>psbA</i> R 10 pmol/ $\mu\text{l}$	0.25
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.75
DMSO	0.5
TAq 5 U/ $\mu\text{L}$	0.125
Volumen total	25 $\mu\text{L}$

**Cuadro 3.2.** Programas de PCR utilizados en la amplificación de las regiones ITS y *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*.

Proceso	Temperatura /Tiempo			
	ITS		<i>trnH<sup>GUG</sup>-psbA</i>	
Pre-desnaturalización	94°C/2 min	28 ciclos	94°C/1 min	35 ciclos
Desnaturalización	94°C/1 min		94°C/30 s	
Renaturalización	50°C/1 min		53°C/40 s	
Extensión	72°C/1 min		72°C/40 s	
Extensión final	72°C/7 min		72°C/5 min	

### Edición de secuencias, alineamiento y codificación de “indels”.

Los cromatogramas fueron editados y ensamblados con Sequencher versión 4.6 (Genes Codes Corp.). Las secuencias se alinearon visualmente siguiendo las recomendaciones de Kelchner (2000).

En ambas regiones de ADN fue necesaria la postulación de eventos de inserción-delección (“indels”) debido a variaciones de longitud de los siguientes tipos: a) repeticiones directas de secuencias adyacentes, tanto de conjuntos pequeños de nucleótidos como de un solo nucleótido; b) inserción o delección de secuencias en la que no fue posible identificar la repetición de secuencias adyacentes; y c) inserciones o delecciones grandes, que en el caso de la región *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*, en las especies de *Isochilus* y *P. juncifolia* pueden ser de hasta ca. de



300 nucleótidos. Todos los indels no autoapomórficos se codificaron como caracteres binarios (presencia-ausencia) con el método de codificación simple de indels propuesto por Simons y Ochoterena (2000).

## SELECCIÓN Y CODIFICACIÓN DE LOS CARACTERES ESTRUCTURALES

La selección de caracteres estructurales se realizó considerando aquellos caracteres en los que al menos uno de sus estados está presente en dos o más terminales, excluyendo así los caracteres exclusivos o autapomórficos.

## ANÁLISIS CLADÍSTICOS

Se realizaron análisis de parsimonia con el programa PAUP\* versión 4.0b10 (Swofford, 1998) de las secuencias obtenidas para las especies en estudio de los siguientes conjuntos de datos: 1) espaciador *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*; 2) secuencias de la región ITS; 3) secuencias de las dos regiones de ADN combinadas; 4) datos estructurales 5) secuencias de las dos regiones de ADN más los caracteres estructurales.

Los análisis de los conjuntos de datos por separado permiten explorar la señal filogenética de cada conjunto de datos y, mediante la comparación de los árboles resultantes, ver si existen indicios de posible conflicto (Wiens, 1998). Por otra parte, el análisis combinado permite la interacción de caracteres moleculares y estructurales en el análisis, maximizando el poder explicativo de los datos (Nixon y Carpenter, 1996) e impone una prueba rigurosa de las hipótesis de homología primaria a través de la congruencia de caracteres (de Pinna, 1991).

Todos los caracteres se consideraron como no ordenados y de igual peso. Se aplicaron búsquedas exhaustivas en todos los casos, guardando todos los árboles más parsimoniosos. El apoyo interno de los clados se evaluó por medio de un análisis "bootstrap" (Felsenstein, 1985) consistiendo de 300 réplicas bootstrap, cada una con 10 réplicas heurísticas de secuencia con adición de terminales al azar e intercambio de ramas por medio de "branch swapping" (TBR) salvando hasta 20 árboles más cortos por cada réplica.

Se optimizaron todos los caracteres estructurales sobre el árbol más parsimonioso resultante del análisis combinado de las dos regiones de ADN y los caracteres estructurales. Para esto se utilizó el programa MacClade versión 4.02 (Maddison y Maddison, 2001) con la opción de transformación acelerada "ACCTRAN", la que favorece las hipótesis de homología primarias como verdaderas en ausencia de evidencia que las contradiga (de Pinna, 1991).

# RESULTADOS

## CARACTERES ESTRUCTURALES.

Se eligieron cuatro caracteres macromorfológicos observados en ejemplares vivos o herborizados y nueve caracteres anatómicos obtenidos de las observaciones de microscopía electrónica y de luz, detallados en los dos capítulos precedentes. Todos los caracteres estructurales fueron cualitativos ya sea binarios o multiestado (Cuadro 3). A continuación se definen los caracteres y sus estados de carácter (Cuadro 3) y en el cuadro 4 se muestra la matriz codificada.

**1. Tipo de tallo.** 0= cormo, 1= tallo tipo caña sin ramificar, 2= tallo tipo caña ramificado. Existen dos tipos de tallo en las especies estudiadas. *Bletiinae* tiene tallos engrosados subterráneos (cormos). *Ponerinae* y *E. nocturnum* tienen tallos tipo caña, los cuales son de dos tipos: simples en *Isochilus*, *P. juncifolia* y *E. nocturnum* y ramificados en *H. guerrerensis* y las especies de *Nemaconia*.

**2. Verrugas de las vainas foliares.** 0= ausentes, 1= presentes. Se presentan verrugas en las vainas foliares de *Isochilus*, *Nemaconia* y *P. juncifolia*, mientras que en *H. guerrerensis*, *B. purpurea* y *E. nocturnum* no hay.

**3. Forma de las flores.** 0= tubular, 1= campanulada, 2= estrellada. Las flores son tubulares en *Isochilus*, campanuladas en *Nemaconia*, *P. juncifolia* y *B. purpurea* y estrelladas en *E. nocturnum*.

**4. Marcas en la lámina foliar.** 0= sin marca, 1= una marca, 2= dos marcas. Las láminas foliares de las especies de *Isochilus*, *Nemaconia* y *P. juncifolia* presentan una o dos marcas transversales. Dichas marcas están ausentes en *H. guerrerensis*, *B. purpurea* y *E. nocturnum* (ver capítulo 2).

**5. Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie adaxial.** 0= plana, 1= convexa, 2= cóncava. La pared periclinal de las células epidérmicas es plana en *H. guerrerensis* y las especies de *Nemaconia*, convexa en *Isochilus*, *P. juncifolia* y *B. purpurea* y cóncava en *E. nocturnum* (Cap. 1, Fig. 3.1.).

**6. Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie abaxial.** 0= plana, 1= convexa de domos bajos, 2= convexa de domos altos, 3= cóncava. La pared periclinal de las células epidérmicas es plana en *H. guerrerensis*, convexa de domos

bajos en *Isochilus*, *P. juncifolia*, *N. graminifolia* y *N. striata*, convexas de domos altos en *B. purpurea* y cóncava en *E. nocturnum* y *N. dressleriana* (Cap. 1, Fig. 3.1.).

**7. Tipo de aparato estomático.** 0= anomocítico, 1= tetracítico, 2= diacítico. La mayoría de las especies estudiadas tienen estomas anomocíticos, pero las especies de *Nemaconia* tetracíticos y *B. purpurea* diacíticos (Cap. 1, Fig. 1.4.).

**8. Forma de los estomas.** 0= circular, 1= elíptico. La forma de los estomas fué considerada a partir del contorno de ambas células oclusivas. Es circular en *H. guerrerensis*, las especies de *Isochilus*, *P. juncifolia* y *E. nocturnum*, y elíptico en las especies de *Nemaconia* y *B. purpurea* (Cap. 1, Fig. 1.4.).

**9. Forma del poro estomático.** 0= elíptico, 1= linear. Las especies de *Isochilus*, *P. juncifolia* y *E. nocturnum* tienen el poro estomático elíptico y el resto de las especies estudiadas lo tiene linear (Cap.1, Fig. 1.4.).

**10. Nivel de los estomas con respecto a las otras células epidérmicas.** 0= superficiales, 1= hundidos. Los estomas están al mismo nivel que las demás células epidérmicas, es decir son superficiales, en la mayoría de las especies estudiadas menos en el género *Nemaconia* donde se encuentran por debajo del nivel de las células epidérmicas adyacentes, es decir son hundidos (Cap. 1, Fig. 1.4. C, I).

**11. Fibras no vasculares.** 0= ausentes, 1= solitarias, 2=agrupadas en haces. Las fibras no vasculares están ausentes en *B. purpurea*, son solitarias en todos los representantes de Ponerinae y se encuentran agrupadas en haces no vasculares en *E. nocturnum* (Cap. 1, Fig. 1.6. A, E, F, G).

**12. Drusas.** 0=ausente, 1=presente. Se presentan drusas en todas las especies de Ponerinae, pero no en *B. purpurea* ni en *E. nocturnum* (Cap. 1, Fig. 1.7. C, E).

**13. Cristales lenticulares.** =ausente, 1=presente. Los cristales lenticulares se presentan en *H. guerrerensis*, *N. striata*, *P. juncifolia* y *E. nocturnum*, estando ausentes en el resto de las especies estudiadas (Cap. 1, Fig. 1.7. F).

**Cuadro 3.3.** Síntesis de los 13 caracteres y estados de carácter de la subtribu  
*Ponerinae, B. purpurea y E.nocturnum.*

No. de carácter	Caracteres	Estados de carácter		
1	Tipo de tallo	cormo (0)	Tallo tipo caña sin ramificarse(1)	Tallo tipo caña, ramificado(2)
2	Verrugas de las vainas foliares	Ausentes (0)	Presentes (1)	
3	Forma de las flores	Tubular(0)	Campanulada (1)	Estrellada (2)
4	Marcas en la lámina foliar	Sin marca (0)	Una marca (1)	Dos marcas (2)
5	Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie adaxial	Plana (0)	Convexa (1)	Cóncava (2)
6	Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie abaxial.	Plana (0)	Convexa de domos bajos (1)	Convexa de domos altos (2)      Cóncava (3)
7	Tipo de aparato estomático	Anomocítico (0)	Tetracítico (1)	Diacítico (2)
8	Forma de los estomas	Circular (0)	Elíptico (1)	
9	Forma del poro estomático	Elíptico (0)	Linear (1)	
10	Nivel de los estomas con respecto a las otras células epidérmicas	Superficiales (0)	Hundidos (1)	
11	Fibras no vasculares.	Ausentes (0)	Solitarias (1)	Agrupadas en haces (2)0
12	Drusas	Ausentes (0)	Presentes (1)	
13	Cristales lenticulares	Ausentes (0)	Presentes (1)	

**Cuadro 3.4.** Datos morfológicos codificados. Matriz de la subtribu Ponerinae, *B. purpurea* y *E.nocturnum*. Los números de carácter se refieren a los listados en el cuadro anterior.

Taxa/carácter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>E.. nocturnum</i>	0	0	2	0	2	3	0	0	0	0	2	0	1
<i>B. purpurea</i>	1	0	1	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0
<i>H. guerrerensis</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
<i>I. carnosifloru</i>	0	1	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>I. alatus</i>	0	1	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>I. langlassei</i>	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>I.s latibracteatus</i>	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>P. juncifolia</i>	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>N. dressleriana</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>N. graminifolia</i>	0	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>N.striata</i>	0	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1

#### CARACTERES MOLECULARES.

No se logró amplificar ni secuenciar la región *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* para la especie *N. dressleriana* ni la región ITS para la especie *P. juncifolia*.

#### ANÁLISIS CLADÍSTICOS

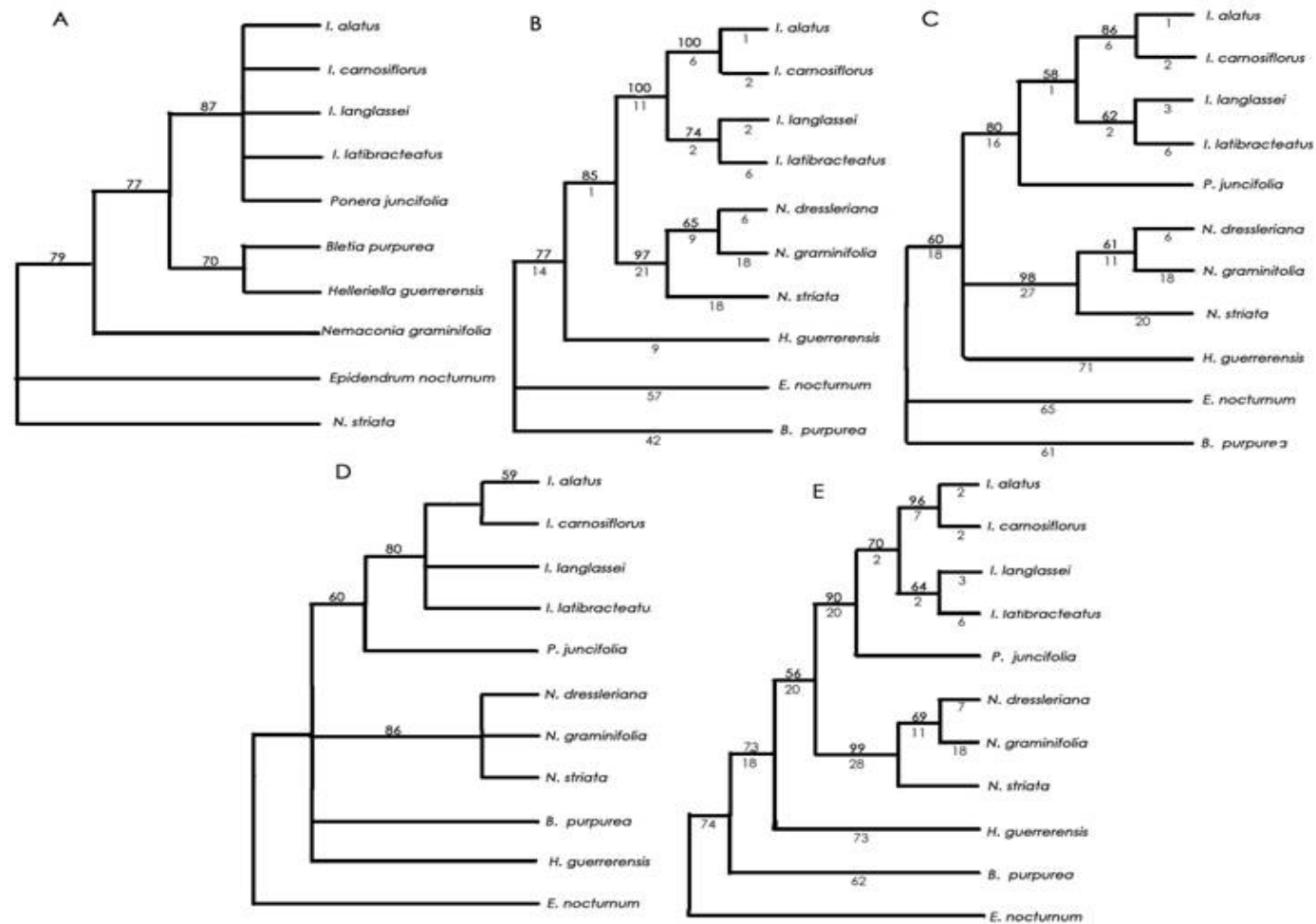
Los cladogramas obtenidos de los análisis por separado y combinados recuperaron relaciones filogenéticas similares, de hecho, las topologías de los árboles son las mismas en el

análisis de la región de ITS, las dos regiones de ADN y el análisis combinado. Además en la mayoría de los análisis se recuperan los clados correspondientes a los géneros considerados actualmente en Ponerinae: *Helleriella*, *Isochilus*, *Nemaconia* y *Ponera*.

**Análisis de *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*.** La matriz alineada del espaciador intergénico *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* consistió de 906 posiciones de nucleótidos, siete indels codificados, para un total de 899 caracteres de los cuales 93 fueron variables y 22 fueron informativos para la parsimonia. La búsqueda exhaustiva recobró 75 árboles más parsimoniosos de 125 pasos, CI=0.96 e IR=0.82. En el consenso estricto de estos árboles (Fig. 3.2. A) la subtribu Ponerinae resultó parafilética, ya que *B. purpurea* se anidó dentro de ella, formando un clado con *H. guerrerensis* (PB=70) cuyo grupo hermano es *N. graminifolia* (PB=77). *P. juncifolia* y las especies de *Isochilus* conforman un clado moderadamente apoyado (PB=87) pero sin resolución al interior.

**Análisis de la región ITS.** La matriz alineada de la región ITS consistió de 974 posiciones de nucleótidos, ocho indels codificados, para un total de 966 caracteres de los cuales 121 fueron variables y 107 fueron potencialmente informativos para la parsimonia. La búsqueda exhaustiva encontró un solo árbol más corto (Fig. 3.2. B) con una longitud de 249 pasos, CI=0.79 y RI=0.69 (Cuadro 5). Ponerinae constituyó un grupo monofilético con soporte moderado (PB=77) formado por dos clados principales bien apoyados, el de las especies de *Isochilus* (PB=100) y de *Nemaconia* (PB=97), siendo *H. guerrerensis* su linaje hermano. En *Isochilus* existen dos subclados el de *I. alatus*-*I. carnosiflorus* y el de *I. langlassei*-*I. latibracteatus* y en *Nemaconia*, *N. striata* es hermana del clado formado por *N. dressleriana*-*N. graminifolia*.

**Análisis de las dos regiones de ADN combinadas (*trnH<sup>GUG</sup>-psbA* e ITS).** El conjunto de secuencias de las dos regiones de ADN combinadas incluyó 1880 posiciones de nucleótidos, 15 indels codificados, para un total de 1865 caracteres de los cuales 214 caracteres fueron variables y 129 fueron informativos para la parsimonia. La búsqueda exhaustiva encontró un solo árbol más corto (Fig. 3.2. C) con una longitud de 352 pasos, CI=0.83 y RI=0.68.



**Figura 3.2.** Comparación entre los cladogramas obtenidos para los 11 taxones estudiados de la región (A) *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* (L=125, CI=0.96, RI=0.82), (B) ITS (L=1249, CI=0.79, RI=0.69), (C) Las regiones *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* e ITS combinadas (L=352, CI=0.83, RI=0), (D) los 13 caracteres estructurales (L=28, CI=0.75, RI=0.77), (E) Las regiones *trnH<sup>GUG</sup>-psbA*, ITS y los caracteres estructurales combinados (L=377, CI=0.82, RI=0.62). Los números sobre las ramas indican las proporciones bootstrap > 50 y los números bajo las ramas son la longitud de las mismas.

La monofilia de Ponerinae tuvo un apoyo bajo (PB=60), no hubo resolución entre los principales linajes (*H. guerrerensis*, el clado de *Isochilus* y el de *Nemaconia*). *P. juncifolia* se ubicó como la especie hermana de *Isochilus* y las relaciones intraespecíficas en *Isochilus* y *Nemaconia* fueron iguales a las del árbol de la región ITS. Las cifras de apoyo de los clados se abatieron en comparación con los obtenidos en los árboles de las secuencias por separado.

**Análisis de los caracteres morfológicos.** Este análisis produjo un árbol más parsimonioso de 28 pasos de largo, CI=0.75 y RI=0.77 (Fig. 3.2. D). La búsqueda exhaustiva resultó en un árbol más corto (Fig. 3.2. D) con una longitud de 28 pasos, CI=0.75 y RI=0.77. No hay apoyo a la monofilia de Ponerinae, pero sí se recuperan los clados de las especies de *Nemaconia* (PB=86) y de *Isochilus* (PB=80), cuyas relaciones al interior no están resueltas o están escasamente.

**Análisis de las regiones de ADN y los caracteres morfológicos.** La búsqueda exhaustiva realizada con las secuencias de las dos regiones de ADN y los caracteres estructurales originó un cladograma (Fig. 3.2. E). En este cladograma, las relaciones de todas las especies de la subtribu Ponerinae están resueltas. La topología del árbol del análisis combinado fue muy similar al de la región de ITS, pero con *P. juncifolia* como especie hermana de *Isochilus*.

En el cuadro 4 se muestran las características de las matrices obtenidas para cada uno de los datos analizados así como los principales estadísticos de los cladogramas resultantes.



**Cuadro 3.5.** Características de los grupos de datos analizados en el presente estudio.

L= Longitud, CI= Índice de consistencia, RI= Índice de retención

Análisis	Longitud de la matriz alineada	Número de gaps codificados	Número/% caracteres informativos	Número de cladogramas más parsimoniosos encontrados	L	CI	RI
Región <i>trnH<sup>GUG</sup>-psbA</i>	906	7	22/2.4	75	125	0.96	0.82
Región ITS	974	8	107/10.1	1	249	0.79	0.69
Región <i>trnH<sup>GUG</sup>-psbA</i> + ITS	1880	15	129/6.9	1	352	0.83	0.68
Caracteres estructurales	13	-	11/84	1	28	0.75	0.77
Secuencias+ caracteres estructurales	1893	15	99/5.2	1	377	0.82	0.68

Debido que el análisis combinado proporcionó uno de los árboles más resueltos, donde los apoyos bootstrap se incrementaron en algunos clados en comparación con el árbol que emplea los datos moleculares o el que muestra solo los datos estructurales, se considera la mejor estimación filogenética y por lo tanto será utilizado para optimizar los caracteres estructurales.

#### OPTIMIZACIÓN DE LOS CARACTERES ESTRUCTURALES EN EL ÁRBOL FILOGENÉTICO COMBINADO.

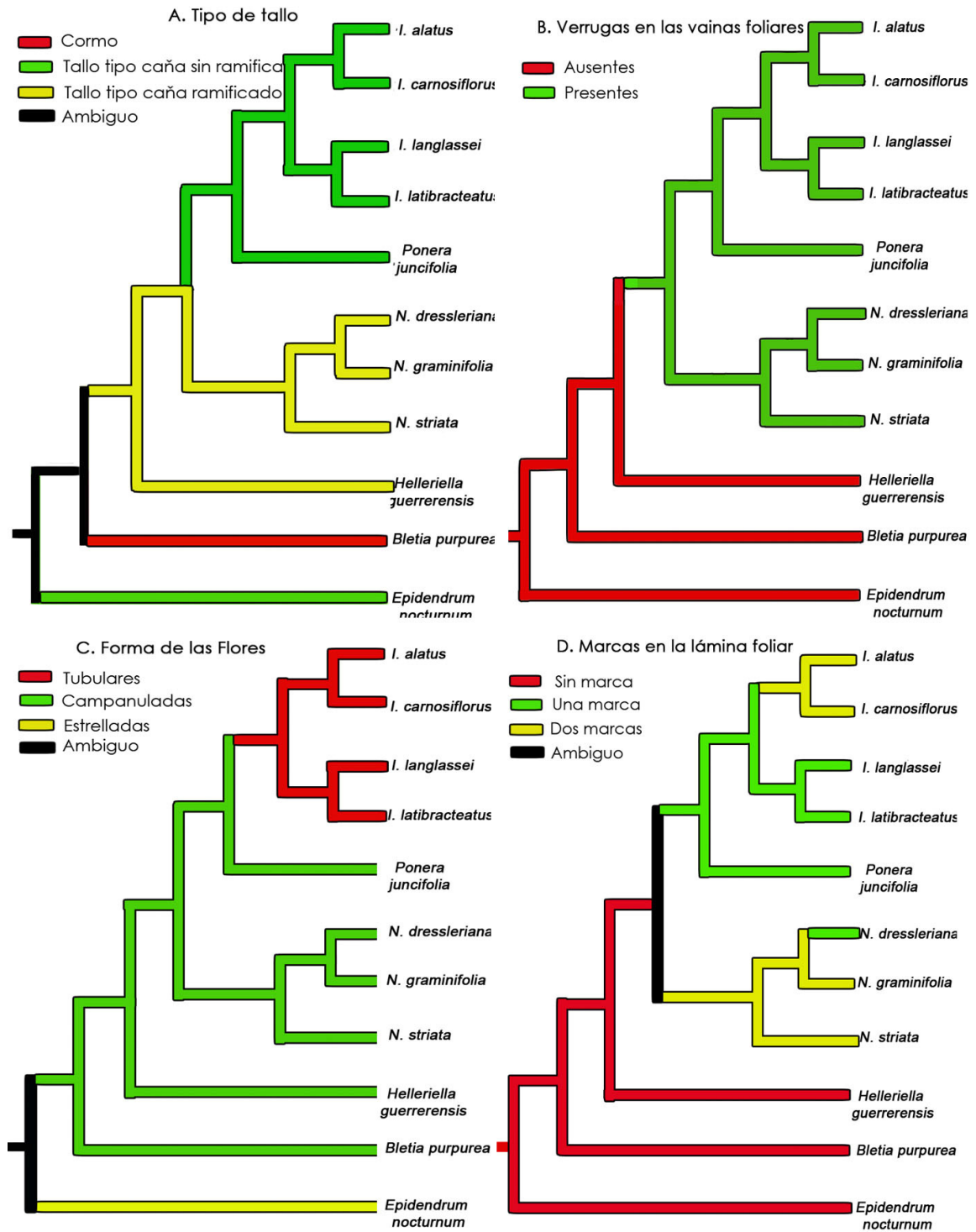
Los cambios en los estados de carácter de los 13 caracteres estructurales incluidos en los análisis cladísticos de acuerdo con la optimización "ACCTRAN" en MacClade, se indican a continuación (Fig 3.3.-3.5).

**1). Tipo de tallo.** El estado ancestral de este carácter es ambiguo entre el tallo tipo caña sin ramificar de *E.nocturnum* y el corno de *B. purpurea*. Si se asume que el estado ancestral es la condición tallo tipo caña sin ramificar, el carácter derivó a la condición de corno en *B. purpurea* y a tallo tipo caña ramificado en *H. guerrerensis* y *Nemaconia* y posteriormente revirtió a la condición ancestral en *Isochilus* y *P. juncifolia* (Fig. 3.3. A).

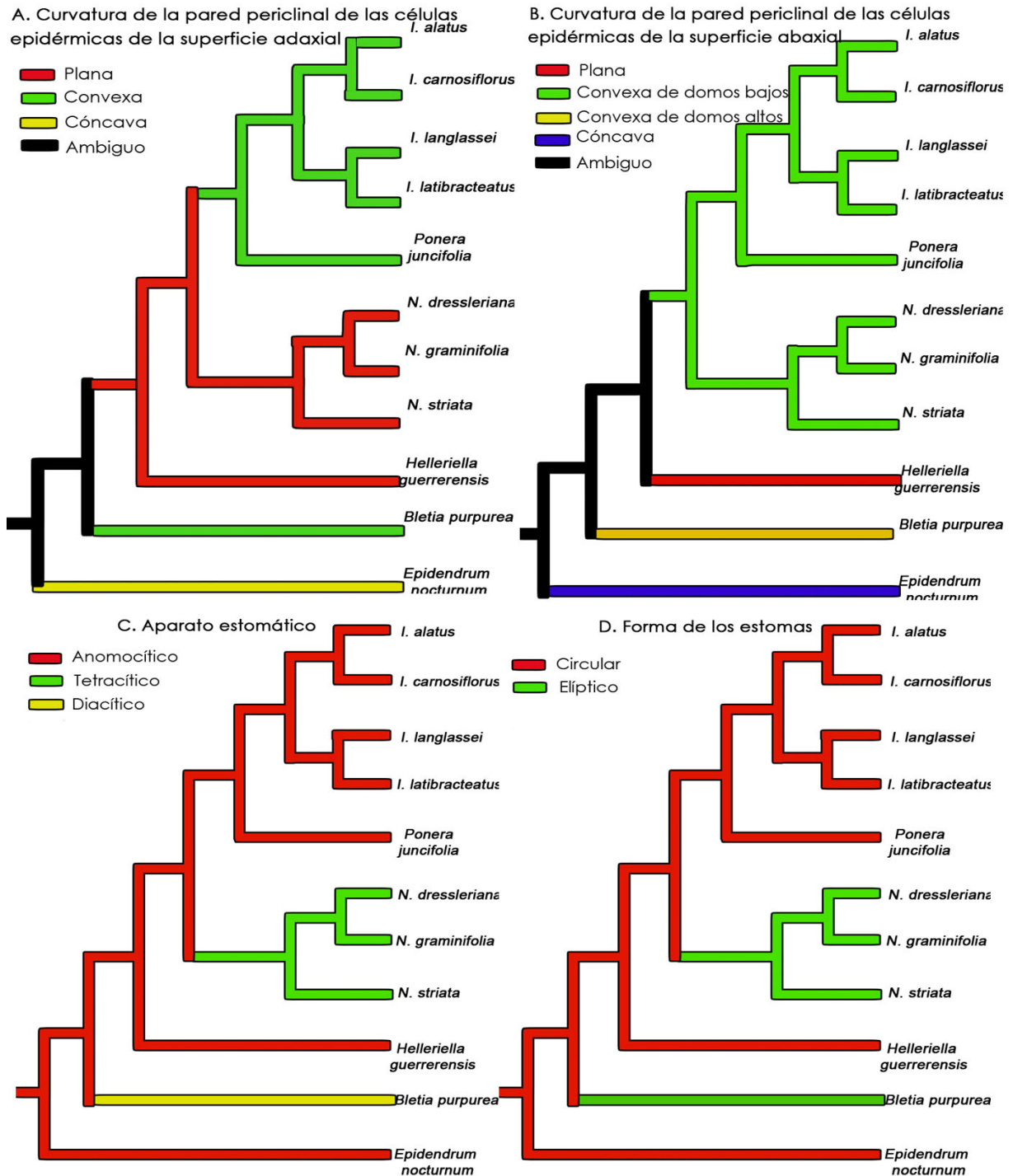
**2) Verrugas de las vainas foliares.** La ausencia de verrugas en las vainas foliares es el estado ancestral de este carácter (*E. nocturnum*, *B. purpurea* y *H. guerrerensis*) y de él se deriva la presencia de verrugas en las vainas foliares en *Nemaconia*, *P. juncifolia* e *Isochilus* (Fig. 3.3. B).

**3) Forma de las flores.** El estado ancestral de este carácter es ambiguo entre las flores estrelladas como en *E. nocturnum* y las flores campanuladas presentes en *B. purpurea* y casi todas las Ponerinae, menos *Isochilus*, donde derivó a la condición de flores tubulares (Fig. 3.3. C).

**4) Marcas en la lámina foliar.** La condición plesiomórfica de este carácter es la ausencia de marcas en la lámina foliar en los grupos externos y en *H. guerrerensis*, pero existe ambigüedad en el resto de los representantes de Ponerinae entre la posesión de una o dos marcas (Fig. 3.3. D). Si la condición ancestral es una marca, la posesión de dos marcas se originó independientemente en *I. alatus*-*I. carnosiflorus* y *Nemaconia*, donde *N. dressleriana* revierte a la condición ancestral. Pero si el estado plesiomórfico es la presencia de dos marcas, una marca se derivó en el linaje *P. juncifolia* /*Isochilus* e independientemente en *N. dressleriana*.



**Figura. 3.3.** Optimización ACCTRAN de los caracteres. A) Tipo de tallo. B) Verrugas de las vainas foliares. C) Forma de las flores. D) Marcas en la lámina foliar, en el árbol más parsimonioso obtenido del análisis conjunto de los caracteres moleculares y estructurales.



**Figura 3.4.** Optimización ACCTRAN de los caracteres. A) Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie adxial. B) Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie abaxial. C) Tipo de aparato estomático. D) Forma de los estomas, en el árbol más parsimonioso obtenido del análisis conjunto de los caracteres moleculares y estructurales.

**5) Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie adaxial.** En este carácter se recuperó como ambiguo el estado ancestral, siendo cóncavo en *E. nocturnum*. El estado convexo aparece independientemente en *B. purpurea* y en el clado [*P. juncifolia* [*Isochilus*]], mientras que la condición plana es ancestral en Ponerinae (Fig. 3.4. A).

**6) Curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas en la superficie abaxial.** El estado ancestral de este carácter es ambiguo. Sin embargo, la condición convexa de domos bajos, se presenta en casi todos los miembros estudiados de la subtribu Ponerinae, excepto en *H. guerrerensis* (Fig. 3.4. B).

**7) Tipo de aparato estomático.** El estado ancestral de este carácter es el estoma anomocítico y de él se derivan los estados diacítico en *B. purpurea* y tetracítico en *Nemaconia* (Fig. 3.4. C).

**8) Forma de los estomas.** Los estomas de forma circular son el estado ancestral de este carácter. La condición elíptica tuvo dos orígenes independientes en *B. purpurea* y *Nemaconia* (Fig. 3.4. D).

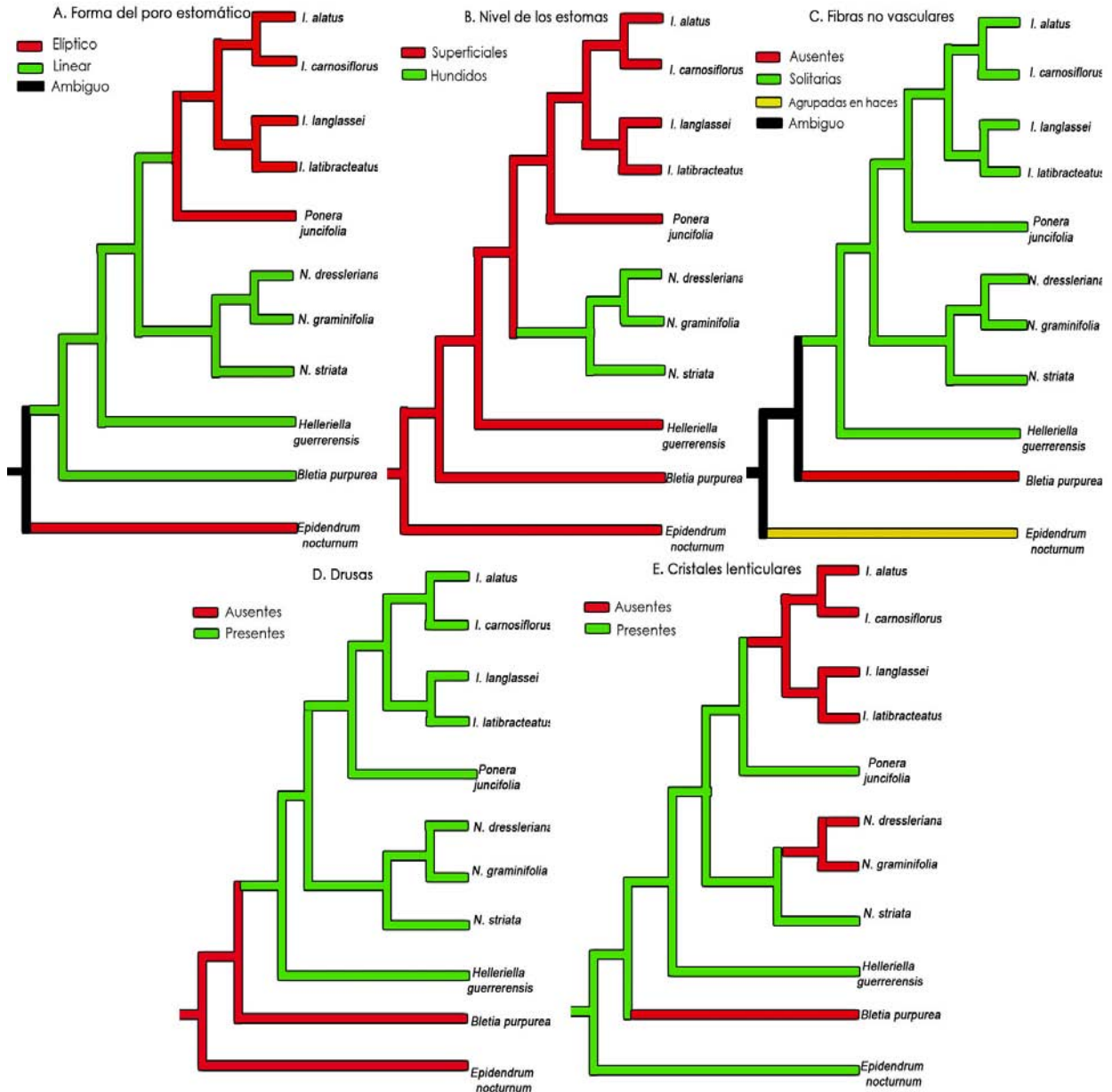
**9) Forma del poro estomático.** El poro elíptico evolucionó derivadamente en *P. juncifolia*/ *Isochilus* y *E. nocturnum*. El linear es simplesiomórfico en Ponerinae y *B. purpurea* (Fig. 3.5. A).

**10) Nivel de los estomas con respecto a las otras células epidérmicas.** Los estomas superficiales son la condición ancestral, la que cambió al estado hundido en *Nemaconia* (Fig. 3.5. B).

**11) Fibras no vasculares.** El estado ancestral de este carácter es ambiguo entre las fibras agrupadas en haces, solitarias y ausentes. La presencia de fibras solitarias es una sinapomorfía en la subtribu Ponerinae (Fig. 3.5. C).

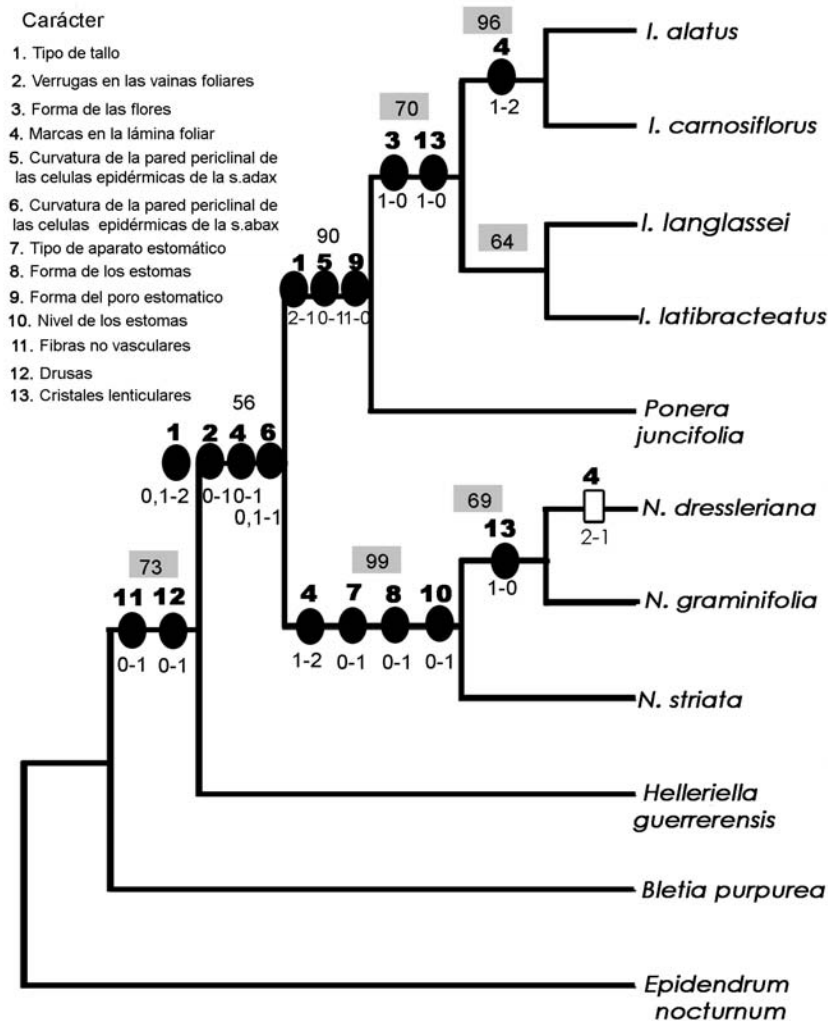
**12) Drusas.** El estado ancestral de este carácter es la ausencia de drusas, por lo tanto, la presencia de drusas es una condición derivada y única para Ponerinae (Fig. 3.5. D).

13) **Cristales lenticulares.** La presencia de cristales lenticulares es la condición ancestral y la ausencia de éstos evolucionó tres veces: una en *B. purpurea*, otra en *N. dressleriana*-*N. graminifolia* y otra en *Isochilus* (Fig. 3.5. E).



**Figura 3.5.** Optimización ACCTRAN de los caracteres. A) Forma del poro estomático. B) Nivel de los estomas. C) Fibras no vasculares. D) Drusas. E) Cristales lenticulares.

A continuación se indican la polaridad en los cambios de los estados de carácter de los 13 caracteres estructurales examinados al optimizarlos con “ACCTRAN” en el árbol más parsimonioso generado del análisis combinado, que muestra una síntesis de los caracteres sinapomórficos para Ponerinae y los subgrupos en Ponerinae (Fig. 3.6).



**Figura 3.6.** Distribución de los cambios de los estados de carácter estructurales en el cladograma más parsimonioso generado del análisis combinado de secuencias de ADN de las regiones *trnH<sup>GUG</sup>-psbA* e ITS y 13 caracteres morfológicos/anatómicos de nueve especies de la subtribu Ponerinae, *B. purpurea* y *E.nocturnum*. Los números en los rectángulos grises son las proporciones bootstrap > 50, los elipses negros indican las sinapomorfias, los rectángulo blanco indica reversión, bajo éstos se encuentra la dirección de cambio.

# DISCUSIÓN

## RELACIONES EN LA SUBTRIBU PONERINAE E IMPLICACIONES TAXONÓMICAS

Aunque el objetivo de este estudio no fue evaluar la monofilia de la subtribu Ponerinae, se encontraron resultados consistentes con los de van den Berg *et al.*, (2000, 2005). La monofilia de Ponerinae se reafirma, pero en este caso, con valores de apoyo bootstrap más bajos (60-77 vs. 100), ya que en sus análisis utilizaron cinco regiones de ADN, una nuclear (ITS) y cuatro del cloroplasto (*trnL*, *trnL-F*, *matK* y *rbcL*). Mientras que en este estudio sólo se utilizaron dos regiones, de las cuales *trnHGUC-psbA* no se había empleado en ningún análisis filogenético de la familia Orchidaceae.

Los linajes resultantes en Ponerinae corresponden a la clasificación intragenérica previa, que incluye a los géneros *Isochilus*, *Helleriella*, *Nemaconia* y *Ponera* (Soto 2005, Soto *et al.*, 2007). Sin embargo, que en la mayoría de los cladogramas obtenidos en este trabajo *Helleriella* es hermana del resto de Ponerinae, mientras que en el trabajo de van den Berg *et al.* (2005) lo es *Nemaconia*.

A pesar de que muchos de los caracteres estructurales muestran homoplasia (Fig. 3.6.) todos ellos constituyen sinapomorfias de los clados que se mencionan a continuación.

Para la subtribu Ponerinae las sinapomorfias son fibras no vasculares solitarias y las drusas (Fig. 3.6., carácter 11 y 12). Estas sinapomorfias son interesantes porque las fibras no vasculares solitarias solo se han encontrado de manera aislada en cuatro orquídeas orquidoides (Olatunji y Nengim, 1980, Arditti, 1992) y las drusas también se han reportado en las orquídeas (Pridgeon, 1994; Holltzmeier *et al.*, 1998; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001), lo significativo es su abundancia en la subtribu Ponerinae.

Con la exclusión de *H. guerrerensis* el resto de los géneros en Ponerinae forman un clado caracterizado por la presencia de verrugas en las vainas foliares y la curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas de la superficie abaxial convexa de domos bajos (Fig. 3.6. carácter 2, 6). La presencia de marcas en las láminas foliares está restringida a este clado, pero no se pudo conocer su condición plesiomórfica. Las marcas son una impresión de la porción apical de la vaina de una hoja anterior o de dos hojas anteriores en el caso de dos marcas, sobre la lámina de la hoja en formación, producida por una presión durante el



desarrollo de la hoja (capítulo 2). Por lo tanto, es más factible pensar que se origina primero una marca y luego aparecieron dos marcas independientemente en el clado *Isochilus alatus*-*I. carnosiflorus* y *Nemaconia*, revirtiendo a la condición plesiomórfica en *N. dressleriana* (Fig. 3.3. D).

El clado [*P. juncifolia* [*Isochilus*]] se caracteriza por el tallo tipo caña sin ramificar, por la curvatura de la pared periclinal de las células epidérmicas de la superficie adaxial convexa que se presenta independientemente en *B. purpurea* (Fig. 3.4. A, Fig. 3.6. caracteres 1, 5), por el poro estomático elíptico, el cual se presenta también en *E.nocturnum* (Fig. 3.5. A, Fig. 3.6. carácter 9) y por la presencia de una marca, aunque en el clado de *I. alatus* -*I. carnosiflorus* derive en la posesión de dos marcas (Fig. 3.3. D).

Para el género *Isochilus* la forma de las flores tubulares es una sinapomorfia (Fig. 3.3. C, Fig. 3.6. carácter 3). Este carácter parece estar relacionado con la polinización por colibríes. De hecho, existen reportes de polinización por colibríes en *I. carnosiflorus* (Van der Pijl y Dodson, 1966), *I. aurantiacus* (Soto, 2003) e *I. alatus* (Soto, 2008).

*Nemaconia* se encuentra sustentada por los tallos tipo caña ramificados, condición que además se presenta en *H. guerrerensis* (Fig. 3.3. A) y varios estados de carácter de los aparatos estomáticos como son los estomas tetracíticos, elípticos y hundidos con respecto a las células epidérmicas adyacentes (Fig. 3.4. C, D y Fig. 3.5. D, caracteres 7, 8, 10). Así como la posesión de dos marcas en *N. graminifolia* y *N. striata*, pero que en *N. dressleriana* evoluciona a una marca.

Como resultado de la optimización de los caracteres estructurales también se pudieron observar simplisiomorfías que se encuentran en los representantes de Ponerinae y en alguno o en los dos grupos externos, tales como los aparatos estomáticos anomocíticos, los estomas circulares, el poro estomático elíptico y los estomas superficiales. (Fig. 3.4. C-D y 3.5. A-B). Las flores campanuladas son simplisiomórficas en Ponerinae, porque también están presentes en *B. purpurea* (Fig. 3.3. C). La polinización no está documentada, en *Helleriella*, *Nemaconia* y *Ponera* pero los vectores son probablemente las abejas (no euglosinas) porque las flores tienen las características del síndrome de polinización por abejas que son: anthesis diurna, flores zigomórficas con labelo prominente, segmentos florales de colores blanco, púrpura o amarillo, guías de néctar y flores horizontales (Endress, 1994). En *B. purpurea* se ha reportado polinización por *Euglossa hemichlora*, *Melipona* sp. y *Thygater* sp. (Dodson y Frymire, 1961).

La presencia de cristales lenticulares es simplesiomórfico, pero la ausencia de cristales lenticulares separadamente define los clados de *Isochilus*, *N. dressleriana*-*N. graminifolia* y aparece independientemente en *B. purpurea* (Fig. 3.5. E).

El tallo tipo caña se presenta en los representantes de la subtribu Ponerinae, en sus modalidades de no ramificado y ramificado y el cormo que es un tallo engrosado de almacenamiento localizado bajo la superficie de la tierra se encuentra en *B. purpurea*. Dressler (1981) sugirió que el hábito tallo tipo caña (*reed-stem*) pudo haberse derivado de dos tipos ancestrales: un hábito cormoso o de los tallos engrosados que se presentan en algunas orquídeas saprófitas durante la fase de plántula. Sin embargo, en función de lo que se conoce de las relaciones filogenéticas de Epidendreae, aunque Bletinae es hermana de Ponerinae es muy aberrante en la posesión de cormos, porque es el único miembro de este gran linaje que tiene cormos, por lo tanto la condición ancestral posiblemente es el tallo tipo caña y el cormo es un estado derivado y único (autoapomorfía) en *B.* (Fig. 3.3. carácter 1).

## CONCLUSIONES

Las relaciones filogenéticas obtenidas mediante el análisis cladístico de las regiones de ADN (*trnH<sup>GUG</sup>-psbA* e ITS) y los caracteres estructurales son similares a los que consideraron autores previos (van den Berg *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007), donde se propone a la subtribu Ponerinae como un grupo monofilético que incluye a los géneros *Isochilus*, *Helleriella*, *Nemaconia* y *Ponera*.

Prácticamente todos los caracteres estructurales analizados en conjunto con los caracteres moleculares delimitan clados y son consistentes con la clasificación genérica. Clasificaciones previas como las de Pfitzer (1887), Dressler (1993) y Szlachetko (1995) que solamente consideraban caracteres florales, no coinciden con los resultados de los análisis filogenéticos posteriores (van den Berg *et al.*, 2000, 2005), mientras que todos los atributos estructurales que se estudiaron aquí, de alguna manera ayudan a delimitar tanto a la subtribu Ponerinae como grupo monofilético y reconocer clados a su interior. Por lo tanto, es necesario considerar todas las fuentes posibles de información y no restringirse a determinados tipos de caracteres.

## LITERATURA CITADA

- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley y Sons, Inc. U. S.A. 691.
- Baker, M.A. 1972. Foliar anatomy of the Laeliinae (Orchidaceae). Tesis de doctorado. Washington University, St. Louis Missouri.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, S. Campbell y M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Cameron, K. M. 2007. Molecular phylogenetics of Orchidaceae: The first decade of DNA sequencing. En: Cameron, K. M., J. Arditti y T. Kull (Eds.) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, IX. pp. 164-200. NYBG Press.
- Chase, M. W, J. V. Freudenstein, K. M. Cameron y R. L. Barrett. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. En: Dixon K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett, y P. Cribb (Eds.). *Orchid Conservation*. pp. 69-89. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah..
- Dodson, C. H. y G. P. Frymire. 1961. Natural pollination of orchids. *Missouri Botanical Garden Bulletin* 49: 133-139.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin, Botanical Society of America* 19: 11-15.
- Dressler, R. 1981. *The Orchids. Natural History and Classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, E. U. A.. 305.
- Dressler, R. 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchids Family*. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 314 .
- Endress, P. K. 1994. *Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- Holtzmeier, M. A., L. Stern y W. S. Judd. 1998. Comparative anatomy and systematics of Sengha's cushion species of *Maxillaria*. *Botanical Journal of Linnean Society* 127: 43-82.
- Kelchner, S. A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87: 482-498.

- Maddison, W. P. y D. R. Maddison, 2001. *MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution*. Version. 4.02. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Olantunji, O. A. y R. O. Nengim. 1980. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in Orchidaceae. *Botanical Journal of Linnean Society* 80: 357-370.
- Nixon, K. C. y J. M. Carpenter. 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12: 221-241.
- Patterson, C. 1982. Morphological Characters and Homology. En: Joysey, K. A. y A. E. Friday (Eds). *Problems of Phylogenetic Reconstruction*. pp. 21-74. Academic Press. London.
- Pinna, M. C. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* 7: 367-394.
- Pfitzer, E. 1887. Entwurf einer natürliehen Anordnung der Orchidenn. Carl Winter's Universitätsbuchhandlung, Heidelberg.
- Pridgeon, A. M. 1994. Systematic leaf anatomy of Caladeniinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 114: 31-48.
- Prychid, J. Ch. y P. Rudall. 1999. Calcium oxalate in Monocotyledons: A review of their structure and Systematics. *Annals of Botany*. 84: 725-739.
- Sandoval-Zapotitla, E. y T. Terrazas. 2001. Leaf anatomy of 16 taxa of the *Trichocentrum* clade (Orchidaceae: Oncidiinae). *Lindleyana* 16:81-93
- Schlechter, R. 1926. Das system der Orchidaceen. Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin.Dahlem 9: 563-91.
- Sang, T., D. J. Crawford y T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84 (9): 1120-1136.
- Shaw, J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling y R. L. Small. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92 (1): 142-166.
- Simmons, M. P. y H. Ochoterena. 2000. Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. *Systematic Biology* 49 (2): 369-381.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis y J. J. Doyle. (Eds.). 1998. *Molecular systematics of plants II. DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers. Boston.

- Soto Arenas, M. A. 2003. *I. aurantiacus*. In Orchids of Mexico, parts 2 and 3. Icones Orchidacearum, fasc. 5 y 6. (ed. E. Hágsater and M. A. Soto Arenas), pl. 592. Herbario AMO, Ciudad de México.
- Soto Arenas, M. A. 2005. Ponerinae. En: Pridgeon A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase y F. N. Rasmussen (Eds.) Genera Orchidacearum: Epidendroideae. 1. Vol. 4. Oxford University Press.
- Soto, M. A., G. Salazar y C. van den Berg. 2007. New combinations in *Domingoa*, *Homalopetalum* (Orchidaceae, Laeliinae) and *Nemaconia* (Orchidaceae: Ponerinae) Ponerinae. *Neodiversity* 2: 7-7.
- Soto, M. A. 2008. *Isochilus alatus*. In Orchids of Mexico, part. 4. Icones Orchidacearum, fasc. 10. (ed. E. Hágsater y M. A. Soto Arenas), pl. 1030. Herbario AMO, Ciudad de México.
- Sun, Y., D. Z. Skinner y S. H. Hulbert. 1994. Phylogenetics analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.
- Szlachetko, D. 1991. New taxa in the order Orchidales. *Folia Geobotanica Phytotaxa* 26(3): 315-329.
- Szlachetko, D. 1995. Systema Orchidaliium. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* (Supplement) 3: 1-152.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates. Massachussets.
- Tate, J. A. y B. B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and Diverse Origins of the Polyploid Species. *Systematic Botany* 28 (4): 723-737.
- van den Berg, C., W. E. Higgins, R. L. Dressler, W. M. Whitten, M. A. Soto Arenas, A. Culham y M. W. Chase. 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., D. H. Goldman, J. V. Freudenstein, K. M. Cameron y M. W. Chase. 2005. An overview of phylogenetics relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92(4): 613-624.
- Van der pijl, L. y C. H. Dodson. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, FL.

- White, T. J., T. Bruns., S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky y T.J. White (eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. pp. 315-322. Academic Press, San Diego California, USA.
- Wiens, J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47: 568-581.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

En Ponerinae parecería que la anatomía de las hojas de sus representantes es relativamente homogénea, pero existen varios caracteres variables e incluso que se vislumbraban como sinapomorfias potenciales, para la subtribu y los grupos a su interior. Una vez que los caracteres estructurales junto con los moleculares correspondientes a dos regiones de ADN se analizaron mediante el método de parsimonia, muchas de las sinapomorfias se confirmaron como tales. Estos caracteres sustentaron la monofilia de Ponerinae y de varios clados dentro de la subtribu.

Las marcas y la prominencia media de la lámina foliar de las especies de Ponerinae, salvo *H.* son una depresión lineal y una elevación triangular respectivamente del nivel general de la lámina en la superficie abaxial. Las marcas se parecen a la región de abscisión en etapas tempranas de la diferenciación de esta la última, la cuál inicia también con una depresión entre la lámina y la vaina foliar. Sin embargo, los cambios substanciales en los tejidos internos representados por la formación y agrandamiento de espacios lisoesquizógenos entre los haces vasculares que ocurren en la región de abscisión, no ocurren en las marcas. Pero nada de esto ocurre en los tejidos internos de las especies que tienen las marcas. Las marcas de la lámina foliar probablemente se forman por la presión de la región de abscisión de la hoja previa sobre la lámina en desarrollo, porque la abertura de la porción apical de la vaina foliar es menor que la amplitud de la lámina foliar que se elonga a través de ella.

Para saber con certeza la naturaleza y el origen de las marcas y confirmar o refutar el mecanismo de formación propuesto en este trabajo sería necesario realizar un estudio de desarrollo de las hojas. También podría extenderse el muestreo anatómico de la hoja a un mayor número de especies de la subtribu, así como a la obtención de secuencias de las dos regiones de ADN utilizadas para contar con una filogenia más robusta de la subtribu Ponerinae.

**Apéndice 1.** Especies estudiadas de la subtribu Ponerinae, Bletiinae y Laeliinae.

Espece	No. colecta	Localidad	Anatomía	ADN
<i>Helleriella guerrerensis</i> Dressler y Hágsater	E. Hágsater 13238	Guerrero	+	+
<i>Isochilus alatus</i> Schltr.	G.A. Salazar 5764	Oaxaca. Chimalapas.	+	+
<i>Isochilus. carnosiflorus</i> Lindl.	L. Sánchez 592	Quintana Roo. Othón P. Blanco. Ejido Caobas, sabana del Jaguacteal, 15 km al s de carr. Principal desde Xpujl-Chetumal	+	+
<i>Isochilus. langlassei</i> Schltr.	G.A. Salazar 6452	Guerrero. Omiltemi	+	+
<i>Isochilus latibracteatus</i> A. Rich. y Galeotti	G.A. Salazar 6688	Oaxaca.	+	+
<i>Nemaconia dressleriana</i> (Soto Arenas) van den Berg, Salazar & Soto Arenas	G.A. Salazar 7229	Morelos	+	+
<i>Nemaconia graminifolia</i> (Knowles y Westc.) van den Berg, Salazar y Soto Arenas	A. Espejo 5365	Puebla: Tetela de Ocampo: Cañón de Escahuasco.	+	+
<i>Nemaconia striata</i> (Lindl.) van den Berg, Salazar y Soto Arenas	E. Pérez 36	Chiapas. Ocosingo. A 6 km sobre el camino a las ruinas de Toniná.	+	+
<i>Ponera juncifolia</i> Lindl.	G.A. Salazar 6742	Oaxaca.	+	+
<i>Bletia purpurea</i> (Lam.) DC.	Osnaya 201 y E.A. Pérez	Oaxaca. Nizanda, sabana a 250 m.s.n.m.	+	+
<i>Epidendrum nocturnum</i> Jacq.	L. Sánchez 567	Quintana Roo. 1 km al N de la Unión, cuenca alrededor de un gran cenote.	+	+