

COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

BOTÁNICA

**Anatomía de raíz de la tribu Cranichideae
(Orchidaceae), con énfasis en la importancia
filogenética del velamen**

COYOLXAUHQI FIGUEROA BATALLA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO 2007.

La presente tesis titulada: **ANATOMÍA DE RAÍZ DE LA TRIBU CRANICHIDEAE (ORCHIDACEAE), CON ÉNFASIS EN LA IMPORTANCIA FILOGENÉTICA DEL VELAMEN**, realizada por la alumna: **COYOLXAUHQI FIGUEROA BATALLA**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR:

**Consejero
Co-Director de tesis**

Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

Co-Director de tesis

Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez

Asesor

Dr. E. Mark Engleman

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2007.

Anatomía de raíz de la tribu Cranichideae (Orchidaceae), con énfasis en la importancia filogenética del velamen

Coyolxauhqui Figueroa Batalla, M. C.
Colegio de Postgraduados. 2007.

El velamen es una rizodermis especializada formada por células muertas con engrosamientos en la pared secundaria; se encuentra en muchas orquídeas y otras monocotiledóneas. Se considera que esta estructura podría tener valor taxonómico, aunque no se han realizado estudios al respecto en la tribu Cranichideae. En este trabajo se examinó la estructura anatómica de la raíz de 26 especies/19 géneros de cinco linajes (subtribus) de la tribu Cranichideae mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Se evaluó la importancia taxonómica y filogenética del velamen en el marco de una filogenia generada a partir de secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto así como caracteres morfológicos/anatómicos de raíz. Se registró por primera vez la presencia de espacios supraendodérmicos y tilosomas en la tribu Cranichideae; ambos caracteres parecen tener importancia ecológica pues se presentan en plantas de lugares con períodos de sequía marcada. Los engrosamientos paralelos o anastomosados de la pared del velamen permiten delimitar el clado Prescottiinae – Spiranthinae. Cranichidinae podría ser diagnosticada por su velamen con poros y sin engrosamientos, aunque estos poros también se presentan en Goodyerinae y Manniellinae. Los tilosomas agrupan las especies de la subtribu Spiranthinae, pero evolucionaron independientemente en *Prescottia*. El carácter más importante taxonómicamente fue la presencia de engrosamientos en la pared del velamen. Los tilosomas y la forma de la raíz también apoyaron los clados recuperados en la filogenia molecular. Se encontró evidencia de evolución paralela de algunos atributos anatómicos de la raíz en taxones distantemente relacionados. El análisis comparativo de los caracteres en un contexto filogenético explícito contribuye a entender la evolución de las estructuras anatómicas de la raíz.

Palabras clave: Anatomía de raíz, Cranichideae, filogenia, nrITS, Orchidaceae, plastidio *trnK-matK*, secuencias de ADN, tilosomas, velamen.

Root anatomy of Cranichideae tribe (Orchidaceae), with emphasis in phylogenetic importance of velamen

Coyolxauhqui Figueroa Batalla, M. C.
Colegio de Postgraduados. 2007.

Previous studies have suggested that velamen characteristics are useful as markers in the Orchidaceae. Species of Cranichideae have been assigned to two velamen types constructed as combinations of characters such as presence of secondary cell wall thickenings and pores. However, such characters have not been analyzed on an individual basis in explicit cladistic analyses. The micromorphology of roots of 26 species of tribe Cranichideae was examined through scanning electron microscopy and light microscopy, scoring the variation and distribution of four characters: number of velamen cell layers, velamen cell wall thickenings, presence and types of tilosomes, supraendodermal spaces and one morphological character (shape of root). The last four characters were analyzed cladistically in combination with DNA sequence data of plastid *trnK/matK* and nuclear ribosomal ITS regions and optimized in the resulting phylogeny. Thickenings of velamen cell walls group Prescottiinae with Spiranthinae whereas tilosomes, documented here for the first time in Cranichideae, provide an unambiguous synapomorphy for subtribe Spiranthinae. Supraendodermal spaces occur mostly in species dwelling in seasonally dry habitats but appear to have evolved three times. Three of the four structural characters assessed are phylogenetically informative, marking monophyletic groups recovered by the combined molecular and morphological analysis. This study highlights the need of conducting character-based structural studies to overcome analytical shortcoming of the typological approach.

Key words: Cranichideae, DNA sequences, nrITS, Orchidaceae, phylogeny, plastid *trnK-matK*, root anatomy, tilosomes, velamen.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apoyar a la ciencia en México y permitir la conclusión de mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados y la especialidad de Botánica por contribuir en mi consolidación como maestra en ciencias en esta fascinante área.

Al Doctor Gerardo Adolfo Salazar Chávez por mostrarme el maravilloso y amplio mundo de las orquídeas; por su paciencia, apoyo y comprensión.

A la Doctora Hilda Araceli Zavaleta Mancera por su confianza, apoyo y enseñanzas con respecto a la anatomía e histología vegetal.

Al Doctor E. Mark Engleman por sus brillantes observaciones en mi trabajo anatómico.

A Miguel Vega técnico del laboratorio de anatomía del Colegio de Postgraduados, por brindarme su amistad y ayuda durante mi trabajo de investigación.

A la M. C. Maria Berenit Mendoza Garfias, responsable de la unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Biología de la UNAM por su apoyo en la toma de fotografías con el microscopio electrónico de barrido.

A la M. C Lidia Cabrera y Biol. Carolina Granados por su amistad y asesoría sobre temas taxonómicos.

DEDICATORIA

A mi madre: Merced Batalla Salvador, ilustre mascarera de la Universidad Autónoma de Guerrero, por el gran amor que me profesa, por compartir y disfrutar mi trabajo de colecta y mis fabulosas orquídeas.

A mi familia: Ameyali y David, que comparten conmigo su vida y mi trabajo, por su amor, apoyo y comprensión.

A mis queridos hermanos, abuelos, tíos y primos, por ser luchadores incansables.

A mis otros hermanos “amigos”, del taller de mascararas, de la danza, del temazcal, de la UNAM, de Chapingo y por supuesto del Colegio de Postgraduados, por su cariño y confianza.

Orquídea enigmática,
belleza pura, armonía perfecta,
eres retoño de la luz, agua, aire y tierra,
naciste para ser perpetua...



Ponthieva formosa Schltr.
Foto: Gerardo A. Salazar.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Estudios anatómicos de las raíces de la tribu Cranichideae.	5
2.2 Estudios filogenéticos moleculares de la tribu Cranichideae.	10
2.2 Importancia de los caracteres moleculares en estudios filogenéticos.	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1 Anatomía de raíces.	13
4.1.1 Material biológico.....	13
4.1.2 Fijación y cortes para microscopía de luz.....	13
4.1.3 Tinciones.	13
4.1.4 Microscopía electrónica de barrido.	14
4.1.5 Selección y codificación de los caracteres anatómicos.....	15
4.2 Filogenia molecular.	18
4.2.1 Material biológico.....	18
4.2.2 Métodos moleculares.	18
4.2.3 Regiones de ADN utilizadas.....	19
4.2.4 Análisis cladístico.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1 Anatomía de raíz de la tribu Cranichideae.	21
5.2 Anatomía de raíz de la subtribu Goodyerinae (grupo externo).....	23

5.3 Anatomía de raíz de la subtribu <i>Spiranthinae</i>	25
5.4 Anatomía de raíz de la subtribu <i>Cranichidinae</i>	26
5.5 Anatomía de raíz de la subtribu <i>Prescottiiinae</i>	26
5.6 Anatomía de raíz de la subtribu <i>Manniellinae</i>	27
5.7 Anatomía de raíz con variación informativa para la sistemática de la tribu <i>Cranichideae</i>	30
5.7.1 Forma de la raíz.....	30
5.7.2 Engrosamientos de la pared del velamen.....	30
5.7.3 Tilosomas.....	31
5.7.4 Espacios supraendodérmicos.	31
5.8 Análisis de secuencias de ADN de cloroplasto (<i>matK</i>), núcleo (ITS) y caracteres morfológicos.....	34
6. DISCUSIÓN	36
6.1 Optimización de los caracteres anatómicos de la raíz con valor taxonómico.	36
6.2 Evolución de los caracteres anatómicos de la raíz de <i>Cranichideae</i>	39
6.3 Importancia funcional y ecológica de los caracteres anatómicos de la raíz de <i>Cranichideae</i>	43
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Ejemplares de la tribu Cranichideae examinados anatómicamente.....	17
Cuadro 2.	Morfología y anatomía de raíz de las subtribus Cranichidinae, Goodyerinae, Manniellinae, Prescottiinae y Spiranthinae.....	27
Cuadro 3.	Caracteres morfológicos y anatómicos de la raíz con variación informativa para la taxonomía de la tribu Cranichideae.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tipos de velamen propuestos por Porembski y Barthlott (1988). 1) <i>Calanthe</i> , 2) <i>Bulbophyllum</i> , 3) <i>Pleurothallis</i> , 4) <i>Malaxis</i> y 5) <i>Spiranthes</i>	8
Figura 2.	Representación de un corte transversal de raíz de la tribu Cranichideae..	16
Figura 3.	Morfología de las raíces de la tribu Cranichideae.	21
Figura 4.	Anatomía transversal de raíz de la tribu Cranichideae.	24
Figura 5.	Características estructurales del velamen de la tribu Cranichideae.....	33
Figura 6.	Árbol más parsimonioso generado en el análisis combinado de secuencias de ADN del gen <i>matk</i> , la región ITS y caracteres morfológicos/anatómicos de raíz de Cranichideae.....	34
Figura 7.	Optimización de los caracteres forma de la raíz, presencia o ausencia de engrosamientos de pared, tilosomas y espacios supraendodérmicos, en el árbol obtenido a partir de las secuencias de <i>matK – trnK</i> e ITS y caracteres morfológicos, bajo el criterio ACCTRAN.....	37
Figura 8.	Hábitat de algunas especies pertenecientes a la tribu Cranichideae.....	51

1. INTRODUCCIÓN

La tribu Cranichideae agrupa alrededor de 100 géneros y 1320 especies de orquídeas predominantemente terrestres con distribución mundial (Chase *et al.*, 2003), pero especialmente es diversa en los trópicos y subtropicos (Pridgeon *et al.*, 2003). Esta tribu consiste de plantas pequeñas con raíces carnosas que son fasciculadas a veces están separadas a lo largo de un rizoma; con hojas no articuladas y suaves, generalmente formando una roseta basal o arregladas en espiral; con inflorescencia terminal, con una a muchas flores por racimo; con flores tubulares o estrelladas, resupinadas o a veces no resupinadas; con pétalos frecuentemente unidos al sépalo dorsal para formar una capucha sobre el labelo y la columna; con un labelo que puede ser entero, bipartido o tripartido, sacciforme o presentar espolón; el ginostemio con antera y rostelo más o menos erectos, con viscidio terminal y polinios séctiles o granulares, excepto en Chloraeinae que tiene antera dorsal erecta proyectándose más allá del rostelo y sin viscidio (Dressler, 1993). La tribu Cranichideae comprende siete subtribus: Chloraeinae, Cranichidinae, Goodyerinae, Manniellinae, Prescottiinae, Pterostylidinae y Spiranthinae (Salazar *et al.*, 2003; Chase *et al.*, 2003).

La clasificación de la tribu Cranichideae es complicada debido a la insuficiencia de caracteres morfológicos para distinguir los grupos (Salazar *et al.*, 2003). Los trabajos sistemáticos previos se basaron principalmente en características morfológicas de las flores, especialmente de la columna y el polinario (Schlechter, 1911; Szlachetko, 1995), además algunos autores integraron información de otras estructuras y propusieron árboles filogenéticos aunque generados de manera intuitiva (Dressler, 1981, 1993).

Varios estudios se enfocaron a las características anatómicas de la raíz de la familia Orchidaceae, incluyendo algunas especies de la tribu Cranichideae (Pridgeon *et al.*, 1983; Porembski y Barthlott, 1988, Stern *et al.*, 1993). Sin embargo, la muestra taxonómica de la tribu fue muy pequeña; por ejemplo, Porembski y Barthlott (1988) exploraron la importancia taxonómica del velamen en la familia Orchidaceae y describieron doce tipos de velamen con base en el número de estratos, la presencia o ausencia de engrosamientos secundarios de pared, presencia o ausencia de poros, engrosamientos de pared de la exodermis, presencia o ausencia de tilosomas e idioblastos traqueoidales en la corteza. Estos autores estudiaron representantes de 18 géneros de Cranichideae y con los datos generados establecieron que hay dos tipos de velamen presentes en la tribu: a) tipo *Calanthe* y b) tipo *Spiranthes*. Además registraron la ausencia de velamen en el género *Goodyera*. Porembski y Barthlott propusieron el velamen tipo *Calanthe* como primitivo por carecer de engrosamientos de la pared y al tipo *Spiranthes* como avanzado por tener engrosamientos paralelos y poros en la pared.

Dressler (1990) utilizó caracteres morfológicos y anatómicos para clasificar la subfamilia Spiranthoideae. Este autor segregó varios géneros originalmente incluidos en Cranichidinae en la nueva subtribu Prescottiinae con base en la posesión de velamen tipo *Spiranthes* establecido por Porembski y Barthlott (1988), rostelo laminar, polinios suaves y sin hamulus, mientras que Cranichidinae tiene velamen tipo *Calanthe*, polinios quebradizos, pequeñas caudículas terminales y un pequeño estípite hamular. Dressler (1990) propuso que Prescottiinae podría ser hermana de la subtribu Spiranthinae por compartir con ella el velamen tipo *Spiranthes*.

Stern *et al.* (1993a) realizaron un estudio de la anatomía vegetativa y la

sistemática de la subfamilia Spiranthoideae y analizaron cladísticamente los datos anatómicos, concluyendo que la subfamilia Spiranthoideae *sensu* Dressler (1993) es polifilética. Stern *et al.* (1993a) propusieron que los spirantosomas y la exodermis con engrosamientos escalariformes en las paredes radiales son sinapomorfias de Cranichideae; sin embargo, sus datos no aportaron caracteres suficientes para resolver las relaciones subtribales

Vargas (1997) hizo un análisis cladístico de Cranichideae, utilizando caracteres morfológicos y los tipos de velamen *Calanthe* y *Spiranthes* propuestos por Porembski y Barthlott (1988), para tratar de resolver las relaciones subtribales de la tribu. Los tipos de velamen no fueron útiles en su análisis por ser altamente homoplásicos, su muestreo taxonómico fue muy limitado (10 géneros) y no incluyó grupos externos adecuados (Salazar *et al.*, 2003).

Salazar *et al.* (2003) realizaron el primer estudio filogenético basado en secuencias de ADN de la tribu Cranichideae, evaluando su monofilia y clasificación subtribal desde una perspectiva independiente de los criterios morfológicos usados originalmente para delimitar los taxa. Estos autores encontraron que Cranichideae *sensu* Dressler (1993) es monofilética, al igual que algunas de las subtribus reconocidas por dicho autor, excepto la subtribu Prescottiinae que se divide en dos grupos. Debido a que se han encontrado discrepancias entre la filogenia molecular y las clasificaciones propuestas a partir de criterios morfológicos, se plantea la necesidad de reevaluar los caracteres morfológicos en que se basó la delimitación de taxa en Cranichideae, los cuales no se han analizados en un contexto filogenético explícito (Salazar *et al.*, 2003).

Una limitante del uso de caracteres morfológicos para la clasificación de plantas es que frecuentemente no son suficientes para construir hipótesis filogenéticas robustas (Freudenstein y Rasmussen, 1999). Los caracteres morfológicos representan una fuente valiosa de datos adicionales, que al ser combinados con otros datos, en este caso moleculares, pueden resolver la filogenia de grupos complicados (Pridgeon y Chase, 1995; Stern y Carlsward, 2006). Debido a lo antes mencionado se plantea aquí la generación de una filogenia de 26 especies de 19 géneros, representantes de los principales linajes de Cranichideae a partir de datos moleculares (secuencias de nucleótidos de ADN nuclear y cloroplasto), en combinación con los caracteres anatómicos con importancia taxonómica y utilizar dicha filogenia para examinar posibles rutas evolutivas de los caracteres anatómicos del velamen y otros tejidos de la raíz en este grupo de orquídeas. Las preguntas que se quieren contestar son las siguientes: ¿Existen caracteres estructurales de la raíz con variación informativa para la sistemática en la tribu Cranichideae? y ¿Cómo evolucionaron en la tribu dichos caracteres anatómicos?

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios anatómicos de raíz de la tribu Cranichideae

La tribu Cranichideae tiene raíces engrosadas que además de fijar la planta al sustrato, absorber agua y nutrientes y realizar fotosíntesis, funcionan como un importante órgano de reserva y perenación (Arditti, 1992; Hágsater *et al.* 2005). Una función adicional de las raíces es que albergan las micorrizas, las cuales son necesarias para la germinación de las semillas e intervienen en la nutrición de la planta (Arditti, 1992; Stern, 1999), la micorriza digiere la materia orgánica del sustrato y conduce los nutrimentos a través de sus hifas hasta el interior de la planta hospedera, donde son fijados como almidón (Stern, 1999).

Estructuralmente estas raíces se caracterizan por tener: a) comúnmente una medula formada por células parenquimatosas y espacios intercelulares, b) un cilindro vascular con elementos traqueales binarios rodeados de parénquima, c) un estrato de periciclo, d) un estrato de endodermis, e) una corteza constituida por células parenquimatosas, f) un estrato de exodermis y g) uno o varios estratos de velamen de células poligonales o elípticas (Stern *et al.*, 1993a). La corteza acumula agua, nutrientes, frecuentemente almidón y a veces puede contener cloroplastos, rafidios y mucílago (Arditti, 1992; Stern *et al.*, 1993a). El almidón es sintetizado y almacenado en amiloplastos especializados. Estos amiloplastos fueron llamados “spirantosomas”, porque inicialmente se creyó que estaban restringidas a la subfamilia Spiranthoideae *sensu* Dressler (1993), donde se incluía la tribu Cranichideae (Stern *et al.*, 1993b). Ahora se han encontrado también en los géneros *Uleiorchis* y *Wullschlaegelia*, que están incluidos en la subfamilia Epidendroideae (Stern *et al.*, 1999). La exodermis es

uniseriada formada por dos tipos de células, unas con paredes que muestran engrosamientos escalariformes en las paredes radiales y otras células vivas con protoplastos densos llamadas células de paso (Engard, 1944).

La epidermis especializada de las raíces de orquídeas fue llamada originalmente “*velamen radicum*” y la observó por primera vez Link en 1824. Posteriormente Engard (1944) definió el velamen como un tejido especializado de varios estratos de células que cubre las raíces aéreas y terrestres de las orquídeas. El estableció que el velamen es derivado de la protodermis por divisiones periclinales, y por ende es una epidermis múltiple. Una descripción más reciente es la de Porembski y Barthlott (1988). Estos autores proponen que el velamen consiste de células muertas y es delimitado internamente por uno o varios estratos de exodermis cerca de la corteza de la raíz. En 1993 Dressler definió al velamen como una rizodermis especializada formada por uno a 24 estratos de células muertas con engrosamientos en la pared secundaria, el cual se encuentra en muchas orquídeas y otras monocotiledóneas. En el presente trabajo nos basamos en la definición de velamen de Dressler (1993).

Recientemente, Pridgeon *et al.* (1983) estudiaron con microscopía electrónica de barrido los tilosomas, definidos como excrescencias lignificadas de la pared del velamen adyacente a las células de pasaje de la exodermis, presentes sólo en raíces de orquídeas epífitas. Estos autores establecieron los siguientes tipos de tilosomas: esponjosos, baculados, lamelados, discoides, plegados, palmados y reticulados. Ellos mencionaron que los tilosomas no se encuentran en plantas terrestres de las subfamilias Spiranthoideae y Orchidoideae, aunque estos mismos autores reconocieron la deficiencia de su muestreo, porque solo incluyeron nueve especies de ocho géneros de

Cranichideae.

El estudio más amplio realizado sobre la micromorfología del velamen es el de Porembski y Barthlott (1988), quienes enfatizaron la importancia taxonómica de este tejido en la familia Orchidaceae. Basados en la variabilidad del velamen los autores propusieron 12 tipos de velamen a partir de un conjunto de caracteres anatómicos que se mencionan a continuación: a) número de estratos de células, el cual varía de uno a 20 según la especie, b) el arreglo de los estratos c) la forma y tamaño de las células individuales; d) la presencia y el arreglo de los engrosamientos helicoidales de la pared celular, e) el número y el tamaño de los poros, f) los engrosamientos de pared de las células cortas de la exodermis y g) presencia o ausencia de idioblastos que contienen cristales como rafidios o drusas o los que poseen engrosamientos parciales de la pared y frecuentemente poros. Porembski y Barthlott (1988) describieron los siguientes tipos de velamen: *Calanthe*, *Bulbophyllum*, *Pleurothallis*, *Malaxis*, *Spiranthes*, *Coelogyne*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Cymbidium*, *Vanda*, entre los que incluyen el velamen no específico, también mencionaron que algunas especies no tienen velamen (Fig. 1). En la tribu Cranichideae observaron géneros con velamen tipo *Spiranthes* y tipo *Calanthe*, y el género *Goodyera* sin velamen (Fig. 1). La principal limitante de este trabajo fue el muestreo limitado de la tribu Cranichideae de la cual solo se incluyeron 19 especies de 18 géneros, de las cuales siete especies de seis géneros pertenecieron a la subtribu Goodyerinae; ocho especies de ocho géneros de la subtribu Spiranthinae y cuatro especies de cuatro géneros de la subtribu Cranichidinae (dos incluidos por Dressler [1993] en Prescotttiinae). El muestreo fue poco robusto ya que no se incluyeron todos los linajes de la tribu; faltaron más especies de la subtribu Cranichidinae y Prescotttiinae, así

como representantes de Manniellinae y Galeottiellinae. Aunque Porembski y Barthlott (1988) no hacen un análisis cladístico de los caracteres, proponen el velamen tipo *Calanthe* como el más primitivo, caracterizado por tener pared con poros y sin engrosamientos, además porque dicho tipo de velamen se presentó en los linajes más primitivos de las subfamilias de Orchidaceae; aunque en todo caso la rizodermis de *Goodyera* es más simple por carecer de ornamentación de pared, dichos autores no lo toman en cuenta como argumento válido para considerarlo como más ancestral.

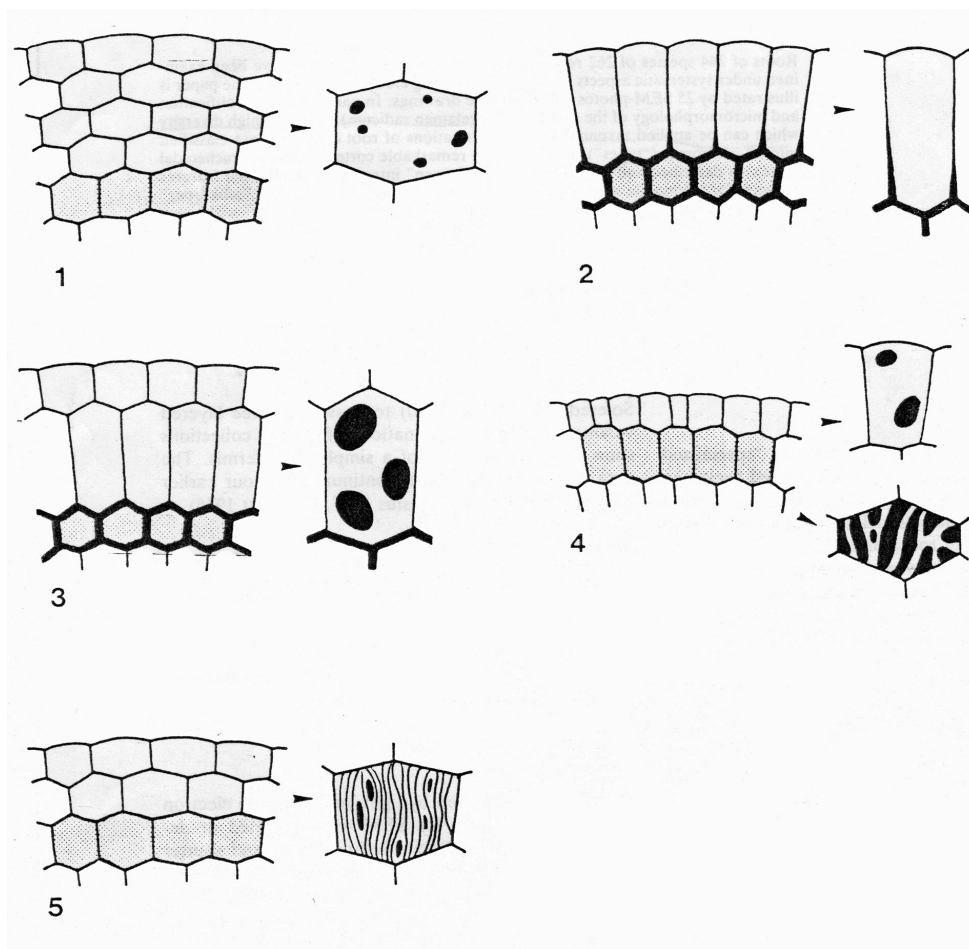


Figura 1. Tipos de velamen propuestos por Porembski y Barthlott (1988). 1) *Calanthe*, 2) *Bulbophyllum*, 3) *Pleurothallis*, 4) *Malaxis* y 5) *Spiranthes*. Stern *et al.* (1993a) fueron pioneros al realizar un estudio de anatomía vegetativa

y sistemática de la subfamilia Spiranthoideae, en la que se incluía la tribu Cranichideae; ellos analizaron cladísticamente los datos anatómicos y concluyeron que la subfamilia *sensu* Dressler (1993) es polifilética. Lo anterior se debe a que los géneros *Corymborkis*, *Tropidia* y *Dicerastosteles* se incluyeron en la subfamilia Epidendroideae, mientras que los representantes de la tribu Cranichideae, incluida por Dressler (1993) en la subfamilia Spiranthoideae, resultaron ser más cercanos a la subfamilia Orchidoideae. Estos autores propusieron que los spirantosomas y la exodermis con engrosamientos escalariformes en las paredes radiales son sinapomorfias de Cranichideae. Dichos autores construyeron un cladograma con los caracteres vegetativos que encontraron; sin embargo, se formó una politomía a nivel subtribal, quedando sin resolver la filogenia a este nivel. Stern *et al.* (1993), estudiaron 43 especies de 23 géneros de la tribu Cranichideae, de los cuales 20 especies de 14 géneros pertenecieron a Goodyerinae; cuatro especies de dos géneros a Prescottiinae; 15 especies de seis géneros a Spiranthinae y una especie de un género a Manniellinae. Aunque en este caso el muestreo de las especies de la tribu fue más amplio, el análisis cladístico no fue claro ya que el autor formó subgrupos donde incluyó especies de subtribus diferentes: por ejemplo en el grupo Cranichideae I, Stern *et al.* (1993a) combinó especies de las subtribus Cranichidinae (*Cranichis*, *Ponthieva*), Goodyerinae (*Pachyplectron*, *Hylophila*, *Vrydagzynea*), Manniellinae (*Manniella*), Prescottiinae (*Altensteinia*, *Prescottia*) y Spiranthinae (*Cyclopogon*, *Eurystyles*, *Pelexia*, *Sarcoglottis*, *Spiranthes*, *Stenorrhynchos*); en el grupo Cranichideae II y III incluyó solo géneros de Goodyerinae. Además separó otros géneros tales como *Anoectochilus* y *Lepidogyne* por la ausencia de spirantosomas, contradictorio pues los mismos autores aseveran que los amiloplastos son muy variables. Los subgrupos formados se utilizaron

en el análisis cladístico, por lo tanto, las relaciones subtribales de Cranichideae no se resolvieron.

2.2 Estudios filogenéticos moleculares en la tribu Cranichideae

Recientemente se ha aplicado la secuenciación de ADN como una fuente importante de caracteres, que permiten resolver por métodos cladísticos la filogenia de grupos complicados de clasificar (Givnish, 1997). Algunos autores realizaron análisis filogenéticos de secuencias de plastidio, en específico *rbcL* (Kores *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 1999; Chase *et al.*, 2001), y un intron de proteína codificadora de mitocondria, gen *nad1* (Freudenstein *et al.*, 2000), ellos propusieron que la tribu Cranichideae es parafilética. La transferencia de Pterostylidinae y Chloraeinae de Diurideae a Cranichideae ha sido bien apoyada (Kores *et al.*, 2000). Entonces Cranichideae es monofilética si se incluyen los dos grupos mencionados anteriormente (Chase *et al.*, 2003). La monofilia de la tribu también se indicó en estudios basados en caracteres morfológicos (Freudenstein y Rasmussen, 1999).

Salazar *et al.* (2003) realizaron el primer estudio filogenético molecular, sin incluir los criterios morfológicos usados originalmente para clasificar la tribu Cranichideae. Ellos evaluaron la monofilia de la tribu y su clasificación subtribal. Estos autores encontraron que la tribu Cranichideae *sensu* Dressler (1993) es monofilética.

2.3 Importancia de los caracteres moleculares en estudios filogenéticos

Los caracteres morfológicos son esenciales para el reconocimiento de las especies y pueden ser muy útiles con altos niveles taxonómicos en la familia Orchidaceae (Freudenstein y Rasmussen, 1999). Sin embargo, los caracteres morfológicos no son suficientes para la construcción de un cladograma, debido a que

son escasos. Por otro lado Pridgeon y Chase, (1995) argumentaron acerca de los altos grados de homoplasia en los estudios filogenéticos basados en caracteres morfológicos, cuyas causas son en parte, la convergencia y el paralelismo de este tipo de caracteres. La convergencia puede ser menos frecuente en ciertos tipos de caracteres moleculares como sitios de restricción de ADN menos expuestos a presión de selección (Givnish, 1997). Los estudios moleculares tienen ventajas porque se obtiene un gran número de caracteres en poco tiempo, los análisis son independientes de otros tipos de caracteres ya utilizados por lo que no son redundantes; además, la variación en las secuencias de ADN de organelos y núcleo ha servido para estudiar cualquier nivel taxonómico (Soltis y Soltis, 1998). Stern (1999) argumentó que los caracteres moleculares podrían ser útiles para definir filogenias de especies de plantas con estructuras especializadas y reducidas, en las que no se pueden obtener suficientes caracteres morfológicos. Además, la validez de las inferencias con base en las moléculas puede ser probada por comparación con otros grupos de datos, si estos producen árboles congruentes en análisis separados y combinados entonces las moléculas proveen un fuerte soporte a las hipótesis filogenéticas (Soltis y Soltis, 1998; Chase *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la utilidad taxonómica de los atributos del velamen y otros tejidos de la raíz en la tribu Cranichideae y establecer hipótesis sobre la evolución de los caracteres.

Objetivos particulares

Describir detalladamente la estructura de las raíces de orquídeas de la tribu Cranichideae, considerando especies miembros de los linajes o subtribus principales.

Estudiar la estructura de la raíz en busca de caracteres anatómicos útiles para distinguir o delimitar grupos taxonómicos.

Analizar la evolución de los caracteres seleccionados en un marco filogenético explícito basado en secuencias de ADN.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Anatomía de raíces

4.1.1 Material biológico

Se utilizaron individuos de 26 especies de orquídeas de 19 géneros que representan las siguientes subtribus de Cranichideae *sensu* Dressler (1993): Cranichidinae, Goodyerinae, Manniellinae, Prescottinae y Spiranthinae. El material para el estudio anatómico se obtuvo de ejemplares vivos recolectados directamente en campo o mantenidos en cultivo, excepto los ejemplares secos de *Pterichis habenarioides* y *Aa colombiana* que se obtuvieron del Herbario Nacional de México (MEXU), de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuadro 1).

4.1.2 Fijación y cortes para microscopía de luz

Fragmentos de 0.5 cm de longitud de la región media de la raíz fueron fijados en FAA (50 % de propanol, 5 % de ácido acético glacial, 3.7 % de formaldehído en agua destilada) (Sass, 1958) durante al menos 24 h. Algunas especies se fijaron en etanol al 70 %. Los tejidos se lavaron con agua y se colocaron en amortiguador de fosfatos de Sorensen ($\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2 \text{O}$) al 0.1 %, pH 7.2 durante 24 h. Posteriormente los fragmentos se endurecieron en etanol al 30 % y 50 % durante 24 h para facilitar su corte. Se obtuvieron cortes transversales de 50 μm de grosor con un micrótomo de mano R. Jung, AG, Heidelberg.

4.1.3 Tinciones

Los cortes se tiñeron con dos colorantes: a) una mezcla acuosa (0.5 % azul de metileno, 0.5 % borax, 0.5 % de azure II) para teñir las paredes celulares del velamen y b) APS (ácido peryódico y luego reactivo de Schiff) para polisacáridos insolubles

(Ruzin, 1999). Con el objeto de conocer la composición de los tejidos se realizaron pruebas histoquímicas. Para detectar la presencia de lípidos se utilizó rojo “O” de aceite saturado (0.05 % p/v rojo “O” de aceite + 25 % v/v 1- butanol + 75 % v/v etilenglicol) de acuerdo con Zavaleta y Engleman (1994). Para almidón se usó I₂KI (0.5 % de yoduro de potasio en agua destilada + yodo elemental, Johansen, 1940). Para identificar lignina se utilizó 2 % de fluoroglucinol, 68 % de etanol y 30 % de HCl concentrado (Sass, 1958).

Los cortes teñidos se montaron en un medio de jalea glicerizada (50 % de glicerina + 10 % de gelatina + 1 % de fenol + 39 % de agua). Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio de luz Zeiss, Axiostar Plus. Se capturaron imágenes digitales de 1600 x 1200 píxeles en formato JPG, con una cámara SONY Cyber-Shot, montada al microscopio óptico.

4.1.4 Microscopía electrónica de barrido

La mayoría de las raíces se fijaron en una solución de glutaraldehído al 4 % en amortiguador de fosfato de Sorensen pH 7.2 (Ruzin, 1999). Algunas especies fueron fijadas en FAA o conservadas en etanol al 70 %. Posteriormente los tejidos se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, 100 % y 100 %), por un lapso mínimo de 4 horas por cambio. Las muestras se secaron a punto crítico (secadora Tousimis, Samdri – 780 A), se montaron en portamuestras de cobre con cinta doble adhesiva de carbono y se cubrieron con oro (ionizadora JEOL, Fine Coat). Las muestras se examinaron bajo un microscopio electrónico de barrido JEOL, JSM 35 C, operando a 15 kV y algunas muestras se analizaron en un microscopio HITACHI S-2460N. Se capturaron imágenes en película

fotográfica de KODAK, 125 PX de 120 mm y algunas fotografías fueron capturadas en película de KODAK de 35 mm, para su posterior impresión en papel y digitalización.

4.1.5 Selección y codificación de los caracteres anatómicos

Se analizaron los cortes anatómicos de raíces de todas las especies estudiadas con énfasis en los caracteres que forman parte de los tipos *Calanthe* y *Spiranthes* propuestos por Porembski y Barthlott (1988). Posteriormente se seleccionaron aquellos caracteres cuya variación fuera criterio útil para agrupar las especies de cada subtribu; o bien, tuvieran una probable significancia ecológica. Algunos caracteres como los spirantosomas y engrosamientos escalariformes de la exodermis no se usaron porque no presentaron variación entre los taxa examinados. Caracteres continuos como el número de polos del xilema no se usaron porque se requeriría un muestreo más amplio para poder establecer intervalos para una codificación. Se midieron el diámetro tangencial (DT) y radial (DR) de las células de la raíz (Fig. 2), para lo cual se usaron las fotografías digitalizadas con el programa Photoshop versión 7.

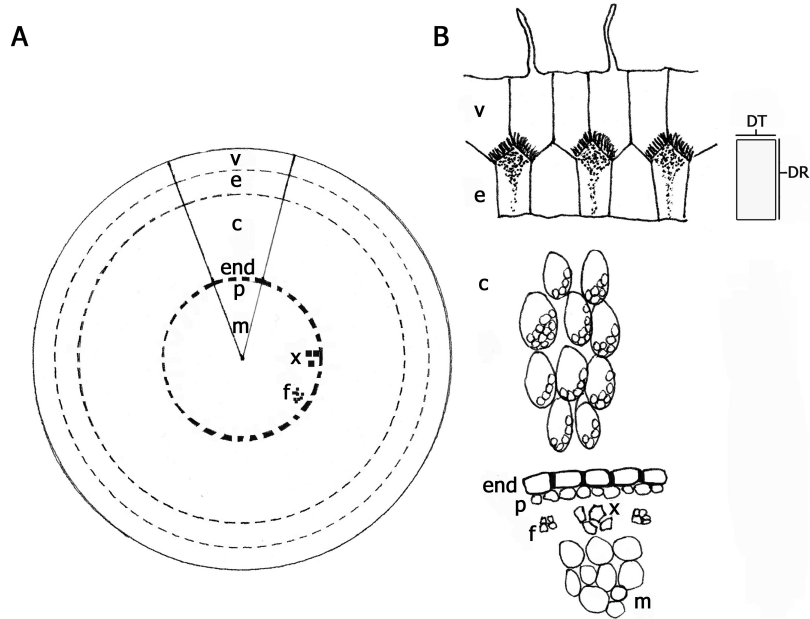


Figura 2. Representación de un corte transversal de raíz de Cranichideae (A). Partes de la raíz y orientación de las mediciones realizadas (B). Abreviaturas: v: velamen, e: exodermis, c: corteza, end: endodermis, p: periciclo, m: medula, x: xilema, f: floema, DT: diámetro tangencial, DR: diámetro radial.

Cada carácter anatómico seleccionado fue optimizado en un cladograma derivado del análisis cladístico de secuencias de ADN de una región de núcleo, otra de cloroplasto y cuatro caracteres adicionales, uno morfológico (forma de raíz) y tres anatómicos los cuales son: presencia o ausencia de engrosamientos de pared, tilosomas y espacios supraendodérmicos, con la finalidad de explorar su evolución en el marco de una hipótesis filogenética explícita. La optimización se realizó con el programa MacClade (Maddison y Maddison, 2001).

Cuadro 1. Ejemplares de la tribu Cranichideae examinados anatómicamente.

ESPECIE	SUBTRIBU	ORIGEN	RESPALDO
<i>Cranichis cochleata</i> Dressler	Cranichidinae	México	Salazar 6547, MEXU.
<i>Cranichis revoluta</i> Hamer & Garay	Cranichidinae	México	Soto 10097, MEXU.
<i>Ponthieva ephippium</i> Rchb. f.	Cranichidinae	México	Salazar 6440, MEXU.
<i>Ponthieva formosa</i> Schltr.	Cranichidinae	México	Salazar 6539, MEXU.
<i>Ponthieva tuerckheimii</i> Schltr.	Cranichidinae	México	Salazar 6512, MEXU.
<i>Pterichis habenarioides</i> (F. Lehm. & Kraenzl.) Schltr.	Cranichidinae	Costa Rica	Davidse 24767, MEXU.
<i>Goodyera brachyceras</i> (A. Rich & Galeotti) Garay & G. A. Romero	Goodyerinae	México	Hernández 2005, MEXU
<i>Ludisia discolor</i> (Ker Gawl.) A. Rich.	Goodyerinae	Cultivada	Salazar S. Núm., MEXU. (Foto). Planta Cultivada.
<i>Manniella gustavi</i> Rchb. f.	Manniellinae	Camerún	Salazar 6505, MEXU.
<i>Aa colombiana</i> Schltr.	Prescotttiinae	Colombia	J. Aldana 002, MEXU.
<i>Altensteinia fimbriata</i> Kunth	Prescotttiinae	Ecuador	Salazar 6789, MEXU.
<i>Prescottia tubulosa</i> (Lindl.) L. O. Williams	Prescotttiinae	México	Salazar 6888, MEXU.
<i>Prescottia stachyodes</i> (Sw.) Lindl.	Prescotttiinae	México	Salazar 6515, MEXU.
<i>Pseudocranichis thysanochila</i> (Rob. & Greenm.) Garay	Prescotttiinae	México	Salazar 6887, MEXU.
<i>Aulosepalum pyramidale</i> (Lindl.) M. A. Dix & M. W. Dix	Spiranthinae	México	Figuroa 045, CP.
<i>Cyclopogon comosus</i> (Rchb. f.) Burns-Bal. & E. W. Greenw.	Spiranthinae	México	Soto 94034, MEXU.
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i> (La Llave & Lex.) Garay	Spiranthinae	México	Figuroa 043, CP.
<i>Dichromanthus michuacanus</i> (La Llave & Lex.) Salazar & Soto Arenas	Spiranthinae	México	Salazar 6583, MEXU.
<i>Mesadenus lucayanus</i> (Britton) Schltr.	Spiranthinae	México	Salazar 6714, MEXU.
<i>Mesadenus polyanthus</i> (Rchb.f.) Schltr.	Spiranthinae	México	Figuroa 042, CP.
<i>Microthelys constricta</i> (Szlach.) Szlach.	Spiranthinae	México	Hernández--- MEXU.
<i>Pelexia disjuncta</i> Salazar	Spiranthinae	México	Salazar 6421, MEXU.
<i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay	Spiranthinae	México	Salazar 6718, MEXU.
<i>Sarcoglottis shaffnerii</i> (Rchb.f.) Ames.	Spiranthinae	México	Figuroa 044, CP.
<i>Schiedeella llaveana</i> (Lindl.) Schltr.	Spiranthinae	México	Salazar 6508, MEXU.

4.2 Filogenia molecular

4.2.1 Material biológico

En el presente estudio se incluyeron las 26 especies que fueron estudiadas anatómicamente, que representan las subtribus Cranichidinae, Goodyerinae, Manniellinae, Prescottiinae y Spiranthinae. Se consideró como grupo externo a *Goodyera brachyceras* y *Ludisia discolor* de la subtribu Goodyerinae y a *Manniella gustavi* de la subtribu Manniellinae, con base en el estudio filogenético molecular de Salazar *et al.* (2003), donde se estableció que las subtribus Prescottiinae, Spiranthinae y Cranichideae son subtribus que a su vez forman un grupo monofilético, cuyo hermano es el grupo formado por Manniellinae, Goodyerinae y Pachyplectroninae. El ADN utilizado en esta parte del trabajo en algunos casos se obtuvo del mismo individuo estudiado anatómicamente, pero en otros casos provino de otra planta de la misma especie.

4.2.2 Métodos moleculares

La extracción, amplificación y secuenciación de ADN para su análisis cladístico se llevaron a cabo mediante métodos bioquímicos estándar detallados en Salazar *et al.* (2003). De manera sucinta, dichos métodos incluyen la extracción del ADN genómico a partir de a) tejido fresco secado en gel de sílice para su posterior análisis, o b) obtención de ejemplares de herbario mediante una modificación del método de Doyle y Doyle (1987). El ADN extraído y purificado fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y secuenciado en un secuenciador “3100 Genetic Analyzer” de Applied Biosystems. Las cadenas de ADN fueron secuenciadas y los electroforamas resultantes fueron ensamblados y editados con el

programa Sequencher (Gene Codes Corp.).

4.2.3 Regiones de ADN utilizadas

En este estudio se analizaron secuencias de nucleótidos de dos organelos del genoma de la célula vegetal: a) la región de los espaciadores internos transcritos (ITS) de la familia multigénica ribosomal nuclear y b) el gen de plastidio *matK*, incluyendo la mayor parte del intrón del gen *trnK* en el cual se encuentra inmerso. Ambas regiones han sido ampliamente utilizadas para reconstruir las relaciones filogenéticas de numerosos grupos de plantas (Soltis y Soltis, 1998), y han mostrado su utilidad para resolver las relaciones intrafamiliares en varios linajes de orquídeas (Aceto *et al.*, 1999; Bateman *et al.*, 1997; Bellstedt *et al.*, 2001; Cameron *et al.*, 1999; Douzery *et al.*, 1999; Goldman *et al.*, 2001; Gravendeel *et al.*, 2001; Kores *et al.*, 1997, 2000, 2001; Pridgeon *et al.*, 1997, 2001; Ryan *et al.*, 2000; Sosa *et al.*, 2001; van den Berg *et al.*, 2000; Whitten *et al.*, 2000).

El uso de ADN codificante y no codificante del genoma proveniente de dos organelos con distintas dinámicas evolutivas permiten, a) resolver relaciones filogenéticas a distintos niveles jerárquicos, y b) explorar si las distintas regiones recuperan relaciones similares o diferentes. En este último caso, existe la posibilidad de que las distintas regiones reflejen la historia particular de una región de ADN y no de la filogenia del organismo (Doyle y Doyle, 1997).

Las secuencias de ADN fueron proporcionadas por Gerardo Salazar (datos no publicados) y forman parte de un estudio más amplio de las relaciones filogenéticas de la tribu Cranichideae (Salazar, Chase y Cabrera, en preparación).

4.2.4 Análisis cladístico

Las dos matrices de las regiones de ITS y *matK* – *trnK* se analizaron inicialmente por separado para comparar las relaciones por cada una. Las relaciones recuperadas fueron muy similares y en los casos de diferencias los grupos no recibieron apoyo interno, por lo que las diferencias pueden interpretarse como falta de interacción y no como conflicto real entre ambas reconstrucciones (Wiens, 1998; Wendel y Doyle, 1998). Debido a lo anterior, las dos regiones fueron analizadas en combinación. Del análisis combinado de ambas regiones de resultaron tres árboles más parsimoniosos, pero al analizar junto con los datos anatómicos resultó un solo árbol más parsimonioso. Por lo tanto se eligió el último análisis combinado por resultar en una sola hipótesis filogenética. Este punto de vista constituye un análisis riguroso de hipótesis de homología primaria.

Los análisis cladísticos se realizaron bajo el criterio de parsimonia utilizando el programa PAUP* versión 4.2 b para Macintosh (Swofford, 2002). Se usaron búsquedas heurísticas con 1000 repeticiones de orden aleatorio de taxa para calcular los árboles iniciales, efectuando intercambio de ramas con “tree- bisection- reconnection” (TBR), salvando hasta 20 árboles más cortos por repetición. Todos los caracteres fueron considerados con igual peso y no ordenados. El apoyo interno de los clados se evaluó mediante un análisis “bootstrap” (Felsenstein, 1985), efectuando 300 repeticiones de bootstrap. Cada repetición consistió de una búsqueda heurística con 10 repeticiones de taxa en orden aleatorio y TBR. Se guardaron hasta 20 árboles más cortos por repetición. La optimización de los caracteres morfológicos/anatómicos, se realizó con el programa MacClade, con la opción ACCTRAN.

5. RESULTADOS

5.1 Anatomía de las raíces de Cranichideae

Las raíces de la tribu Cranichideae mostraron notable variación en algunos caracteres morfológicos. Las raíces de las subtribus Cranichidinae y Goodyerinae tuvieron raíces cilíndricas delgadas de 0.2 cm a 0.4 cm de diámetro y de 4 a 9 cm de longitud (Fig. 3 A). Las raíces de la subtribu Spiranthinae fueron fusiformes y las más engrosadas (Fig. 3 B), es decir el diámetro es mayor en la parte media de la raíz y se angosta hacia los extremos. Estas raíces midieron de 0.5 a 1.5 cm de diámetro y de 2 a 7 cm de longitud, aunque *Sacoila lanceolata* y *Dichromanthus cinnabarinus* tuvieron raíces muy largas (12 cm) Las raíces de subtribu Prescottiinae son parecidas a las de Spiranthinae, aunque con algunas excepciones. *Altensteinia fimbriata* tiene raíces cilíndricas engrosadas y muy largas. *Prescottia stachyodes* (Prescottiinae) y *Manniella gustavi* (Manniellinae), tienen raíces zancudas (que están expuestas al aire), cilíndricas engrosadas y muy largas de 5 a 14 cm de longitud (Fig. 3 C).

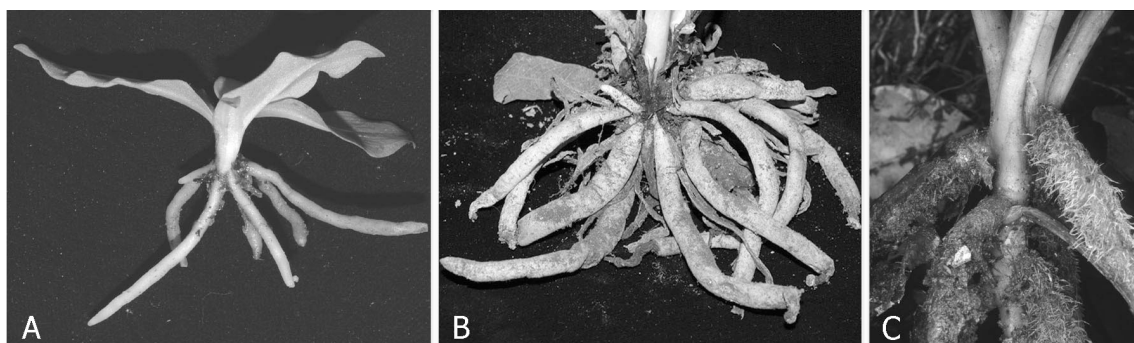


Figura 3. Morfología de las raíces de la tribu Cranichideae. (A) Raíces cilíndricas de *Ponthieva schaffneri*, (B) raíces fusiformes y engrosadas de *Dichromanthus* sp. (C) raíces zancudas de *Manniella gustavi*.

En un corte mediano en la región del ápice, se observó que las células del velamen se diferencian y maduran temprano cerca del ápice (2 a 5 mm). Con el objeto de uniformizar las muestras y asegurar que el velamen estuviera completamente diferenciado, los cortes se realizaron a la mitad de la longitud total de las raíces.

En la mayoría de las especies de la tribu se observaron hongos micorrízicos. Las hifas penetran por los pelos radicales y se dispersan a las células adyacentes por hifas simples las cuales se aglomeran y forman los llamados “pelotones”. Los pelotones luego son digeridos por las células de la orquídea. En algunas especies colectadas en etapa vegetativa no se encontraron micorrizas. La micorriza solo se encontró en determinadas áreas del tejido cortical, ocupando de 30 % a 50 % del área en corte transversal. En la mayoría de los casos las micorrizas se observaron en los estratos externos debajo de la exodermis y alejados del cilindro vascular. La morfología de los pelos radicales no varió entre especies; en todos los casos fueron unicelulares. La densidad fue variable, desde pelos radicales escasos en algunas *Spiranthinae* o abundantes en *Manniella* (*Manniellinae*). Se encontraron spirantosomas en todas las especies analizadas, los cuales variaron en abundancia e incluso en algunas muestras de *Aulosepalum pyramidale*, *Sarcoglottis schaffneri* y *Mesadenus polyanthus* no se detectaron.

Las pruebas histoquímicas revelaron que el velamen está constituido por lípidos (posiblemente suberina) y polisacáridos insolubles (celulosa y hemicelulosa), sin detectarse lignina, compuesto que se ha encontrado en los tilosomas del velamen de orquídeas epifitas (Pridgeon *et al.*, 1983). Las células del parénquima cortical en todas las especies contienen agua, almidón, rafidios y a veces cloroplastos. Los elementos de vaso del xilema y la banda de Caspary mostraron lignificación.

5.2 Anatomía de raíz de la subtribu Goodyerinae (grupo externo).

Los caracteres estudiados en las dos especies son diferentes. El cilindro vascular en *Goodyera brachyceras* tiene rayos de xilema únicos (Fig. 4 C); en cambio en *Ludisia discolor* los haces vasculares están alrededor de una médula. El periciclo y endodermis tienen un estrato en ambas especies. Las células de la corteza tienen paredes delgadas con spirantosomas, sin espacios intercelulares ubicados radialmente en la corteza alrededor del cilindro central, que llamamos “espacios supraendodérmicos”. La exodermis es uniseriada con células alargadas transversalmente, las cuales tienen mayor tamaño que las células del velamen. El velamen, de un estrato de células poligonales, tiene paredes radiales continuas en *Goodyera* y paredes radiales con poros en el caso de *Ludisia discolor*, sin engrosamientos de pared; no se localizaron tilosomas.

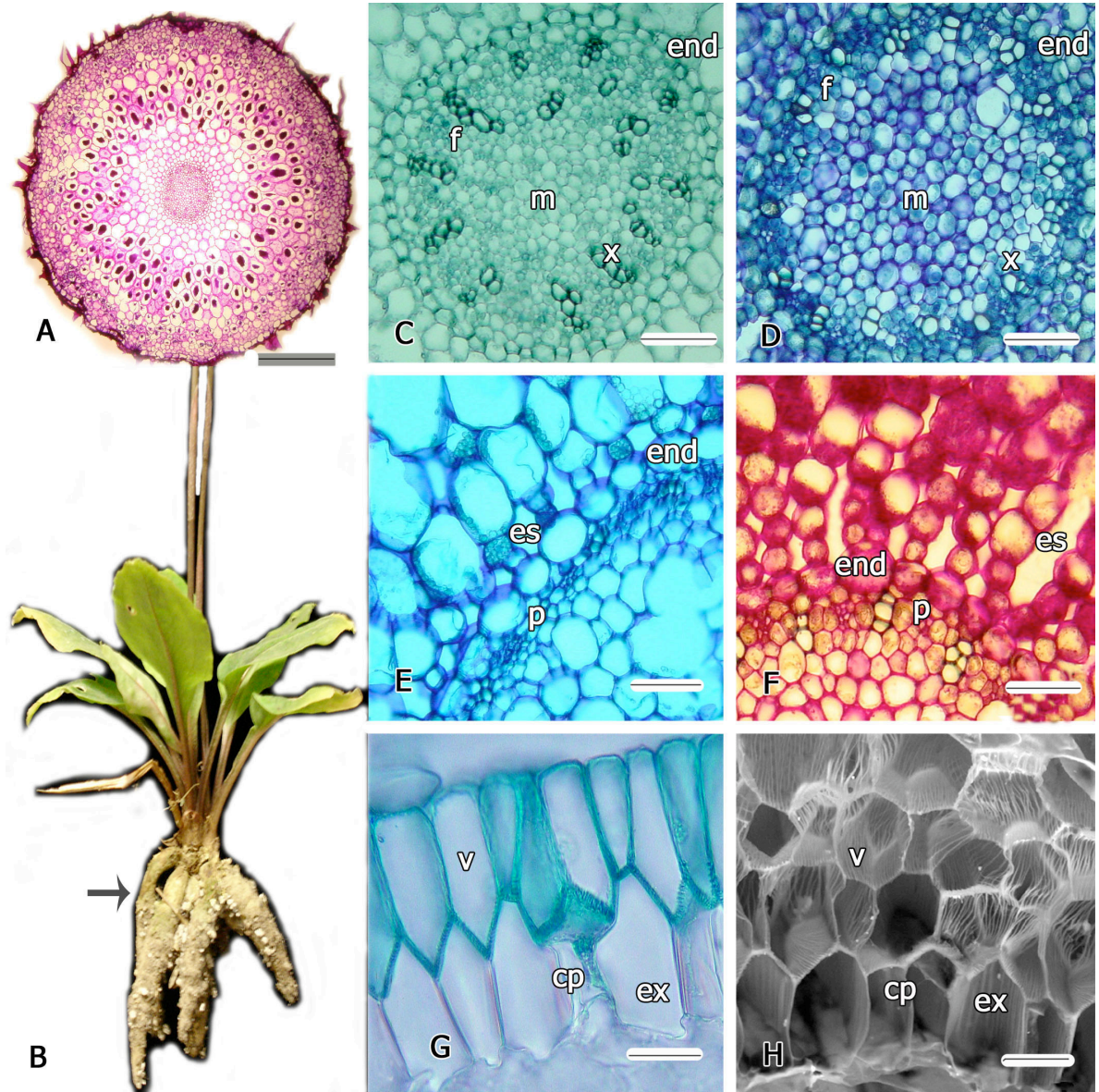


Figura 4. Anatomía transversal de raíz de la tribu Cranichideae. (A) cilindro vascular de *Goodyera brachyceras* (barra= 0.5 mm), (B) planta de *Cyclopogon aff. comosus* con raíces engrosadas, fusiformes y fasciculadas, (C) cilindro vascular de *Goodyera brachyceras* (barra= 80 μ m), (D) cilindro vascular de *Sacoila lanceolata* (barra= 80 μ m), (E) espacios supraendodérmicos de *Mesadenus lucayanus* (barra= 80 μ m), (F) espacios supraendodérmicos en *Sacoila lanceolata* (barra= 80 μ m), (G) velamen de un estrato en *Mesadenus polyanthus* (barra= 80 μ m), (H) velamen de tres estratos en *Prescottia stachyodes* (barra= 50 μ m). Abreviaturas: m, médula; x, xilema; f, floema; p, periciclo; end, endodermis; es, espacios supraendodérmicos; ex, exodermis; cp, célula de paso de la exodermis; v, velamen.

5.3 Anatomía de raíz de la subtribu *Spiranthinae*

La raíz de la subtribu *Spiranthinae* es poliarca con haces vasculares alternos (Fig. 4 D) rodeados por células parenquimatosas. El parénquima medular está constituido por células más pequeñas que las de la corteza, con espacios intercelulares, a veces con spirantosomas. El periciclo es de un estrato de células poligonales. La endodermis es uniseriada con células poligonales más o menos de tamaño uniforme (Fig. 4 C-F), con banda de Caspary definida. La corteza tiene células grandes redondeadas a poligonales con spirantosomas abundantes y rafidios. Las raíces de *Aulosepalum pyramidale*, expuestas parcialmente a la luz, tuvieron cloroplastos en la región externa de la corteza. *Spiranthinae* presentó espacios supraendodérmicos pequeños (Fig. 4 E) o alargados radialmente como en *Sacoila lanceolata* (Fig. 4 F). La exodermis es uniseriada, constituida por células muertas con engrosamientos paralelos en las paredes radiales y alternadas con células vivas de citoplasma evidente, llamadas células de paso (Fig. 4 G-H). En todas las especies de esta subtribu el velamen consiste en un estrato de células poligonales alargadas radialmente y con engrosamientos paralelos o anastomosados con o sin poros en las paredes radiales (Fig. 5 C). Las paredes tangenciales del velamen tienen engrosamientos paralelos muy juntos. Se observaron tilosomas en todas las especies de *Spiranthinae*, asociados con las células de paso de la exodermis. Estos tilosomas tienen engrosamientos paralelos muy juntos parecidos a crestas y surcos entre ellas. Por su descripción, estos tilosomas son similares al tipo lamelado descrito por Pridgeon *et al.* (1983) (Fig. 5 D-F).

5.4 Anatomía de raíz de la subtribu Cranichidinae

La raíz de la subtribu Cranichidinae presentó características diferentes a las observadas en la subtribu Spiranthinae. La raíz es poliarca con haces vasculares alternos y ubicados alrededor de la médula. El periciclo y la endodermis son uniseriados con células rectangulares. La corteza tiene células de menor tamaño que las de Spiranthinae, con paredes delgadas y con abundantes spirantosomas, sin espacios supraendodérmicos. La exodermis tiene un estrato de células. El velamen es uniseriado con células poligonales casi cuadradas. El velamen tiene paredes radiales con poros y sin engrosamientos (Fig. 5 B). Las paredes tangenciales pueden tener poros en algunas células o a veces tiene paredes continuas en otras. El velamen de esta subtribu no tiene tilosomas.

5.5 Anatomía de raíz de la subtribu Prescottiinae

Las raíces de esta subtribu son más parecidas a las de Spiranthinae que a las de las demás subtribus. El cilindro vascular es similar al de Spiranthinae; con haces vasculares alternos rodeando el tejido medular. El periciclo y endodermis constan de un estrato de células. La corteza tiene células con paredes delgadas y con spirantosomas, tiene espacios supraendodérmicos pequeños en *Pseudocranichis thysanochila* y *Aa colombiana*. La exodermis es similar a la descrita para Spiranthinae. El velamen tiene engrosamientos de pared paralelos o anastomosados en las paredes radiales y poros en las áreas de pared delgada que quedan entre los engrosamientos. Las paredes tangenciales tienen engrosamientos paralelos muy juntos. *Pseudocranichis thysanochila*, no tiene engrosamientos de pared, solo poros, aunque se necesita hacer mayor muestreo en esta especie, pues en algunas raíces se observaron engrosamientos rudimentarios

rodeando los poros. El velamen es uniseriado en la mayoría de los casos, pero en *Prescottia stachyodes* es de tres estratos; los tilosomas solo se encontraron en *P. stachyodes* y *P. tubulosa* (Fig. 5 D-H). Los tilosomas de *P. stachyodes* son formados por estructuras cilíndricas orientadas radialmente, similares al tipo baculado descrito por Pridgeon *et al.* (1983). Los tilosomas de *P. tubulosa* son de tipo lamelado como en *Spiranthinae*.

5.6 Anatomía de raíz de la subtribu Manniellinae

Las raíces de esta subtribu tienen características intermedias entre *Cranichidinae* y *Goodyerinae*. Los vasos de xilema son alternos con el floema alrededor de la médula; el periciclo y la endodermis tienen un estrato definido. Las células de la corteza son pequeñas como en *Goodyera*, de paredes delgadas y con spirantosomas pero sin espacios supraendodérmicos. La exodermis es de un estrato y no se distinguen claramente las células de paso. El velamen de esta subtribu consta de un estrato de células generalmente de pared con poros sin engrosamientos en las paredes radiales como en *Cranichidinae*; o a veces tiene pared continua como en *Goodyerinae*. No se encontraron tilosomas en el velamen de esta subtribu.

Cuadro 2. Morfología y anatomía de raíz de las subtribus Cranichidinae, Goodyerinae, Manniellinae, Prescottiinae y Spiranthinae.

Subtribus	Spiranthinae	Prescottiinae	Cranichidinae	Manniellinae	Goodyerinae
Caracteres					
Morfología de raíz					
Diámetro (cm)	0.4-1.5	0.3-0.6	0.2-0.4	0.2-0.5	0.15-0.3
Longitud (cm)	2-9	5-14	4-9	6-10	4-6
Forma de la raíz	Fusiforme	Fusiforme /cilíndrica /zancuda	Cilíndrica	Zancuda	Cilíndrica
Anatomía					
Velamen. Número de estratos	1	1-3	1	1	1
DT (µm)	40-100	50-70	50-100	50-60	70-80
DR (µm)	40-115	40-95	40-75	50-70	30-50
Tilosomas	+	+	-	-	-
Engrosamientos	+	+	-	-	-
Exodermis. Número de estratos	1	1	1	1	1
DT (µm)	60-100	40-90	60-80	80-90	60-100
DR (µm)	30-120	45-90	50-90	70-80	40-100
Capas de corteza	12-20	10-20	8-14	8-15	7-12
DT (µm)	90-235	50-180	20-100	80-100	40-60
DR (µm)	50-120	40-100	40-180	90-100	40-70
Espacios supraendodérmicos	+	+	-	-	-
DT (µm)	20-100	20-40	-	-	-
DR (µm)	20-200	20-50	-	-	-
Endodermis. Número de estratos	1	1	1	1	1
DT (µm)	45-120	40-90	25-50	30-50	40-50
DR (µm)	30-80	30-60	25-50	30-40	15-40
Periciclo. Número de estratos	1	1	1	1	1
DT (µm)	20-75	20-40	10-25	20-30	15-50
DR (µm)	15-40	20-50	10-25	20-30	15-30
Xilema, polos	10-18	8-16	6-10	7-10	8-11
DT (µm)	20-30	10-30	10-30	15-20	15-20
DR (µm)	15-40	10-40	14-30	10-20	15-40
Floema DT (µm)	5-10	7-15	7-10	7-10	8-10
DR (µm)	5-15	7-15	8-10	7-10	8-10
Médula DT (µm)	30-170	30-60	20-35	25-30	30-60
DR (µm)	30-200	30-60	20-40	25-30	40-60

Abreviaturas: DT: diámetro tangencial de las células en corte transversal, DR: diámetro radial de las células en corte transversal, /: indica carácter polimórfico, -: Ausencia, +: Presencia.

Cuadro 3. Caracteres morfológicos y anatómicos de la raíz con variación informativa para la taxonomía de la tribu Cranichideae.

Taxón	Forma de raíz	Estratos de velamen	Tilosomas	Engrosamientos de pared del velamen	Espacios supraendodérmicos
Subtribu Cranichidinae					
<i>Cranichis cochleata</i>	C	1	-	-	-
<i>Cranichis revoluta</i>	C	1	-	-	-
<i>Ponthieva ephippium</i>	C	1	-	-	-
<i>Ponthieva formosa</i>	C	1	-	-	-
<i>Ponthieva tuerckheimii</i>	C	1	-	-	-
<i>Pterichis habenarioides</i>	C	1	-	-	-
Subtribu Goodyerinae					
<i>Goodyera brachyceras</i>	C	1	-	-	-
<i>Ludisia discolor</i>	C	1	-	-	-
Subtribu Manniellinae					
<i>Manniella gustavi</i>	Z	1	-	-	-
Subtribu Prescottiinae					
<i>Aa colombiana</i>	F	1	-	+	+ Cortos
<i>Altensteinia fimbriata</i>	CA	1	-	+	-
<i>Prescottia tubulosa</i>	F	1	+ Lamelados	+	-
<i>Prescottia stachyodes</i>	Z	3	+ Baculados	+	-
<i>Pseudocranichis thysanochila</i>	F	1	-	-	+ Cortos
Subtribu Spiranthinae					
<i>Aulosepalum pyramidale</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos
<i>Cyclopogon aff. comosus</i>	F	1	+ Lamelados	+	-
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos
<i>Dichromanthus michuacanus</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos
<i>Mesadenus lucayanus</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos
<i>Mesadenus polyanthus</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos
<i>Microthelys constricta</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos
<i>Pelexia sp.</i>	F	1	+ Lamelados	+	-
<i>Sacoila lanceolata</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Alargados
<i>Sarcoglottis shaffnerii</i>	F	1	+ Lamelados	+	-
<i>Schiedeella llaveana</i>	F	1	+ Lamelados	+	+ Cortos

Abreviaturas: C: raíz cilíndrica, F: raíz fusiforme, CA: raíz cilíndrica engrosada y alargada, Z: raíz zancuda, -: ausencia, +: presencia.

5.7 Caracteres anatómicos de la raíz con variación informativa para la sistemática de la tribu Cranichideae

Las raíces de las orquídeas de la tribu Cranichideae comparten las siguientes características anatómicas: abundantes tejidos parenquimatosos de almacenamiento, velamen, exodermis, endodermis, periciclo de un estrato y médula de parénquima. Los caracteres útiles para la sistemática fueron los atributos de la pared celular del velamen. Se encontraron cuatro caracteres uno morfológico y tres anatómicos con variación en la tribu Cranichideae.

5.7.1 Forma de la raíz. Las raíces de Goodyerinae y Cranichidinae son cilíndricas delgadas. Las raíces fusiformes se presentan en Spiranthinae y Prescottiinae, excepto por *Prescottia stachyodes* (Prescottiinae) que tiene raíces zancudas, condición que comparte con *Manniella gustavi* (Manniellinae). *Altensteinia fimbriata* (Prescottiinae) y *Sacoila lanceolata* y *Dichromanthus cinnabarinus* (Spiranthinae) tienen raíces cilíndricas, engrosadas y muy largas.

5.7.2 Engrosamientos de la pared del velamen. Todas las especies de Spiranthinae y cuatro de las cinco especies estudiadas de Prescottiinae presentan engrosamientos paralelos o anastomosados en las paredes radiales. *Pseudocranichis thysanochila* es la única especie de Prescottiinae que no tiene engrosamientos. Todas las especies de la subtribu Cranichidinae presentaron paredes radiales con poros sin engrosamientos. En el caso de la subtribu Manniellinae, se presentó pared con poros y a veces pared continúa en raíces muy jóvenes. En Goodyerinae, la ornamentación fue variable; *Goodyera* tiene pared continúa, pero en *Ludisia discolor* se encontraron paredes radiales con poros; en ambos casos no hay engrosamientos.

5.7.3 Tilosomas. La palabra tilosoma se originó del griego *tilos*: fibra y *soma*: cuerpo; este término fue usado para definir las excrecencias lignificadas de la pared interna del velamen y que están adyacentes a las células de pasaje de la exodermis; los tilosomas fueron descritos en orquídeas epifitas y se mencionaron ausentes en orquídeas terrestres (Pridgeon *et al.*, 1983). En el presente trabajo se evidencia la presencia de tilosomas en todas las especies analizadas de la subtribu Spiranthinae y en el género *Prescottia*.

Los tilosomas observados en las plantas terrestres estudiadas en este trabajo son de menor tamaño que los tilosomas reportados para orquídeas epifitas por Pridgeon *et al.* (1983). Los acercamientos MEB mostraron que estas estructuras están formadas de engrosamientos desarrollados en la pared tangencial de las células del velamen, asociados a las células de paso de la exodermis (Fig. 5 D-H). Existen algunas diferencias entre los tilosomas de la subtribu Spiranthinae y Prescottiinae; en Spiranthinae los engrosamientos son paralelos como crestas o lamelados según Pridgeon *et al.* (1983) (Fig. 5 D-F) y en Prescottiinae son lamelados en *Prescottia tubulosa* y baculados en *P. stachyodes* (Fig. 5 G-H).

5.7.4 Espacios supraendodérmicos. En corte transversal, la corteza interna de siete especies de la subtribu Spiranthinae y dos especies de la subtribu Prescottiinae (Cuadro 3), presentó hileras radiales de células isodiamétricas alineadas con las células de la endodermis, de menor tamaño que las células vecinas. Entre las hileras radiales se forman espacios intercelulares prominentes a los que se les denomina en este trabajo “espacios supraendodérmicos” por encontrarse sobre la endodermis. El origen de estos espacios no fue estudiado. Se encontró diferencia en los espacios supraendodérmicos de

Sacoila lanceolata (Spiranthinae) porque son de mayor tamaño que los espacios presentes en el resto de las especies (Fig. 4 F). Aunque principalmente estos espacios se encontraron en las especies de la subtribu Spiranthinae, también se presentaron en *Aa colombiana*, especie de Sudamérica, y en *Pseudocranichis thysanochila*, especie endémica del estado de Oaxaca, México, ambas especies de la subtribu Prescottiinae.

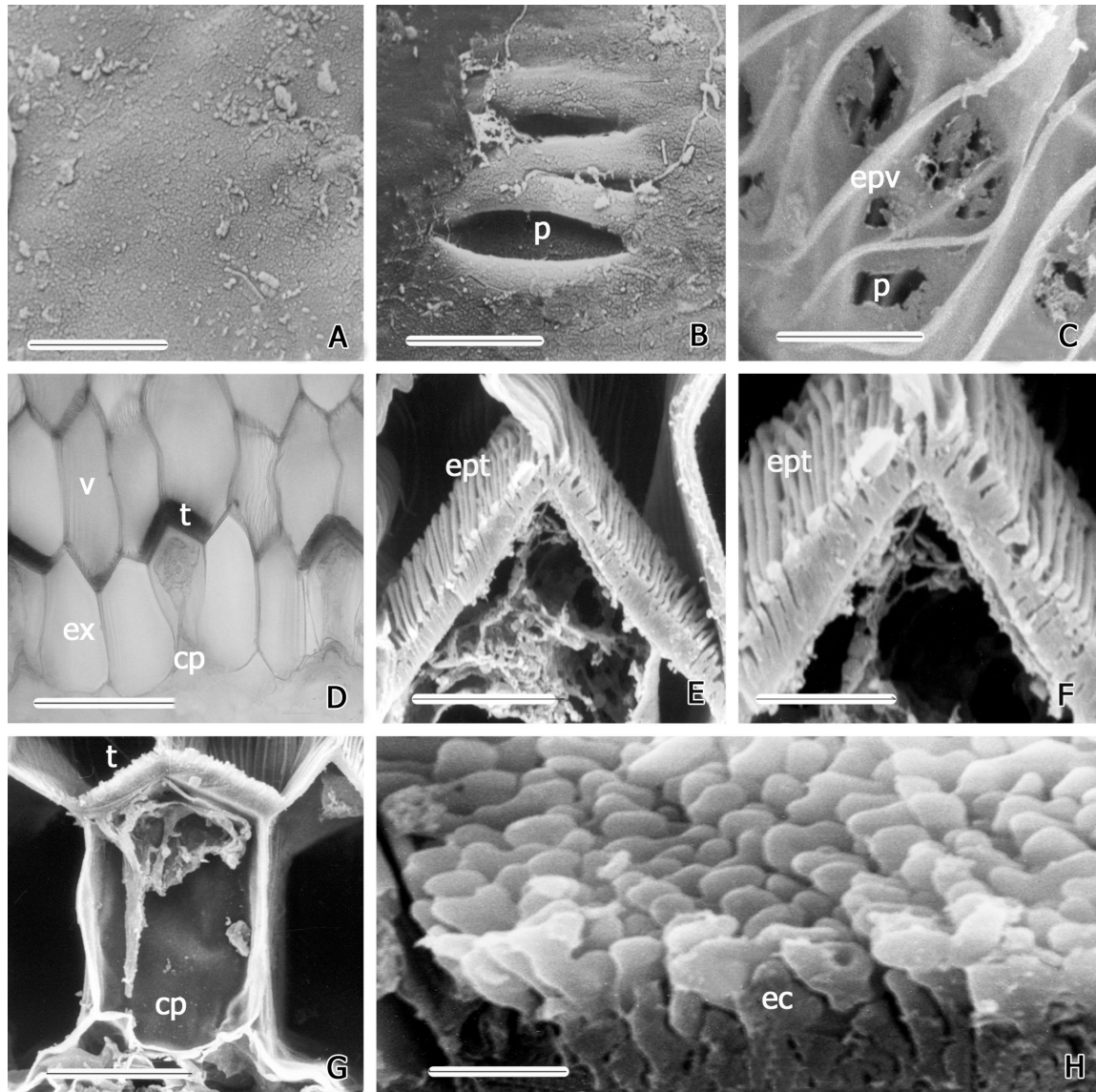


Figura 5. Características estructurales del velamen de la tribu Cranichideae. (A) velamen con pared continua en *Goodyera brachyceras* (barra= 7 μ m), (B) velamen de pared con poros sin engrosamientos de pared en *Manniella gustavi* (barra= 2 μ m), (C) velamen de pared con engrosamientos y poros en *Schiedeella llaveana* (barra= 8 μ m), (D) tilosoma de *Mesadenus polyanthus*, corte en fresco (barra= 90 μ m), (E, F) *Prescottia tubulosa* (E) tilosoma visto por arriba (barra= 20 μ m), (F) tilosoma lamelado (barra= 10 μ m), (G-H) *Prescottia stachyodes*, (G) vista del tilosoma junto con la célula de paso de la exodermis (barra= 35 μ m), (H) tilosoma baculado (barra=2 μ m). Abreviaturas: v, velamen; ex, exodermis; p, poros; epv, engrosamientos paralelos o anastomosados de las paredes radiales del velamen; cp, célula de paso de la exodermis; t, tilosoma; ec, engrosamientos cilindricos del tilosoma baculado; y ept, engrosamientos paralelos del tilosoma lamelado.

5.8 Análisis de secuencias de ADN de cloroplasto (*matK*), núcleo (ITS) y caracteres morfológicos/anatómicos.

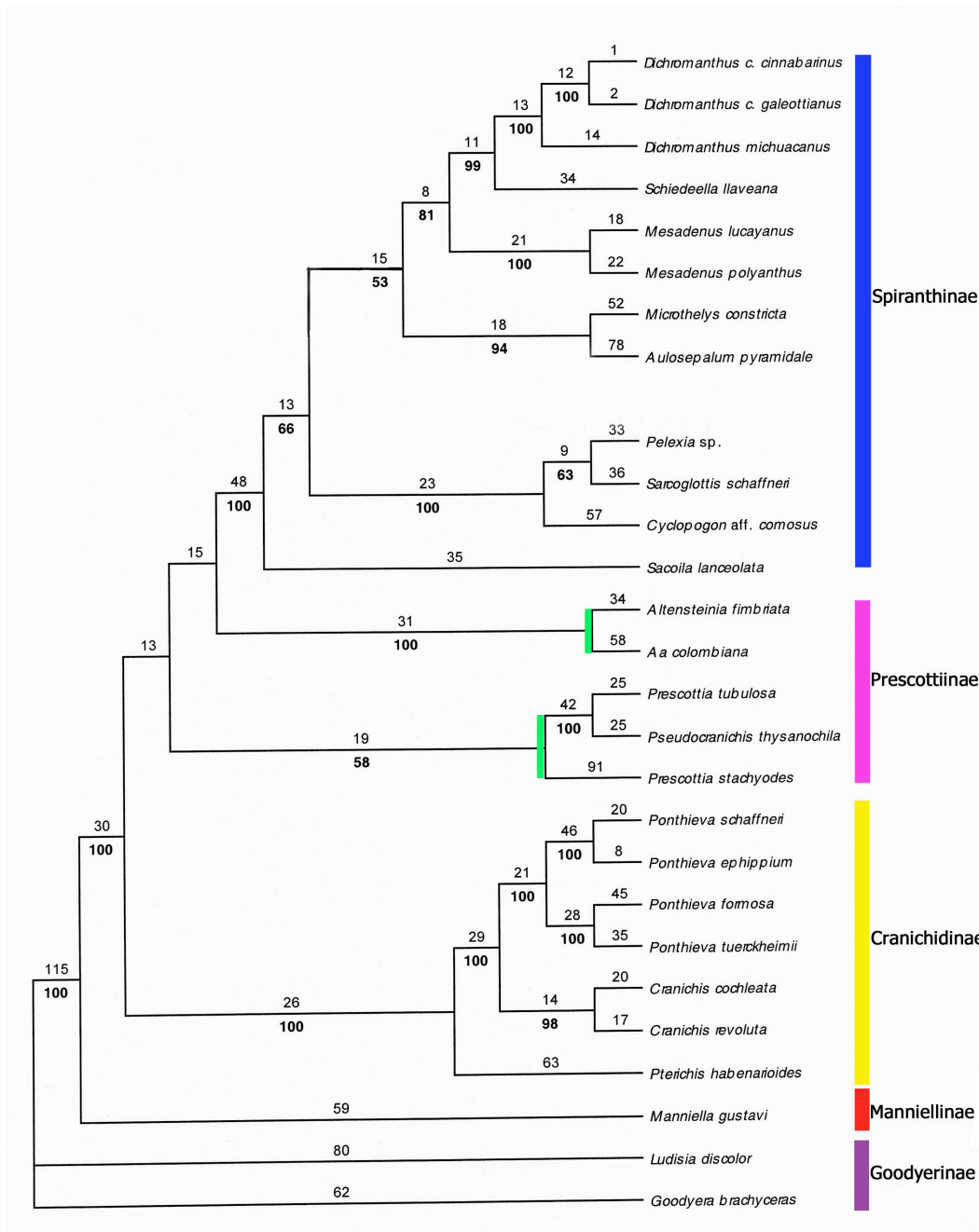


Figura 6. Árbol más parsimonioso generado en el análisis combinado de secuencias de ADN del gen *matK*, la región *ITS* y caracteres morfológicos/anatómicos de raíz de Cranichideae.

La matriz alineada de secuencias de la región de *matK* – *trnK*, la región ITS y caracteres morfológicos/anatómicos consistió de 2664 caracteres, de los cuales 543 fueron informativos para la parsimonia. Del análisis por búsqueda heurística resultó un solo árbol más parsimonioso con una longitud de 1765 pasos. El índice de consistencia (CI) fue de 0.64 y el índice de retención (RI) de 0.71 (Fig. 6).

En el cladograma (Fig. 6) sobre él que se han indicado los valores obtenidos por el análisis bootstrap, el grupo de Spiranthinae-Cranichidinae-Prescottiinae-Manniellinae, tuvo un apoyo del 100 %, estas cuatro subtribus quedan como hermanas de *Ludisia discolor* y *Goodyera brachyceras* grupo externo (subtribu Goodyerinae), aunque no está definida la relación de hermandad entre estas últimas especies. La mayoría de las subtribus estudiadas son monofiléticas. Los clados formados tienen valores de bootstrap muy altos, por ejemplo las orquídeas de la subtribu Spiranthinae y Cranichidinae tienen un valor de soporte del 100 %. Sin embargo, la subtribu Prescottiinae aparece como polifilética ya que se divide en dos clados, el de las especies andinas (*Altensteinia fimbriata* y *Aa colombiana*) con 100 % de apoyo y el clado de México (*Prescottia stachyodes*, *Pseudocranichis thysanochila* y *Prescottia tubulosa*) con 58 % de apoyo. En el cladograma combinado se indica que la subtribu Prescottiinae es más cercana a Spiranthinae, pero las ramas no tienen apoyo. Por lo tanto, la relación de Cranichidinae y Prescottiinae con respecto a la subtribu Spiranthinae no está bien definida.

6. DISCUSIÓN

6.1 Optimización de los caracteres anatómicos de la raíz de la tribu Cranichideae

Se seleccionaron cuatro caracteres por presentar variación taxonomicamente informativa entre las subtribus. Los caracteres estructurales se combinaron con los moleculares para generar el cladograma (Fig. 6). Después cada carácter estructural se optimizó en el cladograma (Fig. 7). Para poder analizarlos, dichos caracteres se codificaron tratando de mostrar la variación que existía entre ellos. Como resultado quedaron de la siguiente manera:

1. Forma de la raíz:

- Cilíndricas delgadas (0)
- Fusiformes (1)
- Cilíndricas engrosadas (2)
- Zancudas (3)

2. Engrosamientos paralelos o anastomosados de la pared del velamen:

- Ausencia (0)
- Presencia (1)

3. Tilosomas:

- Ausentes (0)
- Lamelados (1)
- Baculados (2)

4. Espacios supraendodérmicos:

- Ausentes (0)
- Cortos (1)
- Alargados (2)

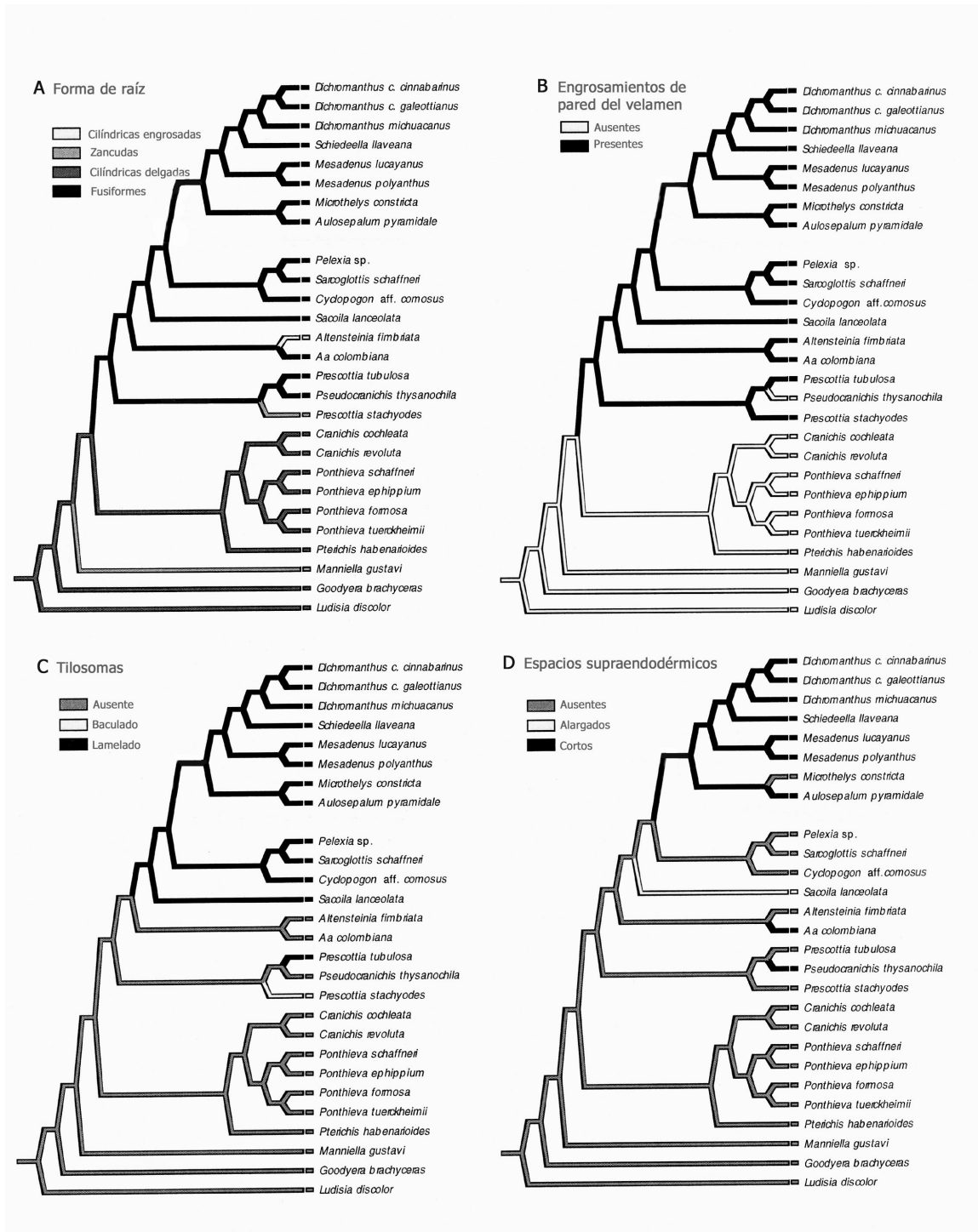


Figura 7. Optimización de los caracteres: forma de la raíz, presencia o ausencia de engrosamientos de pared, tilosomas y espacios supraendodérmicos; en el árbol obtenido a partir de las secuencias de *matK* – *trnK* e ITS y caracteres morfológicos/anatómicos, bajo el criterio ACCTAN.

El carácter raíz cilíndrica de Goodyerinae y Cranichidinae se indica como el estado ancestral. El carácter raíz fusiforme resultó sinapomorfía en Spiranthinae, pero evolucionó independientemente en Prescotttiinae. Las raíces zancudas evolucionaron paralelamente en Manniellinae y *Prescottia stachyodes*. *Altensteinia fimbriata* tiene raíces cilíndricas, engrosadas y alargadas, una autapomorfía de esta especie (Fig. 7 A).

Los engrosamientos de pared del velamen fue un carácter con variación informativa para la sistemática del grupo. El estado ancestral del carácter fue la ausencia de engrosamientos de pared, condición que se presentó en las subtribus Goodyerinae, Manniellinae y Cranichidinae. Posteriormente los engrosamientos estuvieron presentes y representaron una sinapomorfía para Prescotttiinae y Spiranthinae. En Prescotttiinae, *Pseudocranichis thysanochila* no tiene engrosamientos, característica distintiva de esta especie (Fig. 7 B).

La ausencia de tilosomas fue optimizada como plesiomorfía del grupo. Los tilosomas lamelados son una sinapomorfía en la subtribu Spiranthinae y evolucionaron paralelamente en *Prescottia tubulosa* (Prescotttiinae). Los tilosomas baculados son autapomorfía de *Prescottia stachyodes* (Fig. 7 C). Si los tilosomas se hubieran codificado en dos estados como presencia o ausencia, independientemente de su estructura, entonces los tilosomas serían sinapomorfía de Spiranthinae-Prescotttiinae con pérdidas independientes en *Pseudocranichis* y el clado de *Aa*. Sin embargo, debido a a) la marcada diferencia entre los tilosomas lamelados y baculados y b) la falta de información acerca de su ontogenia, se prefirió codificarlos como dos condiciones distintas.

En la optimización se resuelve que el estado ancestral en la tribu es la ausencia

de espacios supraendodérmicos. Los espacios se presentaron en la mayoría de las especies de Spiranthinae (condición derivada) excepto en el clado de *Cyclopogon*, *Sarcoglottis* y *Pelexia*. Los espacios alargados radialmente son autapomorfia de *Sacoila lanceolata*. Los espacios supraendodérmicos son muy homoplásicos, ya que se presentan en momentos independientes en Spiranthinae y Prescottiinae (tanto en el clado Andino como de *Prescottia*). Por lo tanto, estos espacios parecen tener mayor significancia ecológica (Fig. 7 D).

6.4 Evolución de los caracteres anatómicos de la raíz de la tribu Cranichideae

Las especies de la tribu Cranichideae se consideraron como primitivas (Dressler, 1990), por el crecimiento de su tallo, las hojas suaves arregladas en roseta y sus raíces fasciculadas. La presencia de un velamen en las raíces engrosadas de Spiranthinae podría ser una precondition para su adaptación en sitios bien drenados y a algunos nichos semi-epifíticos (Dressler, 1981), como ocurre en *Cyclopogon* (Fig. 8). Goebel (1922), argumentó que el velamen ya existía en los ancestros terrestres y no fue adquirido por el hábito epifito. Chou (1971) estableció que las raíces con pocos estratos de velamen conservan la naturaleza primitiva de la epidermis, porque las células del velamen tienden a desarrollar pelos radicales y conservan la función de absorción. Las raíces de Cranichideae tienen pelos radicales pero también un velamen de un estrato de células muertas. En estados avanzados el velamen aumenta su número de capas y también cambia su función.

Las características uniformes de las raíces de Cranichideae observadas en este trabajo, tanto en características del velamen, tejidos de reserva y composición química,

podrían deberse a que son plantas terrestres. Pridgeon (2001) señaló que las orquídeas terrestres tienen menor variación anatómica que las epífitas, porque sus órganos no están expuestos al aire y son menos afectados por la insolación, temperatura, humedad relativa y precipitación, factores que ejercen presión de selección.

En trabajos previos (Porembski y Barthlott, 1988; Stern *et al.*, 1993; Dressler, 1993; Vargas, 1997) se analizaron los caracteres estructurales de la raíz y se consideró al velamen como un carácter con valor taxonómico. Sin embargo la variación del velamen fue estudiada en muestreos incipientes y no filogenéticamente. El velamen se clasificó en tipos con base en un conjunto de caracteres que no fueron evaluados por separado (Porembski y Barthlott, 1988).

En el presente trabajo se realizó un muestreo extenso (26 especies de 19 géneros) en el que se incluyeron géneros de cinco subtribus de la tribu Cranichideae. Con base en este muestreo robusto, resultó que los engrosamientos secundarios de la pared del velamen fueron más útiles para la sistemática de Cranichideae. Los otros cuatro caracteres propuestos por Porembski y Barthlott (1988), número y tamaño de los poros, engrosamientos de la exodermis, y número de estratos de velamen, no fueron informativos para la sistemática de Cranichideae. Nuestras observaciones coinciden con las de Sandford y Adanlawo (1973); ellos encontraron que los engrosamientos de pared son consistentes entre especies, en presencia y diseño.

La optimización de los caracteres sobre el árbol molecular, propone que la ornamentación de pared del velamen cambió de pared continua o con poros (condición más ancestral, presente en el grupo externo, Manniellinae y Cranichidinae) a pared con engrosamientos paralelos o anastomosados y poros; por lo que coincide con las hipótesis

de ancestría de Porembski y Barthlott (1988), que propusieron al tipo *Calanthe* (pared con poros) como el más primitivo por su estructura simple, aunque *Goodyera* (pared continua) es también ancestral. Porembski y Barthlott (1988), consideraron al tipo *Spiranthes* (pared con engrosamientos) como derivado dentro de la tribu Cranichideae por su complejidad estructural.

En el ejercicio cladístico combinado de caracteres morfológicos y anatómicos, se apoya que las Prescottiinae son más cercanas a Spiranthinae por los engrosamientos de la pared del velamen, hipótesis que coincide con la de Dressler (1990). Además este autor observó las diferencias del velamen de estas dos subtribus con respecto a Cranichidinae, pero no realizó un análisis filogenético explícito. Cranichidinae podría distinguirse por tener velamen de pared con poros porque todas sus raíces comparten esta característica, sin embargo, este carácter también se presenta en Goodyerinae y Manniellinae.

En el presente trabajo se encontraron dos caracteres por primera vez, los tilosomas y los espacios supraendodérmicos; ambos caracteres son útiles ya que se presentaron generalmente en la subtribu Spiranthinae y en Prescottiinae. Los tilosomas podrían usarse como una sinapomorfía principalmente en Spiranthinae y tal vez estos caracteres podrían apoyar la hermandad con Prescottiinae, aunque es necesario realizar un muestreo mayor de especies de esta última subtribu. La utilidad taxonómica de los tilosomas es apoyada por Dressler (1981) y Pridgeon *et al.* (1983), quienes argumentaron acerca del valor sistemático de estas estructuras incluso a niveles genéricos. En el estudio de Stern *et al.* (1993a), se afirma la ausencia de tilosomas en *Prescottia stachyodes* y algunas especies de los géneros *Cyclopogon* y *Sarcoglottis*.

Pridgeon *et al.* (1983) y Pridgeon (1987) reportan la ausencia de tilosomas en *Sarcoglottis acaulis* y *Spiranthes odorata*; ninguna de estas especies fue evaluada en nuestro trabajo, pero dada la alta frecuencia de los tilosomas en la subtribu Spiranthinae sería interesante verificar este carácter en dichos taxones. Stern *et al.* (1993a) describe engrosamientos en *Cryptostylis subulata* similares a los encontrados en la presente tesis, los cuales se usaron como carácter taxonómico para separar este género de la tribu Cranichideae. No se habían detectado estas estructuras, posiblemente porque Pridgeon *et al.* (1983) solo analizó nueve especies de nueve géneros de Cranichideae. Además probablemente solo se analizaron pocas muestras de las diferentes especies que estudiaron.

Los engrosamientos de la exodermis y el número de estratos del velamen son constantes en la tribu Cranichideae por lo que no brindan información útil acerca de la historia evolutiva del grupo. Pridgeon (1982) consideró que los engrosamientos de la exodermis y los estratos de velamen probablemente no tienen valor sistemático a nivel genérico. Porembski y Barthlott (1988) consideraron la presencia y tamaño de los poros de la pared como un carácter taxonómico; sin embargo en el presente trabajo se encontró que los poros son variables en la tribu Cranichideae: pueden no estar, o estar presentes con diferentes tamaños y formas. Noel (1974) señaló que los poros se originan como pequeñas rasgaduras elípticas y forman campos porosos en la pared del velamen; además las perforaciones grandes son rodeadas por engrosamientos secundarios, los cuales probablemente limitan el tamaño de las perforaciones. Con base en lo planteado, los poros son muy variables.

En el presente trabajo se observaron engrosamientos rodeando los poros en raíces de *Pseudocranichis thysanochila*. Según observaciones realizadas durante este trabajo, la presencia de poros también puede estar asociada con la etapa de desarrollo de la raíz. Por ejemplo las raíces jóvenes de *Manniella gustavi* y *Pseudocranichis thysanochila* primero no presentaron poros, aunque se encontraron posteriormente en raíces maduras. Aparentemente los poros no son útiles para la taxonomía del grupo.

6.3 Importancia funcional y ecológica de los caracteres anatómicos de la raíz de Cranichideae

Las especies recolectadas de la tribu Cranichideae para este trabajo, fueron encontradas en una amplia variación ambiental y ecológica. Se incluyeron algunas especies de amplia distribución como *Dichromanthus cinnabarinus* y *Sacoila lanceolata*, así como una endémica de México *Pseudocranichis thysanochila* (Salazar *et al.* 2003). También se incluyeron especies extranjeras como *Ludisia discolor* de Asia, *Manniella gustavi* de África y *Aa colombiana*, *Altensteinia fimbriata* y *Pterichis habenarioides* de Sudamérica (Pridgeon *et al.* 2003). Estas especies pueden crecer desde bosque tropical caducifolio hasta el páramo en Sudamérica. Esta amplia adaptación a diversos hábitats podría deberse a algunas características de sus raíces, las cuales tienen las funciones de absorción, fijación, reserva de almidón y reserva de agua. Además estas raíces son un importante órgano de perenación que permite a muchas de estas orquídeas terrestres su adaptación a hábitats con sequías temporales (Hágsater *et al.*, 2005), aunado a estas características, la simbiosis con hongos les permite una mejor absorción de nutrientes (Arditti, 1992). La presencia de un velamen con engrosamientos de pared y

tilosomas posiblemente protege de la desecación y daños mecánicos a los tejidos blandos de la raíz (Haberlandt, 1914).

La composición química del velamen se estudió en trabajos previos (Leitgeb, 1865; Kraft, 1949; Guttenberg, 1968; Noel 1974; Benzing *et al.* 1983; Meinecke, 1984). En general los compuestos del velamen mencionados fueron la celulosa, suberina y lignina.

En el presente trabajo se encontró que el velamen de *Cranichideae* está compuesto por polisacáridos insolubles (posiblemente celulosa y hemicelulosa) y lípidos (quizá suberina), sin lignina. Tales resultados son apoyados por Noel (1974) y Benzing *et al.* (1983) que observaron que todas las paredes del velamen son celulósicas y se impregnan con cantidades variables de lignina y suberina. Kraft (1949) encontró que las paredes del velamen pueden o no tener lignina, y observó que el velamen de *Oncidium crispum* es solo suberizado. Meinecke (1824) encontró que en las células largas de la exodermis también varían la proporción de suberina y lignina, o a veces las paredes pueden ser no engrosadas.

Existe una controversia con respecto a las funciones del velamen, pero en general las funciones atribuidas al sistema velamen – exodermis son: a) las células largas suberizadas y a veces lignificadas de la exodermis, podrían proteger el parénquima cortical de la desecación (Haberlandt, 1914 y Benzing *et al.* 1983); b) las células de paso con paredes delgadas, conducen sustancias nutritivas del velamen hacia los tejidos corticales (Leitgeb, 1865 y Haberlandt, 1914); c) el velamen protege los tejidos vivos de daños mecánicos (Sanford y Adanlawo, 1973); d) el velamen disminuye la desecación en raíces aéreas (Benzing *et al.* 1983); e) el velamen condensa agua y los

tilosomas absorben agua y solutos por imbibición y capilaridad (Link, 1824 y Noel, 1974).

Los tilosomas encontrados en Cranichideae son engrosamientos de la pared interna del velamen, compuestos de polisacáridos insolubles (celulosa y hemicelulosa) y aparentemente suberina pero sin lignina. En otras especies se propuso que dichas estructuras podrían tener la función de pasaje de agua y solutos por su conexión con células de pasaje de la exodermis (Pridgeon *et al.*, 1983). Leitgeb (1865) argumentó que los tilosomas por su porosidad y asociación con las células de paso, podrían funcionar como cuerpos de absorción y condensación de vapor de agua de la atmósfera. Además estos engrosamientos podrían almacenar agua temporalmente, para luego transferirla de forma gradual a través de las células de paso de la exodermis hacia la corteza. Además Leitgeb (1865) argumentó que estos engrosamientos también podrían prevenir la pérdida de agua de esas mismas células. Los tilosomas de Cranichideae por su contenido de suberina parecen estar asociados a la protección de las células de pasaje contra la desecación dado que dicho compuesto confiere impermeabilidad y funciona como aislante térmico (Sandoval, 2005). Benzing *et al.* (1982) estudiaron los tilosomas de *Sobralia* y argumentaron que los tilosomas podrían actuar como una barrera para la transpiración y podrían bloquear la entrada de patógenos, pero cuando hay humedad, el agua puede penetrar los cuerpos fibrosos y pasar hacia los tejidos corticales.

Los tilosomas se encontraron en todas las especies de orquídeas de Spiranthinae, de las cuales la mayoría de ellas crecen en espacios abiertos, en pastizales o sobre rocas con muy poco sustrato, en general en hábitats de climas con sequía durante una temporada definida del año, por lo que las plantas han desarrollado mecanismos para

afrentar la sequía severa, como la pérdida de hojas durante la floración que se da en el periodo seco (Hágsater *et al.*, 2005). Las raíces de estas plantas están sujetas a presión de selección por insolación y sequía (Fig. 8), los engrosamientos de pared del velamen y los tilosomas podrían ser resultado de este fenómeno. El género *Dichromanthus* crece en pastizales inducidos por el hombre en diferentes tipos de vegetación, tales como bosques de encino, bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, entre otros; pero es de los géneros más favorecidos por el disturbio; un caso similar es *Sacoila lanceolata*, solo que esta especie crece en trópico seco incluso suele encontrarse a orillas de caminos (Pridgeon *et al.*, 2003). *Schiedeella llaveana*, *Mesadenus polyanthus*, *Sarcoglottis schaffneri* y *Aulosepalum pyramidale* son especies que pueden encontrarse en hondonadas en matorrales xerófilos, aunque *Mesadenus lucayanus* y *Aulosepalum pyramidale* también son frecuentes en selva baja caducifolia (Hágsater *et al.*, 2005). *Microthelys* y *Pelexia*, crecen en bosques templados de pino encino, templados a fríos. *Cyclopogon* crece en bosque tropical caducifolio, expuesto a la variación ambiental en este ecosistema caracterizado por un largo periodo de sequía (Pridgeon *et al.*, 2003); este género también suele encontrarse en bosque tropical perennifolio como semi-epífito o litófito con sus raíces expuestas al aire (Fig. 8). Los engrosamientos de la pared del velamen también se localizaron en casi todas las especies de la subtribu Prescottiinae. Además de los engrosamientos de las paredes anticlinales, se encontraron tilosomas en *Prescottia tubulosa* y *Prescottia stachyodes*. La primera especie crece en bosques de pino-encino y la segunda crece en bosque tropical perennifolio que es un ecosistema más húmedo, pero desarrolla raíces zancudas es decir que crecen sobre la hojarasca expuestas al aire y que podrían utilizar estas estructuras para condensar agua de la

atmósfera.

La ornamentación de la pared del velamen es debida principalmente a la acumulación de polisacáridos insolubles. Noel (1974) argumentó que los engrosamientos de pared aumentan la superficie de condensación de vapor de agua. Link (1851) y Pridgeon (1982) mencionaron que los engrosamientos de pared pueden mejorar el soporte mecánico y prevenir el colapso celular durante el período de desecación; esto podría explicar la presencia de engrosamientos paralelos en *Spiranthinae* y *Prescottiinae*. Las subtribus *Cranichidinae*, *Manniellinae* y *Goodyerinae*, tuvieron velamen con pared continua o pared con poros, tales poros podrían promover el intercambio de gases en la raíz (Link, 1851); en estas subtribus no se encontraron estructuras especializadas tales como engrosamientos de pared, tilosomas o espacios supraendodérmicos. Esto podría ser relacionado a que estas especies crecen en condiciones ambientales favorables; *Cranichis cochleata* y *Cranichis revoluta* crecen en bosque perennifolio relativamente calido y bosque nublado de baja altitud, dichos tipos de vegetación se caracterizan por ser muy húmedos y sin heladas. *Ponthieva schaffneri*, *P. formosa* y *P. tuerckheimii* fueron colectadas en bosque nublado perennifolio, ambiente con poca variación climática. Estas plantas crecen cercanas al piso del bosque con humedad y poca luz, donde el dosel atenúa los cambios de temperatura y humedad que se dan entre el día y la noche, creando un microambiente favorable la mayor parte del año (Hágsater *et al.*, 2005). Sandford y Adanlawo (1973) señalaron que los engrosamientos de pared de velamen y la exodermis son más marcados en climas estacionalmente secos, entonces tales caracteres pueden ser debidos a la presión ambiental, por lo que si las plantas crecen en ambientes favorables podrían no

presentarse estas estructuras. En *Manniella gustavi* se da un caso similar, ya que esta especie crece en bosques tropicales de África, que son mucho más húmedos que los de México (Pridgeon *et al.*, 2003). Así mismo las plantas de Goodyerinae crecen en lugares favorables, *Ludisia discolor* crece en bosques tropicales húmedos de Asia, en rocas y humus cerca de cauces de agua, aunque en este caso se mantuvo en cultivo (Fig. 8) y *Goodyera brachyceras* crece en bosques fríos de pino encino húmedos, con neblina y sin sequía marcada (Salazar, 2006).

El número de estratos de velamen no se modificó con respecto a las condiciones ambientales. Las orquídeas de la tribu Cranichideae tienen un estrato de velamen y habitan en ambientes diferentes. *Prescottia stachyodes* fue la excepción con sus tres estratos. Esta especie se localiza en bosques muy húmedos de pino encino pero tiene raíces tipo zancudas. Estas raíces hacen que la planta salga por encima de la hojarasca, evitando así que las yemas de renuevo se pudran por exceso de humedad. Las raíces zancudas también quedan expuestas al aire. La presencia de tres estratos de velamen en las raíces de *Prescottia stachyodes* podría asociarse a: a) la necesidad de captar agua y nutrientes del aire y b) a la protección de los tejidos vivos de la raíz. *Manniella* también tiene raíces zancudas pero a diferencia de *Prescottia* solo tiene un estrato de velamen; sin embargo tiene abundantes pelos radicales que podrían funcionar de forma similar al velamen de tres estratos. De acuerdo a este planteamiento, Dycus y Knudson (1957), mencionaron que el número de estratos de velamen no está influido por el ambiente, solo se modifica el tamaño celular debido a la humedad relativa. Por el contrario, Parrilla y Ackerman (1990) argumentaron que el número de estratos de velamen está determinado por la humedad del suelo o del aire y mencionan que las plantas que crecen

en zonas muy húmedas tienen de uno a tres estratos y las de ambientes secos más de tres; aunque ellos analizaron especies de diferentes subfamilias de Orchidaceae, por lo que tienen una limitante filogenética importante. Esta hipótesis no coincide con nuestras observaciones.

Los espacios supraendodérmicos, podrían desempeñar una función parecida al aerénquima común de especies que crecen en zonas muy húmedas o secas, considerado como un tejido de transporte de gases y como lugar de reserva de oxígeno requerido para la respiración de los tejidos que no tienen contacto con el aire (Esau, 1987). Incluso podría tener una función parecida a los neumatodos, que son poros o zonas llenas de aire en el límite de la corteza, que intervienen en el intercambio de gases y aireación de los tejidos (Benzing *et al.* 1983). Por ejemplo *Sacoila lanceolata* tiene espacios supraendodérmicos grandes; crece en suelos arcillosos que se inundan con frecuencia (Gerardo Salazar, comunicación personal). Las spiranthinae del matorral xerófilo que viven sin agua la mayor parte del año, también tuvieron espacios supraendodérmicos, aunque de menor tamaño que *Sacoila*. La presencia de estos espacios podría relacionarse con la reserva de oxígeno o los espacios supraendodérmicos podrían funcionar como canales secretores de mucílago, sustancia que se observó al cortar raíces frescas de *Aulosepalum pyramidale*, *Mesadenus polyanthus*, *Sarcoglottis schaffneri*. Hágsater *et al.* (2005) reportaron mucílago en las Spiranthinae, pero no se especificó su ubicación anatómica. Aunque en este trabajo no se estudió la ontogenia de los espacios supraendodérmicos, puede ser que estos se hayan derivado de la división de células jóvenes de la endodermis, tal como sucede en algunas Asteraceae, donde células

endodérmicas jóvenes se dividen tangencialmente y se desarrollan canales secretores esquizógenos entre las filas de células formadas (Guttenberg, 1968). El mucílago consiste de polisacáridos que pueden absorber agua y se presentan en plantas adaptadas a zonas áridas (Esau, 1987); tal es el caso de la mayoría de las especies estudiadas en el presente trabajo. Los espacios supraendodérmicos también se presentaron en dos especies de la subtribu Prescottinae; *Pseudocranichis thysanochila* (Prescottinae), que crecen en suelos calcáreos, en condiciones extremas (Salazar *et al.*, 2003). Esta especie fue una de las que presentó mayor grosor de raíz dentro de la subtribu (0.6 cm), por lo que los espacios supraendodérmicos podrían estar asociados al crecimiento rápido en diámetro o a la oxigenación de los tejidos. Debido a que en este trabajo no se estudio a profundidad estos espacios, se requieren estudios posteriores de desarrollo y función de estos los espacios supraendodérmicos.

Otro carácter con variación asociada a las condiciones ambientales y etapa fenológica de las plantas son los spirantosomas (Stern, 1999b). Las Spiranthinae del matorral xerófilo desarrollan sus hojas en condiciones de humedad (mayo a octubre). En época de sequía la planta florece y presentó almidón en las raíces. Suponemos que la traslocación de fotoasimilados de las hojas hacia las raíces, sucede en la etapa vegetativa, de manera que en la floración los fotoasimilados de reserva (almidón) son utilizados para la fase reproductiva de la planta. Probablemente la presencia de micorrizas disminuya la presencia de almidón.

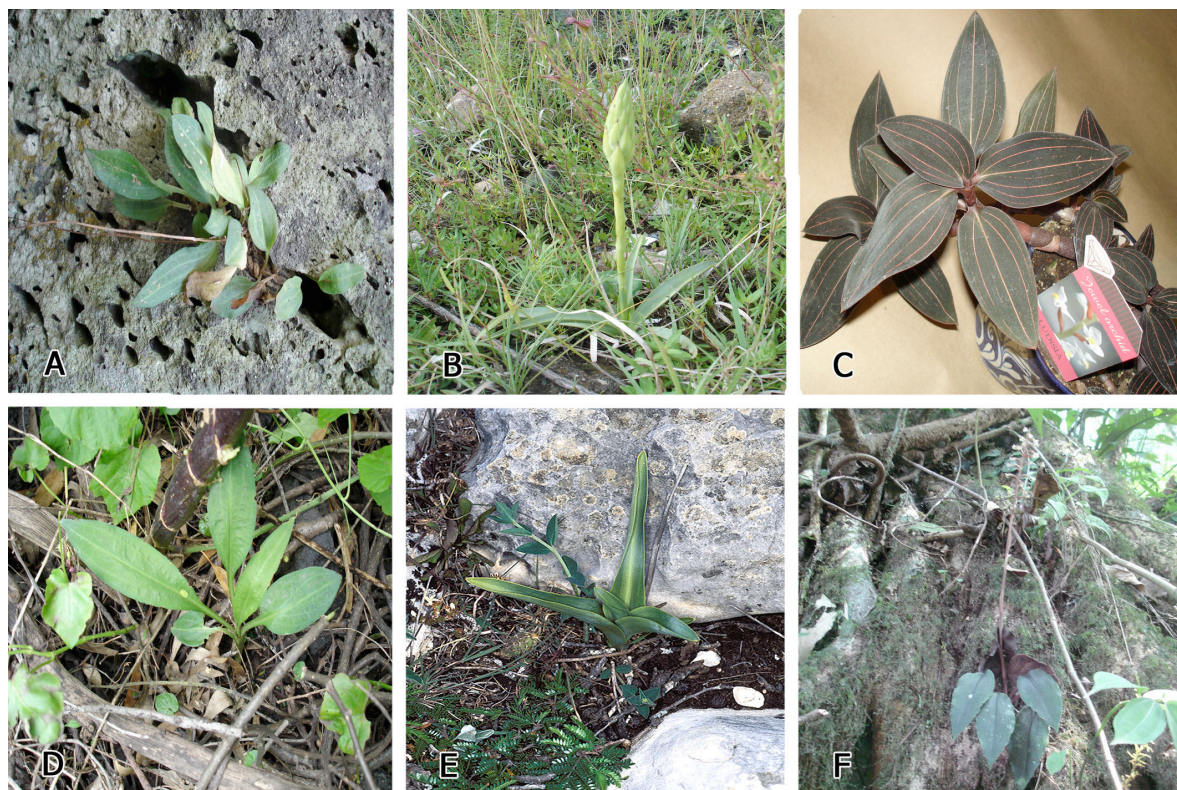


Figura 8. Hábitat de algunas especies pertenecientes a la tribu Cranichideae. (A) *Mesadenus polyanthus* creciendo en una roca, en matorral xerófilo, (B) *Dichromanthus cinnabarinus* creciendo en un pastizal inducido en matorral xerófilo, (C) *Ludisia discolor* mantenida en cultivo, (D) *Aulosepalum pyramidale* creciendo en una hondonada en un encinar bajo con palmas, (E) *Dichromanthus michuacanus* creciendo en pastizales inducidos en bosque de encino (foto: Gerardo A. Salazar) y (F) *Cyclopogon comosus* creciendo en las raíces de un árbol del bosque tropical perennifolio.

7. CONCLUSIONES

Desde el punto de vista taxonómico, los engrosamientos de la pared del velamen permiten delimitar el grupo Spiranthinae - Prescottiinae. La subtribu Cranichidinae se distingue por el velamen con poros y sin engrosamientos, aunque este carácter evolucionó independientemente en *Pseudocranichis thysanochila*, Manniellinae y Goodyerinae.

Se describe por primera vez para la tribu Cranichideae la presencia de tilosomas; engrosamientos pequeños y no lignificados en la pared tangencial de las células del velamen asociadas a las células de paso de la exodermis. Los tilosomas agrupan las Spiranthinae y evolucionaron paralelamente en *Prescottia stachyodes* y *Prescottia tubulosa*.

Los espacios supraendodérmicos son descritos por primera vez en la tribu Cranichideae y principalmente se presentan en la subtribu Spiranthinae y evolucionaron independientemente en *Aa colombiana* y *Pseudocranichis thysanochila*. Estos parecen tener importancia ecológica y funcional.

Nuestros resultados coinciden con las características del velamen descritas por Porembski y Barthlott (1988) para la tribu Cranichideae. Sin embargo, los tipos de velamen que propusieron estos autores, por ser combinaciones de caracteres, no permiten reconstruir la evolución de cada carácter.

La interpretación de los cambios morfológicos, en el árbol filogenético robusto basado en secuencias de ADN de cloroplasto y núcleo, permite poner a prueba de manera explícita hipótesis sobre la evolución de los caracteres morfológicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aceto S, P Caputo, S Cozzolino, L Gaudio y A Moretti. 1999. Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 67-76.
- Arditti J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley & sons, Inc. USA. 691 p.
- Bateman RM, AM Pridgeon y MW Chase. 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidaceae, Orchidoideae) based on nuclear ITS sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis sensu stricto*. *Lindleyana* 12: 113-141.
- Bellstedt DU, HP Linder y E Harley. 2001. Phylogenetic relationships in *Disa* based on non-coding *trnL-trnF* chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions. *American Journal of Botany* 88: 2088-2100.
- Benzing DH, DW Ott y WE Friedman. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany* 69: 608-614.
- Benzing DH, WE Friedman, G Peterson y A Renfrow. 1983. Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of Orchidaceae in the epiphytic biotope. *American Journal of Botany* 70: 121-133.
- Benzing DH y DW Ott. 1981. Vegetative reduction in epiphytic Bromeliaceae and Orchidaceae: Its origin and significance. *Biotropica* 13: 131-140.
- Cameron KM, MW Chase, WM Whitten, PJ Kores, DC Jarrell, VA Albert, T Yukawa, HG Hills y DS Goldman. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208-224.
- Chase MW, H Kurzweil, P Linder y P Cribb. 2001. Phylogenetics of Orchidoideae. In: AM Pridgeon, PJ Cribb, MW Chase y FN Rasmussen [eds.]. *Genera Orchidacearum*, vol.2. Oxford University Press. Oxford, UK. pp. 1-5.
- Chase MW, KM Cameron, RL Barrett y JV Freudenstein. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification. In: KW Dixo, SP Kell, RL Barrett y PJ Criba (eds.), *Orchid Conservation*. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah. pp. 69-89.
- Douzery E, AM Pridgeon, PJ Kores, H Kurzweil, P Linder y MW Chase. 1999. Molecular phylogenetics of *Disa* (Orchidaceae): a contribution from nuclear

- ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* 86: 887-899.
- Doyle JJ y JL Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dressler RL. 1981. The orchids: Natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge. UK. 332 p.
- Dressler RL. 1990. The Spiranthoideae: grade or subfamily? *Lindleyana* 5: 110-116.
- Dressler RL. 1993. "Phylogeny and classification of the orchid family". Ed. Dioscorides Press, Pórtland. USA. 314 p.
- Dycus AM y L Knudson. 1957. The role of the velamen of the aerial roots of orchids. *Botanical Gazette* 119: 78-87.
- Engard JC. 1944. Morphological identity of the velamen and exodermis in orchids. *Botanical Gazette* 105: 457-462.
- Esau K. 1987. Anatomía de las plantas con semilla. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 513 p.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Freudenstein JV y FN Rasmussen. 1999. What does morphology tell about orchid relationships? A cladistic analysis. *American Journal of Botany* 86: 225-248.
- Givnish TJ. 1997. Adaptive radiation and molecular systematics: issues and approaches. In: TJ Givnish y KJ Systma (eds.). Molecular evolution and adaptive radiation. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp. 1-34.
- Goldman DH, JV Freudenstein, PJ Kores, M Molvray, DC Jarrell, WM Whitten, KM Cameron, RJ Jansen y MW Chase. 2001. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences. *Systematic Botany* 26: 670-695.
- Gravendeel B, MW Chase, EF de Vogel, MC Ross, THM Mes y K Bachmann. 2001. Molecular phylogeny of *Coelogyne* (Epidendroideae; Orchidaceae) based on plastid RFLPs, *matK*, and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. *American Journal of Botany* 88: 1915-1927.
- Guttenberg HV. 1968. Der primäre Bau der Angiopermenwurzel. In: K. Linsbauer (ed.) Handbuch der Pflanzenanatomie, 2. Aufl. Vol. 8. Part 5, Gebrüder Borntraeger, Berlin. pp.

- Haberlandt G. 1914. Physiological plant anatomy. First pub. 1884. Trans. From 4th German ed. by M. Drummond. Macmillan. London, UK. 777 p.
- Hágsater E, MA Soto Arenas, GA Salazar Chávez, R Jiménez Machorro, M López Rosas, y RL Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín. México, DF. 304 p.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill. New York. USA. 523 p.
- Kores PJ, KM Cameron, M Molvray y M Chase. 1997. The phylogenetic relationships of Orchidoideae and Spiranthoideae (Orchidaceae) as inferred from *rbcL* plastid sequences. *Lindleyana* 12: 1-11.
- Kores PJ, PH Weston, M Molvray y MW Chase. 2000. Phylogenetics relationships within the Diurideae (Orchidaceae): inferences from plastid *matK* DNA sequences. In KL Wilson and DA Morrison (eds.). Monocots: systematics and evolution. CSIRO, Collingwood, Australia. pp. 449-456.
- Kores PJ, M Molvray, PH Weston, SD Hopper, AP Brown, KM Cameron y MW Chase. 2001. A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany* 88: 1903-1914.
- Kraft MM. 1949. Etude histologique de quelques raciness aériennes d'Orchidées. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 64: 201-211.
- Leitgeb H. 1865. Die Luftwurzeln der Orchideen. Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. *Mathematischnaturwissenschaftlichen Klasse.* 24: 179-222.
- Link HF. 1824. Elementa philosophiae botanicae, ed. 1. Haude & Spener. Berlin. pp.
- Maddison RD y WP Maddison. 2001. Mac Clade 4, version 4.02. Sinaver Associates, Inc. Publishers. University of Arizona. Massachusetts. USA. 109 p.
- Meinecke EP. 1894. Beiträge zur anatomie der luftwurzeln der Orchideen. *Flora* 78: 133-203.
- Noel ARA. 1974. Aspects of cell wall structure and the development of the velamen in *Ansellia gigantea* Reichb. f. *Annals of Botany* 38: 495-504.
- Parrilla DA y JD Ackerman. 1990. Epiphyte roots: anatomical correlates to environmental parameters in Puerto Rican Orchids. *Orquídea* 12: 105-116.
- Porembski S y W Barthlott. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* 8:117-137.

- Pridgeon AM. 1982. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 921-938.
- Pridgeon AM. 1987. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J. ed. "Orchid biology, reviews and perspectives". Chapter IV. Ithaca: Cornell University Press. pp. 139-191.
- Pridgeon AM y MW Chase. 1995. Subterranean axes in tribe Diurideae (Orchidaceae) morphology, anatomy and systematic significance. *American Journal of Botany* 82: 1473-1495.
- Pridgeon AM, WL Stern y DH Benzing. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany* 70: 1365-1377.
- Pridgeon AM, RM Bateman, AV Cox, JR Hapeman y MW Chase. 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* 12: 89-109.
- Pridgeon AM, R Solano y MW Chase. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and DNA sequences. *American Journal of Botany* 88: 2286-2308.
- Pridgeon AM, PJ Cribb, MW Chase y FN Rasmussen. 2003. Genera orchidacearum, vol. 3, Orchidoideae - Vanilloideae. Oxford University Press. Oxford, UK. 358 p.
- Ryan A, WM Whitten, MAT Johnson y MW Chase. 2000. A phylogenetic assessment of *Lycaste* and *Anguloa* (Orchidaceae: Maxillariinae). *Lindleyana* 15: 33-45.
- Rosso SW. 1966. The vegetative anatomy of the Cypripedioideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 59: 309-341.
- Ruzin ES. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, Inc. Oxford, UK. 322 p.
- Salazar GA, MW Chase, MS Arenas y M Ingrouille. 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
- Salazar GA, JS Reyes, C Brachet y JC Pérez. 2006. Orquídeas y otras plantas nativas de la cañada de Cuicatlán, Oaxaca, México. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 175 p.
- Sandoval EZ. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Universidad

- Nacional Autónoma de México. México, DF. 278 p.
- Sanford WD y I Adanlawo. 1973. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of Linnean Society* 66: 307-321.
- Sass JE. 1958. Botanical microtechnique. 3a ed. Iowa State College Press. Ames, Iowa, USA. 228 p.
- Schlechter R. 1911. Die polychondreae (Neottiinae Pfitz.) und ihre systematische einteilung. *Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* (Leipzig) 54: 375-410.
- Soltis DE y PS Soltis. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In DE Soltis, PS Soltis y JF Doyle (eds). Molecular systematics of plants II, DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers. UK. pp. 1-42.
- Sosa V, MW Chase, GA Salazar, WM Whitten y NH Williams. 2001. Phylogenetic position of *Dignathe* (Orchidaceae: Oncidiinae): evidence from nuclear ITS ribosomal DNA sequences. *Lindleyana* 16: 94-101.
- Stern LW, MW Morris, WS Judd, AM Pridgeon y RL Dressler. 1993a. Comparative vegetative anatomy and systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 113: 161-197.
- Stern WL, HC Aldrich, LM McDowell, MW Morris y AM Pridgeon. 1993b. Amyloplasts from cortical root cells of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Protoplasma* 172: 49-55.
- Stern WL. 1999. Comparative vegetative anatomy of two saprophytic orchids from tropical America: *Wulfschlaegelia* and *Uleiorchis*. *Lindleyana* 14: 136-146.
- Stern WL y BS Carlswald. 2006. Comparative vegetative anatomy and systematics of the Oncidiinae (Maxillarieae, Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 91-107.
- Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.2 b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Szlachetko DL. 1995. *Systema Orchidarium. Fragmenta floristica et Geobotanica* (Supplement) 3: 1-152.
- van den Berg C, WE Higgins, RL Dressler, WM Whitten, MA Soto Arenas, A Culham y MW Chase. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from nuclear transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA.

Lindleyana 15: 96-114.

- Vargas CA. 1997. Phylogenetic analysis of Cranichideae and Prescottiinae (Orchidaceae), with some taxonomic changes in Prescottiinae. MSc thesis, University of Missouri, St. Louis Missouri, USA. pp.
- Wendel JF y JJ Doyle. 1998. Phylogenetic Incongruence: Window into genome history and molecular evolution. *In* DE Soltis, PS Soltis y JF Doyle (eds). Molecular systematics of plants II, DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers. UK. pp. 1-42.
- Whitten WM, NH Williams y MW 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. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47: 568-581.
- Zavaleta- Mancera HA y EM Engleman. 1994. Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L) Van Royen (Sapotaceae). *Phytomorphology* 44: 169-175.