



Relaciones filogenéticas de la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae) inferidas a partir de caracteres estructurales y secuencias de ADN (ITS y *matK*): un enfoque combinado

Phylogenetic relationships of the subtribe Oncidiinae (Orchidaceae) inferred from structural and DNA sequences (*matK*, ITS): a combined approach

Estela Sandoval-Zapotitla^{1*}, Javier García-Cruz², Teresa Terrazas¹ y José Luis Villaseñor¹

¹Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México.

²Herbario Metropolitano, Departamento de Biología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Apartado postal 55-535, 09340 México, D.F., México.

*Correspondencia: esz@ibiologia.unam.mx

Resumen. Para conocer el valor que los caracteres estructurales tienen para la reconstrucción filogenética de la subtribu Oncidiinae se realizó un análisis de parsimonia combinado con base en datos anatómico foliares, morfológicos y secuencias de ADN de las regiones *matK* e ITS. Se obtuvieron 2 árboles igualmente parsimoniosos que difieren entre sí sólo en la posición de 1 taxon. Oncidiinae se recobró como monofilética, caracterizada por la presencia de papilas adaxiales y abaxiales en la hoja. Siete sinapomorfías estructurales definen 5 clados con soporte alto, incluyendo: 1) clado *Lockhartia*, definido por una lámina foliar conduplicada; 2) clado *Trichocentrum*, definido por una hoja anfiestomática y 2 o más estratos de haces vasculares; 3) clado compuesto por los géneros *Fernandezia*, *Ornithocephalus* y *Telipogon*, agrupados por la ausencia de estégmatos en haces vasculares y su crecimiento monopodial; 4) un gran clado compuesto por la mayoría de los clados derivados de Oncidiinae, definido por la presencia de 2 estratos en la hipodermis adaxial; 5) clado *Tolumnia*, definido por una hoja con lámina sólo conduplicada marginalmente. La mayoría de los clados adicionales están apoyados por combinaciones de caracteres estructurales; los clados *Trichopilia* y *Miltonia*, al igual que las ramas terminales de algunos de los clados con posición intermedia no están apoyados por caracteres estructurales. Los clados más derivados están apoyados por caracteres estructurales resueltos como reversiones.

Palabras clave: anatomía foliar, filogenia, hoja, morfología, Oncidiinae, Orchidaceae, *matK*, ITS.

Abstract. With the aim of exploring the significance of structural characters in phylogeny estimation of subtribe Oncidiinae, a combined parsimony analysis based on leaf foliar-anatomical, morphological and DNA sequence data of the *matK* and ITS regions was carried out. Two equally parsimonious trees were obtained which differ only in the position of 1 taxon. Oncidiinae was recovered as monophyletic and characterized by the presence of abaxial and adaxial leaf papillae. Seven structural synapomorphies define 5 clades with strong support, including: 1) the *Lockhartia* clade defined by a conduplicate leaf blade, 2) the *Trichocentrum* clade, defined by a blade anphistomatic and 2 or more strata of vascular bundles, 3) a clade composed of the genera *Fernandezia*, *Ornithocephalus* and *Telipogon*, grouped by the absence of stigmata in the vascular bundles and by their monopodic growth, 4) a large clade composed of most derived clades of Oncidiinae, defined by the presence of 2 strata on the adaxial hypodermis, 5) *Tolumnia* clade, defined by a marginally conduplicate leaf blade. Most of the additional clades are supported by structural character combinations; the *Miltonia* and *Trichopilia* clades, as well as the terminal branches of clades with intermediate position in the trees are not supported by structural characters. The most derived clades are supported only by structural characters resolved as reversals.

Key words: leaf anatomy, morphology, phylogeny, Oncidiinae, Orchidaceae, *matK*, ITS.

Introducción

La subtribu Oncidiinae (subfamilia Epidendroideae, tribu Maxillarieae), con aproximadamente 95 géneros

y 1 700 especies (Williams et al., 2001a, 2001b), es uno de los grupos neotropicales más diversos y derivados evolutivamente en la familia Orchidaceae. Además está considerada como una de las subtribus más polimórficas en la familia (Dressler, 1993; Sosa et al., 2001; Williams et al., 2001a, 2001b; Chase et al., 2003), como lo sugieren su

gran variación en cuanto a números cromosómicos, tamaño del genoma, morfologías floral y vegetativa, diferentes historias de vida, numerosos síndromes de polinización y la gran diversidad de nichos ecológicos en que habitan. Son plantas típicamente epífitas, aunque unas cuantas especies son terrestres o litófitas; se les encuentra desde el nivel del mar hasta los páramos de alta montaña; se distribuye desde Sinaloa y Tamaulipas en México hasta Misiones en Argentina, así como en el Caribe y el sur de Florida en los Estados Unidos de América (Chase y Palmer, 1988).

La taxonomía en Oncidiinae se ha basado tradicionalmente en caracteres florales, lo que ha generado sistemas de clasificación artificiales que revelan poco sobre sus relaciones filogenéticas (Chase, 1986a; Chase y Palmer, 1988, 1992). Los caracteres vegetativos y la distribución geográfica sólo en algunas ocasiones han sido considerados en el establecimiento de los límites y relaciones genéricas (Ayensu y Williams, 1972; Chase, 1986a; Rasmussen, 1987; Chase y Palmer, 1988, 1992, 1997; Chase y Phippen, 1988; Toscano de Brito, 1998).

Recientemente, varios trabajos han demostrado la utilidad que los caracteres moleculares tienen en la sistemática y en el establecimiento de las relaciones filogenéticas en Oncidiinae (Chase y Palmer, 1988, 1992; Williams et al., 1999, 2001a, 2001b; Sosa et al., 2001). Williams et al. (2001a, 2001b) realizaron análisis filogenéticos utilizando 3 marcadores moleculares (secuencias de ADN de la regiones ITS, *matK* y *trnL-trnF*), incluyendo 77 taxa que representan los principales grupos definidos para la subtribu Oncidiinae; sus resultados sugieren que la subtribu es monofilética y reconocen 9 clados principales. Dichos trabajos proporcionaron las bases para proponer algunos cambios en la clasificación de la subtribu y demostraron que las clasificaciones anteriormente propuestas para Oncidiinae eran artificiales. La clasificación propuesta por Williams et al. (2001a, 2001b) para Oncidiinae amplía sus límites, ahora incluyendo también las subtribus Ornithocephalinae, Pachyphyllinae y Telipogoninae *sensu* Dressler (1993).

El valor de los caracteres morfológicos para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y la clasificación en plantas ha sido enfatizado en diversos grupos vegetales (Freudenstein y Rasmussen, 1999; Thompson et al., 2001; Scotland et al., 2003; Wiens, 2004; Clement y Weiblen, 2009; Tate et al., 2009); dichos caracteres han sido utilizados en la clasificación o establecimiento de relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos en algunos grupos de Orchidaceae y su importancia se ha demostrado en varios de ellos (Pridgeon, 1987; Stern et al., 1993; Toscano de Brito, 1998; Freudenstein y Rasmussen, 1999; van den Berg et al., 2000; Pridgeon et al., 2001; Stern y Judd, 2001, 2002;

Cameron, 2005; García-Cruz y Sosa, 2005; Sosa, 2007; Figueroa et al., 2008; Cervantes, 2009). Particularmente en Oncidiinae, algunos trabajos describen aspectos anatómicos de algunos de sus grupos o de sus especies (Groom, 1893; Ayensu y Williams, 1972; Williams, 1974; Pridgeon et al., 1983; Chase, 1986b; Rojas-Leal, 1993; Sandoval-Zapotitla, 1993, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001). Sandoval-Zapotitla y Terrazas (2001) analizaron desde el punto de vista sistemático la anatomía foliar de 16 especies del clado *Trichocentrum sensu* Williams et al. (2001a). Dicho trabajo mostró que algunos caracteres anatómico foliares apoyan a grupos reconocidos en las hipótesis de relaciones filogenéticas propuestas a partir de datos moleculares por Sosa et al. (2001) y Williams et al. (2001a, 2001b). Debido a la dificultad de establecer una clasificación sistemática estable entre los géneros de Oncidiinae y con el propósito de evaluar la utilidad de las estructuras anatómicas como herramienta en la sistemática de Oncidiinae, Stern y Carlswald (2006) realizaron un análisis cladístico con 9 caracteres anatómico foliares y morfológicos para 40 géneros de esta subtribu y demostraron que, entre otros caracteres anatómicos, la presencia de hipodermis, la presencia de haces de fibras y la de estégmatos apoyan algunos grupos de Oncidiinae; e. g., el clado *Cuitlauzina-Osmoglossum* está soportado por la presencia de células endodérmicas con paredes engrosadas en forma de "U".

A pesar de que los marcadores moleculares, como las secuencias de ADN, en la actualidad son la fuente principal de datos para la reconstrucción filogenética, consideramos que las clasificaciones taxonómicas no se deben basar únicamente en la similitud entre nucleótidos, sino también en la información que brindan otras fuentes de caracteres (Margulis y Guerrero, 1991), como los morfológicos y anatómicos (Jenner, 2004; Wiens, 2004; Clement y Weiblen, 2009). Algunos autores sugieren, por un lado, que la inclusión de este tipo de caracteres incrementa el soporte de los clados (Koehler et al., 2002; Wortley y Scotland, 2006), y por otro, proporciona oportunidades para probar hipótesis alternativas (Lockhart y Cameron, 2001).

Particularmente en Orchidaceae se han realizado análisis cladísticos donde se combinan secuencias de ADN y caracteres morfológicos (Albert, 1994; Gravendeel y De Vogel, 2002; Koehler et al., 2002; Gravendeel et al., 2004; Sosa, 2007; Figueroa et al., 2008; Cervantes, 2009), los cuales demuestran claramente que la combinación de secuencias de ADN y morfología (en ocasiones con anatomía) no sólo incrementan la resolución de los cladogramas resultantes sino también el apoyo de los clados recuperados (Gravendeel y De Vogel, 2002; Gravendeel et al., 2004; Sosa, 2007; Cervantes, 2009). Incluso se

ha demostrado que algunos caracteres estructurales son diagnósticos de los clados recuperados en los análisis cladísticos combinados (secuencias de ADN y morfología) en diferentes niveles taxonómicos: subfamilia (Albert, 1994; Freudenstein y Rasmussen, 1999), tribu y subtribu (Cameron, 2005; Figueroa et al., 2008; Cervantes, 2009), subtribu, género y especie (Sosa, 2007) e infragenérico (Gravendeel y De Vogel, 2002; Gravendeel et al., 2004). Nixon y Carpenter (1996) se refieren a este efecto como “emergencia de señal filogenética”.

Se ha demostrado que los análisis combinados pueden recobrar árboles más parsimoniosos con mayor resolución y soporte interno más alto que cualquiera de los conjuntos de datos individuales (Gravendeel y De Vogel, 2002; Gravendeel et al., 2004). Además, la inclusión simultánea de toda la evidencia amplifica 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). Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo realizar un análisis cladístico combinado de la subtribu Oncidiinae utilizando caracteres estructurales (anatómicos/morfológicos) y moleculares (secuencias de ADN de las regiones ITS y *matK*) para evaluar la utilidad de los caracteres estructurales en la filogenia de la subtribu.

Materiales y métodos

Especies estudiadas. Un total de 57 especies (Apéndice 1), representantes de 37 géneros que pertenecen a las subtribus Cyrtopodiinae, Maxillariinae, Oncidiinae y Zygopetalinae (Chase y Palmer, 1992; Dressler, 1993; Whitten et al., 2000; Williams et al., 2001a; Chase et al., 2003) fueron incluidas y utilizadas como taxa terminales; dicha muestra incluye especies representativas de los 9 clados principales de la subtribu Oncidiinae del cladograma obtenido por Williams et al. (2001a). En lo posible se utilizaron las mismas especies incluidas en el referido trabajo. Los nombres de las especies siguen las propuestas nomenclaturales más recientes (Dressler y Williams, 2003; Williams et al., 2001a; Chase et al., 2008; Chase et al., 2009). Los ejemplares que respaldan las observaciones para cada especie se presentan en el Apéndice 1.

Se consideró oportuno incluir pocas especies de cada género para representar a los clados o subclados de la subtribu Oncidiinae, debido a que algunos géneros en el estudio de Williams et al. (2001a) se recuperaron como monofiléticos (*Brassia*, *Erycina*, *Ionopsis*, *Lockhartia*, *Miltonia*, *Rodriguezia*, *Rynchostele*, *Tolumnia* y *Trichocentrum*); además, a partir de estudios anatómicos previos en algunas especies de Oncidiinae se encontró

que ciertos caracteres anatómicos foliares, al igual que otros morfológicos, suelen ser homogéneos en el nivel de género (Rojas-Leal, 1993; Sandoval-Zapotitla, 1993, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001). Con el propósito de enraizar los cladogramas obtenidos y poner a prueba la monofilia de Oncidiinae, 4 géneros y 5 especies de las subtribus Cyrtopodiinae, Maxillariinae y Zygopetalinae se usaron como grupos externos, tomando como referencia estudios filogenéticos previos (Cameron et al., 1999; Whitten et al., 2000).

Estudios anatómicos. Se utilizaron hojas maduras de plantas vivas, recolectadas en el campo o de plantas mantenidas en cultivo bajo condiciones de invernadero. De cada hoja, 3 fracciones de la región media y 1 de la región basal estuvieron fijadas en Navashin (Sandoval-Zapotitla et al., 2005) al menos por 24 horas; posteriormente se almacenaron en etanol al 70% hasta su procesamiento; 2 fracciones de la región media se sumergieron en soluciones sucesivas de hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio al 20%, durante 20 y 40 minutos respectivamente; una se utilizó para obtener la superficie de la hoja transparentada y la otra, para obtener las epidermis adaxial y abaxial separadas de la hoja. Se realizaron preparaciones temporales en gelatina glicerínada tanto de la hoja transparentada como de las epidermis adaxial y abaxial. La tercera fracción de hoja se deshidrató en soluciones graduales de alcohol-alcohol butílico terciario (ABT)-agua, desde 30% hasta alcohol absoluto, y finalmente en ABT absoluto. Se infiltraron e incluyeron en parafina histológica a temperaturas de 58° a 60° C. Con un micrótopo (American Optical 820) se cortaron secciones transversales de 15 a 25 µm, y se tiñieron con safranina verde rápido (Sandoval-Zapotitla et al., 2005). Se hicieron preparaciones permanentes montadas en entellán. Los caracteres anatómicos foliares se observaron con un fotomicroscopio Axioskope (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania), y con una cámara de video Exwave HAD (Sony) se tomaron fotomicrografías para analizar los caracteres estructurales.

Caracteres estructurales. Se analizaron y codificaron 37 caracteres, los cuales se listan en el Apéndice 2; de éstos 29 son anatómicos foliares y 8 son atributos de la morfología vegetativa. Con el propósito de minimizar los estados de carácter inaplicables para los taxa que carecieron de estructuras particulares, su ausencia fue incluida como estado de un carácter multiestado (Maddison, 1993). La selección de los caracteres anatómicos se realizó tomando en cuenta trabajos anatómicos previos realizados para algunas especies de la subtribu Oncidiinae (Ayensu y Williams, 1972; Williams, 1974; Rojas-Leal, 1993; Sandoval-Zapotitla, 1993, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001; Stern y Carlswald, 2006). A partir de la vista superficial se analizaron 6 caracteres de la epidermis

(1 – 6; números de acuerdo con el Apéndice 2:) y 2 de las secciones transversales de la hoja (7, 8). Se distinguieron 20 caracteres más de secciones transversales de la región media (9 - 28) y 1 carácter (29) de la región basal de la hoja. La selección de los 8 caracteres morfológico-vegetativos (30-37) se basó en la observación de plantas vivas de los invernaderos del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero en Xalapa, Veracruz; del Herbario AMO en la ciudad de México; del Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica, así como de colecciones particulares, y se complementaron con información obtenida de la literatura. Únicamente fueron incluidos aquellos caracteres que mostraron variación entre los taxa y aprobaron los criterios de similitud y no conjunción (de Pinna, 1991).

Caracteres moleculares. Se utilizaron secuencias de ADN de la región de plastidios *matK* con 1397 caracteres y de la región nuclear ITS con 831 caracteres. Todas las secuencias se obtuvieron de la base de datos pública GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), excepto para *Oncidium alexandrae* (Bateman) M.W.Chase et N.H.Williams y *O. epidendroides* (Kunth) Beer (*matK*), *Tolumnia pulchella* (Hook.) Raf. y *T. triquetra* (Sw.) Nir (*matK*, ITS), las cuales fueron proporcionadas por N. H. Williams. Los números de acceso se presentan en el Apéndice 1.

Análisis cladístico. Las secuencias de ADN se ensamblaron y editaron con el programa BioEdit ver. 7.0.5.3 y se alinearon visualmente. Los juegos de datos se combinaron y analizaron simultáneamente. El análisis de parsimonia se realizó con el programa Nona (Goloboff, 1999) implementado en WinClada ver. 1.00.08 (Nixon, 2002). Todos los cambios de los caracteres fueron tratados como no ordenados y con el mismo peso (Fitch, 1971). Se realizó una búsqueda heurística conservando únicamente los árboles más parsimoniosos. El árbol inicial fue generado por “stepwise addition” con 10 000 réplicas aleatorias, conservando un árbol por réplica. Posteriormente se realizó el intercambio de ramas con la opción TBR+TBR en efecto, salvando no más de 10 000 árboles por réplica. Los árboles más parsimoniosos (APs) obtenidos se guardaron y se procedió a obtener el árbol de consenso estricto. El apoyo de los clados se evaluó con la técnica de remuestreo de *jackknife* (Farris et al., 1996), como está implementado en Nona. Los valores de *jackknife* fueron evaluados mediante el análisis de 1 000 réplicas de *jackknife*, removiendo el 30% de caracteres, 10 adiciones de taxa al azar e intercambio de ramas TBR+TBR, y se guardaron los 10 árboles más parsimoniosos por réplica (Maddison, 1991). Todos los caracteres se optimizaron con la opción “transformación acelerada” (ACCTRAN) que favorece las hipótesis de homología primaria como verdaderas en ausencia de evidencia que las contradiga

(de Pinna, 1991), usando el mismo programa.

Resultados

De los 2 265 caracteres, únicamente 611 fueron parsimoniosamente informativos. El análisis cladístico recuperó 2 árboles más parsimoniosos (AP), con longitud de 3 016 pasos, índice de consistencia de 0.47 e índice de retención de 0.58; con respecto a los caracteres estructurales, de los 37 incluidos en el análisis, 35 fueron parsimoniosamente informativos; de éstos, 29 tienen un índice de retención mayor o igual a 0.60. Los AP difieren en la posición de *Oncidium pictoides* M.W.Chase et N.H.Williams; en el primer AP, *O. pictoides* es el taxon hermano del linaje formado por *O. leucochilum* Bateman ex Lindl., *O. sphacelatum* Lindl., *O. ghiesbreghtianum* A.Rich. et Galeotti y *O. reichenheimii* (Linden et Rchb.f.) Garay et Stacy (Fig. 1). En el segundo AP, *O. pictoides* es el taxon hermano del clado formado por *O. leucochilum* y *O. sphacelatum*.

Los resultados indican que la subtribu Oncidiinae es un grupo monofilético, apoyado por 2 caracteres estructurales homoplásicos: presencia de papilas adaxiales y abaxiales (caracteres 1 y 2 respectivamente). Este grupo natural está bien apoyado por un valor de *jackknife* de 93% (Fig. 1). Fueron identificados 9 clados principales en Oncidiinae.

El clado A contiene todas las especies de *Trichocentrum* incluidas en este estudio (Fig. 1); este género se resuelve como monofilético y está apoyado por 5 caracteres estructurales, de los cuales las hojas anfiestomáticas y 2 o más estratos de haces vasculares que presenta (caracteres 5 y 19 respectivamente; Fig. 2A) son sinapomórficos, y los otros 3 caracteres (16, 20 y 36) son homoplásicos; tiene un apoyo de *jackknife* del 100%.

El clado B incluye los géneros *Psychopsis* y *Trichopilia* (Fig. 1); aunque no está apoyado por ningún carácter estructural, presenta un valor alto de *jackknife* (97%).

El clado C contiene las 2 especies de *Lockhartia* incluidas en este estudio (Fig. 1); este género se resuelve como monofilético y está apoyado por la presencia de una hoja con lámina conduplicada (carácter 37; Fig. 2 B), que es una sinapomorfia, y un estrato de haces de fibras abaxiales (carácter 23), que es homoplásico; presenta un apoyo de *jackknife* del 100%.

El clado D incluye los géneros *Fernandezia*, *Ornithocephalus* y *Telipogon* (Fig. 1) y está apoyado por la ausencia de estérgmatos en los haces vasculares (Fig. 2 C) y por presentar un crecimiento monopodial (caracteres 24 y 30 respectivamente), ambos sinapomórficos, y por 5 caracteres estructurales (3, 22-23, 25 y 36), que son homoplásicos; tiene un valor de *jackknife* del 100%.

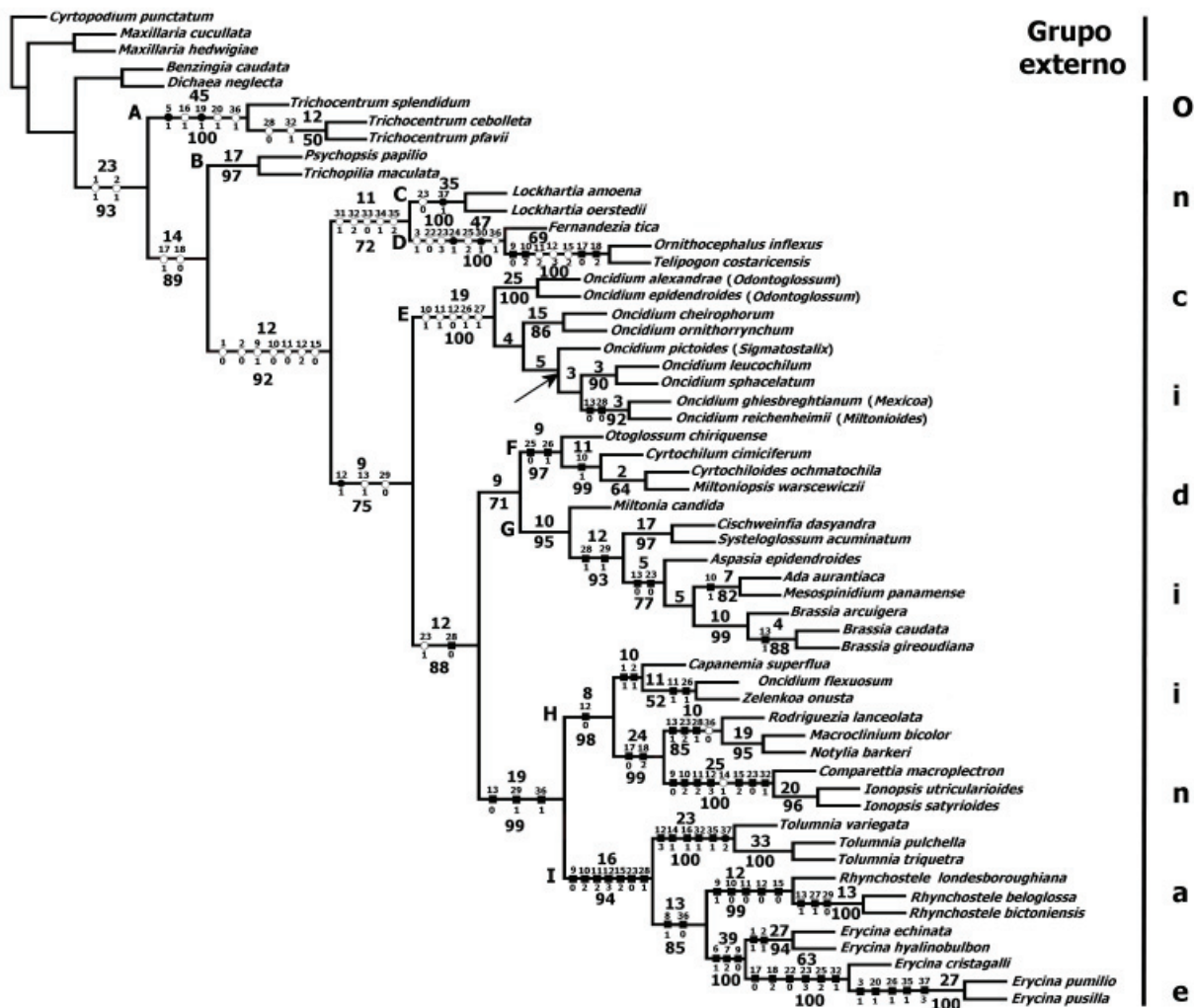


Figura 1. Filogenia combinada (ITS, *matK* y caracteres estructurales) de Oncidiinae. Se muestra 1 de los 2 cladogramas igualmente parsimoniosos obtenidos (L= 3 016, CI= 0.47, RI= 0.58). El nodo que cambia en la otra topología se indica con una flecha. El número por debajo de las ramas corresponde al valor de soporte *jackknife* mayor al 50%, por encima el número de los caracteres que soportan la rama. Se indica la distribución de los caracteres estructurales (sinapomorfías = círculos cerrados; paralelismos = círculos abiertos; reversiones = cuadros cerrados).

El clado E incluye las especies de *Oncidium* analizadas en este estudio (Fig. 1), excepto *O. flexuosum* Lodd.; está apoyado por 5 caracteres estructurales (caracteres 10-12, 26 y 27; Fig. 2 D) que en general son homoplásicos, pero en un nivel menos inclusivo dentro de la filogenia podrían considerarse sinapomórficos; presenta un valor de *jackknife* del 100%.

El clado F incluye los géneros *Otoglossum*, *Cyrtochilum*, *Cyrtochiloides* y *Miltoniopsis* (Fig. 1) y está apoyado por la ausencia de estérgmatos en los haces de fibras abaxiales y por la presencia de cristales prismáticos (caracteres 25 y 26 respectivamente; Fig. 2 E); tiene un

valor de *jackknife* del 97%.

El clado G incluye los géneros *Miltonia*, *Cischweinfia*, *Systemoglossum*, *Aspasia*, *Ada*, *Mesospinidium* y *Brassia* (Fig. 1); no está apoyado por ningún carácter estructural, pero presenta un valor alto de *jackknife* (95%); en este clado, el género *Brassia* se recupera como monofilético y aunque no está apoyado por ningún carácter estructural, presenta un valor alto de *jackknife* del 99%.

El clado H incluye los géneros *Capanemia*, *Oncidium*, *Zelenkoa*, *Rodriguezia*, *Macroclinium*, *Notylia*, *Comparettia* e *Ionopsis* (Fig. 1) y está apoyado por la presencia de un estrato celular de la hipodermis adaxial

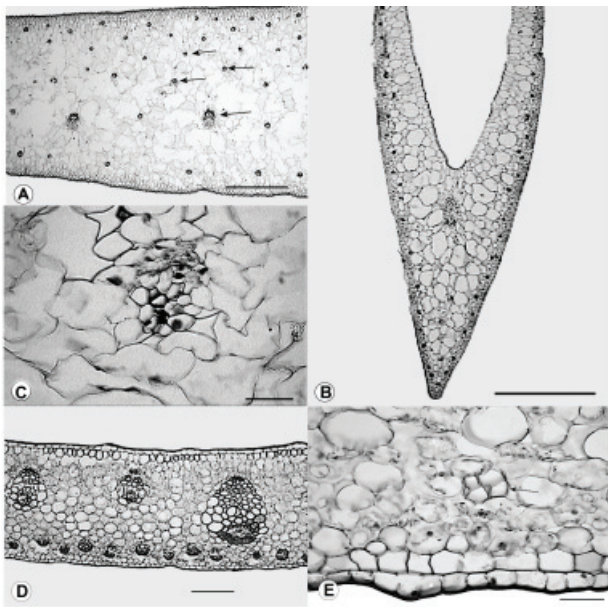


Figura 2. Caracteres estructurales que se recuperaron como sinapomorfías en el análisis combinado para Oncidiinae. A. *Trichocentrum splendidum*, sección transversal de hoja. Haces vasculares en varios estratos (flechas). B. *Lockhartia amoena*, sección transversal de hoja. Lámina conduplicada. C. *Fernandezia tica*, sección transversal de hoja. Haz vascular sin estómatos. D. *Oncidium epidendroides*, sección transversal de hoja. Hipodermis adaxial con células de paredes engrosadas. E. *Cyrtochiloides ochmatochila*, sección transversal de hoja. Haces de fibras abaxiales sin estómatos (flecha). Escala A y B = 1 mm; C, E = 50 μ m; D = 20 μ m.

(carácter 12; Fig. 3 A); presenta un valor de *jackknife* del 98%. Además, las 2 especies del género *Ionopsis* forman un grupo natural apoyado por un valor alto de *jackknife* (96%).

El clado I está formado por los géneros *Tolumnia*, *Rhynchostele* y *Erycina* (Fig. 1) y está apoyado por 7 caracteres estructurales (9-12, 15, 23 y 28; Fig. 3 B), que en nivel general son homoplásicos pero en uno menos incluso son sinapomórficos, y por un valor de *jackknife* del 94%. Cada uno de los 3 géneros que forman este clado se recuperan como grupos monofiléticos, con un valor de *jackknife* del 100%, 99% y 100%, respectivamente, y están apoyados por caracteres estructurales. *Tolumnia* está apoyado por 6 caracteres estructurales (12, 14, 16, 32, 35 y 37; Fig. 3 C), de los cuales el carácter lámina conduplicada (37; Fig. 3 D) sólo marginalmente es una sinapomorfía; *Rhynchostele* está apoyado por 5 caracteres estructurales (9-12 y 15), que en un nivel menos inclusivo de la filogenia podrían ser sinapomorfías, y *Erycina* está apoyado por

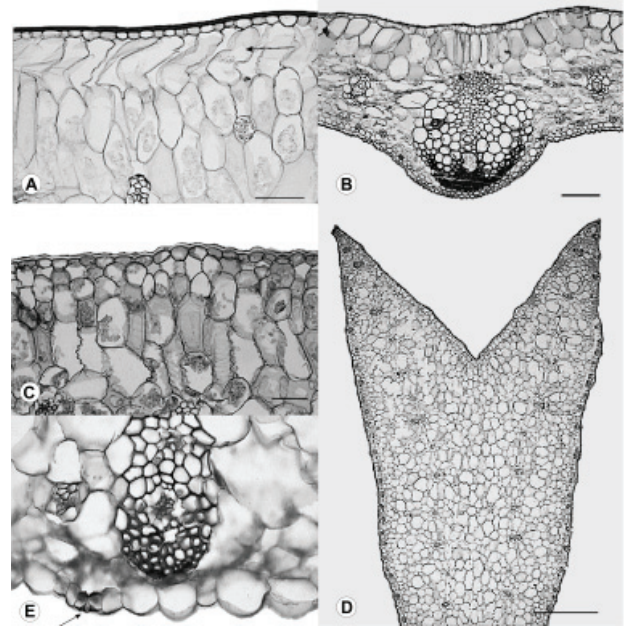


Figura 3. Caracteres estructurales que apoyan los clados o que se recuperan como sinapomorfías en el análisis combinado para Oncidiinae. A. *Notylia barkeri*, sección transversal de hoja. Hipodermis adaxial con un estrato celular (flecha). B. *Otoglossum chiriquense*, sección transversal de hoja. Zona abaxial central convexa. C. *Tolumnia triquetra*, sección transversal de hoja. Mesofilo con parénquima en empalizada. D. *Tolumnia variegata*, sección transversal de hoja. Lámina conduplicada marginalmente. E. *Erycina cristagalli*, sección transversal de hoja. Estoma sin collar cuticular (flecha). Escala A-E = 50 μ m.

3 caracteres estructurales (6, 7 y 9; Fig. 3 E) que, como en el caso de *Rhynchostele*, podrían ser considerados sinapomorfías. Desde el punto de vista de los caracteres estructurales, los clados H e I presentan el mayor número de cambios de estos caracteres (Fig. 1), por lo que podrían considerarse como los clados más derivados dentro de la subtribu Oncidiinae.

Discusión

Integración de los caracteres moleculares y estructurales.

La delimitación genérica en Oncidiinae no ha sido clara a lo largo de su historia, debido a que se han reconocido géneros polifiléticos (Chase, 1986a; Chase y Palmer, 1988, 1989, 1992) y han sido varios los esfuerzos por delimitar tanto los géneros como sus relaciones entre ellos dentro de la subtribu (Chase y Palmer, 1988, 1989, 1997; Williams et al., 2001a, 2001b). Sin embargo, todos estos estudios han incluido datos de secuencias de ADN y dejado a un

lado otras series de datos como los estructurales, debido a la suposición general de que los datos morfológicos presentan altos niveles de homoplasia y bajos niveles de resolución y soporte (Scotland et al., 2003). En un análisis cladístico, el incremento en el número de caracteres generalmente incrementa su resolución (Furtado de Sousa et al., 2007).

Los 9 grupos principales obtenidos en el presente estudio son consistentes con los obtenidos en el estudio realizado por Williams et al. (2001a), donde únicamente se incluyeron datos moleculares. Los 9 clados propuestos por estos autores para Oncidiinae se mantienen en nuestro análisis, a pesar de que no se incluyó la región *trnL-F*, se utilizó un número menor de taxa y se adicionaron los caracteres estructurales; los 9 clados se recuperan con un apoyo alto de *jackknife* ($\geq 94\%$). Al comparar las relaciones filogenéticas de los 9 clados entre el presente trabajo y el estudio de Williams et al. (2001a), se observa que existen algunas diferencias en las relaciones entre los clados, por lo que el análisis combinado que se presenta aquí generó una hipótesis filogenética donde se muestran nuevas o diferentes relaciones entre los clados que no han sido registradas en trabajos previos. Las nuevas relaciones filogenéticas entre los clados están firmemente apoyadas por los caracteres estructurales.

Caracteres estructurales. El análisis aquí presentado dio como resultado una completa resolución entre las especies de Oncidiinae, con sus miembros agrupados en 9 clados bien sustentados (Fig. 1), la mayoría por caracteres estructurales. Muchos de estos caracteres son homoplásicos dentro de la subtribu como un todo, pero algunos de ellos son sinapomorfias (caracteres no conflictivos) dentro de los clados recuperados. Los caracteres estructurales incluidos en este estudio muestran una gran diversificación a lo largo de la evolución de la subtribu, incluso existen varias especializaciones estructurales que caracterizan o diagnostican algunos clados.

En varios estudios se ha mencionado que la presencia de más de 2 estratos de haces vasculares, de hojas anfistomáticas y de células con engrosamientos secundarios en el mesofilo son caracteres distintivos para el género *Trichocentrum* (Williams, 1974; Sandoval-Zapotitla, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001; Stern y Carlswald, 2006); sin embargo, ninguno de estos trabajos postuló una hipótesis filogenética explícita.

El presente estudio corrobora lo anterior mediante un análisis cladístico, mostrando que esos caracteres son sinapomorfias para el género en un nivel menos inclusivo. De igual manera, las células con engrosamientos secundarios también son un carácter diagnóstico para las subtribus Cryptarrheninae y Zygopetalinae (*sensu* Dressler, 1993).

El perfil de la hoja ha sido un carácter importante en la delimitación de grupos dentro de las Orchidaceae; Chase (1986a) lo propuso como un carácter diagnóstico para distinguir grupos dentro de Oncidiinae. Cameron (2005) encontró que las especies epífitas que forman el clado *Oberonia* dentro de la tribu Malaxideae presenta hojas unifaciales, mientras que las especies terrestres que forman otro grupo monofilético tienen hojas plegadas. Stern et al. (2004) mencionan que el perfil de la hoja, junto con otros caracteres anatómicos, permite distinguir 3 grandes grupos dentro de la subtribu Ornithocephalinae (*sensu* Dressler, 1993). Carlswald et al. (1997) demostraron que la relación de grupo hermano entre las secciones *Aporum* y *Rhizobium* de *Dendrobium* (Dendrobiinae) está apoyada por la presencia de hojas unifaciales. En este estudio el género *Lockhartia* (clado C) se caracteriza por presentar una hoja madura con lámina conduplicada, entre otros caracteres.

La presencia/ausencia de haces de fibras adaxiales es otro carácter que ha mostrado utilidad taxonómica dentro de la familia para la caracterización de grupos; por ejemplo, en la subtribu Oncidiinae es un carácter común (Solereder y Meyer, 1930; Ayensu y Williams, 1972; Williams, 1974; Rojas-Leal, 1993; Sandoval-Zapotitla, 1993; Toscano de Brito, 1998; Sandoval-Zapotitla, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001; Stern y Carlswald, 2006); dentro de las Dendrobiinae, su presencia es un carácter que apoya la monofilia de la sección *Aporum* y dentro de Oncidiinae, la del clado I (*Tolumnia*, *Rhynchostele* y *Erycina*), mientras que su ausencia caracteriza la sección *Rhizobium* (Carlswald et al., 1997) y a las subtribus Cryptarrheninae (Stern et al., 2004), Ornithocephalinae y Telipogoninae (*sensu* Dressler, 1993; Toscano de Brito, 1998; Stern et al., 2004). El número de estratos de haces de fibras es otro carácter taxonómico útil para distinguir grupos de especies (Williams, 1974; Toscano de Brito, 1998; Sandoval-Zapotitla, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001; Stern y Carlswald, 2006); tal es el caso del género *Lockhartia* (clado C) que se caracteriza por un estrato de haces de fibras abaxiales.

Otro carácter estructural importante en la delimitación de grupos, no sólo dentro de la familia Orchidaceae, es la presencia de tricomas en la epidermis. La ausencia de tricomas es característico de las subtribus Ornithocephalinae y Telipogoninae (*sensu* Dressler, 1993; Toscano de Brito, 1998; Stern et al., 2004) y de Oncidiinae (Williams, 1974; Toscano de Brito, 1998; Stern y Carlswald, 2006); sin embargo, nuestros resultados muestran que a excepción del clado D, su presencia es un carácter plesiomórfico y común en las Oncidiinae. Los tricomas similares a los observados en Oncidiinae parecen ser un carácter distintivo para *Dreslerella* (Pleurothallidinae;

Pridgeon y Williams, 1979) y son característicos de la subtribu Bletinae (Khasim y Mohana Rao, 1990) y de algunas secciones de *Dendrobium* (Dendrobiinae; Yukawa et al., 1990); en las Cyripedioideae apoyan el clado que presenta hojas conduplicadas (Albert, 1994). En otras familias apoya la relación de grupo hermano entre *Sloetia* y *Bleekrodea* (Moraceae) (Clement y Weiblen, 2009).

La literatura indica que la presencia de estégmatos en los haces vasculares es frecuente en la familia Orchidaceae; sin embargo, su ausencia es característica de algunos grupos, pues se ha registrado que apoya la monofilia de Cranichideae (Stern et al., 1993) y de Vanilleae (Freudenstein y Rasmussen, 1999), además de que es propia de la subtribu Ornithocephalinae (*sensu* Dressler, 1993; excepto *Phymatidium tillandsoides* Barb. Rodr. [Stern et al., 2004], de *Pachyphyllum* [Stern y Carlswald, 2006]) y del clado D recuperado en este trabajo.

El número de estratos celulares, su continuidad y la condición de la pared de las células de la hipodermis adaxial se mencionaron como caracteres con utilidad taxonómica para el reconocimiento de ciertos grupos de especies en Oncidiinae (Williams, 1974), como es el caso de los miembros del clado *Cuitlauzina*, que presentan dichos caracteres (Ayensu y Williams, 1972; Sandoval-Zapotitla, 1993). La presencia de una hipodermis adaxial con 1 estrato es característica en *Rhynchostele*, en el clado E (*Oncidium*), en el clado H (*Capanemia*, *Cyrtochilum*, *Zelenkoa*, *Rodiguezia*, *Macroclinium*, *Notylia*, *Comparettia* e *Ionopsis*) y en algunas especies de *Dresslerella* (Pleurothallidinae; Pridgeon y Williams, 1979); además, en *Rhynchostele* el grosor de la pared celular permite reconocer algunas de sus especies (Rojas-Leal, 1993). La presencia de una hipodermis adaxial con células de paredes delgadas ubicadas en 1 a 2 estratos y sin células con engrosamientos secundarios es característica de los miembros de la subtribu Bletinae (Khasim y Mohana Rao, 1990) y permite reconocer las especies de *Dresslerella* (Pleurothallidinae; Pridgeon y Williams, 1979). La presencia de hipodermis adaxial también se ha registrado en miembros de las subtribus Zygopetalinae, Maxillariinae y Oncidiinae (Maxillarieae; Solereder y Meyer, 1930; Williams, 1974; Rojas-Leal, 1993; Sandoval-Zapotitla, 1993, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001; Stern y Carlswald, 2006).

La ausencia de hipodermis también define algunos grupos, como es el caso de *Tolumnia* y *Erycina*, el clado A (*Trichocentrum*) como ya lo habían registrado Stern y Carlswald (2006) y en algunos miembros de la subtribu Ornithocephalinae y Telipogoninae por Toscano de Brito (1998) y Stern et al. (2004).

Los cristales (prismáticos y/o drusas) son otro carácter que ha sido útil en el reconocimiento de grupos. Los

cristales prismáticos se han registrado en los géneros *Rhynchostele* (incluye los géneros *Lemboglossum* y *Mesoglossum*; Soto-Arenas et al., 1993), *Oncidium* (clado E en este trabajo) y en algunos géneros que forman el clado H del presente estudio y en nivel específico en *Trichoceros antennifer* (Humb. et Bonpl.) Kunth (Oncidiinae; Toscano de Brito, 1998). Con respecto a los cristales como drusas únicamente se tienen registros en el género *Myoxanthus* (Pleurothallidinae; Pridgeon y Stern, 1982), en Ponerinae (Epidendroideae; Cervantes, 2009) y en el clado E (en este trabajo). En estos 2 últimos, la presencia de las drusas apoya su monofilia.

El presente análisis permitió destacar el valor taxonómico que algunos caracteres estructurales podrían tener en la taxonomía de las Oncidiinae, unos en el nivel de género y otros en el de clados más incluyentes. Excepto por las glándulas epidérmicas y los haces de fibras adaxiales, el resto de los caracteres estructurales apoyan la formación de grupos naturales a un nivel en particular. Los caracteres estructurales tienen un efecto importante en el soporte de los clados de Oncidiinae, a pesar de que se ha planteado que los caracteres morfológicos (incluyendo a los anatómicos) presentan altos niveles de homoplasia, bajos niveles de resolución y bajos niveles de soporte (Scotland et al., 2003); en este estudio, cerca del 90% de los caracteres anatómicos foliares y 38% de los caracteres morfológicos tienen un índice de retención mayor a 0.6, lo que indica que hay un elevado nivel de homología (sinapomorfias) en estos caracteres.

Para una familia tan grande como Orchidaceae, a la fecha aún son pocos los análisis cladísticos utilizando únicamente caracteres morfológicos o anatómicos (Stern et al., 1993; Freudenstein y Rasmussen, 1999; Stern y Judd, 2001, 2002; Stern et al., 2004; García-Cruz y Sosa, 2005; Stern y Carlswald, 2006) o en combinación con caracteres moleculares como secuencias de ADN (Albert, 1994; Chase y Palmer, 1992; Gravendeel y de Vogel, 2002; Koehler et al., 2002; Gravendeel et al., 2004; Sosa, 2007; Figueroa et al., 2008; Cervantes, 2009).

Este trabajo incluye un análisis combinado, incorporando la mayoría de los caracteres anatómicos que ya habían sido reconocidos como importantes para distinguir grupos de especies en Oncidiinae (Ayensu y Williams, 1972; Williams, 1974, Rojas-Leal, 1993; Sandoval-Zapotitla, 1993, 1999; Sandoval-Zapotitla y Terrazas, 2001; Stern y Carlswald, 2006) sin un enfoque filogenético explícito. El presente trabajo es el primero que de manera explícita pone a prueba y demuestra la importancia que los caracteres anatómicos tienen en la filogenia de Oncidiinae.

Generalmente, los caracteres vegetativos se consideran más conservadores que los florales (Williams, 1974).

No obstante, los resultados sugieren que ésa no es la generalidad dentro de Oncidiinae; mientras que los clados B, C, F y G presentan pocos o ningún cambio en los caracteres estructurales, los clados A, D, E, H e I han acumulado una gran cantidad de cambios a lo largo de su historia evolutiva. La poca divergencia evolutiva en los primeros indica una posición menos derivada; por el contrario, la gran divergencia evolutiva en los segundos sugiere lo contrario. Estas diferencias quizá se deban a que las presiones de selección actúan a diferente nivel e intensidad en cada uno de los grupos, dando como resultado diferentes respuestas. Algunos autores plantean que la radiación de Oncidiinae en una primera etapa, estuvo basada en especializaciones en el hábitat y su historia de vida (Chase, 1986a; Chase y Palmer, 1997). Los resultados permiten postular que seguramente esta radiación también se vio reflejada en numerosos cambios en sus caracteres estructurales que indudablemente tienen valor adaptativo (Chase y Palmer, 1992, 1997).

Con la combinación de los datos estructurales y moleculares, se pone en evidencia que los caracteres estructurales son informativos en la filogenia de Oncidiinae e importantes en la diversificación de algunos de sus grupos. Varios de los clados en Oncidiinae pudieron haber desarrollado importantes especializaciones estructurales, como la presencia de hipodermis adaxial en un estrato discontinuo y de paredes engrosadas, que posiblemente le confieren soporte interno y resistencia mecánica a las hojas expuestas a la incidencia de fuertes vientos (clado E); la presencia de células buliformes para el despliegue de las hojas durante las primeras etapas de su desarrollo (clados F y G), y un mesofilo diferenciado en parénquima en empalizada y esponjoso, para hacer más eficiente la captación de luz (*Tolumnia*), entre otros.

Los resultados de este trabajo apoyan la propuesta de reunir el mayor número posible de fuentes de evidencia y realizar análisis combinados para que el poder explicativo de los datos utilizados llegue a su máximo (Nixon y Carpenter, 1996). Los resultados del presente estudio destacan la importancia que tiene la inclusión de caracteres estructurales en un análisis combinado de secuencias de ADN ya que además de recuperar relaciones en el nivel de los clados principales, permite incrementar la resolución de las relaciones entre sus miembros, evaluar el valor de los caracteres estructurales para diagnosticar clados y analizar la evolución de la morfología en un contexto filogenético explícito.

Agradecimientos

La presente investigación es parte de los estudios de

posgrado del primer autor, quien agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por su aceptación y apoyo, y al CONACYT por la beca otorgada (Núm.199595). Los autores agradecen a Eduardo Pérez, Gerardo A. Salazar, Ignacio Aguirre, Miguel A. Soto Arenas, Oscar Francke, Sandro Cusi y Teodoro Platas, por proporcionar muestras de hojas de sus colecciones particulares. A Philip J. Brewster y Martín Mata, del Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero de Xalapa, Veracruz, México; a Eric Hágsater, Luis Sánchez y Rolando Jiménez, del Herbario AMO, México, y a Jorge Warner, Robert L. Dressler, Franco Pupulin, Diego Bogarín y Alejandro Rojas, del Jardín Botánico Lankester, Costa Rica, por aportar material biológico y respaldo en la determinación de los taxa utilizados para la presente investigación. A Laura Márquez del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM, quien apoyó en el manejo de las secuencias nucleares, e igualmente a Alejandro Vallejo y Julio Cesar Montero, del Instituto de Biología, UNAM, por su apoyo en la edición de las imágenes, y a Concepción Guzmán y Patricia Zendejas del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, quienes brindaron apoyo técnico para el procesamiento histológico de las muestras.

Literatura citada

- Albert, V. A. 1994. Cladistic relationships of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae) from congruent morphological and molecular data. *Lindleyana* 9:115-132.
- Ayenu, E. S. y N. H. Williams. 1972. Leaf anatomy of *Palumbina* and *Odontoglossum* subgenus *Osmoglossum*. *American Orchid Society Bulletin* 41:687-696.
- Cameron, K. M. 2005. Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxidae (Epidendroideae, Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92:1025-1032.
- Cameron, K. M., M. W. Chase, W. M. Whitten, P. J. Kores, D. C. Jarrell, V. A. Albert, T. Yukawa, H. G. Hills y D. H. Goldman. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86:208-224.
- Carlswald, B. S., W. L. Stern, W. S. Judd y T. W. Lucansky. 1997. Comparative leaf anatomy and systematic in *Dendrobium*, sections *Aporum* and *Rhizobium* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences* 158:332-342.
- Cervantes, L. M. 2009. Estudio de la anatomía foliar de la subtribu Ponerinae (Orchidaceae, Epidendroideae) en un contexto filogenético. Tesis, maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 91 p.
- Chase, M. W. 1986a. A reappraisal of the Oncidioid-Orchids. *Systematic Botany* 11:477-491.
- Chase, M. W. 1986b. A monograph of *Leochilus* (Orchidaceae). *Systematic Botany Monographs* 14:1-97.

- Chase, M. W. y J. D. Palmer. 1988. Chloroplast DNA variation, geographical distribution and morphological parallelism in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 75:163-164.
- Chase, M. W. y J. D. Palmer. 1989. Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 76:1720-1730.
- Chase, M. W. y J. D. Palmer. 1992. Floral morphology and chromosome number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): evolutionary insights from a phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation. *In* Molecular systematics of plants, P. S. Soltis, D. E. Soltis y J. J. Doyle (eds.). Chapman & Hall, New York. p. 324-339.
- Chase, M. W. y J. D. Palmer. 1997. Leapfrog radiation in floral and vegetative traits among twig epiphytes in the orchid subtribe Oncidiinae. *In* Molecular evolution and adaptive radiation, T. J. Givnish y K. J. Sytsma (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p. 331-352.
- Chase, M. W. y J. Phippen. 1988. Seed morphology in the Oncidiinae and related subtribes (Orchidaceae). *Systematic Botany* 13:313-323.
- Chase, M. W., K. M. Cameron, R. L. Barret y J. V. Freudenstein. 2003. DNA Data and Orchidaceae systematics: a new Phylogenetic Classification. *In* Orchid conservation, K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barret y P. J. Cribb (eds.). Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. p. 69-89.
- Chase, M. W., N. H. Williams, K. M. Neubig y W. M. Whitten. 2008. Taxonomic transfers in Oncidiinae to accord with Genera Orchidacearum, vol. 5. *Orchids* 21: 20-31.
- Chase, M. W., N. H. Williams, y W. M. Whitten. 2009. Oncidiinae nomenclature. Generic changes in Genera Orchidacearum, vol. 5. *Orchids* 12:228-238.
- Clement, W. L. y G. D. Weiblen. 2009. Morphological evolution in the Mulberry family (Moraceae). *Systematic Botany* 34:530-552.
- de Pinna, M. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* 7:367-394.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*: Dioscorides Press, Portland, Oregon 314 p.
- Dressler R. L. y N. H. Williams. 2003. New combinations in Mesoamerican Oncidiinae (Orchidaceae). *Selbyana* 24:44-45.
- Farris, J. S., V. A. Albert, M. Källersjö, D. Lipscomb, y A. G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12:99-124.
- Figueroa, C., G. A. Salazar, H. A. Zavaleta y E. M. Engleman. 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101:509-520.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20:406-416.
- Freudenstein, J. V. y F. N. Rasmussen. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? A cladistic analysis. *American Journal of Botany* 86:225-248.
- Furtado de Sousa, L. O., T. Wendt, G. K. Brown, D. E. Tuthill y T. M. Evans. 2007. Monophyly and phylogenetic relationships in *Lymania* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on morphology and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany* 32:264-270.
- García-Cruz, J. y V. Sosa. 2005. Phylogenetic relationships and character evolution in *Govenia* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 83:1329-1339.
- Goloboff, P. 1999. Nona, version 2. Published by the author, Tucumán.
- Gravendeel, B. y E. F. De Vogel. 2002. Revision of *Coelogyne* section *Moniliformes* (Orchidaceae) based on morphology, plastid and nrITS sequences. *Blumea* 47:409-462.
- Gravendeel, B., M. C. M. Eurlings, C. van den Berg y P. J. Cribb. 2004. Phylogeny of *Peione* (Orchidaceae) and parentage analysis of its wild hybrids based on plastid and nuclear ribosomal ITS sequences and morphological data. *Systematic Botany* 29:50-63.
- Groom, P. 1893. On the velamen of orchids. *Annals of Botany* 7:143-151.
- Jenner, R. A. 2004. Accepting partnership by submission? Morphological phylogenetics in a molecular millennium. *Systematic Biology* 53:333-342.
- Khasim, S. M. y P. R. Mohana Rao. 1990. Anatomy in relation to taxonomy in some members of Epidendroideae (Orchidaceae). *Phytomorphology* 40:243-250.
- Koehler, S., N. H. Williams, W. M. Whitten y M. C. E. Amaral. 2002. Phylogeny of the *Bifrenaria* (Orchidaceae) complex based on morphology and sequence data from nuclear rDNA internal transcribed spacers (ITS) and chloroplast *trnL-trnF* region. *International Journal of Plant Sciences* 163:1055-1066.
- Lockhart, P. J. y S. A. Cameron. 2001. Trees for bees. *Trends in Ecology and Evolution* 16:84-88.
- Maddison, R. D. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic Zoology* 40:315-328.
- Maddison, W. P. 1993. Missing data versus missing characters in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:576-581.
- Margulis, L. y R. Guerrero. 1991. "Kingdoms in turmoil". *New Scientist* 132:46-50.
- Nixon, K. C. 2002. WinClada, versión 1.00.08. Published by the author, Ithaca, New York.
- Nixon, K. C. y J. M. Carpenter. 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12:221-241.
- Pridgeon, A. M. 1987. Diagnostic anatomical features in Orchidaceae. Abstracts XIV International Botanical Congress. Berlin (West).
- Pridgeon, A. M. y N. H. Williams. 1979. Anatomical aspects of *Dresslerella* (Orchidaceae). *Selbyana* 5:120-134.
- Pridgeon, A. M. y W. L. Stern. 1982. Vegetative anatomy of *Myoxanthus* (Orchidaceae). *Selbyana* 7:55-63.
- Pridgeon, A. M., W. L. Stern y D. H. Benzing. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany* 70:1365-1377.
- Pridgeon A. M., R. Solano y M. W. Chase. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 88:2286-2308.

- Rasmussen, H. 1987. Orchid stomata: structure, differentiation, function and phylogeny. *In* Orchid biology: reviews and perspectives. IV, J. Arditti (ed.). Cornell University Press, Ithaca, New York. p 105-138.
- Rojas-Leal, A. 1993. Anatomía foliar comparada de *Lemboglossum* Halb. y géneros relacionados. Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. D. F. 73 p.
- Sandoval-Zapotitla, E. 1993. Anatomía foliar de *Cuitlauzina pendula*. Orquídea (Méx.) 13:181-190.
- Sandoval-Zapotitla, E. 1999. Anatomía foliar y análisis numérico del clado *Lophiaris* y géneros relacionados (Orchidaceae: Oncidiinae). Tesis, Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. D. F. 101 p.
- Sandoval-Zapotitla, E. y T. Terrazas. 2001. Leaf anatomy of 16 taxa of the *Trichocentrum* clade (Orchidaceae: Oncidiinae). *Lindleyana* 16:81-93.
- Sandoval-Zapotitla, E., A. Rojas-Leal, C. Guzmán, L. Carmona, R. M. Ponce, C. León, C. Loyola, M. A. Vallejo y A. Medina. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 278 p.
- Scotland, R. W., R. G. Olmstead y J. R. Bennett. 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology* 52:539-548.
- Solereder, H. y F. J. Meyer. 1930. Systematische Anatomie der Monokotyledonen. VI. Microspermae. Gebrüder Borntraeger, Berlin (English translation, 1969, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem).
- Sosa, V. 2007. A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Blettiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Systematic Botany* 32:34-42.
- Sosa, V., M. W. Chase, G. Salazar, W. M. Whitten y N. H. Williams. 2001. Phylogenetic position of *Dignathe* (Orchidaceae: Oncidiinae): evidence from nuclear ITS ribosomal DNA sequences. *Lindleyana* 16:94-101.
- Soto-Arenas, M. A., G. A. Salazar y A. Rojas. 1993. Nomenclatural changes in *Rhynchostele*, *Mesoglossum* y *Lemboglossum* (Orchidaceae, Oncidiinae). *Orquídea (Méx.)* 13:145-152.
- Stern, W. L. y B. S. Carlswald. 2006. Comparative vegetative anatomy and systematic of Oncidiinae (Maxillarieae, Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:91-107.
- Stern, W. L. y W. S. Judd. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 136:153-178.
- Stern, W. L. y W. S. Judd. 2002. Systematic and comparative anatomy of Cymbidiaceae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 139:1-27.
- Stern, W. L., M. Morris y W. S. Judd. 1993. Comparative vegetative anatomy and systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 113:161-197.
- Stern, W. L., W. S. Judd y B. S. Carlswald. 2004. Systematic and comparative anatomy of Maxillarieae (Orchidaceae), sans Oncidiinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 144:251-274.
- Tate, J. A., M. C. Acosta, J. McDill, E. A. Moscone, B. B. Simpson y A. A. Cocucci. 2009. Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological and cytogenetic evidence. *Systematic Botany* 34:198-206.
- Thompson, I. R., P. Y. Ladiges y J. H. Ross. 2001. Phylogenetic studies of the tribe Brongniartieae (Fabaceae) using nuclear DNA (ITS-1) and morphological data. *Systematic Botany* 26:557-570.
- Toscano de Brito, A. L. V. 1998. Leaf anatomy of Ornithocephalinae (Orchidaceae) and related subtribes. *Lindleyana* 13:234-258.
- 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.
- Whitten, W. M., N. H. Williams y M. W. Chase. 2000. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany* 87:1842-1856.
- Wiens, J. 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology* 53:653-661.
- Williams, N. H. 1974. The value of plant anatomy in orchid taxonomy. *In* Proceedings of the Seventh World Orchid Conference. M. Ospina (ed.). Medellín. p. 281-298.
- Williams, N. H., W. M. Whitten y M. W. Chase. 1999. Molecular systematic of neotropical Maxillarieae (Orchidaceae). V Jornadas de Taxonomía Botánica, Lisbon.
- Williams, N. H., M. W. Chase, T. Fulcher y W. M. Whitten. 2001a. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). *Lindleyana* 16:113-139.
- Williams, N. H., M. W. Chase y W. M. Whitten. 2001b. Phylogenetic positions of *Miltoniopsis*, *Caucaea*, a new genus, *Cyrtochiloides*, and *Oncidium phymatochilum* (Orchidaceae: Oncidiinae) based on nuclear and plastid DNA sequence data. *Lindleyana* 16:272-285.
- Wortley, A. H. y R. W. Scotland. 2006. The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 55:677-685.
- Yukawa, T., T. Ando, K. Karasawa y K. Hashimoto. 1990. Leaf surface morphology in selected *Dendrobium* species. *In* Proceedings of the 13th World Orchid Conference. World Orchid Conference Proceedings Trust, Auckland: p. 250-258.

Apéndice 1. Especies de Oncidiinae analizadas en este estudio. Se indica el colector, número de colecta y el número de acceso en GenBank de las secuencias de ADN utilizadas, excepto en *Oncidium alexandrae*, *O. epidendroides* (*matK*), *Tolumnia pulchella* y *T. triquetra* (ITS, *matK*).

	<i>No. de colecta</i>	ITS	<i>matK</i>
<i>Ada aurantiaca</i> Lindl.	JBL 02968	AF350518	AF350597
<i>Aspasia epidendroides</i> Lindl.	WB Hort	AF350521	AF350600
<i>Benzingia caudata</i> (Ackerman) Dressler.	JBL 13500	AY870027	AY869928
<i>Brassia arcuigera</i> Rchb.f.	JBL 3758	AF350522	AF350601
<i>Brassia caudata</i> (L.) Lindl.	OF Hort	AF350523	AF350602
<i>Brassia gireoudiana</i> Rchb.f. et Warsz.	JBL 8343	AF350524	AF350603
<i>Capanemia superflua</i> (Rchb.f.) Garay et Kennedy.	OF Hort	AF350549	AF350628
<i>Cischweinfia dasyandra</i> (Rchb.f.) Dressler et N.H.Williams.	RAVA Hort	AF350527	AF350606
<i>Comparettia macroplectron</i> Rchb.f. et Triana.	RD Hort	AF350541	AF350620
<i>Cyrtochiloides ochmatochila</i> (Rchb.f.) N.H.Williams et M.W.Chase.	RJM 2394	AF432946	AF433009
<i>Cyrtochilum cimiciferum</i> (Rchb.f.) Dalström.	EH 10535	AF350560	AF350639
<i>Cyrtopodium punctatum</i> (L.) Lindl.	JBL 13960	AF239412	AF239508
<i>Dichaea neglecta</i> Schltr.	PJB 50	AF239320	AF239416
<i>Erycina cristagalli</i> (Rchb.f.) N.H.Williams et M.W.Chase.	RAVA Hort	AF350540	AF350619
<i>Erycina echinata</i> (Kunth) Lindl.	ESZ 013	AF350537	AF350616
<i>Erycina hyalinobulbon</i> (La Llave et Lex.) N.H.Williams et M.W.Chase.	PL 702	AF350536	AF350615
<i>Erycina pumilio</i> (Rchb.f.) N.H.Williams et M.W.Chase.	RD 6669	AF350539	AF350618
<i>Erycina pusilla</i> (L.) N.H.Williams et M.W.Chase.	RJM Hort	AF350538	AF350617
<i>Fernandezia tica</i> Mora-Ret. et D.García.	RD 6706	DQ315821	DQ315889
<i>Ionopsis utricularioides</i> (Sw.) Lindl.	RJM Hort	AF350546	AF350625
<i>Ionopsis satyrioides</i> (Sw.) Rchb.f.	OF Hort	AF350547	AF350626
<i>Lockhartia amoena</i> Endres et Rchb.f.	JBL 07707	AF350515	AF350594
<i>Lockhartia oerstedii</i> Rchb.f.	DB 9399	AF350514	AF350593
<i>Macroclinium bicolor</i> (Lindl.) Dodson.	MAS 4951	AF350550	AF350629
<i>Maxillaria cucullata</i> Hook.	AV Hort	DQ210215	DQ209871
<i>Maxillaria hedwigiae</i> Hamer et Dodson.	JBL 9466	DQ210213	DQ209869
<i>Mesospinidium panamense</i> Garay.	JBL 01661	AF350526	AF350605
<i>Miltonia candida</i> Lindl.	MAS Hort	AF350517	AF350596
<i>Miltoniopsis warscewiczii</i> (Rchb.f.) Garay et Dunst.	JBL 2908	AF350556	AF350635
<i>Notylia barkeri</i> Lindl.	ESZ 017	AF350545	AF350624
<i>Oncidium alexandrae</i> (Bateman) M.W.Chase et N.H.Williams	MAS 6401	AF350785	N132
<i>Oncidium cheiroporum</i> Rchb.f.	MAS 5587	AF350567	AF350646
<i>Oncidium epidendroides</i> (Kunth) M.W.Chase et N.H.Williams	RD Hort	AF350777	N190
<i>Oncidium flexuosum</i> Lodd.	MAS Hort	AF350552	AF350631
<i>Oncidium ghiesbreghtianum</i> A.Rich. et Galeotti	MAS 4101	AF350563	AF350642
<i>Oncidium leucochilum</i> Batem ex. Lindl.	MAS 3565	AF350565	AF350644
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> Kunth.	RJM 626	AF350566	AF350645
<i>Oncidium pictoides</i> M.W.Chase et N.H.Williams	JJZ Hort	AF350572	AF350651
<i>Oncidium reichenheimii</i> (Linden et Rchb.f.) Garay et Stacy.	OF Hort	AF350562	AF350641
<i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl.	ESZ 018	AF350564	AF350643
<i>Ornithocephalus inflexus</i> Lindl.	TPH-265	AF350507	AF350586
<i>Otoglossum chiriquense</i> (Rchb.f.) Garay et Dunst.	MAS Hort	AF350561	AF350640
<i>Psychopsis papilio</i> (Lindl.) H.G.Jones.	MAS Hort	AF350582	AF350661

<i>Rhynchosstele beloglossa</i> (Rchb.f.) Dressler et N.H.Williams.	TPH 283	AF350531	AF350610
<i>Rhynchosstele biconiensis</i> (Batem.) Soto Arenas et Salazar.	GAS 2648	AF350529	AF350608
<i>Rhynchosstele londesboroughiana</i> (Rchb.f.) Soto Arenas et Salazar.	MAS 2197	AF350530	AF350609
<i>Rodriguezia lanceolata</i> Ruiz et Pav.	OF Hort	AF350542	AF350621
<i>Systeloglossum acuminatum</i> Ames et C.Schweinf.	DB 2664	AF350528	AF350607
<i>Telipogon costaricensis</i> Schltr.	AR Hort	DQ315860	AF350588
<i>Tolumnia pulchella</i> (Hook.) Raf.	JBL 11677	N351	N351
<i>Tolumnia triquetra</i> (Sw.) Nir	JBL11680	N408	N376
<i>Tolumnia variegata</i> (Sw.) Braem.	RJM 969	AF350533	AF350612
<i>Trichocentrum cebolleta</i> (Jacq.) M.W.Chase et N.H.Williams.	EAP 286	AF350573	AF350652
<i>Trichocentrum pfavii</i> Rchb.f.	RAVA 512	AF350575	AF350654
<i>Trichocentrum splendidum</i> (A.Rich.) M.W.Chase et N.H.Williams.	MAS Hort.	AF350576	AF350655
<i>Trichopilia maculata</i> Rchb.f.	JBL 11683	AF350579	AF350658
<i>Zelenkoa onusta</i> (Lindl.) M.W.Chase et N.H.Williams.	HZ Hort	AF350555	AF350634

Colectores: AR= Alexander Rojas; AV = Andrés Vovides; WB. = Weimann Bussey; DB = Diego Bogarín; EAP = Eduardo A. Pérez García; EH = Eric Hágsater; ESZ = Estela Sandoval Zapotitla; EYG = Elvira Yañes Guerrero; FP = Franco Pupulin; GAS = Gerardo A. Salazar; IA = Ignacio Aguirre-Olavarrieta; JJZ= Juan José Zúñiga; JBL = Jardín Botánico Lankester; JGC = Javier García-Cruz; JLW = Jorge Lamas Walz; MAS = Miguel Ángel Soto Arenas; OF = Oscar Francke; PJB = Philip J. Brewster; PL = Pesach Lubinsky; RL = R. Leleu; RD = Robert Dressler; RAVA = Rafael Valverde; RJM = Rolando Jiménez Machorro; SC = Sandro Cusi; TPH = Teodoro Platas Hernández; HZ = Harry Zelenko.

Apéndice 2. Caracteres estructurales y estados de carácter utilizados en el análisis cladístico combinado.

Caracteres anatómico foliares

1. Apéndices epidérmicos adaxiales como papilas en lámina foliar: 0. sin papilas; 1. con papilas.
2. Apéndices epidérmicos abaxiales como papilas en lámina foliar: 0. sin papilas; 1. con papilas.
3. Pelos no glandulares en epidermis adaxial: 0. con pelos; 1. sin pelos.
4. Glándulas epidérmicas: 0. ausentes; 1. presentes.
5. Ubicación de estomas en la lámina foliar: 0. hoja hipostomática; 1. hoja anfistomática.
6. Collar cuticular en estoma: 0. presente; 1. ausente.
7. Apertura del collar cuticular en estoma: 0. longitudinal y paralelo al eje longitudinal de las células oclusivas; 1. transversal al eje longitudinal de las células oclusivas y poro del estoma; 2. ausente.
8. Pared lateral interna de las células oclusivas, visto en sección transversal: 0. muy engrosadas (más de 2.5 µm); 1. poco engrosadas (hasta de 2.5 µm).
9. Hipodermis adaxial: 0. ausente; 1. presente.
10. Paredes celulares de hipodermis adaxial: 0. delgadas (menos de 2.5 µm); 1. engrosadas (de 2.5 µm o más); 2. ausentes.
11. Distribución de estratos celulares en la hipodermis adaxial: 0. continuos; 1. discontinuos; 2. ausentes.
12. Número de estratos celulares en hipodermis adaxial de la lámina foliar, región media: 0. uno; 1. dos; 2. tres; 3. ausentes.
13. Hipodermis abaxial en lámina foliar, región media de la lámina: 0. ausente; 1. presente.
14. Mesofilo como parénquima en empalizada: 0. ausente; 1. presente.
15. Células con engrosamientos secundarios, en hipodermis adaxial: 0. ausente en hipodermis adaxial; 1. presente en hipodermis adaxial; 2. sin hipodermis adaxial.
16. Células con engrosamientos secundarios, en mesofilo: 0. ausente; 1. presente.
17. Células buliformes: 0. ausente; 1. presente.
18. Ubicación de células buliformes: 0. diferenciadas sólo en la zona central adaxial; 1. diferenciadas en varias zonas además de la central adaxial; 2. ausentes.
19. Número de estratos de haces vasculares: 0. uno; 1. dos o más.
20. Número de haces vasculares de zona central: 0. uno; 1. dos.
21. Haces de fibras adaxiales: 0. ausentes; 1. presentes.
22. Haces de fibras abaxiales: 0. ausentes; 1. presentes.
23. Número de estratos de haces de fibras abaxiales: 0. uno; 1. dos; 2. tres o más; 3. ausentes.
24. Estégmatos en haces vasculares: 0. presentes; 1. ausentes.
25. Estégmatos en haces de fibras abaxiales: 0. presentes; 1. ausentes; 2. sin haces de fibras abaxiales.

26. Cristales prismáticos: 0. ausentes; 1. presentes.
27. Cristales como drusas: 0. ausentes; 1. presentes.
28. Zona abaxial central: 0. convexa; 1. carinada.
29. Espacios aéreos en mesofilo, región basal: 0. presente; 1. ausente.

Caracteres morfológicos

30. Tipo de crecimiento: 0. simpodial; 1. monopodial.
 31. Forma de tallo: 0. tipo pseudobulbo; 1. tipo caña.
 32. Tipo de pseudobulbo: 0. extendido; 1. reducido; 2. ausente.
 33. Número de entrenudos en el tallo: 0. dos o más por tallo; 1. uno por tallo.
 34. Ubicación de las hojas en el tallo: 0. en el ápice del tallo; 1. a lo largo del tallo.
 35. Disposición de las hojas en el ápice del tallo: 0. sin arreglo definido; 1. con arreglo en forma de abanico; 2. dísticas.
 36. Suculencia de la lámina foliar: 0. no suculenta; 1. suculenta.
 37. Perfil de hoja en sección transversal: 0. lámina dorso-ventralmente extendida; 1. lámina conduplicada; 2. lámina sólo conduplicada marginalmente; 3. lámina unifacial, ensiforme; 4. lámina rolliza o terete; 5. lámina plegada.
-

<i>R. tondeboroughiana</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Rodriguezia lanceolata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Systemoglossum acuminatum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Teliogon costaricensis</i>	1	1	2	0	1	2	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	3	1	2	0	0	1	1	1	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	1	0	0			
<i>Tolunnia pulchella</i>	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2
<i>T. triquetra</i>	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2		
<i>T. variegata</i>	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	
<i>Trichocentrum cebolleta</i>	0	0	1	1	0	0	0	4	1	1	0	0	1	2	1	0	2	1	1	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	4		
<i>Tr. pfallii</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2	1	0	2	1	1	0	0	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0			
<i>Tr. splendidum</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2	1	0	2	1	1	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0			
<i>Trichopilia maculata</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0			
<i>Zelenkoa onusta</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0		