

ZAMORANO
CARRERA DE DESARROLLO SOCIOECONÓMICO Y AMBIENTE

Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas

Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Desarrollo Socioeconómico y Ambiente

Presentado por

Sadoc Eliud Aguilar Palma

Honduras
Diciembre, 2003

Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas

Presentado por

Sadoc Eliud Aguilar Palma

Aprobada:

George E. Pilz, Ph. D.
Asesor Principal

Mayra Falck, M.Sc.
Coordinadora, Carrera de
Desarrollo Socioeconómico y
Ambiente

Juan Carlos Rosas, Ph. D.
Asesor Principal

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

José L. Linares, Ing. Agr.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A
Director General

Luwbia Aranda, Ing. Agr.
Asesor

ZAMORANO
Desarrollo Socioeconómico y Ambiente
Diciembre, 2003

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Sadoc Eliud Aguilar Palma

Honduras
Diciembre, 2003

DEDICATORIA

A Dios, ser supremo que me guía por mi destino.

A mi abuela Concepción Lanza (Q.D.D.G) y tío Vicente Aguilar (Q.D.D.G), sus enseñanzas estarán siempre en mi memoria.

A mi padre José F. Aguilar, por el sacrificio, amor y ejemplo que me ha dado en la vida.

A mi madre, Norma C. Palma por sus consejos y cariño.

A mi tía María del Carmen Aguilar por su incondicional apoyo que me ayudó a seguir adelante.

A mi primo José David Aguilar por su gran aprecio.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi guía en todo momento.

A la familia Aguilar por la confianza que tienen en mí.

A la Dra. Ediltrudis Colindres por su amistad y cariño.

Al Dr. George E. Pilz por su apoyo, amistad y confianza en la realización del estudio.

Al Ing. José L. Linares, por su gran amistad, apoyo y dedicación en el trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Rosas, por la oportunidad y apoyo en la ejecución del estudio.

A la Ing. Luwbia Aranda, por su apoyo, tiempo y colaboración en la realización del trabajo.

A mis grandes amigos Freddy Murillo, José David Láinez y Flor de María Nuñez por la gran amistad que me han brindado en toda mi vida.

A Tomasa y Luz, por su colaboración en el trabajo.

A todos mis amigos de Zamorano, por su especial amistad.

Resumen

Aguilar Palma, Sadoc Eliud. 2003. Aplicación de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas. Proyecto especial del programa de Ingeniero en Desarrollo Socioeconómico y Ambiente. Zamorano, Honduras. 35p.

La familia *Orchidaceae* es una de las más extensas en géneros y especies del mundo. Su gran complejidad para definir límites entre los géneros y especies origina debates entre los científicos que estudian esta familia. Los estudios actuales realizados en esta familia se apoyan en múltiples técnicas para definir posición taxonómica entre las especies. Entre estas nuevas técnicas, se está utilizando la biología molecular con mayor frecuencia. Las ventajas que ofrece la técnica permiten que los estudios tengan un mayor fundamento en sus resultados. Entre las técnicas utilizadas esta la aplicación de marcadores moleculares tipo RAPD. Los marcadores moleculares de tipo RAPD son utilizados en el Laboratorio de Biodiversidad para el estudio del frijol, en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Su efectividad en frijol y en otras especies en los trabajos taxonómicos motivó la realización de este estudio en orquídeas. La metodología consistió en utilizar 20 especies del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y aplicar los marcadores moleculares de tipo RAPD utilizando los protocolos para frijol. Asimismo determinar si la técnica de marcadores moleculares tipo RAPD funciona como herramienta para definir su posición taxonómica en relación a su cercanía genética y su clasificación morfológica.

Palabras clave: Biología molecular, RAPD, *Orchidaceae*, posición taxonómica.

CONTENIDO

	Portada.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Resumen.....	vi
	Contenido.....	vii
	Índice de Cuadros.....	ix
	Índice de Figuras.....	x
	Índice de Anexos.....	xi
1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ANTECEDENTES.....	1
1.2	OBJETIVOS.....	2
1.2.1	Objetivo General.....	2
1.2.2	Objetivos Específicos.....	2
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS.....	3
2.2	DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA.....	3
2.3	MARCADORES MOLECULARES.....	8
2.3.1	Marcadores moleculares en la botánica.....	8
2.3.2	Aplicaciones de marcadores moleculares en orquídeas.....	9
2.3.3	Marcadores moleculares tipo RAPD.....	10
2.3.4	Aplicaciones de marcadores tipo RAPD en orquídeas.....	11
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1	UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	12
3.2	MATERIAL EXPERIMENTAL.....	12
3.3	TOMA DE MUESTRAS.....	13
3.4	EXTRACCIÓN DE ADN.....	13
3.5	CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	13
3.6	DILUCIÓN DE ADN.....	13
3.7	AMPLIFICACIÓN DE ADN.....	13
3.8	SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE ADN.....	14

3.8.1	Separación	14
3.8.2	Visualización	14
3.9	MEDICIÓN DE VARIABLES.....	14
3.9.1	Determinación de las bandas.....	14
3.9.2	Análisis de los datos RAPD.....	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5	CONCLUSIONES.....	21
6	RECOMENDACIONES.....	22
7	BIBLIOGRAFÍA.....	23
8	ANEXOS.....	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro.

1	Nombre científico y distribución de las orquídeas empleadas en el estudio. Zamorano, 2003.....	12
2	Lista de cebadores utilizados en el estudio con RAPD. Zamorano, 2003.....	14
3	Número de polimorfismo presente por cebador. Zamorano, 2003.....	16
4	Caracteres morfológicos de las especies utilizadas en el estudio. Zamorano, 2003.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.

1.	Patrones de bandas RAPD generados por el cebador.....	15
2.	Dendrograma molecular de las especies estudiadas.....	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo.

1.	Extracción de ADN para el análisis de RAPD Método de la Universidad de Wisconsin – Madison (UWM).....	26
2.	Cuantificación de ADN.....	27
3.	Dilución de ADN (4 ng/ml) Método de la UWM...	28
4.	Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo RAPD.....	28
5.	Electroforesis de ADN.....	29
6.	Historia de la clasificación de las orquídeas.....	30

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Orchidaceae* es una de las más grandes y diversas, pero no han sido estudiadas científicamente en forma intensa (Dressler, 1990); posiblemente debido a que muchos botánicos opinan que no son adecuadas como sujetos de investigación. Se estima un rango entre 17,000 y 35,000 especies plenamente distribuidas, pero la mayor diversidad se encuentra en los trópicos, especialmente las especies epífitas. En los últimos años un mayor grupo de científicos se ha dedicado a estudiar esta familia, dando como resultado nuevas especies identificadas y mejor entendimiento del comportamiento de este grupo tan importante.

Los nuevos estudios e investigaciones de orquídeas presentan nuevos retos en la identificación y clasificación de las especies. Los métodos actuales para definir la posición taxonómica se basan en caracteres morfológicos. Debido al comportamiento en su polinización, las orquídeas tienen una gran variación genérica y por esto muchas veces es difícil definir su posición taxonómica con los marcadores morfológicos tradicionales. Con los avances en la biología molecular, los botánicos usan técnicas nuevas que facilitan la clasificación de las especies basándose en el ADN de las plantas. Aplicando marcadores moleculares se pueden identificar características específicas de cada especie, y se pueden definir relaciones genéticas entre especies. En las orquídeas las técnicas utilizando ADN para estudios de clasificación de especies pueden ser útiles y dar resultados confiables.

El Herbario Paul C. Standley de Zamorano tiene la colección más completa de la flora centroamericana. Las investigaciones realizadas en el herbario contribuyen de gran manera al conocimiento de la biodiversidad mesoamericana en el ámbito mundial, a través de los contactos con otros herbarios y diversas publicaciones. El estudio pretende definir la utilidad de los marcadores moleculares como una herramienta en los trabajos taxonómicos que realiza el Herbario Paul C. Standley. La aplicación de esta herramienta ayudaría a que los trabajos presenten una mayor confiabilidad y validez científica.

El trabajo empleará marcadores moleculares para establecer su posible utilidad como una herramienta para la posición taxonómica. Con resultados positivos, esta herramienta podría servir para comprobar la clasificación ya existente de las especies de orquídeas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, definir sus similitudes genéticas y servir de base para estudios futuros.

1.1 ANTECEDENTES

El uso de marcadores moleculares en Zamorano se ha limitado al área del mejoramiento del frijol. Los marcadores RAPD y SCAR han demostrado ser herramientas útiles en

investigaciones realizadas en el Laboratorio de Biodiversidad y Fitomejoramiento. Estos marcadores moleculares son utilizados para identificar caracteres de las plantas tales como la resistencia a plagas. La aplicación de los marcadores moleculares en otras instituciones de investigación y educativas se ha hecho en el área de la biología, específicamente en la botánica. Los grandes botánicos ven en los marcadores moleculares un gran potencial para la definición y clasificación de especies. El Zamorano tiene el herbario más completo de la flora en Mesoamérica, pero los métodos para la identificación de ejemplares continúan siendo los convencionales. Estos métodos se basan en caracteres morfológicos (flor, hoja, tallo, raíz, etc.) presentes en la estructura de la planta. Aunque esta técnica sigue siendo la mayormente utilizada por todos los herbarios del mundo, presenta ciertas limitaciones en especial con las familias de alta variabilidad morfológica. Los marcadores moleculares son una alternativa para ayudar con la clasificación de especies cuando los caracteres morfológicos son difíciles de definir. A pesar del potencial que muestran tener los marcadores moleculares, no han sido utilizados en Zamorano como una herramienta de ayuda en la clasificación taxonómica de especies, a excepción del frijol común.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Utilizar marcadores moleculares para la caracterización de especies de orquídeas y determinar su potencial como herramienta en la taxonomía de las mismas.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Utilizar la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) y aplicar los marcadores moleculares RAPD (Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar) en la clasificación de orquídeas.
2. Definir la cercanía genética de las especies de orquídeas incluidas en el estudio con base al análisis de polimorfismo.
3. Evaluar la utilidad de los marcadores moleculares como una herramienta para la clasificación taxonómica en orquídeas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

Por siglos, la diversidad y especialización en la morfología floral de las orquídeas ha fascinado a botánicos y coleccionistas (Zomlefer, 1994). Probablemente, la familia Orchidaceae es la más grande de las angiospermas (Dressler, 1993). Su distribución es amplia, pero su mayor diversidad, incluyendo las epífitas, se encuentra en los trópicos y especialmente en las montañas tropicales. Se estima una cantidad de 19,500 especies en 775 géneros, siendo 73% epífitas (Hamer, 2001). Nuevas especies de los trópicos son identificadas cada año, pero debido a trabajos taxonómicos mal elaborados las líneas genéricas y específicas no siempre están bien definidas. Varias clasificaciones han sido desarrolladas para esa familia (Anexo 6). La clasificación de las sub-familias, tribus, y subtribus se basa en rasgos morfológicas de la planta (Zomlefer, 1994). Las orquídeas están dentro de las monocotiledóneas más avanzadas en la evolución, teniendo especificidad para la polinización, almacenamiento, toma de agua y asociaciones con hongos específicos para satisfacer necesidades nutricionales incluyendo la germinación de las semillas.

Según Dressler (1993), son pocas las familias que igualan la diversidad vegetativa de las orquídeas. La estructura floral es uniforme en número y arreglo de las partes, pero hay una gran diversidad en tamaño y detalles estructurales. El comportamiento sexual de estas plantas es versátil a pesar que su diseño es con el propósito de que un solo polinizador actúe sobre una especie de planta. Tales relaciones específicas ocurren, pero probablemente son más la excepción que la regla. El número de híbridos se acerca a los 100,000 como resultado del alto grado de compatibilidad entre especies.

2.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

La taxonomía se define como la rama de las ciencias naturales que se encarga de la clasificación de los seres vivos. La taxonomía vegetal se encarga del estudio y la clasificación de las plantas o vegetales. Los organismos son clasificados en categorías taxonómicas y generalmente consisten de 9 básicas: reino, división, subdivisión, clase, orden, familia, género, especies y variedades (Linares, 2002). En el caso de las orquídeas se incluyen tribus y subtribus debido a su diversidad. A continuación se detallan las características taxonómicas y morfológicas entre las diferentes especies que se utilizaron en el estudio.

Reino: *Plantae*
 Filo: *Magnoliophyta*
 Clase: *Liliopsida*
 Subclase: *Monocotyledonae*

Orden: *Orchidales*
 Familia: *Orchidiaceae*

Subfamilia: *Epidendroideae*
 Tribu: *Epidendreae*
 Subtribu: *Laeliinae*

Tribu: *Maxillareae*
 Subtribu: *Oncidiineae*

Género *Barkeria*. Epífitas o litófitas; tallos formando pseudobulbos delgados, revestidos de vainas. Hojas de 2 –7, linear o lanceoladas a ampliamente ovaladas, espaciadas o concentradas hacia el ápice. Racimos terminales, algunas veces ramificados, las flores 1 – 6 cm de diámetro, rosado – purpúreas, lilas o blancas, pediceladas; sépalos similares a los pétalos mas anchos; labelo libre o adnado (unido) a la columna la mitad de su longitud, simple (no lobado), el callo ausente o formado de 3 – 5 carinas, engrosadas, algunas veces verrugosas; columna adpresa al labelo o divergente, con alas membranáceas o carnosas ampliamente patentes, el rostelo lingüiforme, el viscidio ausente, la antera terminal, 2 – locular, polinios 4, ceráceos (Hamer,2001).

Barkeria skinneri: Labelo unido a la columna a la mitad del largo; flores brillantes rosado – púrpura, quillas amarillas en el labelo (Dressler, 1993).

Género *Brassavola*. Epífitas o litófitas; tallos secundarios delgados, más o menos engrosados o pseudobulbosos, 1 – 2 foliados. Hojas teretes o aplanadas. Inflorescencias racimos terminales o aparentemente emergiendo directamente del rizoma (radicifloras), a veces unifloras, las flores generalmente grandes y vistosas; sépalos y pétalos similares, patentes, lineares hasta linear – lanceoladas, a menudo largamente atenuados; labelo unguiculado y erecto, su porción basal (o uña) más o menos convulutada y abrazada a la columna, la porción por arriba de la uña dilatada en una lámina ancha, con márgenes enteros o fimbriados; columna erecta y generalmente más corta que la uña labelar, generalmente con 2 alas, sin pie, la antera incumbente, operculada, 2 – locular, cada lóculo con un septo longitudinal inconspicuo, polinios 8, ampliamente ovoides, lateralmente comprimidos. Cápsulas elipsoides (Hamer, 2001).

Brassavola nodosa: Labelo liso, márgenes no dentados; sépalos y pétalos de color verde – amarillento, labellum blanco con puntos púrpuras en la garganta (Dressler, 1993).

Género *Cattleya*. Epífitas o litófitas, rizoma por lo general corto, raras veces alargado; tallos secundarios gruesos y carnosos, por lo general engrosados en pseudobulbos, apicalmente 1 ó 2 foliados. Hojas coriáceas o carnosas con el nervio principal bien desarrollado. Inflorescencia un racimo terminal, paucifloro, el pedúnculo basalmente revestido con 1 ó 2 espatas amplias, las flores generalmente grandes y vistosas; sépalos patentes, similares, libres; pétalos generalmente mucho más anchos que los sépalos, a veces igual de anchos; labelo sésil o cortamente unguiculado, erecto, libre o raras veces algo adnado a la columna, simple hasta profundamente 3 – lobado, los lobos laterales abrazando la columna; columna alargada, semiterete, algo encorvada, sin alas ni pie, la antera

terminal, operculada, incumbente, 2 – locular, cada lóculo con un tabique longitudinal, polinios 4, lateralmente, comprimidos, paralelos, cartilagosos. Cápsulas ovoide – oblongas hasta subglobosas, con costillas longitudinales bastante prominentes (Hamer, 2001).

Cattleya aurantiaca: Flores rojo – anaranjadas o amarillo – verdosas; labelo 2 cm de largo, manchado púrpura o rojo (Hamer, 2001).

Cattleya guatemalensis: Flores púrpureas hasta rojo – violetas, con rojo – anaranjado o rosado; labelo 2.5 cm de largo, de colores muy variables, desde rosado hasta purpúreo (Hamer, 2001).

Cattleya deckeri: Labelo purpúreo con garganta oscura, pétalos agudos (Hamer, 2001).

Cattleya skinneri: Labelo obtuso purpúreo con garganta blanca, pétalos redondeados (Hamer, 2001).

Cattleya bowringiana: Labelo agudo purpúreo con garganta blanca (Correll, 1952).

Género *Encyclia*. Generalmente epífitas, ocasionalmente terrestres; tallos secundarios pseudobulbosos, generalmente ovoides u ovoide – cónicos, raramente comprimidos, apicalmente 1 – 5 foliados. Hojas generalmente gruesas y coriáceas. Inflorescencia terminal, panícula o racimo, con pocas a numerosas flores, escapífera, sin espata, las flores a veces vistosas, resupinadas; sépalos similares, libres, patentes; pétalos subsimilares a los sépalos; labelo generalmente adnado a la columna en la base, generalmente 3 – lobado, los lobos laterales separados del lobo medio por senos anchos y poco profundos, la antera terminal, operculada, incumbente, polinios 4, ceráceos. Cápsulas fusiformes (Hamer, 2001).

Encyclia bractescens: Columna adnada al labelo en el tercio de su longitud; lóbulos laterales lineares, usualmente anchos hacia la punta (Correll, 1952).

Género *Epidendrum*. Generalmente epífitas o litófitas, ocasionalmente terrestres; tallos secundarios comúnmente delgados o a modo de cañas, simples a muy ramificados, foliados o algunas veces engrosados en pseudobulbos cilíndricos que llevan 1 – 5 hojas apicales. Hojas generalmente dísticas a menudo coriáceas y rígidas, generalmente articuladas. Inflorescencia generalmente terminal, racimo simple, algunas veces umbeliforme, hasta una panícula difusa, con 1 a muchas flores; sépalos y pétalos a menudo patentes y libres, los pétalos a menudo más angostos que los sépalos hasta filiformes; labelo con la uña adnada a toda la longitud de la columna, con una hendidura en el ápice de la columna, simple o 3 – lobado, liso o generalmente con un disco variadamente engrosado, generalmente con 2 callos; columna algunas veces con alas, la antera terminal, operculada, incumbente, 2- ó 4 – locular, polinios raramente 2 ó 4, con el viscidio semilíquido. Cápsulas elipsoides (Hamer, 2001).

Epidendrum stamfordianum: Inflorescencia usualmente lateral; hojas 2 – 3; lóbulo medio del labelo más ancho que largo, finbriado; sépalos y pétalos verdes o amarillos pálidos con puntos púrpuras, lóbulo medio anaranjado (Dressler, 1993).

Laelia rubescens: Epífitas, pequeñas, el rizoma corto, pseudobulbos agrupados y superpuestos, orbiculares, 7 cm de largo y 4 cm de ancho, fuertemente comprimidos, 1-foliados. Hoja oblonga-elíptica, hasta 15 cm de largo y 4 cm de ancho, ápice retuso, carnosos-coriáceos; pecíolo corto. Inflorescencia con escapo floral alargado, terminal, terete, revestido de 3 vainas apretadas, raquis subcorimbose con varias flores, la bráctea floral lanceolada, 7mm de largo, acuminada, las flores desde blancas hasta rosadas con una mancha grande de color púrpuro oscuro en la garganta, columna púrpura; sépalos linear – lanceolados, 3.8 cm de largo y 0.8 de ancho, subagudos; pétalos anchamente elípticos, 3.8 cm de largo y 1.6 cm de ancho, obtusos; labelo libre o levemente adnado a la columna, oblongo, 3 cm de largo y 2.2 cm de ancho por arriba de los lobos laterales, 3 – lobado cerca de la mitad, los lobos laterales olabriliformes, obtusos, encorvados y abrazando la columna, el lobo medio cuneado, retuso, disco con 2 laminillas paralelas desde la base del labelo hasta la base del lobo medio; columna clavada, 10 mm de largo, la antera terminal, operculada, incumbente, 2-locular con los lóculos septados, polinios 8, ceráceos; ovario y pedicelo juntos 3 cm de largo, el ovario delgado, flexuoso (Hamer, 2001).

Laelia anceps: Epífitas; tallos envainados con pseudobulbos espaciados; hojas oblongas – lanceoladas; flores rosa – púrpuras con labelo rojo – púrpura oscuro y callo central amarillo (www.orchids.org).

Género *Oerstedella*. Epífitas o terrestres; tallos gramínoideos, sin pseudobulbos, foliosos. Hojas dísticas, membranáceas a coriáceas, planas, con base envainadora rugosa o verrugosa. Inflorescencia terminal o lateral, emergiendo por entre las vainas opuestas a las hojas, las flores libres, los sépalos y pétalos patentes; labelo unido a la base de la columna y formando un nectario, 3-lobado, deflexo; columna semiterete, el rostelo proyectado hacia abajo formando un ángulo de 90° con la columna, antera rostrada, polinios 4, duros, viscidio ausente (Hamer, 2001).

Oerstedella caligiara: Lóbulo medio de labelo 6 mm de ancho, finbriados, lóbulos laterales finbriados profundamente; flor de color rosado pálido (Dressler, 1993).

Género *Oncidium*. Epífitas o a veces litófitas o terrestres, bastante variables, rizoma corto o alargado; tallos secundarios generalmente pseudobulbos, en pocos casos abreviados y revestidos con hojas equitantes o vainas dísticas e imbricadas, provistas de limbos foliares; pseudobulbos inconspicuos hasta bien desarrollados, apicalmente 1- 3 – foliados, cuando jóvenes revestidos de vainas con limbos foliares. Hojas aplanadas, a veces teretes, generalmente alargadas. Inflorescencias unifloras o en la mayoría de los casos racimos o panículas, a veces volubles y de varios metros de largo, emergiendo desde la base de los pseudobulbos o axilares a las vainas u hojas cuando los pseudobulbos están ausentes, las flores desde relativamente pequeñas hasta grandes y vistosas, por lo general amarillas con manchas rojizas, cafés o violáceas, a veces flores fértiles y abortivas presentes; segmentos del perianto patentes o a veces algo reflexos, los sépalos por lo general similares, libres o los laterales connados en la base, en pocos casos el sépalo dorsal y los pétalos son mucho

más alargados y más angostos que los sépalos laterales; pétalos similares al sépalo dorsal o a veces más grandes; labelo patente, en la mayoría de los casos pandurado o 3-lobado, a veces simple, el lobo medio cuando presente por lo general mucho más grande que los lobos laterales, en la mayoría de los casos transversal y marginado, disco con una callosidad variable en la base, generalmente consistente de tubérculos, dientes o carinas; columna corta y gruesa, sin pie, generalmente con 2 alas petaloides apicales, la antera terminal, operculada, incumbente, fuertemente convexa, semiglobosa o cuculada, 1-locular, imperfectamente 2-locular o raras veces 2 – locular, polinos 2, por lo general surcados, cetáceos (Hamer, 2001).

Oncidium ascendens: Alas de la columna lineares, curvadas hacia delante; labelo amarillo con manchas café – rojizas en y alrededor del callo (Hamer, 2001).

Oncidium sphacelatum: Labelo sin istmo, lobo medio retuso; disco con un callo compuesto de 2 aurículas divergentes en la base y 2 en la mitad, con 2 dientes alargados apicales y un engrosamiento oblongo encima (Hamer, 2001).

Oncidium maduroi: Ápice del bulbo subcuadrado, hojas conduplicadas en el ápice largamente lanceolada, vainas foliaceas, bulbos comprimidos ancipilosos oblongos (comunicación personal, Linares, 2003¹).

Oncidium anthocrene: Labelo ancho en el lóbulo medio que en lóbulos laterales; istmo angosto; sépalos y pétalos de color brillante café chocolate con márgenes amarillos, labelo amarillo con puntos basales cafés (Dressler, 1993)

Oncidium superbiens: Epífita con pseudobulbos cónicos y comprimidos rodeados por vainas oblanceoladas; hojas agudas 120 a 240 cm de largo en intervalos irregulares; poca inflorescencia con brácteas (www.orchidspecies.com).

Oncidium onustum: Inflorescencia simple (18-40cm) de la base con flores amarillas, 4 – lobuladas con callo en la base (www.orchids.org).

Género *Rhyncholaelia*. Epífitas compactas; pseudobulbos 4 – 6 cm de largo, comprimidos, revestidos de vainas imbricadas, escariosas, verdes, 1 – foliados. Hojas oblongo – elípticas, 7 – 9 cm de largo y 3 cm de ancho, verde – azules con bordes purpúreos, coriáceas. Inflorescencia sub – sésil, flores solitarias, en el ápice del pseudobulbo, grandes y vistoso, sépalos y pétalos blanquecinos a amarillo – verdosos, el exterior de los pétalos algo rosado, labelo blanquecino a amarillento, callo verde con puntitos rojo oscuros, columna verdosa; sépalos 60 mm de largo y 12 mm de ancho, pétalos 55 mm de largo y 13 mm de ancho, labelo 5 cm de largo y 4.5 cm de ancho cuando aplanado, truncado en el ápice, la porción basal tubular, disco con un callo basal pequeño; columna 1 cm de largo, 5 – dentada en el ápice, polinios 8, amarillos; ovario y pedicelo juntos 6.5 – 8 cm de largo, cubierto de vainas comprimidas, 6 cm de largo (Hamer, 2001).

¹ Ing. Agr. J.L. Linares actual curador del Herbario Paul C. Standley, EAP.

Rhyncholelia dygbiana: Labelo profundo lacerado – finbriado (Correll, 1952).

Rhyncholelia glauca: Labelo no profundo lacerado – finbriado (Correll, 1952).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son caracteres que se pueden usar directa o indirectamente para obtener información sobre la genética de caracteres de un organismo en estudio (Rosas, 2001). Se pueden detectar a diferentes niveles incluyendo morfológico, bioquímico y molecular. A diferencia de los demás marcadores moleculares no son afectados por el ambiente y no varían con la edad de la planta. Pueden ser regiones codificantes, aunque la mayoría de los polimorfismos ocurren en regiones no codificantes.

La biología molecular ha evolucionado incesantemente en el desarrollo de nuevas técnicas para el uso de diferentes tipos de marcadores moleculares, cada vez más complejos y específicos, en las ciencias biológicas. En términos generales, para el uso eficaz en estudios de biodiversidad se debe considerar: 1) la base genética del polimorfismo revelado, 2) los aspectos técnicos del método; y 3) las ventajas y limitaciones implícitas (Rosas, 2001).

2.3.1 Marcadores Moleculares en la Botánica

En los últimos años el uso de marcadores moleculares se ha enfatizado para trabajos en botánica sistemática. Los marcadores moleculares se han aplicado en estudios filogenéticos para diversos géneros. En el Instituto de Ecología en México se utilizó el ADN ribosomal ITS (internal transcriber spacer) y el ADN *trnL-F* del cloroplasto en el género *Ceratozamia* (González y Vovides, 2002). Este método permite demostrar la variabilidad genética entre especies del mismo género para definir la posición cladística de cada una, además muestra relaciones anatómicas entre especies. Un estudio filogenético de la familia Trilliaceae realizado en el Departamento de Botánica de la Universidad de Tennessee por Farmer y Schilling (2002) utilizando marcadores moleculares en las regiones ITS y *mat-K* del ADN determinó que ciertas especies deberían de formar su propio género basándose en las similitudes genética; así mismo, géneros que se pensaban que estaban altamente relacionadas resultaron alejados genéticamente. Finalmente utilizando la misma técnica Hardig (2002) hizo un análisis molecular en la especiación del híbrido *Ceanothus*. La biología molecular para estudios moleculares demuestra ser una herramienta viable en le área de la taxonomía de plantas.

Los marcadores tipo RAPD se han empleado en estudios enfocados a determinar especies a través de su variabilidad genética. Los RAPD se utilizaron para el estudio de la variación en *Eriastrum densifolium* para identificar grupos cohesivos de las poblaciones para su delimitación y conservación (Brunell y Whitkus, 1997). Los resultados brindaron una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, llegando a la conclusión que hay una leve variación genética entre poblaciones cercanas. Posto y Prather (2003), concluyó un estudio con marcadores RAPD para definir relaciones genéticas en *Mimulus*

michiganensis, previamente conocido como *M. glabratus* var. *michiganensis*. Sus resultados definieron que todos los individuos de *Mimulus michiganensis* son similares genéticamente y formaron su propio grupo en el dendrograma, separados de *M. glabratus*, apoyando los estudios morfológicos que determinaron subir el rango taxonómico de variedad a especie. Sastad et al. (1999), aplicó los marcadores RAPD en el complejo *Sphagnum recurvum* para delimitar poblaciones de especies y sus relaciones a través de la variabilidad genética. Los resultados afirman la evidencia morfológica para seis especies dentro del complejo.

2.3.2 Aplicaciones de Marcadores Moleculares en Orquídeas

Las orquídeas han presentado varios problemas para los taxónomos (Przeslawski, 1995). Debido a que no se han encontrado fósiles de orquídeas de más de 30,000 años, nadie está seguro de su origen o linaje. Los problemas también se han encontrado dentro de la familia. Los análisis de ADN pueden responder a algunas de las preguntas más difíciles de la taxonomía de las orquídeas. El precursor de los análisis moleculares en orquídeas, Mark Chase, ha contribuido a la taxonomía de estas plantas por más de 10 años, utilizando marcadores moleculares en el gen *rbcL* del cloroplasto de la planta. Con el uso de análisis molecular se ha logrado corregir errores de identificación, comprobando la utilidad de la información en el área de la botánica. Un alto grado de correlación existe entre los análisis moleculares y no moleculares, apoyando las descripciones cladísticas (Przeslawski, 1995).

Dressler (1993), menciona que la información molecular se puede utilizar en la sistemática de muchas maneras y que a pesar de su alto costo en tiempo y equipo, los resultados pueden ser muy valiosos. En los casos cuando la información estructural es inadecuada o conflictiva, los detalles moleculares pueden mejorar las hipótesis o ayudar a escoger entre ideas conflictivas. En muchos de los casos, la información de análisis moleculares puede estar de acuerdo con una de las hipótesis morfológicas. En estos tiempos se enfatiza en obtener toda la información disponible para determinar relaciones taxonómicas.

El análisis molecular resulta ser una herramienta valiosa en el cultivo de plantas. La selección basada en el ADN tiene ventajas sobre la selección convencional. Debido a que el ADN contenido en las células de un individuo es constante durante su desarrollo y disponibles en todo el tejido, análisis moleculares son posibles a edades tempranas de la planta. Las secuencias de ADN son constantes independientes de las condiciones ambientales permitiendo una selección eficiente cuando se buscan rasgos de tolerancia a temperatura y resistencia a enfermedades. Además de ser útil para la selección, el polimorfismo en el ADN puede ser usado para la identificación de especies/híbridos. La aplicación de estudios moleculares enfocados al cultivo de orquídeas muestra ser de utilidad debido al ciclo de vida largo de muchas de las especies. Los estudios moleculares concernientes a orquídeas proveen importante información de la estructura genómica de esta importante familia (Benner, 1992).

En el Centro de Identificación de Orquídeas del Marie Selby Botanical Garden, Higgins (2002) desarrolló un protocolo para marcar orquídeas utilizando biología molecular. La técnica utilizó microsatélites del genoma como marcadores moleculares sensitivos para

discriminar entre individuos. Los microsatélites son regiones de bases de ADN repetidos. Los cebadores específicos para estas regiones del ADN son utilizados en un termociclador con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para producir fragmentos de ADN vistos en bandas. El protocolo fue utilizado para distinguir entre dos plantas altamente relacionadas, producto de una hibridación. Los resultados determinaron a qué padre se relacionaba más el híbrido. Aunque las relaciones genéticas pueden ser pronosticadas de la morfología floral, los marcadores moleculares ofrecen ser una herramienta útil para la identificación de cultivares específicos.

Los análisis de ADN se utilizan mayormente en el estudio de la filogenética de las orquídeas. Dressler y Higgins (2003) utilizando sistemática molecular definieron un nombre genérico nuevo para el complejo "*Cattleya*" *skinneri*, *Guarianthe*. Se basaron en los análisis obtenidos mediante la comparación de secuencias de ADN. En el Royal Botanic Gardens, Kew, Pridgeon y Chase (2003) evaluaron la sub – tribu Pleurothallidinae para definir su filogenética, utilizando ITS. Concluyeron, tomando en cuenta la fuerte evidencia molecular de las múltiples regiones del ADN, que se incluyera en la sub – tribu Pleurothallidinae tres géneros de orquídeas. Según Norris y Whitten (2003), los límites genéricos y de sub – tribus han sido caóticos, pero sus delimitaciones en los grupos avanzados del Neotrópico están basados en cladogramas obtenidos de análisis nucleares (ITS) y plástidios (*matK*, *trnL*, *F* y *atpB-rbcL*). Los estudios moleculares se han utilizado ampliamente en la familia Orquidaceae para definir cercanías genéticas entre sub – familias, tribus, sub – tribus, generos y especies como lo demuestra Van Der Berg (2000) en su trabajo de análisis molecular utilizando ITS para *Laeliinae* (Orquidaceae).

2.3.3 Marcadores moleculares tipo RAPD

Entre las primeras técnicas moleculares generadas utilizando PCR, se encuentra el uso de los marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Esta técnica sólo utiliza un cebador pequeño (6 – 10 pares de bases, pb), de secuencia arbitraria con 50 – 80% del par guanina – citocina. Se basa en que la secuencia corta del cebador tiene más posibilidades de encontrar varios sitios complementarios en el genoma, originando la amplificación simultánea y varios fragmentos. El número de fragmentos amplificados, depende de la concentración y secuencia de bases en el ADN molde, de la longitud del cebador, y de la temperatura de acoplamiento (Castro et al., 2001).

El proceso consiste en el apareamiento aleatorio del cebador al molde de ADN en dos sitios, uno en cada cadena complementaria, y la amplificación del fragmento entre estos sitios mediante al PCR. Los fragmentos obtenidos (200 – 3000 pb) son identificados por su tamaño, determinado por la distancia entre los dos sitios de acoplamiento. El polimorfismo entre individuos puede deberse a cambios en una sola base, en la secuencia de uno o ambos sitios de acoplamiento o de los fragmentos amplificados entre ellos (Castro et al., 2001).

Las ventajas de estos marcadores son que 1) existe un juego universal de cebadores que puede ser usado en todas las especies; 2) no requiere de sondas, radioactividad ni del conocimiento de la secuencia del cebador; 3) el proceso puede ser automatizado; 4) requiere de pequeñas cantidades del ADN original (5 – 25 ng) y 5) es una técnica de bajo

costo. Sin embargo, su mayor desventaja consiste en la baja repetibilidad de los resultados obtenidos (Castro et al., 2001).

Las aplicaciones de estos marcadores incluyen el mapeo genético, marcaje de genes, información filogenética, diversidad taxonómica y genética.

2.3.4 Aplicaciones de marcadores tipo RAPD en Orquídeas

Los marcadores tipo RAPD se han aplicado en diversos estudios para orquídeas. El trabajo realizado por Lim et al. (1999), aplicó marcadores moleculares de tipo RAPD en el análisis de las especies del género *Vanda* (Orchidaceae) para determinar la cercanía genética de varias de estas especies. Chung et al. (1996), en su estudio con orquídeas empleó RAPD para detectar el virus cymbidium del mosaico. Chan y Sun (1995), investigaron las especies *Spiranthes sinensis* y *S. hongkongensis*, definiendo su diversidad genética aplicando RAPD. Siguiendo con las investigaciones en *Spiranthes hongkongensis*, Chan y Sun (1997), usaron RAPD y ADN de cloroplasto para analizar los patrones de especiación en el individuo. Los RAPD fueron utilizados para determinar las cercanías genéticas entre las especiaciones definiendo las relaciones genéticas entre sí.

La mayoría de los estudios con orquídeas en los cuales se han utilizado los marcadores de tipo RAPD tienen como objetivo determinar variaciones genéticas entre poblaciones de especies para ayudar en el manejo y conservación. Wong y Sun (1999) trabajaron con la especie *Goodyera procera* empleando RAPD, para definir variación genética en 15 poblaciones con la que desarrollaron estrategias para la conservación genética y el manejo de la especie. En otro estudio, Sun y Wong (2001), definieron variaciones genéticas entre las especies *Zeuxine gracilis*, *Zeuxine strateumatica* y *Eulophia sinensis* utilizando RAPD. Los resultados mostraron que la variabilidad genética entre poblaciones depende de las capacidades colonizadoras y sistemas de reproducción de las especies.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el Herbario Paul C. Standley de la Carrera de Desarrollo Socioeconómico y Ambiente y en el Laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria de Zamorano, 30 Km al este de Tegucigalpa, Honduras.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Las orquídeas empleadas para la evaluación molecular fueron 20 especies pertenecientes a la Familia Orquidaceae que se utilizan en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Se escogieron estas plantas por su clasificación taxonómica y disponibilidad para tomar las muestras.

Cuadro 1. Nombre científico y distribución de las orquídeas empleadas en el estudio. Zamorano, 2003.

Nombre científico	Rango de Distribución
1. <i>Barkeria skinneri</i> x <i>Brassavola nodosa</i>	Híbrido comercial
2. <i>Cattleya aurantiaca</i>	Jalisco (México) - Guanacaste (Costa Rica)
3. <i>Cattleya deckeri</i>	Jalisco (México) - Guanacaste (Costa Rica)
4. <i>Cattleya guatemalensis</i>	Jalisco (México) - Guanacaste (Costa Rica)
5. <i>Cattleya skinneri</i>	Jalisco (México) - Guanacaste (Costa Rica)
6. <i>Encyclia bractescens</i>	Belize - Honduras
7. <i>Epidendrum stamfordianum</i>	México - Costa Rica
8. <i>Laelia anceps</i>	Jalisco (México) - Guanacaste (Costa Rica)
9. <i>Laelia superbiens</i>	México - Honduras
10. <i>Laelia rubescens</i> x <i>Brassavola nodosa</i>	Híbrido comercial
11. <i>Oncidium anthocrene</i>	Costa Rica - Brasil
12. <i>Oncidium ascendens</i>	México, Belize - Colombia
13. <i>Oncidium maduroi</i>	Costa Rica – Panamá
14. <i>Oncidium onustum</i>	Panamá, Ecuador, Colombia y Perú
15. <i>Oncidium sphacelatum</i>	México - Honduras; Venezuela, Ecuador
16. <i>Oncidium superbiens</i>	Venezuela, Ecuador, Perú y Colombia
17. <i>Oerstedella caligiara</i>	Panamá, Colombia
18. <i>Rhyncholaelia digbyana</i>	Honduras
19. <i>Rhyncholaelia glauca</i>	México - Nicaragua
20. <i>Cattleya bowringiana</i>	México, Belize, Guatemala, Honduras

3.3 TOMA DE MUESTRAS

En cada una de las plantas se buscó el tejido más joven proveniente de hojas nuevas, brotes y raíces de donde se extrajo la cantidad de 0.2 g. Se utiliza tejido joven porque este tiene una mayor actividad celular, incrementando la cantidad de ADN disponible. Las paredes celulares del tejido joven son más fáciles de romper y permite una mejor extracción de ADN.

3.4 EXTRACCIÓN DE ADN

Se empleó el protocolo de la Universidad de Wisconsin – Madison para la extracción de ADN en frijol. La extracción de ADN se realizó macerando el material vegetativo con un mortero y agregando el buffer PEX. La maceración permite que se rompan las paredes celulares y el buffer extrae los ácidos nucleicos disponibles en las células. Luego de macerar el material, este se pasa a un tubo para microcentrífuga tipo *ependorf* de 1.5 ml y se pone en baño maría durante una hora para destruir mejor el tejido. Las muestras se colocan en una microcentrífuga para concentrar los residuos de tejido. El líquido sobrante se pasa a un nuevo tubo *ependorf* donde se precipitan los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos precipitados se peletizan y el sobrenadante es eliminado. Al pellet se le agrega RNAasa A, para eliminar el ARN y que solamente quede el ADN. Se vuelve a centrifugar el tubo para peletizar el tejido restante y el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio. El ADN en el sobrenadante se precipita con etanol : acetato de sodio 3 M y se pasa a centrifugar para peletizarlo. Los pellets se lavan y se almacenan para su cuantificación (Anexo 1).

3.5 CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación de ADN se hizo en un fluorómetro (Hofer Pharmacia Biotech Inc., DyNA Quant™ 200), expresada en ng/uL, usando buffer de cuantificación y ADN de bovino estándar (100 ng/uL) para la calibración de la máquina (Anexo 2).

3.6 DILUCIÓN DE ADN

El ADN fue diluido a una concentración de 8 ng/uL utilizando el método de la Universidad de Wisconsin – Madison (Anexo 3).

3.7 AMPLIFICACIÓN DE ADN

El ADN se amplificó en un termociclador (PCR - 100™, Programmable Thermal Controller, Peltier – Effect Cycling) empleando una mezcla maestra para marcadores RAPD (Anexo 4).

3.8 SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE ADN

3.8.1 Separación

La separación del ADN fue realizada en un tanque de electroforesis (EC Maxicell EC 360 M, 22 orificios), utilizando una fuente de aplicación y regulación de voltaje (Hofer Scientific Instruments, PS 250/2.5 AMP). Una escalera de ADN de 100 bp sirvió para determinar la longitud de las bandas observadas (Anexo 5).

3.8.2 Visualización

En un transluminador de rayos ultravioleta se observaron las bandas electroforéticas y se empleó una cámara Polaroid empleada para fotografiar los geles y registrar los resultados.

3.9 MEDICIÓN DE VARIABLES

3.9.1 Determinación de las bandas

Los polimorfismos (presencia/ausencia de bandas) generados por los cebadores aplicados al estudio fueron registrados e identificados por observación en las fotografías. Se tomaron en cuenta los cebadores que registraban líneas polimórficas en las diferentes longitudes.

Cuadro 2. Lista de cebadores utilizados en el estudio con RAPD.

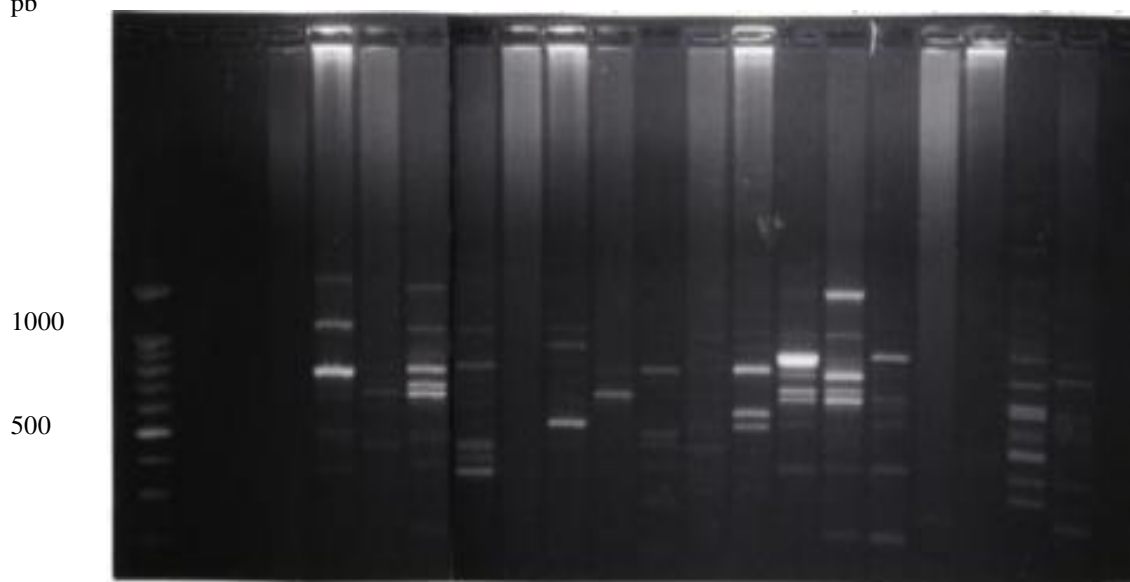
Cebador	Secuencia de bases	Cebador	Secuencia de bases
OPH-13	GACGCCACAC	OPL-04	GACTGCACAC
OPH-04	GGAAGTCGCC	OPU-19	GTCAGTGCCG
OPH-08	GAAACACCCC	OPS-13	GTCGTTCCCTG
OPY-06	AAGGCTCACC	OPZ-04	AGGCTGTGCT
OPC-04	CCGCATCTAC	OPU-01	ACGGACGAGT
OPO-16	TCGGCGGTTC	AH-01	TCCGCAACCA
OPW-06	AGGCCCGATG	OPE-04	CTCACGTGCC
OPT-07	GGCAGGCTGT	OPJ-13	CCACACTACC
OPO-13	GTCAGAGTCC	OPO-19	GGTGCACGTT
OPG-03	GAGCCCTCCA	OPP-09	GTGGTCCGCA
OPX-01	CTGGGCACGA	OPW-09	GTGACCGAGT
OPQ-14	GGACGCTTCA	OPAC-15	TGCCTTGAGA
OPG-15	ACTGGGACTC	OPW-13	CACAGCGACA
OPB-10	CTGCTGGGAC		

3.9.2 Análisis de los datos RAPD

Se contabilizaron las bandas que coincidían con las bandas de la escalera de ADN en cada planta, como presencia (1) y ausencia (0) para construir una matriz. La similitud genética entre las plantas se calculó con el programa NTSYS aplicando el Coeficiente de DICE. Los agrupamientos se realizaron con el método de UPGMA.

Figura 1. Patrones de bandas RAPD generados por el cebador OPU-01. Zamorano, 2003.

E
pb



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Zamorano, el uso de marcadores moleculares se ha usado como herramienta en el Laboratorio de Biodiversidad en variedades de frijol. El uso de los marcadores de tipo RAPD han probado ser una herramienta útil en la caracterización de especies de frijol (Rubio, 2002). En el ámbito mundial el uso de la biología molecular se aplica en estudios de todas las ramas de la biología y se ha demostrado ser una herramienta útil en estudios cladísticos. Aunque las técnicas utilizadas en estos estudios presentan una mayor precisión y costo, el concepto de utilizar similitudes genéticas es el mismo al aplicar la técnica de marcadores de tipo RAPD. Contar con la tecnología de los marcadores moleculares en Zamorano, permite que se realice un estudio aplicado al área de la taxonomía utilizando la misma metodología empleada en frijol.

Se utilizaron en total 27 cebadores en las muestras de ADN de especies de orquídeas 20, pero solamente 18 cebadores se tomaron en cuenta para definir similitudes genéticas entre las especies. Se rechazaron 9 cebadores porque en las fotografías no se presentaron bandas para cada especie indicando que en el ADN de las accesiones no se presentaban ADN la secuencia complementaria de bases de los cebadores. En total se definieron 65 bandas de los 18 cebadores para utilizar en el programa NTSYS (cuadro 3).

Cuadro 3. Número de polimorfismo presente por cebador. Zamorano, 2003.

Cebador	No. Polimorfismo	Cebador	No. Polimorfismo
OPH-13	23	OPP-09	13
OPH-04	14	OPQ-14	5
OPH-08	19	OPB-10	31
OPC-04	43	OPW-13	18
OPO-16	9	OPL-04	7
OBW-06	38	OPU-19	18
OPT-07	16	OPU-01	11
OPO-13	14	OPW-09	32
OPO-19	10	OPE-04	38

Los cebadores que presentaron mayor polimorfismo fueron: BW-06(700pb), P-09(500pb), W-09(400pb), E-04(900pb), E-04(800pb) y E-04(400pb). Se elaboró un análisis cualitativo utilizando el coeficiente DICE y un agrupamiento con el método UPGMA para generar un dendrograma. Este dendrograma demuestra la similitud genética entre especies (figura 1).

Para el análisis no se consideró la especie *Cattleya bowringiana* debido a que no mostró ningún tipo de polimorfismo con los cebadores utilizados. La *Rhynconlaelia glauca* presentó solamente un polimorfismo por lo cual se incluyó en el análisis. Las 20 especies incluidas en el estudio se clasifican en la misma sub – tribu Laeliinae a excepción del género *Oncidium* que pertenece a la tribu Maxillarieae, sub – tribu Oncidiinae. La clasificación vigente y más utilizada es la propuesta por Dressler (1993) determinada a través de los marcadores morfológicos. Un marcador molecular es el indicador de una característica de la planta, entonces al ser las especies cercanas morfológicamente estas deberían de ser similares genéticamente.

En cuanto a la clasificación entre las especies de las subtribus Laeliinae y Oncidiinae, su amplia diversidad hace que la clasificación sea artificial. Generalmente las características que más se toman en cuenta para diferenciar subtribus y géneros son el número de polinia y entrenudos, posición del labelo e inflorescencia. En las especies pertenecientes a cada género, las características morfológicas son generales pero se toman varios caracteres o uno solo específico para diferenciarlos. Igualmente la clasificación entre géneros de la misma subtribu es artificial. Existen entre botánicos opiniones diversas para la distinción entre especies que son variables y cada vez más se basan en los análisis del ADN.

Cuadro 4. Caracteres morfológicos de las especies utilizadas en el estudio. Zamorano, 2003.

Nombre científico	Número de polinios	Posición inflorescencia	Posición del labelo	Número de entrenudos en tallos
<i>Barkeria skinneri</i> x <i>Brassavola nodosa</i>	8	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Cattleya aurantiaca</i>	4	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Cattleya bowringiana</i>	4	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Cattleya deckeri</i>	4	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Cattleya guatemalensis</i>	4	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Cattleya skinneri</i>	4	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Encyclia bractensis</i>	4	Terminal	Adnado	Varios entrenudos
<i>Epidendrum stamfordianum</i>	2	Terminal	Adnado	Varios entrenudos
<i>Laelia anceps</i>	8	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Laelia rubens</i> x <i>Brassavola nodosa</i>	8	Terminal	Libre	Varios entrenudos
<i>Laelia superbiens</i>	8	Terminal	Adnado	Varios entrenudos
<i>Oerstedella caligiara</i>	4	Terminal	libre	Varios entrenudos
<i>Oncidium anthocrene</i>	2	Axilar	libre	Un entrenudo
<i>Oncidium ascendens</i>	2	Axilar	libre	Un entrenudo
<i>Oncidium maduroi</i>	2	Axilar	libre	Un entrenudo
<i>Oncidium onustum</i>	2	Axilar	libre	Un entrenudo
<i>Oncidium sphacelatum</i>	2	Axilar	libre	Un entrenudo
<i>Oncidium superbiens</i>	2	Axilar	libre	Un entrenudo
<i>Rhyncholaelia dygbiana</i>	8	Terminal	libre	Un entrenudo
<i>Rhyncholaelia glauca</i>	8	Terminal	libre	Varios entrenudos

El análisis obtenido utilizando los marcadores RAPD proporcionó resultados que no asemejan a la información obtenida a través de marcadores morfológicos y a los de otros estudios moleculares (Van der Berg, 2000). Según el dendrograma obtenido en este estudio, el grado de similitud entre especies del mismo género y subtribu es muy bajo. Además en este mismo dendrograma, especies de grupos reconocidos como distantes, aparecen muy cercanos, . Comparando con el estudio realizado por Lim (1999) con RAPD en Laeliinae, los resultados deberían presentar información que se asemeje a la clasificación ya existente basada en la morfología de la planta.

El híbrido *Laelia rubescens* x *Brassavola nodosa* presentó alta similitud (0.62) con la especie *Oncidium sphacelatum* un resultado que no coincide con la clasificación morfológica de estas dos especies. La *Laelia* y *Brassavola* pertenecen a la misma sub – tribu Laeliinae y la tribu Epidendreae, pero la *Oncidium* pertenece a la tribu Maxillarieae. Según la clasificación este híbrido debería ser similar a las especies de los géneros de la misma sub – tribu. Además el híbrido *Barkeria skinneri* x *Brassavola nodosa* mostró una similitud de 0.69 con la especie *Cattleya aurantiaca*, a pesar que existe gran diferencia en número de polinios entre las dos plantas.

El grado de similitud presente entre las especies de *Cattleya* es bajo (hasta un 0.20), un resultado inesperado debido a que son especies de un mismo género, su similitud genética debería ser alto. En el dendrograma la especie *Cattleya deckeri* muestra una similitud de 0.37 con la especie *Cattleya skinneri*, el más alto entre las especies de cattleyas. El análisis también mostró una diferencia entre las *Cattleya skinneri* y las *Rhyncholaelias* contrastando los resultados obtenidos por Van Der Berg (2000) en su estudio de la subtribu Laeliinae. Van Der Berg concluye que el género primo de las *Cattleyas* es el género de la *Rhyncholaelia*. Sin embargo, el resultado del estudio apoya lo que menciona Dressler (2003) de separar la *Cattleya skinneri* en su propio género en otro análisis molecular realizado después del estudio de Van Der Berg. El caso de la *Rhyncholaelia glauca* y *Rhyncholaelia dybiana* también muestra una leve similitud genética (0.05), pese a que son del mismo género y su diferencia morfológica es mínima. Al haber diferencias como estas obliga a revisar las muestras para determinar si las plantas están correctamente identificadas. Existe la posibilidad que las muestras se obtuvieron de plantas que no estaban correctamente identificadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, proporcionando resultados que no concuerdan con la clasificación basada en marcadores morfológicos.

Para obtener resultados con mayor precisión con los marcadores de tipo RAPD se necesita utilizar un mayor número de cebadores. Hay que tomar en cuenta que este método no es muy preciso, ya que no busca características específicas de las muestras sino que demuestra la presencia de cierta secuencia de bases en el ADN de la misma. Un cebador no necesariamente tiene que presentar polimorfismo en la muestra porque puede ser que en el ADN no hay presencia de la secuencia de bases. Es importante extraer el ADN de tejidos jóvenes. En una muestra vieja, los tejidos pueden estar linificados o el ADN deteriorado haciendo que la concentración de ADN sea muy baja y no permita una buena visualización de las bandas. Esto fue lo que ocurrió con las muestras de *Cattleya bowringiana* y *Rhyncholaelia glauca*, plantas de más de cinco años. El tejido no generó la suficiente concentración de ADN para la formación de bandas. La mayoría de los trabajos en biología

molecular en orquídeas utilizan ADN de los ribosomas y el cloroplasto, debido a que está mejor conservado. Además las técnicas que se utilizan como ser microsatélites, ITS y AFLP son más precisas porque buscan en secuencias específicas del ADN.

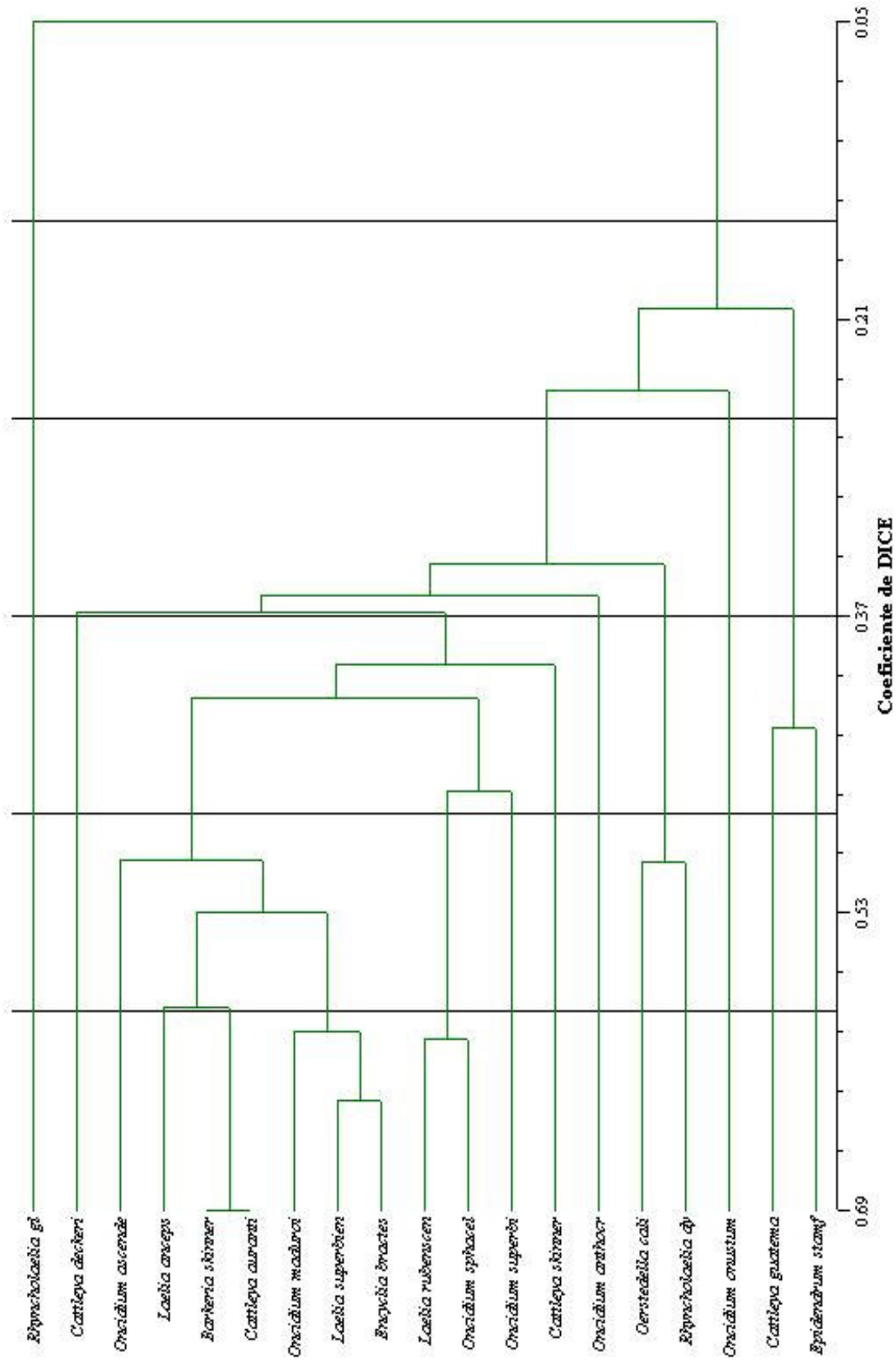


Figura 2. Dendrograma molecular (marcadores RAPD) de las especies estudiadas. Zamorano, 2003.

5. CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares de tipo RAPD mostraron ser una técnica rápida y fácil de aplicar en las 20 especies de orquídeas.

Los resultados obtenidos en el estudio con los marcadores moleculares de tipo RAPD mostraron similitudes genéticas relacionadas con la clasificación entre ciertas especies del mismo género utilizando una técnica sencilla, pero en general estos resultados no muestran la similitud genética esperada con la clasificación taxonómica.

Según los resultados obtenidos, para determinar si la técnica RAPD es una herramienta factible para definir posición taxonómica entre especies de orquídeas, se requiere medir con efectividad con un mayor número de cebadores y mejorar la toma de muestras de ADN en plantas más jóvenes.

La cantidad de ADN extraído de las plantas y errores en la identificación de las especies en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos podría ser algunos de los factores que pudieron afectar los resultados demostrados en el dendrograma.

6. RECOMENDACIONES

La utilización de un mayor número de cebadores con diferente secuencia de bases para generar una mayor cantidad de polimorfismo y así permitir definir mejor las similitudes genéticas.

El material para obtener el ADN debe provenir de tejidos jóvenes de planta (brotes de hojas nuevas) para extraer la suficiente cantidad de ADN y que las bandas sean fáciles de identificar. Además se debe investigar otro tipo de protocolos más específicos para extracción de ADN en orquídeas.

Las especies de orquídeas existentes en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos necesitan ser revisadas para definir su correcta clasificación.

Aplicar otras técnicas de marcadores moleculares más específicas que los RAPD, las cuales pueden generar mejores resultados para ser utilizados en definir posición taxonómica de las especies.

La biología molecular presenta ser una herramienta útil, es por esto que se deben continuar con los estudios relacionados a marcadores moleculares para establecer técnicas útiles que faciliten la definición taxonómica de especies.

7. BIBLIOGRAFÍA

BENNER, M. 1992. Molecular Approaches to Plant Breeding. American Orchid Society Bulletin, 61(3): pp. 250 – 253.

BRUNNELL, M.S.; WHITKUS R. 1997. RAPD Marker Variation in *Eriastrum densifolium* (Polemoniaceae): Implications for subspecific delimitation and conservation. Systematic Botany, 22(3). pp. 97 – 107.

CASTRO, A.; ROSAS, J.C.; ARANDA L. 2001. Manual del Módulo de Biotecnología. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 19p.

CORRELL, D.S.; AMES, O. 1952. Orchids of Guatemala. Fieldiana Botany. 26(1): 727p.

CHAN, M.C.; SUN, M. 1995. Application of RAPD markers for evaluation of genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis* (Orchidaceae). American Journal of Botany 82(6): 71p.

CHAN, M.C.; SUN, M. 1997. RAPD and chloroplast DNA evidence for allopolyploid speciation of *Spiranthes hongkongensis* (Orchidaceae). American Journal of Botany 84(6): 115.

CHUNG, S.Y.; YOON, K.E.; RYU, K.H.; PARK, W.M. 1996. Detection of cymbidium mosaic virus from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of the viral coat protein and 3'-noncoding region sequence. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 37: pp. 158-165.

Descripción de los Géneros y Especies de Orquídeas. Revisado en septiembre del 2003, disponible en www.orchids.org.

Descripción de *Oncidium superbiens*. Revisado en octubre del 2003, disponible en www.orchidspecies.com.

DRESSLER, R. 1990. The Orchids: Natural History and Classification. Cambridge, U.K., Harvard University Press. 332 p.

DRESSLER, R. 1993. Field Guide to the Orchids of Costa Rica and Panama. Cornell University Press. 374 p.

DRESSLER, R. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Portland, Oregon, U.S.A., Dioscorides Press. 314 p.

- DRESSLER, R.; HIGGINS, W. 2003. *Guarianthe*, a generic name for the “*Cattleya*”*skinneri* complex. *Lankesteriana*, 7: pp. 37 – 38.
- FARMER, S.B., SCHILLING E.F. 2002. Phylogenetic Analyses of Trilleaceae based on Morphological and Molecular Data. *Systematic Botany*, 27(4): pp. 674 – 692.
- GONZÁLEZ, D.; VOVIDES, A. 2002. Low Intralineaage Divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with Nuclear Ribosomal DNA ITS and Chloroplast DNA *trnL* – F Non – coding region. *Systematic Botany*, 27(4): pp. 654 – 661.
- HARDIG, T.M. 2002. Morphological and Molecular Analysis of Putative Hybrid Speciation in *Ceanothus* (Rhamnaceae). *Systematic Botany*, 27(4): pp. 734 -746.
- HIGGINS, W. 2002. DNA Fingerprinting. *American Orchid Society Bulletin*, 71(8): pp. 732 – 734.
- HAMER, F. 2001. *Flora de Nicaragua*. Missouri Botanical Garden Press. Tomo II, 85: pp. 1612 – 1860.
- LINARES, J.L. 2002. Seminario de Enfoques Prácticos de la Taxonomía Vegetal. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 86 p.
- LIM, S.H., et al. 1999. RAPD analysis of some species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 83: pp. 193 – 196. Revisado el 8 de octubre en red: aob.oupjournals.org
- NORRIS, W.; WHITTEN, M. 2003. Molecular phylogenetics and generic concepts in the *Maxillarieae* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7: pp. 61 – 62.
- POSTO, A.; PRATHER, A. 2003. The Evolutionary and Taxonomic Implications of RAPD Data on the Genetic Relationship of *Mimulus michiganensis*. *Systematic Botany*, 28(1): pp. 172 – 178.
- PRIDGEON, A.; CHASE, M. 2003. Phylogenetics of the Subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae : Orchidaceae) based on combined evidences from DNA sequences. *Lankesteriana*, 7: pp. 49 – 50.
- PRZESLAWSKI, J. 1995. Mark Chase and the Molecular Systematics Story. *American Orchid Society Bulletin*, 64(6): pp. 629 – 635.
- ROSAS, J.C. 2001. Manual del Módulo de Biodiversidad y Fitomejoramiento. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, 59 p.
- RUBIO, R. 2002. Caracterización de la diversidad genética del germoplasma hondureño de frijol común. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 72 p.

- SASTAD, S. et al. 1999. Species Delimitation and Relationship of the *Sphagnum recurvum* complex (Bryophyta) – as revealed by Isozyme and RAPD markers.
- SUN, M.; WONG, K.C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *Am. J. Bot.* 88: 2180 – 2188.
- VAN DER BERG, C. et al. 2000. A Phylogenetic Analysis of *Laeliinae* (Orchidaceae) based on Sequence Data from Internal Transcriber Spacers (ITS) of Nuclear Ribosomal DNA. *Lindleyana*, 15(2): 96 – 114.
- WONG, K.C.; SUN, M. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 86: 1406 – 1413.
- ZOMLEFER, W.B. 1994. *Guide to Flowering Plant Families*. Chapel Hill, North Carolina, United States of America, The University of North Carolina Press. pp. 293 -296.

8. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN para el análisis de RAPD Método de la Universidad de Wisconsin – Madison (UWM)

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 μ l del *buffer* de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga *ependorf* de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra (*pestle*) de *plexiglass* de laboratorio. Agregar 450 μ l adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
4. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (*pellet*).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo *ependorf* de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/ml) + buffer TE^a 0.1X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.
11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletearlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.

12. Vaciar el etanol/acetato de sodio^b y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).
15. Rehidratar los pellets agregando 100-200 µl de buffer TE 0.1X (dependiendo de su tamaño). Ayudar a disolverlos colocando los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.
16. Almacenar las muestras de ADN en un congelador a -20 °C. A partir de este paso es necesario medir la concentración de ADN (ng/ml), con el fin de preparar las diluciones necesarias para efectuar las reacciones para su amplificación.

^a Buffer TE (TRIS HCl 1 M, pH=7.5 ; EDTA 0.5 M, pH=8.0)

^b Usar acetato de sodio 3H₂O (pH 5.2, usando ácido acético glacial).

Anexo 2. Cuantificación de ADN

(Instrucciones para el uso del fluorómetro Hoefer Pharmacia Biotech Inc.)

Colocar 2 ml de *buffer* de cuantificación en una cubeta (*cuvette*) limpia y calibrar el fluorómetro a cero.

Agregar 2 µl de muestra de ADN al buffer cuantificador.

Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.

Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.

Vaciar el cubo, enjuagarlo con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

* Fluorómetro: (Hoefer) TKO-100, λ_{ex} + 365 nm, λ_{em} + 460 nm

* Buffer de cuantificación:

10 µl solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X (pH=7.4)

Anexo 3. Dilución de ADN (4 ng/ml) Método de la Universidad Wisconsin – Madison (UWM)

1. Agregar 100 μ l de *buffer* TE 0.1 X + Tartrazine en tubos eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído de tejido, estimado mediante la fórmula $V_i = 400 / C_i - 4$.
3. Diluir las muestra en platos de 96 celdas con fondo redondeado (Microplate TM96, Polypropylene, MJ Research, INC.). Cubrir las celdas del plato con tapa selladora, y almacenarlo en el congelador (o refrigerador si se va a usar en los siguientes días). Guardar el resto de ADN en el congelador.

Anexo 4. Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) usando cebadores tipo RAPD

1. Descongelar el ADN a temperatura ambiente del plato con las muestras diluidas de ADN (4 ng/ μ l) guardados en el refrigerador.
2. Preparar la mezcla maestra de acuerdo a los volúmenes de agua, *buffer* 5X, cebador (*primer*), dNTPs y *Taq* polimerasa especificados en el cuadro anexo.
3. Colocar 10 μ l de la mezcla maestra por cada celda en platos con fondo V. Agregar 10 μ l de ADN de cada muestra.
4. Colocar el plato en el termociclador y sellarlo con papel plástico para platos de 96 celdas (Microseal TM “A” Film) antes de cerrar la tapa.
5. Realizar la amplificación usando el perfil térmico para RAPDs (UW-Madison).
6. Una vez finalizadas las reacciones PCR, guardar los platos con las muestras en el refrigerador hasta proceder a la electroforesis.

Cuadro 1. Mezcla de reacción para amplificar marcadores moleculares tipo RAPDs.

Componente	1 reacción (μ l)	X reacciones (μ l)
Agua	4.44	
Buffer (5 X)	4.40	
dNTPs (10 mM c/u) + Mg Cl ₂	0.80	
Cebador (10 μ M)	0.80	
<i>Taq</i> -polimerasa (5U/ μ l)	0.70	
ADN (4ng/ml)	10.00	
Volumen final	20.00	

Anexo 5. Electroforesis de ADN

Preparación de geles (gelatinas) al 1% de agarosa

1. Agregar 170 ml de buffer TBE 0.5X + 1.7 g de agarosa en un Erlenmeyer, para bandejas de 22 orificios; ó 320 ml de buffer TBE 0.5X + 3.2 g de agarosa, para bandejas de 44 orificios.
2. Colocar el Erlenmeyer (con uno más pequeño invertido en su boca) en un horno microondas por 3 min. Retirar el erlenmeyer, agitarlo levemente y colocarlo de nuevo en el horno microondas por 1 min. (*usar guantes resistentes al calor*).
3. Retirar el Erlenmeyer del microondas y colocarlo en una bandeja con agua para enfriar la mezcla de agarosa/TBE buffer. Verificar la temperatura introduciendo un termómetro en el erlenmeyer.
4. Cuando la temperatura baje a 60 °C, agregar 2 µl de bromuro de etidio (170 ml para 22 orificios ó 320 ml para 44 orificios), y vaciar la solución de agarosa y buffer TBE en una bandeja de electroforesis para correr muestras. Colocar los peines de inmediato y dejar solidificar por 30-40 minutos.

* Agarosa de pureza normal gelatiniza a 36-42 °C.

* Buffer TBE (Trisborate), ver guía de preparación de reactivos y enzimas.

* Para detalles del porcentaje de agarosa, revisar manuales; éste varía de acuerdo a las características de las muestras (ADN, proteínas, etc.), el tamaño del gel, el equipo de electroforesis y otros factores.

Electroforesis

1. Colocar 20 µl de cada muestra de ADN amplificado en cada orificio del gel.
2. Dejar correr las muestras en el aparato de electroforesis por una hora a ~140 V
3. Transferir la gelatina al transiluminador, usando guantes de latex desechables.
4. Revisar el nivel de tinción de las bandas en el transiluminador de luz UV.
5. Fotografiar las gelatinas.

* El bromuro de etidio es altamente cancerígeno.

* Proteger los ojos y piel de los rayos UV, usando el equipo apropiado al visualizar y fotografiar la gel en el transiluminador.

* Para detalles del voltaje y tiempo de la electroforesis, revisar manuales. Estos varían de acuerdo al tamaño del gel, el equipo de electroforesis, la estabilidad del voltaje y otros factores.

Anexo 6. Historia de la Clasificación de Orquídeas.

Fuente: Adaptado de Dressler, 1993.

History

Carl van Linné (Linnaeus) 1707-1778

- 1753: *Species Plantarum* - 8 genera & 69 species. 2nd ed. - 102 spp.
- All epiphytes assigned to *Epidendrum*.
- No family designation.

Antoine Laurent de Jussieu (1748-1836)

- Family concept.
- Plants divided into 3 groups: Acotyledons, Monocotyledans, Dicotyledons.
- *Orchideae* in *Genera Plantarum* (1789).

Olaf Swartz (1760-1818): 1st orchid specialist.

- First to recognize division between monandrous and diandrous orchids.

John Lindley (1799-1865): father of modern orchid classification.

- 1830-1840: *Genera and Species of Orchidaceous Plants*
- Described ~2000 taxa.
- Recognized monandrous and diandrous groups, split into 7 tribes.
- Started the serial *Gardeners Chronicle* (1841) in which many orchids were described.

Heinrich Gustav Reichenbach (1824-1889)

- Leading European orchid authority after Lindley's death.
- His classification system not used, however.

George Bentham (1800-1884) - 1st influential system of orchid classification (amplification of Lindley's tribes).

Modern Classification Systems

Friedrich Richard Rudolf Schlechter (1926)

- 2 subfamilies: *Cypripedioideae* and *Orchidoideae* (*Apostasiaceae* as separate family)

Leslie A. Garay (b. 1924) - Harvard University.

Robert L. Dressler (b. 1927) - Smithsonian, now Florida State Museum.

Garay's System - Five subfamilies: *Apostasioideae**Cypripedioideae**Orchidoideae**Neottioideae**Epidendroideae*

Dressler's System (1982, 1994)

- Divided *Orchidaceae* into 6 (later 5) subfamilies and 21 tribes.
- Most primitive orchids: *Apostasioideae* (3 anthers)
- *Cypripedioideae* - 2 anthers
- *Spiranthoideae*
- *Orchidoideae*

- Epidendroideae (Vandoideae: now included in Epidendroideae.)

Dressler's System

- Epidendroideae most divergent.

o Vandoids:

Anther incumbent from very early stages of development.

Pollinia 2-4 with reduced caudicles and always with viscidium.

- Dressler also places Neottiodeae in the Orchidoideae and segregates Spiranthoideae from the former.

Subfamilies According to Dressler (1994)

Apostasioideae - sometime considered distinct family.

- Terrestrial.
- Stamens 2-3.
- Anther on filament (long or short).
- Stigma terminal with 3 lobes.
- No rostellum.
- No pollinia.
- Pollen in single grains.
- Ovary with 3 locules, axile placentation.
- Neuwiedia has fleshy fruits.
- Seed coat thick and opaque.
- Genera: Apostasia, Neuwiedia, both terrestrials of forest understory, 20 spp. Tropical Asia, Australia.
- $2n = 48$.

Cypripedioideae - Slipper orchids

- Most terrestrial.
- Velamen lacking or simple.
- Pouch shaped labellum.
- 2 fertile anthers.
- Anthers on short filament.
- Staminode.
- Terminal 3-lobed stigma.
- No rostellum.
- No pollinia (except some Phragmipedium).
- Pollen in monads.
- Ovary with 1-3 locules, axile or parietal placentation.
- Seed coat thick or transparent and wing-shaped.
- 4 genera: Paphiopedilum, Phragmipedium, Cypripedium, Selenipedium (only one with 3-locular ovary).

Spiranthoideae: 3 tribes Tropicidae (Pantropical), Cranichidae (widespread but esp. tropical Asia), Diceratostealeae (West Africa).

- Terrestrial, epiphytic (some parasites).
- 1 anther, anther base near or below base of stigma.
- Rostellum present, terminal viscidium.
- Pollinia powdery or waxy.

- Pollen usually in tetrads.
- Usually 1 locule in ovary, parietal placentation.
- Usually transparent wing-shaped testa.

Orchidoideae: 3 tribes (Diurideae - mostly Australasia, Orchideae - widespread, Diseae - mostly African)

- Terrestrial (some parasitic).
- Soft, herbaceous leaves.
- Root/stem tuberoids.
- 1 fertile anther.
- Rostellum present.
- Pollinia present, powdery.
- Pollen in tetrads.
- Ovary with 1 locule, parietal placentation.
- Seed with transparent, wing-shaped testa.

Orchidoideae: Diurideae

Orchidoideae: Orchideae

Orchidoideae: Diseae

Subfamilies According to Dressler (1994)

Epidendroideae: 15 tribes

- Leaves spirally arranged or distichous.
- Epiphytic, terrestrial (some parasites).
- 1 anther.
- Anther terminal, but bent downward during development (incumbent) so it is at right angle to column axis or pointed backward in many (most) genera.
- Stigma: entire or 3-lobed; sometimes with viscidium.
- Rostellum.
- Pollinia with or without caudicle and viscidium.
- Pollinia soft and mealy or hard (2,4,6, or 8(12)).
- Pollen in tetrads.
- 1 locule in ovary.
- Transparent seed coat.

Subfamilies - Dressler (1994)

Primitive monandrous orchids (allied with Epidendroideae) with soft pollinia.

- Gastrodieae: saprophytes, 10 genera, worldwide tropics, Eurasia.
- Triphoreae: 3 genera, America, terrestrial or saprophytic.
- Nervilieae: 1 genus, *Nervilia*, terrestrial (Old World tropics).
- Palmorchideae: 1 genus, terrestrial (tropical America).
- Vanilleae: 10 genera, terrestrial or saprophytic, some vines or even shrubs, pantropical.
- Neottieae: 6 genera, terrestrial or saprophytic, mostly Northern Hemisphere.

Primitive monandrous orchids (of uncertain affinity) with soft pollinia.

- Pogoniinae: 5 genera, America and eastern Asia, terrestrial or saprophytic.

The Advanced Tribes of the Epidendroideae (sensu Dressler) = genera of greatest horticultural importance.

Dressler recognizes two main lineages: the “Cymbidoid phylad” and the “Epidendroid phylad.”

Unfortunately, the separation is not terribly discrete.

“Cymbidoid phylad”

- Calypsoeae
- Malaxideae
- Maxillarieae
- Cymbidieae

Calypsoeae

- 9 genera, North temperate and subtropical.
- Terrestrial or saprophytic.
- 4 pollinia, distinct viscidium and stipe.

Malaxideae

- 6 genera, world-wide.
- Terrestrial or epiphytic.
- “Naked” pollinia (though many species have tiny viscidium), no caudicle.

Maxillarieae

- Entirely American
- Virtually all of the American genera with a stipe and viscidium
- 8 subtribes, the most important being:
 - o Oncidiinae (77 genera), largest and most advanced.
 - o Stanhopeinae (22 genera).
 - o Lycastinae (8 genera).
 - o Maxillariinae (8 genera).
 - o Zygopetalinae (30 genera).
 - o Cymbidieae: 2-4 pollinia
- 7 subtribes, the most important being:
 - o Eulophiinae: 6 genera, pantropical but mostly Old World.
 - o Cyrtopodiinae: 12 genera, pantropical but mostly Old World.
 - o Catasetinae: 5 genera, tropical America, all pollinated by male Euglossine bees, mostly unisexual flowers.

“Epidendroid phylad”

8 pollinia (but reduced in many groups), distinct seed types.

- Arethuseae
- Coelogyneae
- Epidendreae
- Podochileae
- Dendrobieae
- Vandeae

Arethuseae

3 subtribes:

- Arethusinae: 2 genera, terrestrial with fleshy corm, temperate Asia and North America
- Blettiinae: 21 genera, pantropical, temperate Asia and North America
- Chysiinae: 1 genus, Tropical America

Coelogyneae

- Pollinia with massive caudicles, Dendrobium seed type.

Epidendreae I (New World)

- Six subtribes:
 - o Sobraliinae
 - o Arpophyllinae: 1 genus.
 - o Meiracylliinae: 1 genus.
 - o Coeliinae: 1 genus.
 - o Laeliinae
 - o Pleurothallidinae

Sobraliinae: 8 soft pollinia

Laeliinae: 43 genera, prominent caudicles.

Pleurothallidinae: 28 genera

Epidendreae II (Old World)

3 tribes:

- Glomerinae: 7 genera, tropical Asia and Australasia.
- Adrorhizinae: 2 genera, Tropical Asia (India, Ceylon).
- Polystachyinae: 4 genera, pantropical but primarily Africa.

The “Dendrobioid Subclade” (the Vandoid orchids)

Spherical silica bodies in cells.

- 3 tribes:
 - o Podochileae.
 - o Dendrobieae.
 - o Vandeae.

Podochileae

4 subtribes:

- Eriinae: 10 genera, tropical Asia and Australasia, 1 genus in Africa.
- Podochilinae: 6 genera, tropical Asia and Australasia.
- Thelasiinae: 6 genera, tropical Asia and Australasia.
- Ridleyellinae: 1 monotypic genus Australia and New Guinea.

Dendrobieae

Naked pollinia without caudicles, prominent column foot, seed type.

- 2 subtribes:
 - o Dendrobiinae: 6 genera, Tropical Asia and Australasia.
 - o Bulbophyllinae: 10-15 genera, pantropical, but especially Old World.

Vandeae

- Monopodial, many with reed stem habit.

- Complex pollinaria.
- 3 subtribes:
 - o Aeridinae: 103 genera, mainly tropical Asia and Australasia; 2-4 pollinia.
 - o Angraecinae: 19 genera, Africa (esp. Madagascar), a few in tropical America, 1 species in Sri Lanka; 2 pollinia, deeply divided rostellum, each division typically with its own viscidium; moth pollination.
 - o Aerangidinae: 36 genera, tropical Africa; 2 pollinia, narrow, beak-like rostellum, moth pollination.