

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Hibridación natural y relaciones genéticas entre  
Lycaste cochleata, L. cruenta y L. suaveolens (Orchidaceae)  
en Guatemala

Trabajo de graduación presentado por Mayra Lisseth Maldonado Montúfar para optar al  
grado académico de Licenciado en Biología



Guatemala  
2001





UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

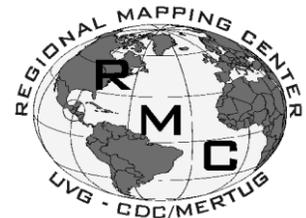


Hibridación natural y relaciones genéticas entre  
Lycaste cochleata, L. cruenta y L. suaveolens (Orchidaceae)  
en Guatemala

Trabajo de graduación presentado por Mayra Lisseth Maldonado Montúfar para optar al  
grado académico de Licenciado en Biología



Guatemala  
2001



Vo. Bo.



---

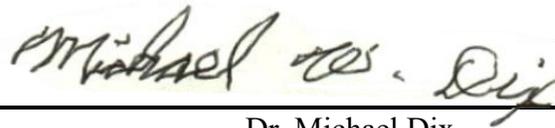
Dra. Margaret Dix

Tribunal examinador:



---

Dra. Margaret Dix



---

Dr. Michael Dix



---

Licda. Margarita Palmieri

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 23 de octubre de 2001

## **PREFACIO**

Muy especialmente agradezco a los Drs. Michael y Margaret Dix y Licda. Margarita Palmieri por su apoyo durante la elaboración de las diferentes etapas de este trabajo.

Gracias a los doctores Michael Arnold, por su colaboración desde el muestreo preliminar y subsecuente ayuda; Henry Oakeley, por ayudar a confirmar la identificación de las especies y su apoyo para animarme a dibujar y describir las diferencias entre los híbridos naturales. Thomas Sheehann, Lee S. Cooke, Pamela Giust, Jeffrey Palmer, Mark Whitten y David Winkle quienes han mandado sus valiosos comentarios y sugerencias.

A los Drs. Silvana Maselli y Álvaro Molina por su ayuda en la parte molecular, muchas gracias.

También a los Drs. Jack Schuster y Charles MacVean por sus revisiones y ayuda en la parte estadística.

A mis amigos, gracias, en especial a Gerda Huertas por sus revisiones y consejos para mejorar y terminar este trabajo.

A mi familia gracias por su apoyo incondicional.

A todas las personas que contribuyeron con flores de sus viajes de campo o con muestras de sus plantas, gracias.

Este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo sin el financiamiento de la Sociedad Americana de Orquideología (American Orchid Society, AOS), las licencias de colecta e investigación del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP), ni el apoyo de la Universidad del Valle de Guatemala y del Centro Regional de Mapeo de la Unidad Guatemala de Investigación y Entrenamiento en Entomología Médica (Regional Mapping Center, Medical Entomology Research and Training Unit - Guatemala, MERTU-G).

PARA LINETH  
*IN MEMORIAM*

## ÍNDICE

PREFACIO .....	v
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
A. Orquídeas del género <u>Lycaste</u> , sección Deciduosae, subsección Xanthanthae .....	1
B. Fenología .....	3
C. Polinización .....	6
D. Importancia de la hibridación natural.....	8
1. Análisis morfológico .....	9
2. Análisis genético .....	11
E. Biogeografía .....	17
F. Justificación.....	21
G. Objetivos.....	22
1. Objetivo general .....	22
2. Objetivos específicos.....	22
II. METODOLOGÍA.....	23
A. Muestreo .....	23
B. Polinización .....	24
C. Análisis morfológico .....	27
D. Análisis genético .....	38
E. Cladograma.....	39
F. Análisis geográfico de distribución de las especies .....	40
III. RESULTADOS.....	41
A. Muestreo .....	41
B. Polinización .....	45
C. Análisis morfológico .....	52
1. t de Student pareada .....	54
2. Moda de los caracteres discontinuos .....	56
3. Análisis discriminante .....	57
4. Conteo de caracteres.....	62
5. Análisis de componentes principales .....	64
6. Clave dicotómica.....	70
D. Análisis genético .....	73
E. Cladograma.....	75

F. Análisis geográfico de distribución de las especies .....	76
IV. DISCUSIÓN .....	77
A. Muestreo .....	77
B. Polinización .....	79
C. Análisis morfológico .....	83
1. Características florales importantes para descripción de especies .....	83
2. Posible origen de los híbridos .....	85
3. Clave dicotómica .....	87
4. Híbridos naturales descritos .....	88
5. Identificación de especímenes nuevos .....	89
D. Análisis genético .....	90
E. Cladograma.....	90
F. Análisis geográfico de distribución de las especies .....	91
V. CONCLUSIONES .....	96
VI. RECOMENDACIONES.....	99
VII. LITERATURA CITADA .....	101
VIII. ANEXOS .....	117
Anexo A. Características morfológicas de <u>Lycaste cochleata</u> , <u>L. cruenta</u> , <u>L. suaveolens</u> , <u>L. aromatica</u> , <u>L. consobrina</u> y <u>L. bradeorum</u> (sect. <u>Deciduosae</u> , subsect. <u>Xanthanthae</u> ), presentes en Mesoamérica, según descripciones taxonómicas y localidades reportadas.....	118
Anexo B. Métodos de análisis de ADN.....	121
A. Extracción de ADN total .....	121
1. Método de Edwards, Johnstone y Thompson (1991).....	121
2. Método de Doyle y Doyle (1990).....	122
B. Medición por fluorimetría de la concentración de ADN total.....	122
C. Amplificación por PCR.....	123
D. Visualización de fragmentos obtenidos.....	124
1. Electroforesis en gel de agarosa .....	124
2. Revelado.....	125
Anexo C. Flores en líquido usadas para determinar características morfológicas, encontradas en Herbario de Orquídeas, Departamento de Biología, UVG. ....	126
Anexo D. Plantas código “G”, de las que se obtuvo material foliar, incluye localidades de origen y las localidades visitadas durante los viajes de campo, entre 1996 y 1999.....	131
Anexo E. Glosario.....	133

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Posible haplotipo del gen <i>ndhF</i> para <i>Lycastes</i> amarillas y su distribución por localidad en el estudio preliminar. ....	17
Cuadro 2. Cruces realizados entre las flores de <i>Lycaste</i> de la sect. <i>Deciduosae</i> , subsect. <i>Xanthanthae</i> , en invernaderos de la UVG.....	25
Cuadro 3. Datos continuos medidos (en mm) en flores de varias especies de <i>Lycaste</i> ....	28
Cuadro 4. Caracteres (datos discontinuos) analizados, y sus respectivas series de notación transformada, utilizados en el análisis morfológico de flores de <i>Lycaste spp.</i> .....	30
Cuadro 5. Distribución de especies en poblaciones simpátricas de <i>Lycaste</i> . ....	42
Cuadro 6. Resultados de la polinización cruzada entre <i>Lycaste cochleata</i> , <i>L. cruenta</i> , <i>L. suaveolens</i> y sus híbridos putativos. ....	45
Cuadro 7. Resultados de autopolinización de flores de <i>Lycaste spp.</i> .....	47
Cuadro 8. Posible ordenación de las barreras para la fecundación por especie de <i>Lycaste</i> y en híbridos naturales. ....	48
Cuadro 9. Media y desviación estándar (DE) e intervalo de los valores (todos en mm) para los caracteres continuos medidos en <i>Lycaste cruenta</i> , <i>L. cochleata</i> , <i>L. suaveolens</i> , <i>L. sulfurea</i> e híbridos. ....	53
Cuadro 10. Prueba de t de Student pareada para las especies de <i>Lycastes</i> amarillas presentes en el país. ....	55
Cuadro 11. Características discontinuas más representativas (moda mayor o igual al 55%) de especies de <i>Lycastes</i> amarillas (n= 252). ....	57
Cuadro 12. Clasificación <i>a priori</i> y predicciones de la función discriminante para flores de <i>Lycaste</i> sect. <i>Deciduosae</i> , subsect. <i>Xanthanthae</i> en Guatemala. ....	58
Cuadro 13. Conteo de caracteres intermedios (en mm) para flores de <i>Lycaste cruenta</i> , <i>L. suaveolens</i> y los híbridos de la localidad de Zacapa (n=72).....	62
Cuadro 14. Conteo de caracteres intermedios (en mm) para flores de <i>Lycaste cochleata</i> , <i>L. suaveolens</i> e híbridos de la localidad de Chiquimula (n=25). ....	63
Cuadro 15. Conteo de caracteres intermedios (en mm) para flores de <i>Lycaste sulfurea</i> , <i>L. suaveolens</i> e híbridos de la localidad de Jutiapa (n=18).....	64
Cuadro 16. Análisis de componentes principales de los caracteres discretos de las flores de <i>Lycaste spp.</i> medidas. ....	65

Cuadro 17. Análisis de componentes principales de los caracteres discontinuos de las flores de <u>Lycaste</u> spp. medidas. ....	67
Cuadro 18. Análisis de componentes principales de todos los caracteres medidos de las flores de <u>Lycaste</u> spp. medidas. ....	68
Cuadro 19. Posible haplotipo del gen <i>ndhF</i> para <u>Lycastes</u> amarillas y su distribución por localidad. ....	74
Cuadro 20. Comparación entre características (medidas en mm) de híbridos naturales, descritos para Guatemala, y las obtenidas para <u>L. sulfurea</u> y <u>L. cruenta</u> en el presente estudio. ....	88
Cuadro 21. Características morfológicas basadas en descripciones taxonómicas de <u>Lycaste cochleata</u> , <u>L. cruenta</u> , <u>L. suaveolens</u> , <u>L. aromatica</u> , <u>L. consobrina</u> , <u>L. sulphurea</u> y <u>L. bradeorum</u> .....	118

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización de genes en el ADN cloroplásmico de <u>Oncidium excavatum</u> Lindl. .....	13
Figura 2. Detalle de los cladogramas de similitud de <u>Lycaste spp.</u> , donde se incluyen especies con flores amarillas.....	14
Figura 3. Reconstrucción de la distribución de bosques y nivel del mar en Centroamérica durante la última glaciación, entre 20,000 y cerca de 10.500 años antes del presente. .....	18
Figura 4. Bosques montanos actuales. ....	18
Figura 5. Distribución actual de la vegetación en Guatemala. ....	19
Figura 6. Ecorregiones en Guatemala.....	20
Figura 7. Callosidad que cierra el estigma en <u>Lycaste</u> después de su polinización.....	26
Figura 8. Partes de la flor y posición de los lugares de medición de caracteres en <u>Lycaste cochleata</u> . ....	29
Figura 9. Formas de apertura del labelo visto desde el frente de la flor en especies de <u>Lycaste</u> . ....	31
Figura 10. Forma de la base del labelo hasta el inicio de los lóbulos medio y laterales en especies de <u>Lycaste</u> . ....	31
Figura 11. Formas del mentón y de la indentación del labelo en especies de <u>Lycaste</u> . ....	32
Figura 12. Posibles formas de los tricomas en las partes florales de <u>Lycaste spp.</u> .....	33
Figura 13. Forma de la vista frontal y ápice del callo en <u>Lycaste spp.</u> .....	34
Figura 14. Posibles formas de los lóbulos laterales del labelo en vista lateral de flores de <u>Lycaste spp.</u> .....	35
Figura 15. Posible posición de los sépalos en relación con el resto de la flor en <u>Lycaste spp.</u> .....	36
Figura 16. Localización aproximada de los cebadores usados para la caracterización del gen <i>ndhF</i> , utilizado para el análisis de especies de <u>Lycaste</u> . ....	39
Figura 17. Período de floración de <u>Lycaste spp.</u> y datos climáticos de los años de toma de datos. ....	44
Figura 18. Comparación y regresión lineal entre el largo de las columnas de ambos padres, en fertilización artificial de <u>Lycaste spp.</u> ....	49

Figura 19. Comparación y regresión lineal, por especie madre, entre el largo y el ancho de las cápsulas formadas (n=90), después de la polinización artificial de <i>Lycaste spp.</i>	49
Figura 20. Comparación y regresión lineal entre el largo del ovario de la flor madre y el largo que alcanzó la cápsula, en fertilización artificial de <i>Lycaste spp.</i>	50
Figura 21. Comparación y regresión lineal entre el largo de la columna de la flor padre y el largo alcanzado por la cápsula, en fertilización artificial de <i>Lycaste spp.</i>	51
Figura 22. Comparación y regresión lineal entre el largo de la columna de la flor padre y el ancho alcanzado por la cápsula, en fertilización artificial de <i>Lycaste spp.</i>	51
Figura 23. Largo promedio, máximo y mínimo de las columnas de flores donadoras de polinias que formaron cápsula en <i>Lycaste cochleata</i> , <i>L. cruenta</i> , <i>L. suaveolens</i> e híbridos naturales.	52
Figura 24. Análisis discriminante de 50 caracteres morfométricos en flores de <i>Lycaste cruenta</i> , <i>L. cochleata</i> , <i>L. suaveolens</i> y <i>L. sulfurea</i> .	59
Figura 25. Análisis discriminante de 50 caracteres morfométricos en flores de <i>Lycaste cruenta</i> , <i>L. cochleata</i> , <i>L. suaveolens</i> , <i>L. sulfurea</i> y los híbridos putativos.	60
Figura 26. Análisis discriminante entre individuos de <i>Lycaste bradeorum</i> y <i>L. consobrina</i> encontrados en Guatemala y especímenes de otros países y <i>L. cochleata</i> y <i>L. suaveolens</i> de poblaciones guatemaltecas.	61
Figura 27. Comparación entre flores de <i>Lycaste sulfurea</i> y <i>L. cruenta</i> .	71
Figura 28. Vistas frontal y lateral de flores típicas de <i>Lycaste</i> .	72
Figura 29. Posibles haplotipos en el gen <i>ndhF</i> de <i>Lycaste spp.</i>	73
Figura 30. Cladograma de disimilitud entre especies de <i>Lycaste</i> .	75
Figura 31. Mapa de Guatemala que presenta la distribución geográfica de los haplotipos del gen <i>ndhF</i> y las posibles regiones a encontrar, basadas en los caracteres morfológicos para especies de <i>Lycaste</i> amarillas.	76

## RESUMEN

Se estudió la distribución de Lycaste cochleata, L. cruenta, L. suaveolens y sus posibles híbridos (dentro de la subsección Xanthanthae) en Zacapa, Chiquimula, Huehuetenango, Jutiapa (poblaciones simpátricas), Suchitepéquez e Izabal (poblaciones alopátricas). Las épocas de floración se traslapan entre estas especies de flores amarillas, lo que facilita la hibridación natural y ocasiona problemas de identificación en zonas de contacto interespecífico.

En el jardín botánico de la Universidad del Valle de Guatemala se condujeron experimentos de polinización para confirmar barreras precigóticas entre las especies y sus híbridos naturales. Se polinizaron 247 flores, obteniendo un porcentaje de fecundación total de 33%. Los híbridos produjeron más cápsulas (47%), y L. cochleata y L. suaveolens produjeron menos (29%).

Se analizaron 50 caracteres morfométricos de 283 flores de Lycaste. Las especies de L. cochleata, L. suaveolens, L. cruenta, L. sulfurea, L. consobrina, L. aromatica y L. bradeorum (sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae), forman un grupo en el cladograma. L. dowiana y L. macrophylla subs. xanthocheila, (sect. Macrophyllae) forman un segundo grupo. Las especies L. lasioglossa, L. deppei (sect. Deciduosae), y L. skinneri (sect. Macrophyllae) son las especies con mayor diferencia morfológica dentro de las Lycaste de Guatemala. Los caracteres más útiles para identificar entre especies de lycastes con flores amarillas son la proporción de largo y ancho de la columna, y el ancho de la indentación del mentón del labelo. El análisis de factores principales agrupa caracteres relacionados con el aterrizaje de abejas polinizadoras. El análisis discriminante, ayuda a separar grupos de datos muy parecidos, apoya la presencia de caracteres similares a los de L. suaveolens en los híbridos haciéndola uno de los posibles padres. Las especies con características más parecidas, y por lo mismo más difíciles de identificar, son L. suaveolens, L. cochleata, L.

bradeorum, L. consobrina y los posibles híbridos entre las mismas. Los híbridos naturales encontrados presentan características nuevas, intermedias con las de los posibles padres. En Zacapa, fue confirmada la presencia de híbridos entre L. suaveolens y L. cruenta. En las otras poblaciones muestreadas no fue posible confirmar las posibles especies padres de los híbridos por falta de material floral. Basados en los resultados morfológicos obtenidos se expone una clave dicotómica para la identificación de flores de plantas del género Lycaste de la sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae.

Se encontraron dos posibles haplotipos para el gen *ndhF* de los cloroplastos. L. cochleata presenta un haplotipo de 1,700 pares de bases (pb) y L. cruenta de 1,500pb. En poblaciones simpátricas se encontraron ambos tamaños del fragmento. L. suaveolens puede presentar cualquiera de los dos haplotipos. L. sulfurea solo presenta el haplotipo de 1,700pb.

L. sulfurea es una especie diferente de L. cruenta, esto es apoyado por el análisis discriminante y el cladograma obtenido para todas las especies. Se necesita nuevo material floral y foliar de poblaciones simpátricas y con híbridos de L. cochleata y L. cruenta para continuar con los análisis iniciados en esta investigación.

Basados en los caracteres morfológicos en Guatemala, separamos una comunidad en la costa sur y Huehuetenango, y otra que agrupa las poblaciones del norte y de las sierras orientales. Las poblaciones más variables fueron las del oriente del país donde se pueden encontrar hábitats ambas vertientes, Pacífico y Atlántico. Las poblaciones que requieren mayor protección por su diversidad son las de Huehuetenango, Jutiapa y Chiquimula.

## ABSTRACT

The distribution of Lycaste cochleata, L. cruenta, L. suaveolens and their possible hybrids (within the subsection Xanthanthae) in sympatric populations from Zacapa, Chiquimula, Huehuetenango, Jutiapa, and in allopatric populations from Suchitepéquez and Izabal, was studied. Flowering seasons overlap between these yellow flowered species, which facilitates natural hybridization and causes identification problems in areas of interspecific contact.

Pollination experiments were conducted at the botanical garden of the Universidad del Valle de Guatemala, to confirm pre-zygotic barriers between the species and their natural hybrids. 247 flowers were pollinated, obtaining a total fertilization percentage of 33%. Hybrids produced more capsules (47%), and L. cochleata and L. suaveolens produced fewer (29%).

50 morphometric characters from 283 Lycaste flowers were analyzed. The species of L. cochleata, L. suaveolens, L. cruenta, L. sulfurea, L. consobrina, L. aromatica and L. bradeorum (sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae), form a group in the cladogram. L. dowiana and L. macrophylla *subs. xanthocheila*, (sect. Macrophyllae) form a second group. The species L. lasioglossa, L. deppei (sect. Deciduosae), and L. skinneri (sect. Macrophyllae) are the species with the greatest morphological difference within the Lycaste of Guatemala. The most useful characters to identify between species with yellow flower lycastes are the proportion of length and width of the column, and the width of the indentation at the mentum of the labellum. The principal component analysis factors groups characters related to the landing site of pollinating bees. Discriminant analysis, which helps to separate very similar data sets, supports the presence of characters kin to those of L. suaveolens in hybrids, making it one of the possible parents. The species with the most

similar characteristics, and therefore more difficult to identify, are L. suaveolens, L. cochleata, L. bradeorum, L. consobrina and their possible hybrids. The natural hybrids found, show new characteristics, intermediate with those of the possible parents. In Zacapa, the presence of hybrids between L. suaveolens and L. cruenta was confirmed. In the other sampled populations, it was not possible to confirm the possible parent species of the hybrids due to lack of floral material. Based on the morphological results obtained, a dichotomous key for the identification of floral specimens of the genus Lycaste of the sect Deciduosae, subsect. Xanthanthae is presented.

Two haplotypes were found for the *ndhF* chloroplast gene. L. cochleata has a haplotype of 1,700 base pairs (bp) and L. cruenta of 1,500bp. In sympatric populations, both sizes of the fragment were found. L. suaveolens can have either haplotype. L. sulfurea only has the haplotype of 1,700bp.

L. sulfurea is a distinct species from L. cruenta, supported by the discriminant analysis and cladogram obtained for all species. New floral and foliar material from sympatric populations and hybrids of L. cochleata and L. cruenta is needed to continue with the analyses initiated in this research.

Based on morphological characters, in Guatemala, we separate a community on the south coast and Huehuetenango, and another that groups the populations of the north and the eastern mountains. The most variable populations were those in the east of the country, where habitats from both, Pacific and Atlantic slopes, can be found. The populations that require greater protection due to their diversity are those of Huehuetenango, Jutiapa, and Chiquimula.

# I. INTRODUCCIÓN

## A. Orquídeas del género Lycaste, sección Deciduosae, subsección Xanthanthae

Las plantas poco comunes en la naturaleza están pobremente representadas en la literatura científica. Consecuentemente, los biólogos en conservación tienen que hacer inferencias y extrapolaciones si están interesados en trabajar con estos grupos. Estas inferencias se basan en características generales del desarrollo de grupos de plantas cultivadas relacionadas evolutivamente, pero que muestran variación genética estadísticamente significativa (Center for Plant Conservation 1991).

Guatemala tiene más de 700 especies de orquídeas (Dix y Dix 2000). La temperatura y humedad son factores esenciales que controlan la distribución y supervivencia de orquídeas en zonas tropicales y templadas, como las de Guatemala. La mayoría de las especies son epífitas o litófitas en laderas moderadamente frías. Son más abundantes entre elevaciones que van desde los 800 hasta los 1,600 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.) en bosques húmedos (Ames y Correll 1953; Dix *et al.* 1998; Dix y Dix 2001).

Entre los géneros más vistosos y apreciados, por los horticultores y orquideólogos, está el género Lycaste Lindl., en el cual se encuentra la Monja Blanca (Lycaste skinneri var. alba Dombraïn), la Flor Nacional de Guatemala. El género Lycaste está conformado por unas 25 especies que se encuentran desde México hasta Sudamérica (Oakeley 1993). Estas especies son fácilmente cultivables y por su variedad de colores están representadas en híbridos en la horticultura desde inicios de los 1800's (Jameson 1826; Hooker 1827;

Lindley 1836; Paxton 1836; Morel 1855; Donnell-Smith 1889, 1903, 1905; Rolfe y Hurst 1909; Schlechter 1918; Ames y Correll 1953; Oakeley 1991c y 1993). Este interés horticultural hace que las poblaciones naturales estén en grave riesgo de desaparecer por la colecta desmedida. Además, la pérdida de hábitat por incendios y cambio del uso de la tierra por ganadería y agricultura son otras de sus amenazas. Aunque son plantas perennes, las plantas productoras de semilla, tardan entre 8 y 10 años desde la siembra hasta la floración (Larson 1992, Zotz 1995, Winkler y Hietz 2001), mientras que los individuos jóvenes toleran estos cambios por pocos años y pone a las poblaciones en peligro (Oakeley 1991a).

Este género es representado por al menos 11 especies en Guatemala. Mesoamérica es el centro de radiación evolutiva de las especies con flores amarillas de la sección (sect.) *Deciduosae*, subsección (subsect.) *Xanthanthae*, Fowlie 1970 (Behar y Tinschert 1998; Dix y Dix 1992; Oakeley 1993). Los híbridos naturales son frecuentes en esta subsect. y los enjambres de híbridos putativos entre *Lycaste cruenta* Lindl., *L. cochleata* Lindl. y *L. suaveolens* Summerh. son encontrados en zonas montañosas a elevaciones entre 800 y 1,800 m s.n.m. Las *Lycaste* amarillas pueden ser terrestres, litófitas o epífitas, y se encuentran en hábitats con zonas de traslape interespecífico de rápido cambio ecológico y altitudinal en distancias relativamente cortas (Dix y Dix 1992). Por ejemplo, en la Reserva de la Biosfera Sierra de las Minas, Zacapa, se pueden subir 1,500 m s.n.m., desde 320 m s.n.m., recorriendo tan solo 14 km, atravesando al menos 5 zonas de vida y 3 asociaciones vegetales (Dix *et al.* 1998), encontrando una comunidad continua de lycastes en el intervalo antes mencionado. Este traslape de hábitats y la proximidad entre especies, facilita la hibridación, ya que este grupo comparte polinizadores y períodos de floración (Tinschert 1983; Dix y Dix 1992, 2000; Oakeley 1993).

En localidades de poblaciones simpátricas de *L. cochleata*, *L. cruenta* y *L. suaveolens*, existen individuos que presentan mezclas de las características encontradas en las especies puras. Se cree que *L. suaveolens* se originó como un híbrido en una zona de traslape entre otras especies, que divergen en términos de requerimientos ecológicos y climáticos. Las especies padre más probables son *L. cochleata* y *L. cruenta*. Observaciones

preliminares (Dix y Dix 1992) sugieren que *L. suaveolens* está restringida a un intervalo altitudinal entre 1,300 y 1,800 m s.n.m. en bosques de pino-encino, sujetos a alta humedad y neblina al medio día (Dix y Dix 2000).

Es difícil interpretar la descripción original de las especies de *Lycaste* amarillas (Ames y Correll 1953, Dix y Dix 1992 y 2000, Donnell-Smith 1903 y 1905, Fowlie 1970; Hamer 1974, 1981, 1983 y 1988; Oakeley 1991b y 1993; Reichenbach f. 1882, Richard 1847, Summerhayes 1931; Anexo A.), al igual que identificar el material seco encontrado en herbarios (Ames y Correll 1953; Fowlie 1970; Dix y Dix 1992 y 2000; Oakeley 1991b y 1993; Summerhayes 1931). Por lo mismo, se han desarrollado varias revisiones, desiguales y enredadas, de las especies presentes en este grupo (Ames y Correll 1953; Fowlie 1970; Dix y Dix 1992 y 2000; Oakeley 1991b y 1993). Las especies mesoamericanas de este género están siendo revisadas para publicación en la Flora Mesoamericana (M. A. Dix en preparación) y el análisis de este grupo servirá como insumo para el mismo.

## **B. Fenología**

La definición de especie se ha visto complicada en años recientes por dos avances en la sistemática filogenética. El primero es el uso de genética molecular para la reconstrucción filogenética y revisiones taxonómicas. Estudios de la variación a nivel molecular han revelado discontinuidades genéticas dentro de los taxones que han hecho que se reconsidere si son una o varias especies (Brown *et al.* 1996).

La segunda complicación ha aparecido desde la introducción de los nuevos conceptos de especie, evolutiva y filogenética. La especie evolutiva se ha definido como una especie a cualquier población que haya permanecido aislada lo suficiente de otras poblaciones como para convertirse en una unidad evolutiva independiente. La especie filogenética considera como especie a cualquier población con un carácter derivado o apomorfía (Brown *et al.* 1996).

Las aplicaciones de estos conceptos de especie han resultado en la separación de nuevas especies basadas en sus características genéticas distintivas. Estos cambios en la sistemática tienen el mérito de hacer la definición de especie consistente con la teoría y práctica de la reconstrucción de las relaciones filogenéticas basadas en datos moleculares, pero crean problemas prácticos a los taxónomos y cualquier otra persona que se enfrente a la tarea de tratar de identificar organismos vivos en el campo o sus restos preservados en fósiles o colecciones de museos. También, hay problemas a niveles más altos de clasificación, porque los sistemáticos moleculares están usando el concepto de clado, definido como el grupo de todos los descendientes de un antecesor común, para redefinir los grupos taxonómicos tradicionales (Brown *et al.* 1996).

Los últimos avances han ayudado a entender mejor la historia de la distribución de plantas y animales. Sin embargo, se necesita enfatizar en la necesidad de definiciones de especie estandarizadas, para que los biogeógrafos y otros científicos puedan identificar sus organismos y puedan aplicar los avances en reconstrucciones filogenéticas en sus propios estudios. Para mientras, los estudios cuantitativos de los intervalos geográficos tendrán que basarse en las clasificaciones taxonómicas y estudios publicados (Brown *et al.* 1996).

Los cambios en todos los niveles de organización ecológica en las décadas recientes son obvios: cambios poblacionales y fenológicos, sesgos en el rango geográfico, cambios en la composición de especies en comunidades y cambios en la estructura y funcionamiento de ecosistemas. Aunque no se puede atribuir estas diferencias solamente a los cambios climáticos, se deben tomar en cuenta tanto para esfuerzos de conservación *in situ* como de reintroducción (McCarty 2001).

Cambios en la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico pueden hacer que se desarrollen cambios fenológicos en plantas, en periodos que van desde días a semanas. Al correr simulaciones de incremento de este gas y cambios climáticos asociados hay aumento en la biomasa vegetal, esto se debe al apareamiento de nuevos nichos que pueden ser aprovechados por las plantas (Cramer *et al.* 2001). Se han reportado migraciones rápidas ante el cambio climático que van de 150 a 500 m/año en periodos entre 10 y 100 años.

Cada especie tiene distinta velocidad de adaptación y presenta diferentes tolerancias a las variables ambientales. Estos cambios han sido documentados a partir de los datos de polen de árboles después de la última glaciación (Clark *et al.* 1998).

Para poder hacer predicciones sobre los posibles cambios fenológicos ante el cambio climático antropológico, se han hecho análisis de cómo cambió la flora después de la última glaciación. Los cambios de distribución, respuesta de especies forestales al clima del cuaternario, son conspicuos y las extensiones de estas distribuciones son llamadas migraciones. Estas migraciones, en las plantas, son pasivas y ocurren por la dispersión de semillas y establecimiento de plántulas en sitios donde antes no se los permitían las condiciones ambientales. En regiones en las que no hubo glaciaciones severas muchas especies se mantuvieron en las mismas latitudes, pero cambiaron su intervalo de distribución altitudinal, expandiendo o contrayendo el tamaño de su población. La respuesta dominante fue el cambio de distribución altitudinal al unirse distintos refugios sin una dirección única, esto es, no solo subieron, sino que también bajaron en elevación al cambiar los regímenes de lluvias y humedad (Davis y Shaw 2001).

Las semillas, al dispersarse largas distancias, hacen que poblaciones disjuntas puedan intercambiar material genético, a este grupo de poblaciones le llamamos metapoblación. En términos espaciales, se puede decir que una población está separada de otra por varios cientos de metros y la mayoría de las semillas germinará dentro de un radio de menos de 100m de su progenitora. Por lo que el alcance de una población dentro de una metapoblación dependerá enteramente de que ocurra una dispersión de larga distancia (Cain *et al.* 2000).

Las semillas de orquídeas pueden diseminarse por distancias largas por el viento, durante tormentas o por dispersión secundaria sobre un sustrato. Esto último puede pasar cuando las semillas se adhieren a las patas, pelo o plumas de los vertebrados. Las distancias máximas reportadas para semillas son de 1 a 20 km. Y, aunque sabemos que pueden desplazarse distancias considerables, son pocos los datos que pueden caracterizar esas distancias de manera precisa (Cain *et al.* 2000). En estudios de simulación se ha encontrado

que aun con una proporción de 0.1% de las semillas que se aleje de su planta madre una distancia larga (entre 1 y 10 km) puede hacer que la tasa de dispersión se eleve en un orden de magnitud (Higgins y Richardson 1999).

Esta dispersión puede ser importante para hacer predicciones precisas en la tasa de invasión biológica, así como su importancia en contexto del cambio climático. Incrementa la riqueza de especies en paisajes fragmentados. E influye en la diferenciación entre poblaciones, dejando una firma que puede persistir por periodos largos de tiempo (Le Corre *et al.* 1997). Al realizar estudios genéticos en varias poblaciones se puede reflejar el movimiento y el éxito de establecimiento de las semillas, pero no refleja la dispersión total de las semillas. A pesar de eso al hacer estudios genéticos de herencia extracromosómica, heredada por la madre en este caso, podemos determinar la población de origen de las plantas (Cain *et al.* 2000).

### **C. Polinización**

Para conocer los patrones de entrecruzamiento de estos enjambres de híbridos se debe conocer el comportamiento de sus polinizadores. Este grupo de especies del género Lycaste comparte polinizadores, al menos dos especies de abejas del género Euglossa (Hymenoptera: Apidae: Euglossini), y períodos de floración (Tinschert 1983; Williams y Whitten 1983; Dix y Dix 1992, 2000; Oakeley 1993). Este género de abejas puede ser encontrado en toda América tropical, en bosques húmedos, sabanas y bosques de galería localizados entre los 0 y los 1,600 m s.n.m., aunque en lugares más cálidos se han reportado hasta los 2,000m de elevación.

Sin tratar específicamente de coleccionar polen, estas abejas de la tribu Euglossini, son responsables de la polinización de especies de las familias Caesalpinaceae, Maranthaceae, Euphorbiaceae, Araceae, Gesneriaceae, Bignoniaceae, y otras (Armbruster y Webster 1979, Williams y Whitten 1983, de Brito y Rêgo 2001). En las Orchidaceae, los machos son polinizadores exclusivos de la tribu Gongoreae, subtribu Stanhopeinae y subtribu Catasetinae, así como también muchas de las Zygopetalinae, Lycastinae y Bifrenariae,

incluidos los géneros Dichaea, Lockhartia, Macradenia, Notylia, Trichocentrum, Trichopilia y Warmingia (Allen 1950, 1954, Ackerman 1981, Dressler 1982). Éstas los atraen con esencias producidas por las flores. Las abejas colectan esos olores por medio de las almohadillas de olor en los tarsi de sus patas frontales y los almacenan en los bolsillos de las tibias del tercer par de patas (Bennet 1972, de Brito y Rêgo 2001)

Entre las observaciones de comportamiento de estas abejas, se ha determinado que hay dos patrones entre los machos que polinizan orquídeas, unos tienen un recorrido establecido y otros vuelan más. La mayoría de las abejas macho tienen un recorrido establecido para visitar plantas en su territorio y en algunos casos se han encontrado abejas revoloteando en el área donde se han removido especímenes de interés para ellas. El resto de los individuos tiene patrones de movimiento más amplios, llegando a recorrer hasta 23 kilómetros (por ejemplo, especies medianas a grande, del género Eufriesea) y hasta 2.5 km sobre cuerpos de agua para llegar a trampas de olores (Dressler 1968a y b, 1982, Janzen 1971, Williams y Dodson 1972). El período de floración entre especies que son polinizadas por las abejas euglosinas puede extenderse desde días hasta meses (Gentry 1974).

El hecho de visitar varias especies indica que estas abejas no discriminan entre especies parecidas visual y olfativamente (Dafni e Ivri 1979, Dafni 1983, Ackerman 1983, Williams y Whitten 1983, Armbruster y McCormick 1990). Las plantas que dependen de este grupo de abejas para su reproducción tienen estructuras florales que han evolucionado para colocar su polen en áreas del cuerpo de las abejas donde no pueden acicalarse (Dressler 1982).

En orquídeas la señal primaria de la polinización es el resultado del contacto físico entre el polen y el estigma, que desencadena una evolución rápida del etileno en el estigma que precede al desarrollo del tubo polínico. Este mecanismo conlleva a cerrar el estigma. Al probar falsas polinizaciones, con cuentas de látex en lugar de polinias, no se logró detonar esta producción de etileno, ni ninguna de las otras respuestas químicas y físicas de la polinización (O'Neill 1997).

Desde hace mucho tiempo, los especialistas en hibridación de plantas reconocieron que existen diferencias notables entre los grupos vegetales con respecto a la facilidad para cruzar especies y a la fertilidad de los híbridos resultantes. En algunos géneros las especies emparentadas se cruzan con dificultad y, en caso de lograrlo, los híbridos resultantes por lo general son estériles. Al otro extremo se encuentran grupos vegetales en los cuáles el cruzamiento lejano es posible entre especies, secciones y hasta géneros morfológicamente diferentes, y los híbridos derivados de tales cruzamientos alejados son fértiles (Grant 1989).

Las orquídeas son una familia en la que es posible lograr cruzamientos entre taxones muy alejados evolutivamente, por ejemplo, Vanda se ha cruzado con éxito con miembros de otros nueve géneros. El género Ophrys de la región del Mediterráneo contiene varias especies que pueden cruzarse artificialmente para producir híbridos fértiles. En la naturaleza, estas especies se encuentran en varias combinaciones simpátricas formando híbridos. Su aislamiento en la naturaleza se fundamenta principalmente en diferencias florales que actúan como barreras etológicas y mecánicas a la polinización interespecífica por abejas (Stebbins y Ferlan 1956, Dodson y Frymire 1961, Grant 1989).

#### **D. Importancia de la hibridación natural**

La hibridación natural entre individuos de líneas evolutivas divergentes ha sido documentada en plantas y animales (Arnold 1994), y este proceso depende de la viabilidad relativa de los híbridos, comparada con la de las especies padres (Cruzan *et al.* 1993). La existencia de un amplio rango de condiciones ambientales y gradientes marcados en la disponibilidad de agua produce nichos potenciales que no han sido explotados, un fenómeno tipificado en las sierras guatemaltecas.

Podemos encontrar varias consecuencias de la hibridación: (1) la hibridación introgresiva, movimiento de material genético entre taxones hibridados a través de retrocruces entre las especies padres y sus híbridos, que promueve una población fenotípicamente muy variable, pero genéticamente constante; (2) fortalecimiento de las

barreras genéticas interespecíficas; (3) los híbridos pueden ser más viables que las especies padres, logrando que la descendencia ocupe nuevos hábitats o desplace a otras especies presentes; (4) reducción del potencial reproductivo de las especies, y/o (5) aparición de nuevas especies (Grant 1989; Funk y Brooks 1990; Rieseberg 1991; Arnold 1994; Whitham *et al.* 1999).

Los resultados de la hibridación, benéficos o desfavorables para las comunidades biológicas, tienen un impacto directo en la taxonomía y sistemática. Aunque estas disciplinas han sido consideradas de menor importancia o difíciles, son críticas para la biología de la conservación porque proveen bases fundamentales para las decisiones de manejo. Desafortunadamente, las metodologías de la taxonomía clásica son, la mayoría de las veces, inadecuadas para la identificación precisa de híbridos de primera generación, razas introgresivas y especies que provienen de híbridos, así como para la diferenciación entre los mismos. Es más, aún no está claro cómo estas categorías deben ser protegidas bajo las leyes vigentes (Rieseberg 1991; Endangered Species Act 1995; Whitham *et al.* 1999).

Aunque no ha sido probado, parece que la diversidad de orquídeas epífitas en los trópicos puede ser resultado de introgresión y a pesar de que parezca una especie pura, puede tener un acervo genético de bloques de genes de otras especies (Lenz y Wimber 1959). Aun así, los cambios evolutivos ocurren en poblaciones, no en individuos. El individuo es efímero, solo la población es continua (Ayala 1976). Por esto, para poder describir especies se deben analizar las poblaciones, no solo individuos y se deben incluir análisis morfológicos y moleculares.

## **1. Análisis morfológico**

La mayoría de las características morfológicas de los híbridos son intermedias entre las de las especies padres, y pocas son combinaciones de características entre los mismos. Estas características intermedias hacen más difícil distinguir entre los híbridos que están

en medio de los extremos del grupo y los taxones padres (MacDade 1990). Esto se debe a que los híbridos, y los individuos resultantes de la introgresión, no son mezclas de igual proporción de cada padre. Son un mosaico de los atributos de los padres y pueden tener también caracteres que no son evidentes en los taxones originales (Rieseberg 1995; Wilson 1992).

El reconocimiento de los híbridos putativos en la naturaleza o en herbarios, el desarrollo de hipótesis sobre cuáles de los individuos en las poblaciones estudiadas son padres o híbridos putativos, y las decisiones sobre cuáles individuos deben procesarse para futuros análisis es necesario para poder realizar estudios adecuados de las evaluaciones y análisis de la variación morfológica. Estas hipótesis proveerán una base firme para estudios posteriores y también crean un punto de partida para comparaciones entre datos morfológicos y moleculares. Aun así, el error más común en los estudios de hibridación es el iniciar los análisis, sin confirmar antes, que efectivamente hay procesos de hibridación actuales y no solo el reflejo de la divergencia histórica de las especies (Wilson 1992).

En los primeros análisis de características morfológicas para demostrar hibridación e introgresión se utilizaron representaciones visuales de datos comparativos y diagramas. Ejemplo de estos son los diagramas de distancia híbrida de Wells y diagramas pictográficos esparcidos (pictorial scatter diagrams). Estas técnicas de ordenamiento incluían símbolos para mostrar la importancia de los caracteres usados (Adams 1982, Wilson 1992). Las limitaciones de estos procedimientos son la complejidad del manejo de datos para hacer estudios extensivos y/o de muchos caracteres, porque hacen estos diagramas indescifrables.

Otras metodologías, que sirven para demostrar divergencia y/o hibridación, son los índices de híbridos (Goodman 1967), análisis de componentes principales (Moore y Buchanan 1985), análisis canónico (Smouse 1972) y el análisis de conteo de caracteres (Wilson 1992). Se demuestra la divergencia analizando si un organismo intermediario es casi igual a uno de los padres putativos para algunas mediciones y casi igual al otro posible padre en otras. En este caso, hay más probabilidad de que sea un ancestro intermedio entre sus descendientes, y no un híbrido intermedio (Goodman 1967; Wilson 1992; Zar 1999).

El análisis de conteo de caracteres se utilizó en el presente trabajo para confirmar la hibridación natural en las poblaciones simpátricas actuales de las Lycaste amarillas.

Con los avances de los programas de análisis estadístico multivariados, en computadoras personales, se ha facilitado el uso de funciones discriminantes; análisis de componentes principales, PCA; análisis de coordenadas principales, PCO; y análisis de variables canónicas, CVA (Adams 1982; Anderson 1949; Dufrière, Gathoye y Tyteca, 1991; Estabrook, Gil-ad y Reznicek 1996; Freudestein y Doyle 1994; Hedrén, Fay y Chase 2001; Kores, Molvray y Darwin 1993; Moore y Buchanan 1985; Smouse 1972; Tyteca y Dufrière 1993; Wilson 1992). Estos métodos son útiles al analizar introgresión y estructura de conglomerados de híbridos, pero solo si se ha demostrado que existe hibridación entre los grupos en estudio (Albert, D'Antonio y Schierenbeck 1997; Freudestein y Doyle 1994; Kores, Molvray y Darwin 1993; Theriot y Stormer 1984; Wilson 1992). El PCA es la metodología utilizada para este proyecto.

Aun así, como ha pasado en otros grupos de plantas estudiadas, por ejemplo, los Iris, lo impredecible de la expresión de caracteres disminuye la utilidad de la morfología para identificar procesos de hibridación por sí misma (Rieseberg y Ellstrand 1993). Por eso los análisis morfológicos deben ser complementados con estudios genéticos (Cox *et al.* 1998; Peakall *et al.* 1997).

## **2. Análisis genético**

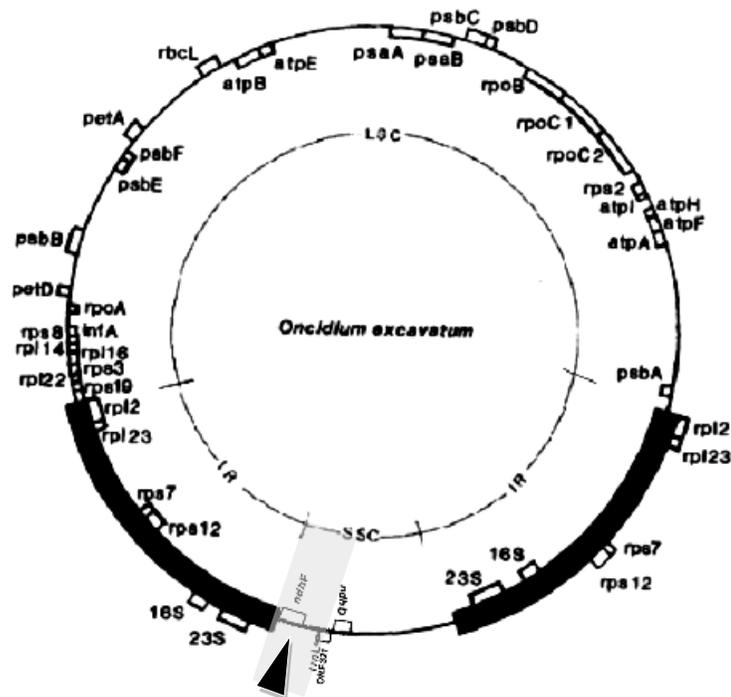
Por su importancia en los procesos de especiación y evolución, siempre se ha tenido a la hibridación como un componente de la investigación de la sistemática vegetal. Los avances recientes en la sistemática molecular han provisto técnicas poderosas para discernir la hibridación. Estas técnicas siguen siendo mejoradas y refinadas, dando acceso a un número mayor de marcadores (Aceto *et al.* 1999a; 1999b; 2000; Arduino *et al.* 1996; Case 1994; Cox *et al.* 1998; Grünanger *et al.* 1998; Hedrén, Fay y Chase 2001; Olmstead y Palmer 1994; Palmer 1987). Estos marcadores nos permiten la determinación de híbridos primarios y derivados, evaluaciones de los niveles de flujo genético entre especies,

biogeografía y reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre los taxones hibridados y sus parientes cercanos (Pellegrino *et al.* 2001; Rieseberg y Ellstrand 1993; Schlegel *et al.* 1989).

Estudios recientes, con datos no morfológicos, que son de ayuda en la determinación de híbridos son: a) el análisis de metabolitos secundarios, por el uso de los patrones aditivos en la expresión química (Borba, Trigo y Semir 2001; Christenson y Whitten 1995; Williams y Whitten 1983), y b) perfiles de proteínas y alozimas, que permiten la determinación de la distribución de los productos de loci individuales, sin la complicación de los productos intermedios o aditivos (Aceto *et al.* 2000; Arduino *et al.* 1996; Hedrén 1996; Rossi *et al.* 1995; Schlegel *et al.* 1989; Sun y Wong 2001)

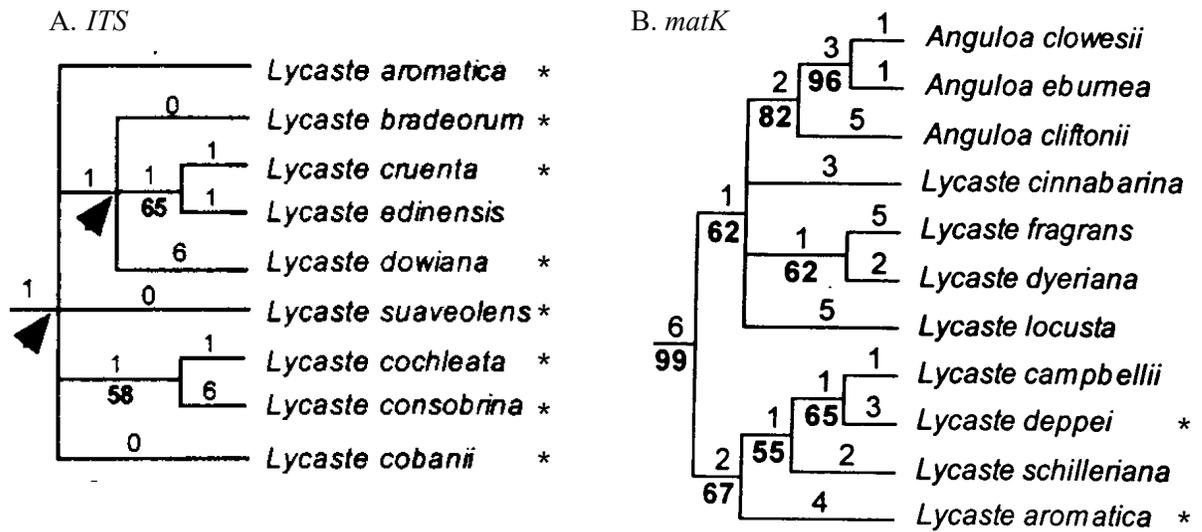
Los patrones aditivos de estas características fenotípicas tienden a prevalecer en el ADN nuclear. Para poder hacer inferencias evolutivas hay que tomar en cuenta tanto herencia nuclear, de ambos padres (Cox *et al.* 1997; Pellegrino *et al.* 2001), como la herencia que sufre menos recombinación a través del tiempo (herencia extracromosómica). El ADN de los cloroplastos (ADNcp, ver Figura 1), nos muestra herencia de un solo padre la mayoría de las veces. En el caso de las orquídeas esta herencia es materna (Chase y Palmer 1989; Corriveau y Coleman 1988; MacDade 1990; Palmer *et al.* 1988; Catalán *et al.* 1997; Petit *et al.* 1997; Schall, Leverich y Rogstad 1991; Wilson 1992).

Además, el ADNcp es abundante en las células foliares y es relativamente fácil de extraer (Palmer 1987). Por esto, se han utilizado los segmentos de cloroplasto de los genes *rbcl* (“unidad larga de la enzima fotosintética ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa / oxidasa”, RuBisCO; Cameron *et al.* 1999; Judd *et al.* 1999; Kores *et al.* 1997), *matK* (“gen de maturasa K”, antes conocido como “Open Reading Frame K, ORF K”, Judd *et al.* 1999; Kores *et al.* 2001; Ryan *et al.* 2000; Ryan 2001), *ndhF* (“subunidad F de la NADP deshidrogenasa”, Judd *et al.* 1999; Neyland y Urbastch 1995; 1996a; 1996b), obteniendo mejor resolución en orden ascendente y mejorándolos al hacer estos análisis, y uniendo todos los caracteres obtenidos (Cox *et al.* 1998; Cozzolino *et al.* 1998; Kores *et al.* 2001; Peakall *et al.* 1997; Rossi *et al.* 1992).



**Figura 1.** Localización de genes en el ADN cloroplásmico de *Oncidium excavatum* Lindl. SSC copia única y pequeña (Small Single Copy); IR repetición inversa (Inverted Repeats) y LSC copia única y larga (Large Single Copy). Los genes en el interior del círculo se transcriben en el sentido de las agujas del reloj; los del exterior, en contra sentido. La flecha y el sombreado resaltan al gen *ndhF* en la SSC. Fuente: modificado de Palmer *et al.* (1988) para incluir la localización del gen *ndhF* en la SSC.

Paralelamente a la presente investigación, se efectuó una evaluación filogenética para los géneros *Lycaste* y *Anguloa*, incluyendo análisis morfológico, filogenético molecular, histológico para determinar la presencia de osmóforos (células asociadas a la producción de olores) en flores, y perfiles de fragancias por especies (Ryan *et al.* 2000 y Ryan 2001). Para el análisis filogenético se analizaron las secuencias del gen *matK* (cloroplastos) y de los *ITS1* y *2* (espaciador interno transcrito del ADN de los ribosomas nucleares), con un número total de 55 taxones incluidos. Este análisis solo incluyó un individuo por taxón, normalmente se utilizan pocos individuos ya que son más importantes las mutaciones encontradas (Poe 1998). Los cladogramas parciales, para las *Lycaste* sect. *Xanthanthae*, se muestran en la Figura 2 (Ryan *et al.* 2000 y Ryan 2001). Sin embargo, no incluyeron todas las especies presentes en este enjambre y no obtuvieron una buena resolución para separar las plantas de *Lycaste* de flores amarillas.



**Figura 2.** Detalle de los cladogramas de similitud de *Lycaste spp.*, donde se incluyen especies con flores amarillas.

A. Cladograma obtenido a partir de los genes *ITS* de los ribosomas nucleares (n=46 taxones),

B. Cladograma obtenido a partir del gen *matK* de los cloroplastos (n=22 taxones). Las flechas muestran nodos que colapsan al usar consenso estricto. Los números superiores es el número de sitios informativos en los fragmentos amplificados. Los números inferiores muestran el porcentaje de los nodos conservados durante el análisis de Bootstrap.

\* Denota las especies compartidas con este trabajo.

Fuente: Ryan et al. (2000).

En la Figura 2A encontramos que dentro del grupo de las *Lycaste* amarillas hay máximo 18 sitios informativos en los genes *ITS*1 y 2 (mínimo 18 sustituciones en 660pb). La base del nodo no presenta una buena resolución y no se pueden establecer dicotomías que separen bien a las especies. Puede deberse a que al haber hibridación dentro del grupo no se logran separar totalmente. Aun así, la resolución puede mejorar al incluir más caracteres genéticos al realizar el árbol, esto no se pudo confirmar en el estudio de Ryan *et al.* (2000) porque no se logró suficiente diversidad entre los taxones al hacer el análisis de *matK* (ver Figura 2B).

Sin embargo, encontramos que *L. cochleata* difiere por 7 sitios informativos de *L. consobrina* Rchb.f, formando un grupo bien resuelto, con un 58% de agrupación de las 1,000 veces que se realizó el análisis de Bootstrap. Otro grupo bien resuelto en este cladograma es el formado por *L. cruenta* con *L. edinensis* Hort., otra especie que no ha sido

encontrada en Guatemala y no fue incluida en el análisis morfológico (65% de agrupación en Bootstrap). Se suponía que L. edinensis era un híbrido natural entre L. aromatica (Graham ex Hooker) Lindl. × L. macrophylla (Poep. & Endl.) Lindl., pero al agruparla genéticamente con L. cruenta hace dudar de la fidelidad de la identificación de los padres de híbridos naturales a partir de la morfología únicamente, y le da relevancia al uso combinado de ambos tipos de análisis.

Según las secuencias genéticas L. aromatica es una especie con más diferencias del grupo de las amarillas. En *ITS* (Figura 2A), la encontramos basalmente entre las amarillas y en las secuencias obtenidas de *matK* (Figura 2B) la encontramos como basal de un grupo, aunque su posición no está confirmada por el análisis de Bootstrap. Esta es una de las especies más fáciles de identificar por la forma de su callo y no presenta dificultad para su descripción. Esta posición se debe al tamaño de las otras estructuras florales, que es intermedio.

Al incluir a L. × cobani Oakeley (híbrido descrito, Figura 2A) se esperaba que presentara la misma conformación de *ITS* que uno de sus padres, L. cruenta o L. cochleata. Estas dos especies están bien separadas y cada una se encuentra en uno de los dos nodos bien definidos para este cladograma, esto sugiere que el origen de este híbrido natural no es ninguna de estas especies, ya que por introgresión presenta la secuencia de otra especie, posiblemente L. suaveolens. Se necesita trabajar más con este grupo y los híbridos naturales descritos. Durante su estudio, Ryan *et al.* (2000), encontraron que L. macrophylla *subs. xanthocheila* Fowlie está más alejada de otras subespecies de L. macrophylla, por lo que sugiere elevarla a nivel de especie. También encontró que L. lasioglossa está más relacionada con L. deppei (Lodd.) Lindl. que con el grupo de las Lycaste amarillas. Es necesario realizar un análisis detallado para poder compararlas, tanto con las secuencias de al menos un gen de mayor tasa de evolución, como con los genes *matK* y *ndhF*.

El gen *ndhF* reside en la región pequeña y única (Small Single Copy, SSC, ver localización en Figura 1) del genoma cloroplásmico (Hiratsuka *et al.* 1989; Kim y Jansen 1995; Neyland y Urbastch 1995, 1996a; 1996b; Palmer *et al.* 1988). Codifica un péptido

clororespiratorio (subunidad 5 de la NADPH deshidrogenasa de cloroplastos o NADPH plastoquinona oxidoreductasa). Este gen en tabaco tiene un largo de 2,133pb (codificando una proteína de 740 aminoácidos) y en arroz tiene 2,205pb de largo (Catalá, Sabater y Guéra 1997; Clark, Zhang y Wendel 1995; Kim y Jansen 1995; Smith y Atkinson 1998; Terry *et al.* 1997). Permite separar grupos taxonómicos cercanos más fácilmente que otras regiones del ADNcp porque presenta aproximadamente el doble de variabilidad y es 50% más largo que el gen *rbcL*, que ha sido ampliamente utilizado en análisis filogenéticos (Cameron *et al.* 1999; Clark, Zhang y Wendel 1995; Hiratsuka *et al.* 1989; Judd *et al.* 1999; Kim y Jansen 1995; Kores *et al.* 1997; Olmstead y Reeves 1995; Smith y Atkinson 1998; Terry, Brown y Olmstead 1997).

En 1996, se realizó un muestreo preliminar de material vegetal, y el Dr. Michael L. Arnold, de la Universidad de Georgia (Athens) hizo un análisis preliminar utilizando 60 individuos de poblaciones simpátricas de Zacapa y un grupo control de 20 especímenes en cultivo de Lycaste amarillas, de varias localidades (Cuadro 1). Al analizar estos especímenes encontró diferencias entre los fragmentos amplificados de la región del gen cloroplásmico *ndhF*. Este fragmento (haplotipo) en L. cruenta migra en la gel de agarosa hasta la marca de 1,500 pares de bases (pb) aproximadamente, en L. cochleata migra el equivalente a un fragmento de entre 200 a 300 pb más.

Al analizar los organismos de Zacapa, solo se encontró presente el haplotipo más grande, aún en híbridos. Esto sugiere posible introgresión del haplotipo de 1,700pb sobre el de 1,500pb, este proceso consiste en el traspaso de material genético entre diferentes especies por medio de hibridación y retrocruces repetidos, reemplazando así, al menos parte del material genético de una de las especies padres. Estos fragmentos fueron analizados después por el procedimiento de Alu-PCR para detectar diferencias e híbridos (Benham y Rowe 1992; Dowling *et al.* 1996), donde la enzima de restricción *Alu I* corta fragmentos dentro de la secuencia del gen *ndhF* amplificada (Olmstead, Sweere y Wolfe 1993). No se encontraron diferencias entre los fragmentos de ADNcp digeridos, por lo que no se extendieron dichos análisis (Arnold *com. pers.* 1997). Aun así, las diferencias encontradas en los productos de la PCR sirven para hacer inferencias sobre los procesos de

hibridación e introgresión en estas poblaciones. En el presente trabajo se analizarán los haplotipos del gen *ndhF* en el género Lycaste sect. Xanthanthae.

**Cuadro 1.** Posible haplotipo del gen *ndhF* para *Lycastes* amarillas y su distribución por localidad en el estudio preliminar.

Especie	Localidad	Haplotipo gen <i>ndhF</i> (pb)		Total
		1500	1700	
<u>L. cochleata</u>	Chiquimula (Cq)	+		6
	Izabal (Iz)		+	1
<u>L. cruenta</u>	Baja Verapaz (BV)		+	2
	Cq		+	2
	Zacapa (Za)		+	3
<u>L. suaveolens</u>	BV		+	1
	Cq	+		1
	Za		+	8
<u>L. sulfurea</u>	BV		+	1
Híbrido	Za		+	1
Especie desconocida <sup>1</sup>	Za		+	47
	TOTAL	7	66	73

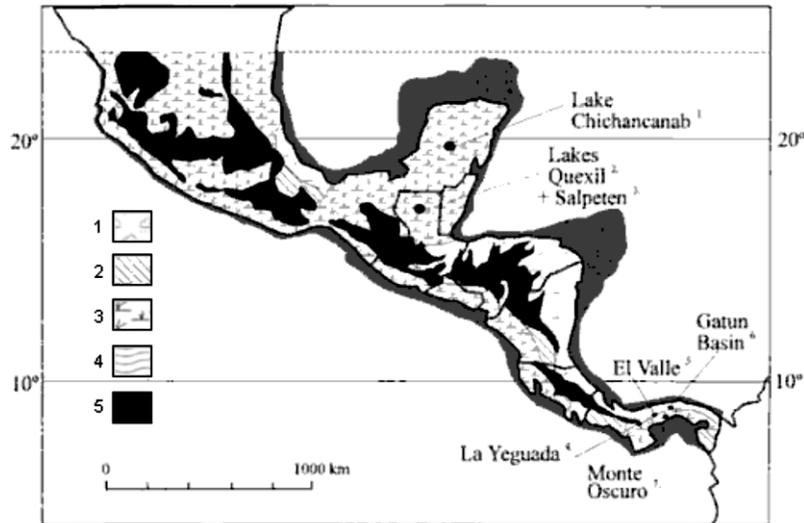
<sup>1</sup> Plantas que no han producido flores, a la fecha, para poder identificarlas, pero se utilizó material foliar para el análisis.

Fuente: Michael L. Arnold (1996)

## E. Biogeografía

El intervalo de distribución de una especie es la unidad básica de la biogeografía y esta depende de cómo se caracterizan a estos intervalos y a la misma especie. Los esfuerzos para hacer biogeografía comparativa, y en especial cuantitativa, se complican por los problemas en definir y mapear intervalos geográficos de distribución. Al igual que los esfuerzos por distinguir y clasificar especies, los esfuerzos para caracterizar los intervalos geográficos de especies necesariamente involucran reducir un fenómeno complejo a una abstracción muy simplista. Las unidades reales de los intervalos de distribución son los patrones espaciales y temporales en los que los individuos se dispersan sobre la tierra. Cualquier mapa u otra caracterización de los intervalos de distribución de especies es una simplificación de esas distribuciones complejas (Brown *et al.* 1996).

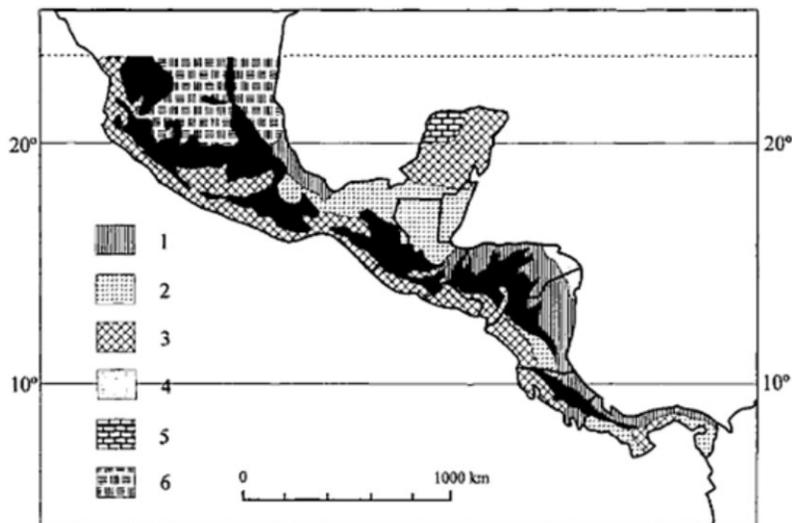
Desde la última glaciación (Figuras 3 y 4) los bosques montanos mantienen su misma distribución (Piperno y Pearsall 1998), pero los bosques aledaños, al menos en Centroamérica, presentan temperaturas más bajas que permitieron a especies como las *Lycaste* amarillas ampliar su área de dispersión hasta los 1850 m s.n.m.



**Figura 3.** Reconstrucción de la distribución de bosques y nivel del mar en Centroamérica durante la última glaciación, entre 20,000 y cerca de 10.500 años antes del presente.

- |  |                    |
|--|--------------------|
| 1. Bosques húmedos continuos;              | con árboles bajos. |
| 2. Bosques más secos que en la actualidad; | 4. Sabana;         |
| 3. Bosques espinosos, matorrales y sabanas | 5. Bosque montano. |

Fuente: modificado de Piperno y Pearsall 1998

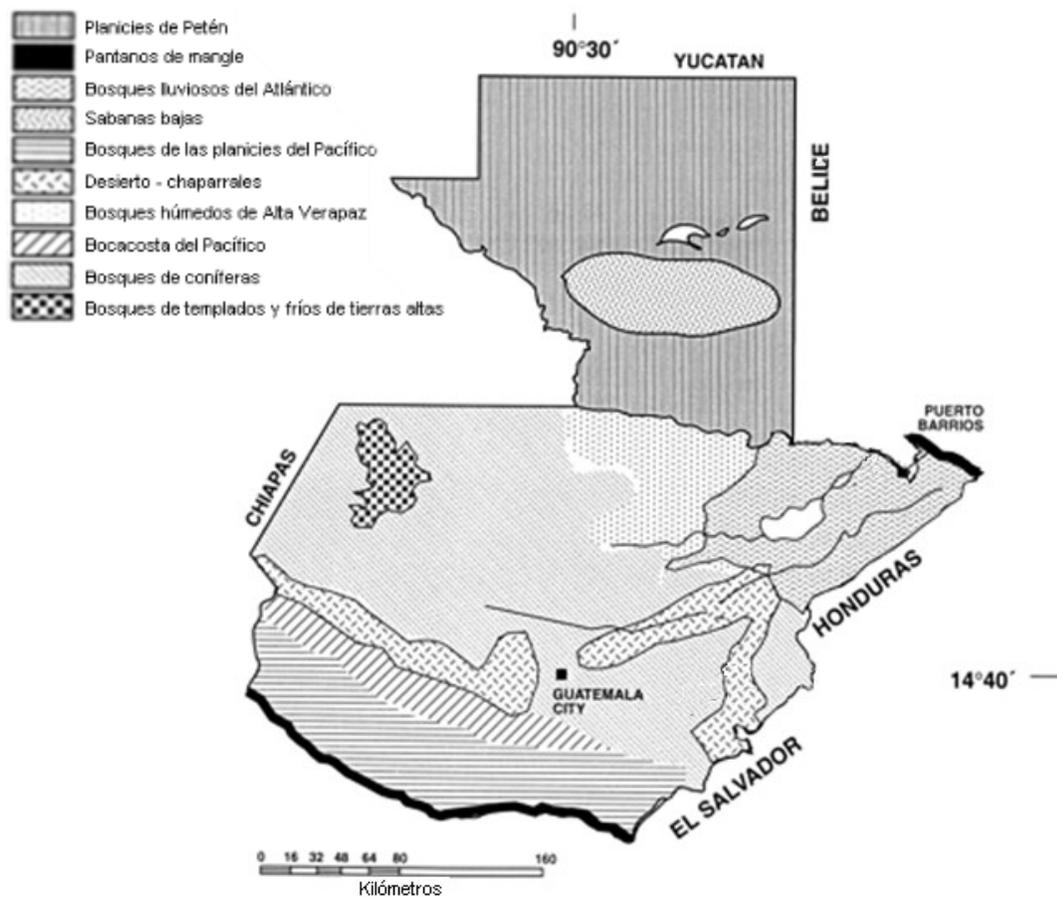


**Figura 4.** Bosques montanos actuales.

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1. Bosques siempre verdes tropicales; | 4. Bosques de pino encino y sabana;     |
| 2. Bosques semi siempre verdes;       | 5. Bosque espinoso, praderas, desierto; |
| 3. Bosques tropicales deciduos;       | 6. Matorrales con cactus y desiertos;   |
- El color negro denota los bosques montanos.

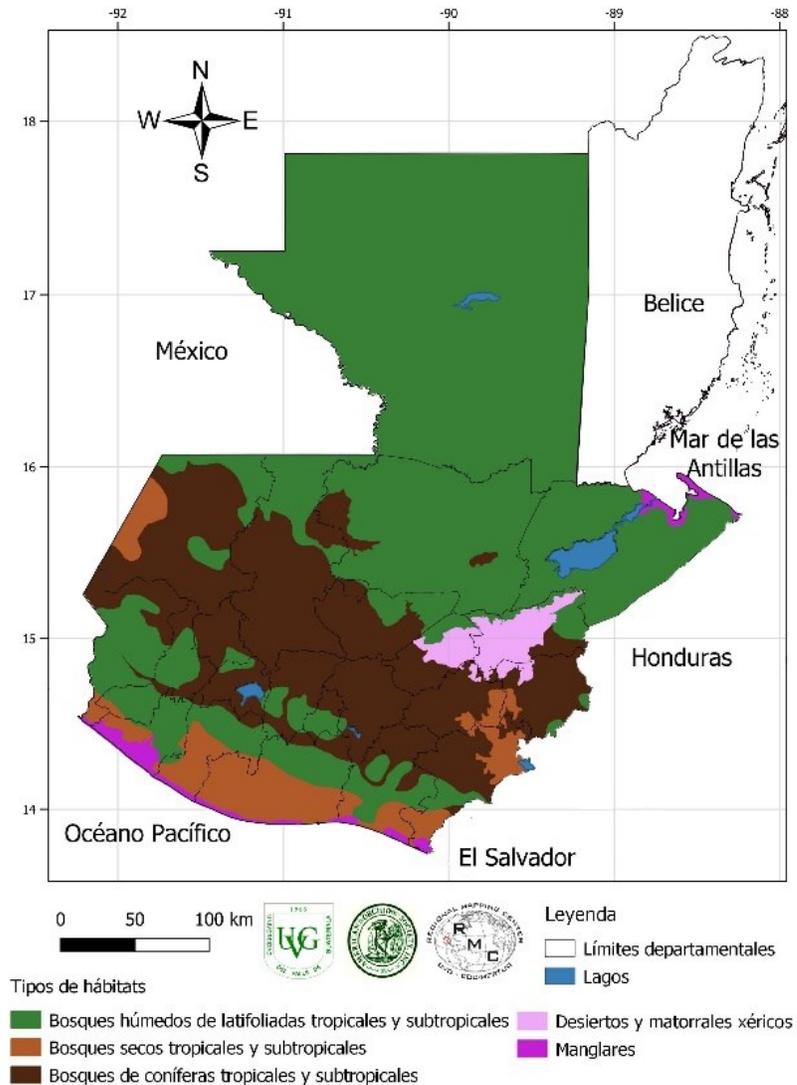
Fuente: modificado de Piperno y Pearsall 1998

En Standley y Steyermark (1945) y Steyermark (1950), encontramos una definición más fina de las asociaciones vegetales en Guatemala (Figura 5). Donde encontramos que en el intervalo altitudinal en el que encontramos las lycastes amarillas (200 y 1850 m s. n.) hay poblaciones en las planicies boscosas (del Pacífico y de Petén), la bocacosta del Pacífico, bosques de coníferas, bosques lluviosos del Atlántico, y bosques húmedos de Alta Verapaz.



**Figura 5.** Distribución actual de la vegetación en Guatemala.  
Fuente: modificado de Standley y Steyermark 1945 y Steyermark 1950.

Se ha trabajado en una definición común para los bosques de países centroamericanos desarrollando el mapa de ecorregiones (Dinerstein *et al.* 1995). La Figura 6 denota que las áreas de interés para las lycastes amarillas son los bosques secos, de coníferas y húmedos de latifoliadas. Esta definición de bosques, aunque resuelve el problema de definiciones en común entre países, es menos específico para diferencias a nivel local.



**Figura 6.** Ecorregiones en Guatemala

Fuente: Dinerstein *et al.* 1995.

## F. Justificación

Este trabajo representa el primer estudio detallado en Guatemala sobre hibridación en poblaciones naturales de orquídeas del género Lycaste. Las técnicas utilizadas son útiles para averiguar el flujo genético y relaciones entre las especies, así como la diversidad intraespecífica.

Las mediciones morfológicas permitirán comparar información histórica con la que se ha obtenido recientemente. Además, estos datos serán de utilidad para personas, no científicas, que están interesadas en la identificación correcta de plantas en cultivo.

Las técnicas moleculares propuestas no son destructivas y no implican la colecta de las plantas encontradas en el campo. Es importante recopilar esta información para usarla en estudios filogenéticos y de análisis de germoplasma. Este estudio además de ser novedoso en Guatemala es una oportunidad para desarrollar capacidad local para futura investigación en esta área.

Esta investigación contribuye a clarificar los problemas de identificación que conlleva la presencia de conglomerados de híbridos en poblaciones de Lycaste cruenta, L. suaveolens y L. cochleata. Los resultados ayudarán a planear un proyecto intensivo sobre la evolución del género Lycaste en Mesoamérica y a localizar zonas de bosques, entre 800 y 1,800 m s.n.m., con alta diversidad genética de L. cochleata, L. cruenta y L. suaveolens, que necesiten ser protegidas. Además, contribuirá a entender las interacciones genéticas y procesos evolutivos en poblaciones naturales de especies del género Lycaste, que justifican la protección de bosques altamente amenazados por uso humano.

## **G. Objetivos**

### **1. Objetivo general**

Evaluar la variación morfológica y genética de Lycaste cochleata, L. cruenta, L. suaveolens y sus híbridos naturales en Guatemala.

### **2. Objetivos específicos**

#### **a. Muestreo**

Determinar el estado actual de poblaciones de L. cochleata, L. cruenta y L. suaveolens reportadas en la literatura y localidades potenciales.

#### **b. Polinización**

Determinar el traslape entre periodos de floración para L. cochleata, L. cruenta y L. suaveolens y sus posibles híbridos naturales, para establecer posibles barreras precigóticas.

#### **c. Análisis morfológico**

Identificar los caracteres más importantes para la diferenciación de L. cochleata, L. cruenta y L. suaveolens y que puedan ayudar a determinar los posibles padres de híbridos naturales.

#### **d. Análisis genético**

Determinar los haplotipos presentes en cada localidad, para fragmentos del gen cloroplásmico *ndhF* en Lycaste.

#### **e. Análisis biogeográfico**

Determinar las zonas de mayor diversidad genética y morfológica para L. cochleata, L. cruenta, L. suaveolens y sus híbridos.

## II. METODOLOGÍA

### A. Muestreo

Las localidades reportadas en la literatura pueden ser poco informativas, ej. Lycaste cruenta, como Maxillaria cruenta, en Guatemala (Lindley 1842), por lo que se buscaron las localidades históricas, georreferenciables, reportadas en la literatura para aumentar la posibilidad de encontrar poblaciones de interés (Ames y Correll 1953; Fowlie 1970; Tinschert 1983; Dix y Dix 1992, 2000).

Se buscaron poblaciones de Lycaste en los departamentos de **Chiquimula** [L.C. Castellanos, M.L. Maldonado (MLM) y L. Quevedo en 1997, y otra por M.W. Dix (MWD) y MLM en 1998], **Huehuetenango** [N. Cabrera (NC), MWD. y MLM en 1998], dos localidades en **Izabal** (MWD en 1996, y MWD y MLM en 1998), **Jutiapa** (MWD, R. Dix y MLM en 1997), **Suchitepéquez** [E. Castellanos, A.M. Dix, M.A. Dix (MAD), MWD, J. Hazard y MLM en 1999] y dos localidades en **Zacapa** (M.L. Arnold, MAD., MWD y MLM en 1996; MWD, MLM, M.E. Méndez, M. Palmieri en 1997 y otra por R. Blanco, NC y MWD en 1998). Ver el Anexo D. para más información de las localidades. Las poblaciones se visitaron a lo largo de todo el año y se les dio mayor importancia a las plantas en flor. Las fechas de floración para las plantas en el campo fueron determinadas para corroborar las observaciones sobre barreras para la fecundación interespecífica en Dix y Dix (1992).

Se utilizaron plantas encontradas desde el suelo hasta 4 m sobre el tronco de los árboles, porque no era posible llegar más alto sin equipo de escalada. En cada población se marcó la mayor cantidad de individuos encontrados, para poder localizarlos nuevamente, ya que no todos florecen al mismo tiempo y se necesita la flor para identificarlos

tentativamente. Las etiquetas fueron lacradas en plástico (Dymo©) color negro, y se amarraron a las plantas con alambre de cobre con cubierta de plástico obscuro (negro o café), para no llamar la atención sobre la planta o la etiqueta. El código utilizado consistía en “G”, por ser trabajo en conjunto de la Universidad del Valle de Guatemala con la Universidad de Georgia en Athens, y un número correlativo a partir de uno (G1 en adelante).

Se rescataron algunas plantas de zonas de pastoreo intensivo y lugares donde el bosque había sido talado para cambio de uso de la tierra o para extracción de madera. Estas plantas estaban en malas condiciones y podían ser comidas por el ganado o desecadas por el sol. Las plantas recolectadas fueron depositadas en el invernadero del Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala.

## **B. Polinización**

Se realizaron cruces intra- e interespecíficos (ver Cuadro 2) para confirmar si existían barreras precigóticas entre las especies más encontradas, en individuos depositados en los invernaderos de UVG: L. cruenta, L. suaveolens y L. cochleata. Se utilizaron al menos 15 flores para cada uno de los cruces. Además, se realizaron dos formas de autopolinización, con polinias provenientes de la misma flor y con polinias de otra flor de la misma planta. Primero se retiró la cubierta de la antera y se tomaron las cuatro (4) polinias que produce cada flor. Para polinizarlas, se colocaron dos (2) polinias, con un palillo de madera, de punta redonda, nuevo, en el estigma de la columna. Para evitar posible contagio de virus, cada palillo fue utilizado solamente una vez y solo se usaron las polinias de plantas que no presentaban síntomas de enfermedades.

**Cuadro 2.** Cruces realizados entre las flores de Lycaste de la sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae, en invernaderos de la UVG.

Madre (Columna)	Padre (Polinias)	Madre (Columna)	Padre (Polinias)
<u>L. cruenta</u>	<u>L. cruenta</u>	<u>L. suaveolens</u>	<u>L. cruenta</u>
	<u>L. cochleata</u>		<u>L. cochleata</u>
	<u>L. suaveolens</u>		<u>L. suaveolens</u>
	Híbrido		Híbrido
<u>L. cochleata</u>	<u>L. cruenta</u>	Híbrido	<u>L. cruenta</u>
	<u>L. cochleata</u>		<u>L. cochleata</u>
	<u>L. suaveolens</u>		<u>L. suaveolens</u>
	Híbrido		Híbrido

Fuente: Elaboración propia.

Los datos consignados son nombres de ambos padres, fecha de floración de la flor donante de polinios (padre) y de la que formará la cápsula (madre), fecha de polinización (Rolfe y Hurst 1909) y largo y ancho de la columna antes de recolectar la cápsula (9 meses después de la fecundación). Se tomaron los largos de las columnas de las flores utilizadas durante los experimentos de polinización y se compararon entre madres y padres por medio de pruebas de t pareada.

Se cubrieron las flores con gasa, amarrada con hilo alrededor del segmento del escapo más cercano al ovario, para evitar que posibles polinizadores (e.g. Euglossa spp., Dix y Dix 1992) colocaran otras polinias en el estigma antes de que se formara una callosidad en la entrada a éste (ver Figura 7). La gasa era retirada máximo tres días después de la polinización para evitar que la flor se pudriera, pero dándole suficiente tiempo para cerrar el estigma.

Para marcar las flores polinizadas se colocó al menos un pedazo de alambre de color y se usaron hasta dos alambres, dependiendo del estado desarrollo de las flores y cápsulas de la temporada de floración anterior (flores de hasta un año atrás). Se dejaron desarrollar máximo cinco cápsulas por planta por año, para evitar debilitar y/o matar a la planta. Al iniciar a polinizar un nuevo grupo de flores se retiraron los alambres de las polinizaciones anteriores que no produjeron cápsula, teniendo en cuenta no repetir patrones de colores en las plantas.



**Figura 7.** Callosidad que cierra el estigma en *Lycaste* después de su polinización. **A.** Dos flores de *L. cochleata*, una con columna polinizada y una que no ha sido polinizada, ambas sin cubierta de la antera ni polinias; **B.** Columna polinizada en *L. cochleata*, iniciando a ensancharse **C.** Flor de *L. suaveolens* polinizada naturalmente, con la cobertura de la antera en su sitio. Las flechas señalan el estigma cerrado y la columna ensanchada. **D.** Cápsulas de polinización artificial en *L. suaveolens.*, la flecha señala la codificación de alambre, en el recuadro se nota la etiqueta G197.  
Fuente: Elaboración propia.

Una polinización fue catalogada como exitosa, si la flor polinizada, después de uno a tres días, había cerrado su estigma con un cuerpo calloso (Figuras 7A y B) y empezaba a engrosar el ovario y se formaba una cápsula. Las cápsulas se retiraron 9 meses después de la polinización para poder medir su ancho y largo antes de que se abrieran. Estos datos se correlacionaron y se comparó el número de las fecundaciones exitosas con el de las que no produjeron cápsula por medio de  $\chi^2$ .

Los grados de libertad para esta prueba se calculan a partir del número de categorías evaluadas y el número de restricciones impuestas sobre la comparación dada (Daniel 1992). En este caso se están haciendo tres restricciones; al forzar que la suma de las frecuencias esperadas sea igual a la de las frecuencias observadas y al no incluir los valores de la media y desviación estándar en la  $H_0$ . Se evalúan las siguientes hipótesis:

$H_0$ : El porcentaje de éxito de la polinización no depende de la especie receptora de polen ( $P \leq 0.05$ ).

$H_a$ : El porcentaje de éxito de la polinización depende de la especie receptora de polen ( $P > 0.05$ ).

### C. Análisis morfológico

Se usaron 283 flores de 206 plantas. Estas incluyen flores de plantas de las poblaciones estudiadas, plantas en cultivo y las almacenadas en líquido (75% Etanol, 20% agua destilada y 5% glicerina, o FAAG), desde 1975 a la fecha. Todas estas flores están depositadas en la colección de Orquídeas, del Departamento de Biología de UVG (Anexo C.). No se utilizaron flores prensadas en herbario porque, aún después de volverlas a hidratar, la mayoría de las características del labelo no llegaban a su tamaño original. Se midieron 33 características continuas (ver Cuadro 3 y Figura 8), con una regla milimétrica flexible, y 17 discontinuas (ver Cuadro 4, Figuras 9 a la 15), todas con la ayuda de un estereomicroscopio. Antes de medirlas todas con una regla, se confirmó que no había diferencia con la medición realizada con un “pie de rey” (vernier).

Las especies analizadas son: L. cochleata, L. cruenta, L. suaveolens, L. sulfurea (*sensu* Hamer 1988, *non* Rchb.f.) y sus híbridos putativos. Como grupo de especies hermanas se usaron al menos 2 flores de L. aromatica (Graham ex Hooker) Lindl. (México), L. consobrina Rchb.f. (México), L. bradeorum Schltr. (Costa Rica), L. deppei (Lodd.) Lindl. y L. lasioglossa Rchb.f.; todas de la sect. *Deciduosae*, subsect. *Xanthanthae*. También se examinaron flores de otras especies de la sect. *Macrophyllae*, que están en

Guatemala: *L. dowiana* Endres & Rchb.f., *L. macrophylla* subs. *xanthocheila* Fowlie y *L. skinneri* (Bateman ex Lindl.) Lindl.

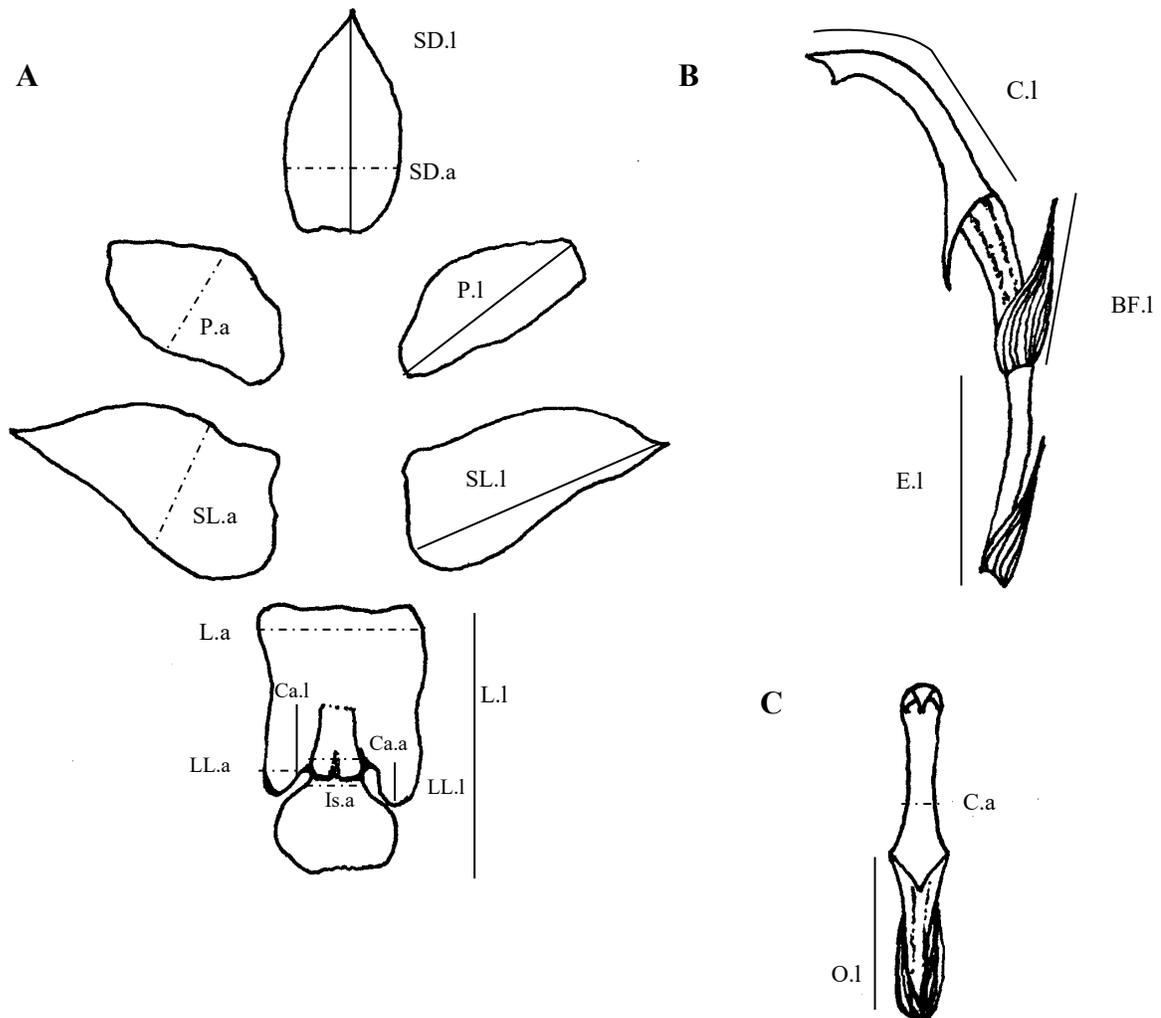
**Cuadro 3.** Datos continuos medidos (en mm) en flores de varias especies de *Lycaste*. Ver lugar y forma de las mediciones en la Fig. 3.

---

Caracteres
Largo y ancho de:
Base de la flor
Labelo
Columna
Callo del labelo
Lóbulos laterales del labelo
Lóbulo medio del labelo
Sépalos laterales
Sépalo dorsal
Pétalo
Largo de:
Ovario
Bráctea floral
Primer segmento del escapo a partir del ovario
Ancho del istmo del lóbulo medio del labelo
Proporciones entre datos continuos
Ancho con respecto a largo de:
Base de la flor
Labelo
Columna
Callo del labelo
Lóbulos laterales del labelo
Lóbulo medio del labelo
Sépalos laterales
Sépalo dorsal
Pétalo
Largo del ovario en proporción al largo de la bráctea floral
Ancho del callo con respecto al ancho del istmo del lóbulo medio del labelo

---

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 8.** Partes de la flor y posición de los lugares de medición de caracteres en *Lycaste cochleata*. A. vista frontal de la flor, desarmada y aplanada fresca; B. vista lateral de la columna sin cubierta de la antera; C. vista frontal de la columna. SD sépalo dorsal, SL sépalos laterales, P pétalos, L labelo, LL lóbulos laterales del labelo, Is istmo del lóbulo medio del labelo, Ca callo del labelo, C columna, O ovario, BF bráctea floral, E Primer segmento del escapo a partir del ovario. Para todas las características: l y líneas continuas se refieren al largo, a y líneas punteadas al ancho. Fuente: Elaboración propia.

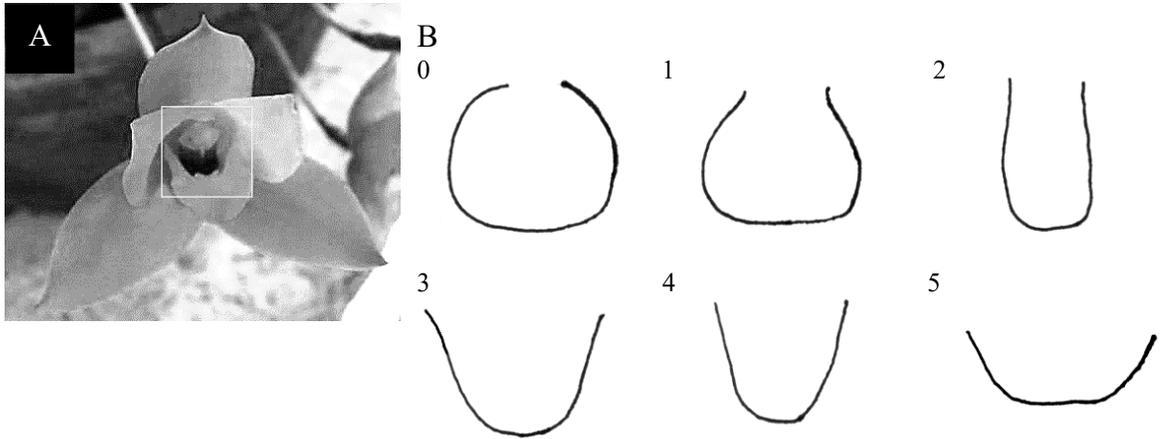
No se consideró ningún ordenamiento para los caracteres discontinuos multiestado, excepto para la forma de los lóbulos laterales que se tomaron en orden creciente en relación con el largo de estos a partir del nacimiento del lóbulo medio (ver Figuras 10 y 14). Para la clasificación de largo y densidad de tricomas en las partes florales se utilizó la descripción encontrada en el carácter 5 en Cuadro 4 (ver también Figura 12). Se tomaron

como tricomas cortos los de 1 mm de largo o menos, y como largos los de más de 1 mm de largo. Los términos se definen en el glosario (ver Anexo E.).

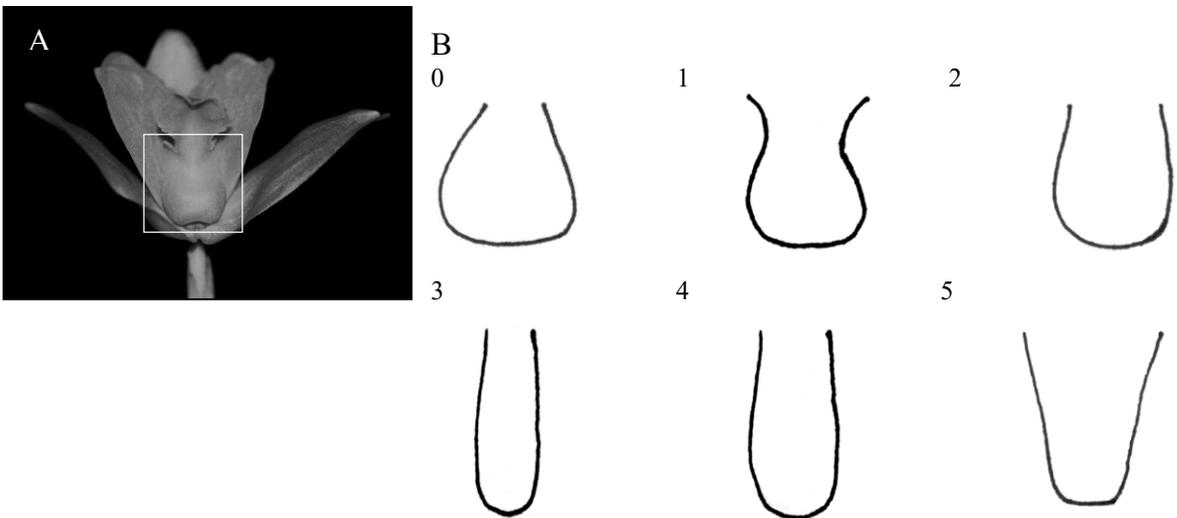
**Cuadro 4.** Caracteres (datos discontinuos) analizados, y sus respectivas series de notación transformada, utilizados en el análisis morfológico de flores de *Lycaste spp.*

<b>Caracteres</b>	<b>Series de transformación</b>	<b>Caracteres</b>	<b>Series de transformación</b>
1. Abertura del labelo	0 a 5 (ver Fig. 7)	8. Tricomas en el callo	0 a 6 (ver descripción en serie 5)
2. Forma del labelo, vista ventral	0 a 5 (ver Fig. 8)	9. Lóbulos laterales del labelo, vista lateral	0 a 6 (ver Fig. 12)
3. Mentón del labelo (ver Fig. 9)	Ausente Presente	10. Lóbulos laterales del labelo, vista ventral	0 No sobresalientes 1 Sobresalientes 2 Sobresalientes y se traslapan con el lóbulo medio
4. Ancho relativo de la indentación de la base del labelo (ver Fig. 9)	0 Ausente 1 Un Cuarto 2 Mitad 3 Entero	11. Forma del ápice del lóbulo medio del labelo	0 Indentado 1 Redondeado 2 Agudo
5. Tricomas en la superficie interna del labelo (ver Fig. 10)	0 Glabro 1 Glabrato 2 Puberulento 3 Tomentoso 4 Piloso 5 Velutinoso 6 Lanado	12. Forma de la columna	0 Recta 1 Ligeramente curvada 2 Curvada
6. Callo, vista frontal (ver Fig. 11)	0 Plano 1 Ligeramente curvado 2 Forma de "U" 3 Forma de "V"	13. Tricomas en parte distal de la columna	0 a 6 (ver descripción en serie 5)
7. Ápice del callo (ver Fig. 11)	0 Bífido 1 Cuadrado 2 Redondeado 3 Puntiajado 4 Agudo	14. Tricomas en parte media de la columna	0 a 6 (ver descripción en serie 5)
		15. Tricomas en la base de la columna	0 a 6 (ver descripción en serie 5)
		16. Posición de los sépalos en relación con la forma de la flor	0 a 3 (ver Fig. 13)
		17. Traslape de los pétalos atrás de la columna	No Sí

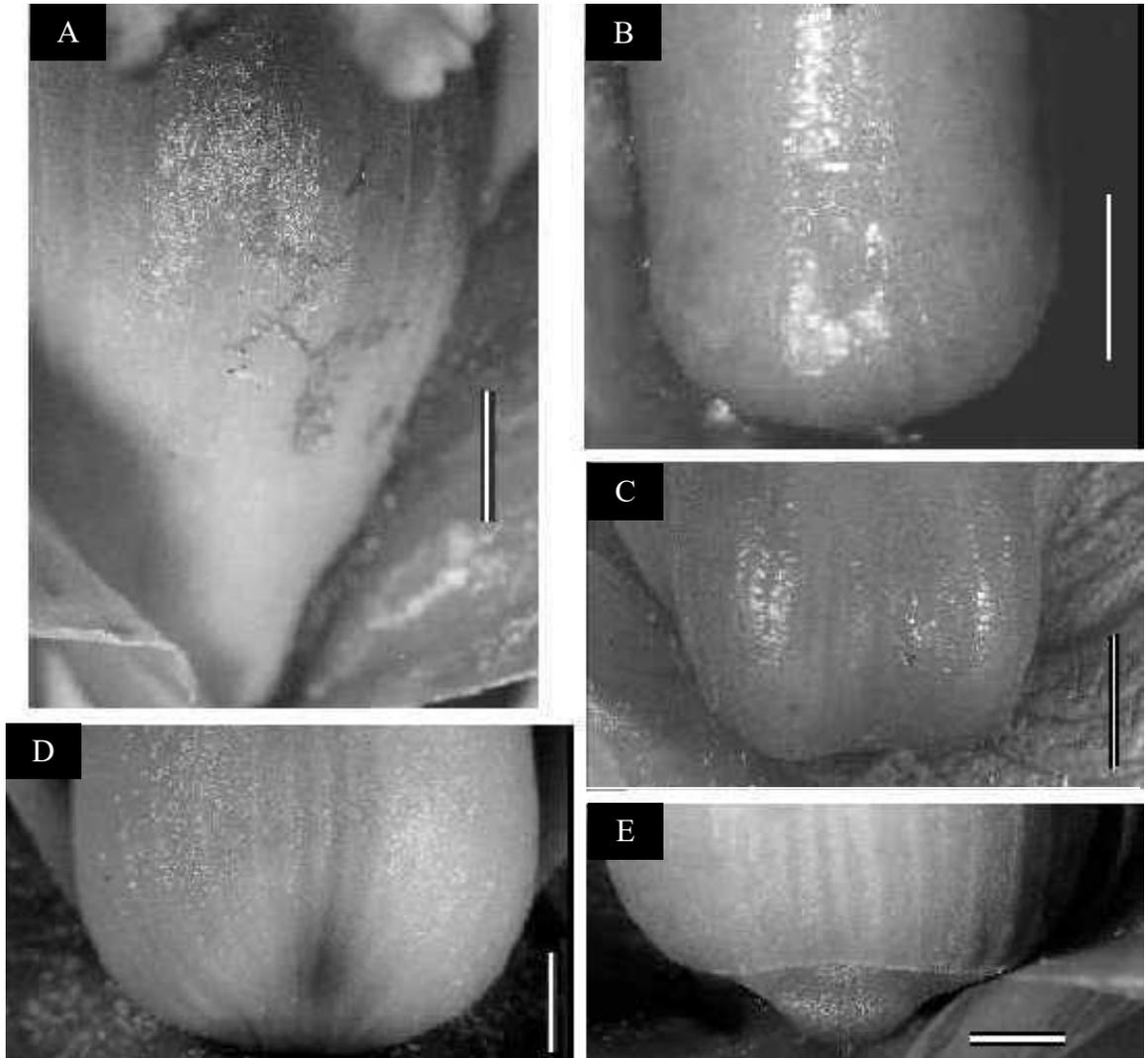
Fuente: Elaboración propia.



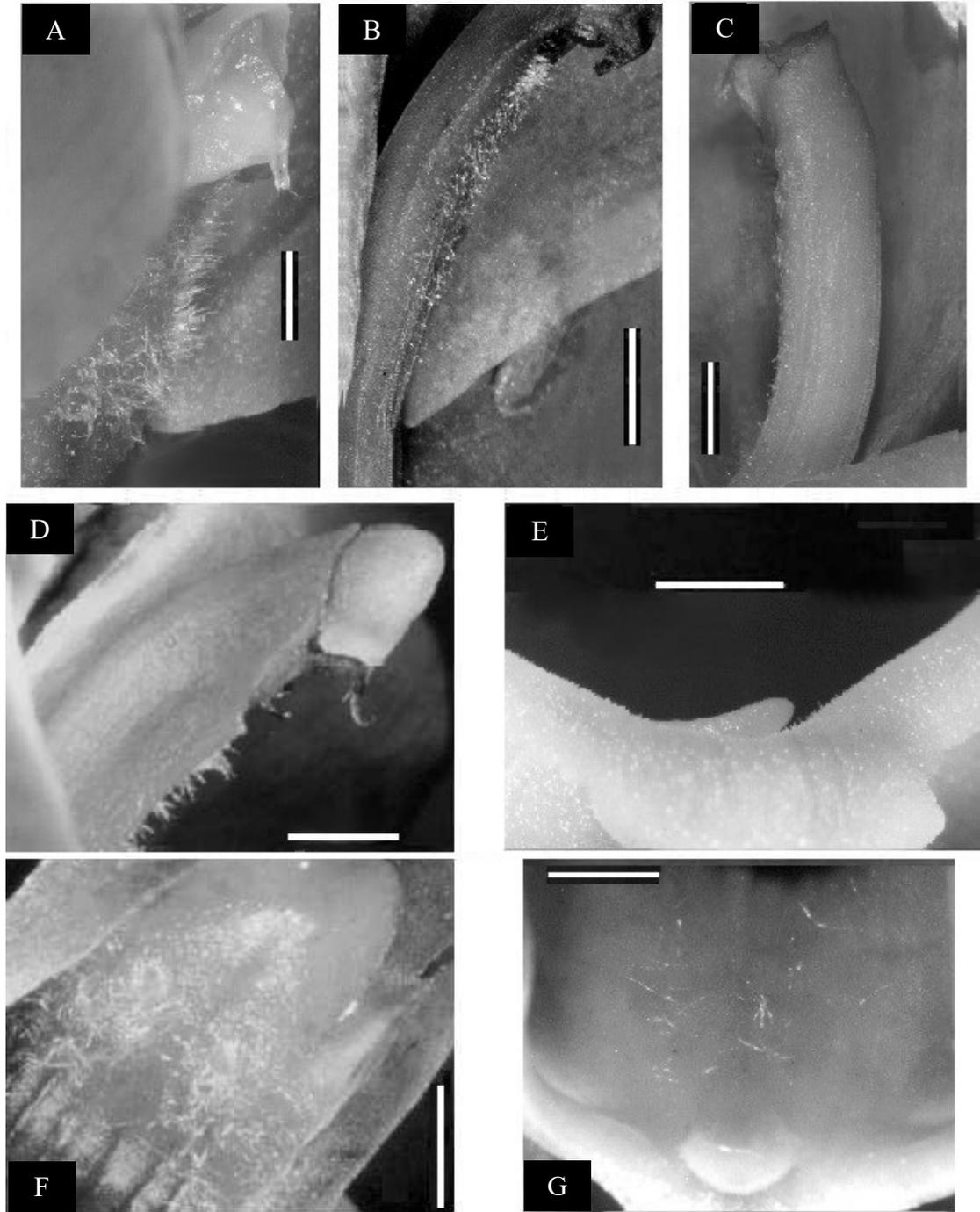
**Figura 9.** Formas de apertura del labelo visto desde el frente de la flor en especies de Lycaste.  
**A.** Abertura del labelo en L. cruenta (carácter 3, el recuadro rodea el carácter observado en las flores de Lycaste.), **B.** Posibles formas del carácter de 0 al 5.  
 Fuente: Elaboración propia.



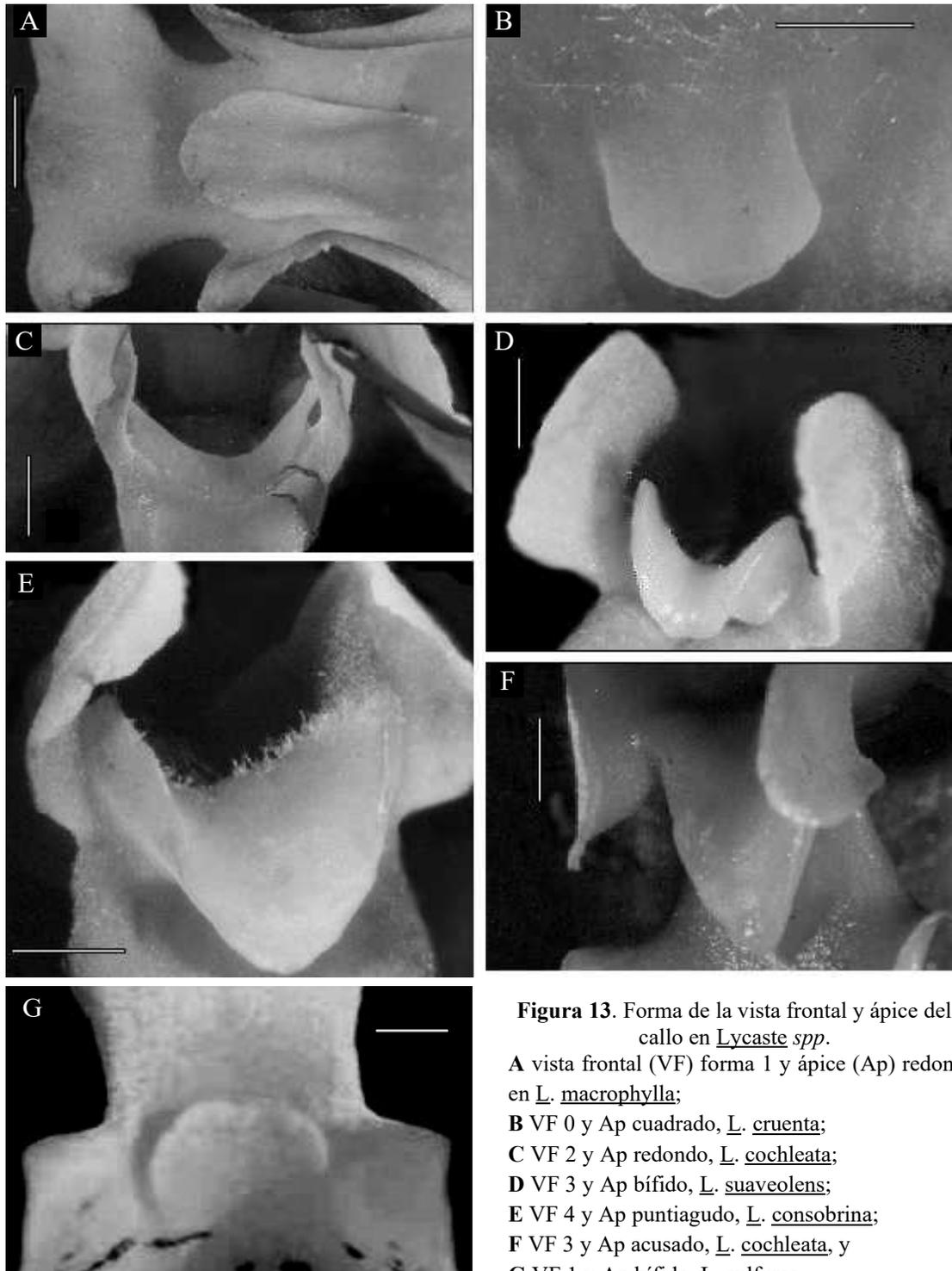
**Figura 10.** Forma de la base del labelo hasta el inicio de los lóbulos medio y laterales en especies de Lycaste.  
**A.** Base del labelo en vista inferior de flor de L. suaveolens (carácter 2, el recuadro rodea el carácter observado en las flores de Lycaste.), **B.** Posibles formas del carácter de 0 al 5.  
 Fuente: Elaboración propia.



**Figura 11.** Formas del mentón y de la indentación del labelo en especies de Lycaste. **A** sin mentón L. macrophylla subs. xanthocheila, **B** a la **E** con mentón; **B** sin indentación, L. consobrina; **C** con indentación en una cuarta parte, L. cochleata; **D** con indentación que cubre la mitad, L. sulfurea, y **E** con indentación a todo lo ancho de la base, L. cruenta. Las líneas blancas equivalen a 2mm.  
Fuente: Elaboración propia.

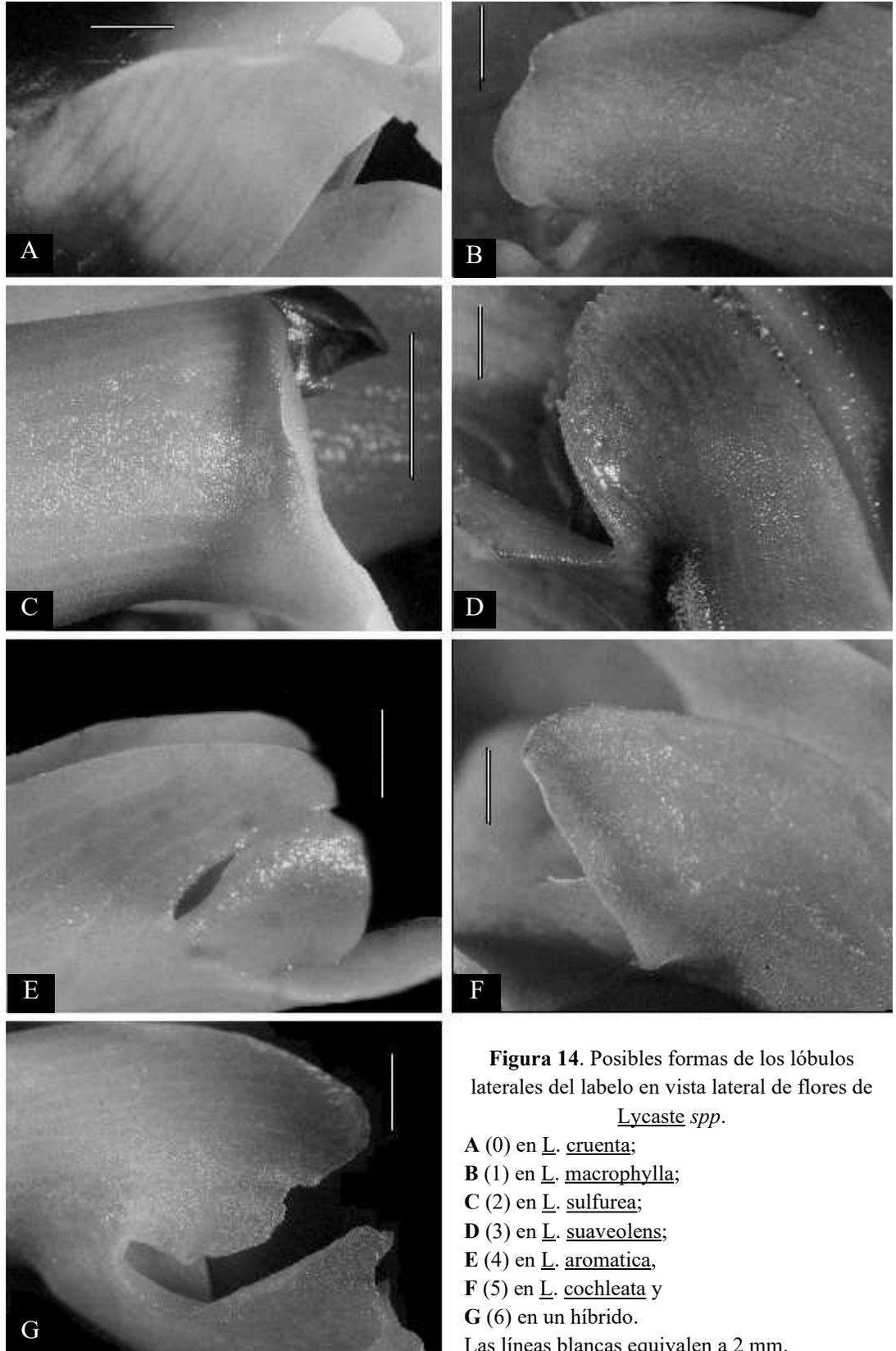


**Figura 12.** Posibles formas de los tricomas en las partes florales de *Lycaste* spp. **A a D** en la Columna. **E a G** en el Labelo y el callo. **A** Base glabra y partes proximal y distal lanadas en *L. cruenta*; **B** Base glabra, parte proximal puberulenta y parte distal tomentosa en *L. cochleata*; **C** Parte distal puberulenta en *L. bradeorum*; **D** Parte distal glabrata en *L. cochleata*; **E** Superficie glabrata en labelo de *L. cruenta*; **F** superficie velutinosa en el labelo y glabra en el callo, *L. bradeorum*; **G** superficie pilosa en el labelo y glabra en el callo, *L. cruenta*. Las líneas blancas equivalen a 2mm.  
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 13.** Forma de la vista frontal y ápice del callo en *Lycaste spp.*  
**A** vista frontal (VF) forma 1 y ápice (Ap) redondo en *L. macrophylla*;  
**B** VF 0 y Ap cuadrado, *L. cruenta*;  
**C** VF 2 y Ap redondo, *L. cochleata*;  
**D** VF 3 y Ap bifido, *L. suaveolens*;  
**E** VF 4 y Ap puntiagudo, *L. consobrina*;  
**F** VF 3 y Ap acusado, *L. cochleata*, y  
**G** VF 1 y Ap bifido, *L. sulfurea*.  
 Las líneas blancas equivalen a 2 mm.

Fuente: Elaboración propia.

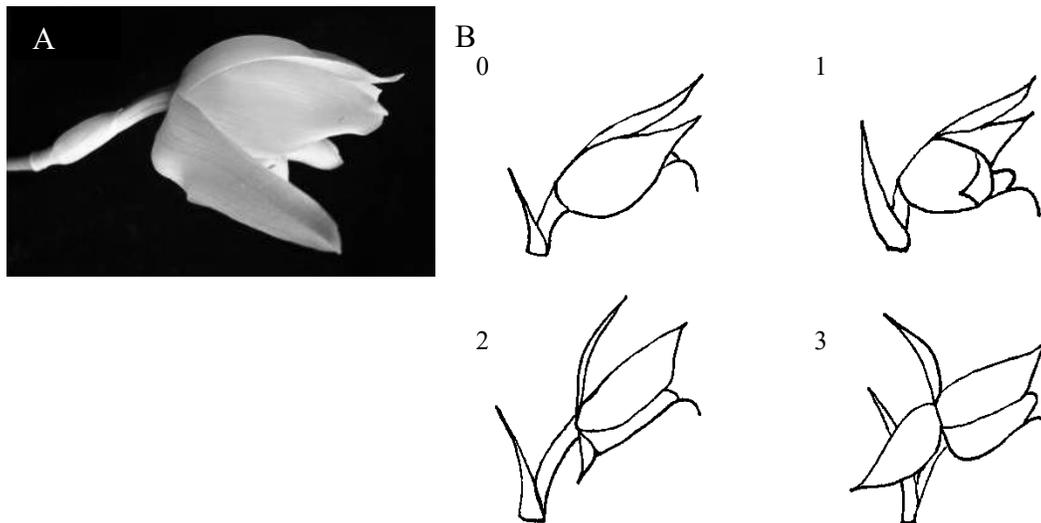


**Figura 14.** Posibles formas de los lóbulos laterales del labelo en vista lateral de flores de *Lycaste spp.*

- A (0) en *L. cruenta*;
- B (1) en *L. macrophylla*;
- C (2) en *L. sulfurea*;
- D (3) en *L. suaveolens*;
- E (4) en *L. aromatica*,
- F (5) en *L. cochleata* y
- G (6) en un híbrido.

Las líneas blancas equivalen a 2 mm.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 15.** Posible posición de los sépalos en relación con el resto de la flor en *Lycaste spp.*  
**A.** Posición de los sépalos en *Lycaste suaveolens* (carácter 0); **B.** Posibles estados de carácter, van de 0 a 3.  
 Fuente: Elaboración propia.

Para el diagnóstico estadístico de la morfología se ingresaron los datos observados en una matriz rectangular en Microsoft Office Excel© 97, el cual es compatible con el resto de los programas a utilizar. La interpretación de todos los datos combinados se basa en análisis multivariado (Molina Cano 1977). Con SYSTAT 8.0 (SPSS 1998) se realizaron los análisis discriminante y de componentes principales para señalar diferencias morfológicas intra- e interespecíficas del grupo interno. Se inició el análisis entre los supuestos individuos puros para confirmar si había traslape entre sus características y confirmar su identificación. Después se agregaron los híbridos naturales para que sus características intermedias no interfirieran con la identificación de las especies.

El análisis discriminante es particularmente informativo porque los individuos mal identificados *a priori*, pueden ser reconocidos y asignados a la especie a la que pertenecen (Rojas, Barriga y Figueroa 2000). Después de confirmar la identidad de los individuos medidos se procedió a reportar y comparar las medias y respectivas desviaciones estándar,

de cada carácter continuo, medido por medio de la t de Student para parejas de especies, evaluando:

H<sub>0</sub>: Las medias para cada carácter son iguales entre especies.

H<sub>a</sub>: Existe diferencia entre las medias de cada carácter para las parejas de especies.

Para las características discontinuas se reportó la moda de cada carácter para cada especie, utilizándola descriptivamente para determinar los más útiles para identificación de las especies y crear una clave de identificación funcional para científicos y público en general.

El análisis de componentes principales agrupa varios caracteres relacionándolos en factores, y muestra gráficamente cómo cada uno de los factores encontrados, contribuye a separar grupos (Rojas, Barriga y Figueroa 2000). Estos métodos son útiles al analizar introgresión y estructura de conglomerados de híbridos, solo si se ha demostrado que existe hibridación entre los grupos en estudio (Albert, D'Antonio y Schierenbeck 1997; Freudestein y Doyle 1994; Theriot y Stormer 1984; Wilson 1992).

Se determinó la presencia de híbridos en las comunidades de *Lycaste spp.*, basándose en el procedimiento de conteo de caracteres (Wilson 1992). Este procedimiento se realizó, para cada población simpátrica en la que se realizaron colectas, de la manera siguiente:

Los individuos se colocaron en grupos, dos taxones parentales putativos y otro como posible híbrido, todos de la misma comunidad. En este caso, para facilitar la comparación, solo se tomaron en cuenta los datos cuantitativos cuyas medias eran estadísticamente diferentes entre ambas especies padres (t de Student pareada,  $P \leq 0.001$ ). Estos datos se presentaron como medias y su respectiva desviación estándar para cada comunidad.

Se determinó si la media de cada carácter de los híbridos es intermedia o no entre las medias de los posibles parentales. Se contaron los caracteres intermedios y también los que no. Se juzga con una Prueba de Signos (Sign Test, en inglés) de una cola, de caracteres intermedios vs. no intermedios (Wilson 1992; Zar 1999). Las hipótesis estadísticas por evaluar son:

H<sub>0</sub>: No existe divergencia entre las especies evaluadas ( $P \leq 0.05$ ). Esto quiere decir que hay un grupo intermedio o híbrido.

H<sub>a</sub>: Existe divergencia entre las especies evaluadas ( $P > 0.05$ ). Esto quiere decir, que son especies separadas y no hay híbridos entre ellas.

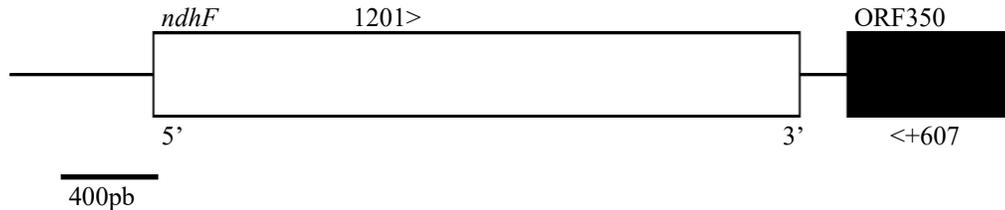
#### **D. Análisis genético**

Este análisis fue realizado para 100 plantas en total, que incluye individuos de L. cochleata, L. cruenta, L. suaveolens, L. sulfurea y sus híbridos. Para el análisis del ADN cloroplásmico (ADN<sub>cp</sub>) se cortaron dos pedazos de aproximadamente 9cm<sup>2</sup> ( $\approx 3\text{cm} \times 3\text{cm}$ ) de hojas, jóvenes y sanas, por planta, con una hoja de afeitar de un solo filo. Para evitar contagio de virus se esterilizaron las hojas de afeitar calentándolas al rojo vivo en un mechero de alcohol antes de usarlas en cada planta. Las muestras se empacaron en papel tisú (Kimwipes™) y papel aluminio, dentro de cajas plásticas con sílica gel con indicador de humedad y se almacenaron a -20°C.

Los procedimientos detallados de extracción, cuantificación y amplificación de ADN están en el Anexo B. Se extrajo ADN del material vegetal con la metodología de Edwards, Johnstone y Thompson (1991) y también con una modificación de Doyle y Doyle (1990). Se compararon las concentraciones de ADN total ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenido por métodos de fluorimetría.

Luego se amplificó una porción del gen *ndhF* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores +607 reverso (Reverse), y 1201 anverso (Forward), de la Universidad de Georgia en Athens (P7 y P4 respectivamente, según

Neyland y Urbastch 1995, secuencias completas están en el Anexo B.). Estos cebadores están diseñados para iniciar la amplificación de la hebra de ADNcp a partir del par de bases 1201 del gen *ndhF* hasta aproximadamente el par de bases 607 del gen colindante (Open Reading Frame, ORF 350), mostrados en la Figura 16.



**Figura 16.** Localización aproximada de los cebadores usados para la caracterización del gen *ndhF*, utilizado para el análisis de especies de Lycaste.

Fuente: Neyland y Urbatsch (1995).

Los fragmentos de ADNcp amplificado (haplotipos) se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos posteriormente con bromuro de etidio. Se visualizaron las bandas con luz ultravioleta en un transiluminador, fotografiando el gel para su interpretación posterior.

Se tomaron los haplotipos identificados y se relacionaron con los individuos identificados morfológicamente y sus localidades de origen. Se buscó una correlación entre caracteres morfológicos y los diferentes haplotipos para encontrar la posible especie que dio origen a las poblaciones simpátricas visitadas y poder identificar la especie madre de los individuos de identificación problemática.

## E. Cladograma

Se realizó un cladograma, el cual incluye datos morfológicos continuos y discontinuos, para poder hacer inferencias filogenéticas con ayuda de los datos genotípicos (Molina Cano 1977; Domínguez *et al.* 1998). El cladograma analiza las características medidas de Lycaste cochleata, L. cruenta, L. suaveolens y L. sulfurea (grupo interno de fenotipos encontrados más abundantemente en las poblaciones analizadas), además de L. aromatica (México), L. bradeorum (de Guatemala y Costa Rica), L. consobrina (de

Guatemala y México), L. deppei, L. lasioglossa (sect. *Deciduosae*, subsect. *Xanthanthae*) como especies hermanas, y L. dowiana, L. macrophylla subs. xanthocheila y L. skinneri (sect. *Macrophyllae*, encontradas en Guatemala) como grupo externo.

## **F. Análisis geográfico de distribución de las especies**

Se referenciaron en un mapa los sitios de muestreo y los haplotipos conocidos del gen *ndhF* de las especies de Lycaste amarillas y se asociaron las características morfológicas agrupadas según localidad de origen. Esto sirvió para correlacionar estos caracteres con su identificación taxonómica y posible lugar de origen, o dispersión en el país.

### III. RESULTADOS

#### A. Muestreo

Las especies más abundantes encontradas durante los muestreos, en orden decreciente son: L. suaveolens, híbridos naturales, L. cruenta y L. cochleata. Las menos abundantes son L. consobrina y L. bradeorum y L. skinneri. Las especies encontradas en una sola localidad en este estudio son L. bradeorum, L. consobrina, L. deppei y L. sulfurea (Cuadro 5).

No todas las plantas en cultivo de las poblaciones visitadas durante este estudio produjeron flores y hojas en este período, así que se incluyeron flores de plantas en cultivo de poblaciones de Escuintla, Santa Rosa, Sololá (las tres poblaciones alopátricas para L. cruenta), Izabal (población alopátrica para L. cochleata), Petén, Zacapa, y las Verapaces (poblaciones simpátricas), además de plantas compradas en la ciudad, cuya localidad de origen es desconocida, así como material vegetal para análisis genético de las mismas.

Se encontraron poblaciones alopátricas de L. cochleata (Izabal, 1996 por M. W. Dix) y de L. cruenta (Suchitepéquez, 1999, e Izabal, 1998), todas las demás poblaciones son simpátricas con otras especies de *Lycaste*. En Izabal se encontraron solo 8 individuos de L. cochleata (1996) y 13 de L. cruenta (1998) en poblaciones alopátricas. En la población de Suchitepéquez encontramos 40 individuos de L. cruenta.

Las demás poblaciones visitadas de *Lycaste* amarillas son simpátricas con otras especies de lycastes. Las poblaciones de Zacapa (130 individuos numerados, pero solo 63 identificados por flores entre 1997 y 2001) incluyen las tres especies en estudio y sus posibles híbridos. La comunidad de Huehuetenango (20 individuos numerados, solo 15

florearon), tiene individuos de *L. deppei* y *L. cruenta*. En Jutiapa (52 individuos numerados, 16 identificados) se encuentran *L. cruenta*, *L. sulfúrea*, *L. suaveolens* e híbridos naturales; en anteriores viajes de campo a la misma localidad solo se había reportado la presencia de *L. cruenta* (cuadernos de colecta D&D en la colección de orquídeas, Departamento de Biología, UVG). La población de Chiquimula (11 individuos encontrados e identificados) incluye a *L. cochleata*, *L. suaveolens*, e híbridos. Los datos de las plantas identificadas, provenientes de poblaciones simpátricas se resumen en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Distribución de especies en poblaciones simpátricas de *Lycaste*.

Especie	Departamentos <sup>1</sup>					Individuos encontrados (% de la población)			Total de individuos (% de individuos)
	Muestras entre 1997 y 1999					Muestras anteriores			
	Za	Ju	Cq	Iz <sup>2</sup>	Hu	Pe	AV	BV	
Híbridos	15 (24)	10 (63)	4 (36)	-	-	1 (17)	6 (32)	7 (39)	<b>43 (28)</b>
<i>L. cochleata</i>	1 (2)	-	3 (27)	4 (67)	-	3 (50)	4 (21)	1 (6)	<b>16 (10)</b>
<i>L. cruenta</i>	2 (3)	-	-	-	7 (47)	-	3 (16)	3 (17)	<b>15 (10)</b>
<i>L. sulfúrea</i>	-	5 (31)	-	-	-	2 (33)	-	1 (6)	<b>8 (5)</b>
<i>L. bradeorum</i>	2 (3)	-	-	-	-	-	1 (5)	-	<b>3 (2)</b>
<i>L. consobrina</i>	1 (2)	-	-	-	-	-	-	-	<b>1 (1)</b>
<i>L. suaveolens</i>	42 (67)	1 (6)	4 (36)	-	-	-	-	5 (28)	<b>52 (34)</b>
<i>L. deppei</i>	-	-	-	-	8 (53)	-	-	-	<b>8 (5)</b>
<i>L. dowiana</i>	-	-	-	-	-	-	4 (21)	-	<b>4 (3)</b>
<i>L. lasioglossa</i>	-	-	-	2 (33)	-	-	-	-	<b>2 (1)</b>
<i>L. skinneri</i>	-	-	-	-	-	-	1(5)	1 (6)	<b>2 (1)</b>
<b>Total, individuos por localidad</b>	<b>63</b>	<b>16</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>154</b>
<b>Total, especies amarillas por localidad</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
Presencia de híbridos naturales	+	+	+	-	-	+	+	+	<b>6 de 8</b>

<sup>1</sup> Za, Zacapa; Ju, Jutiapa; Cq, Chiquimula; Iz, Izabal; Hu, Huehuetenango; Pe, Petén; AV, Alta Verapaz; BV, Baja Verapaz.

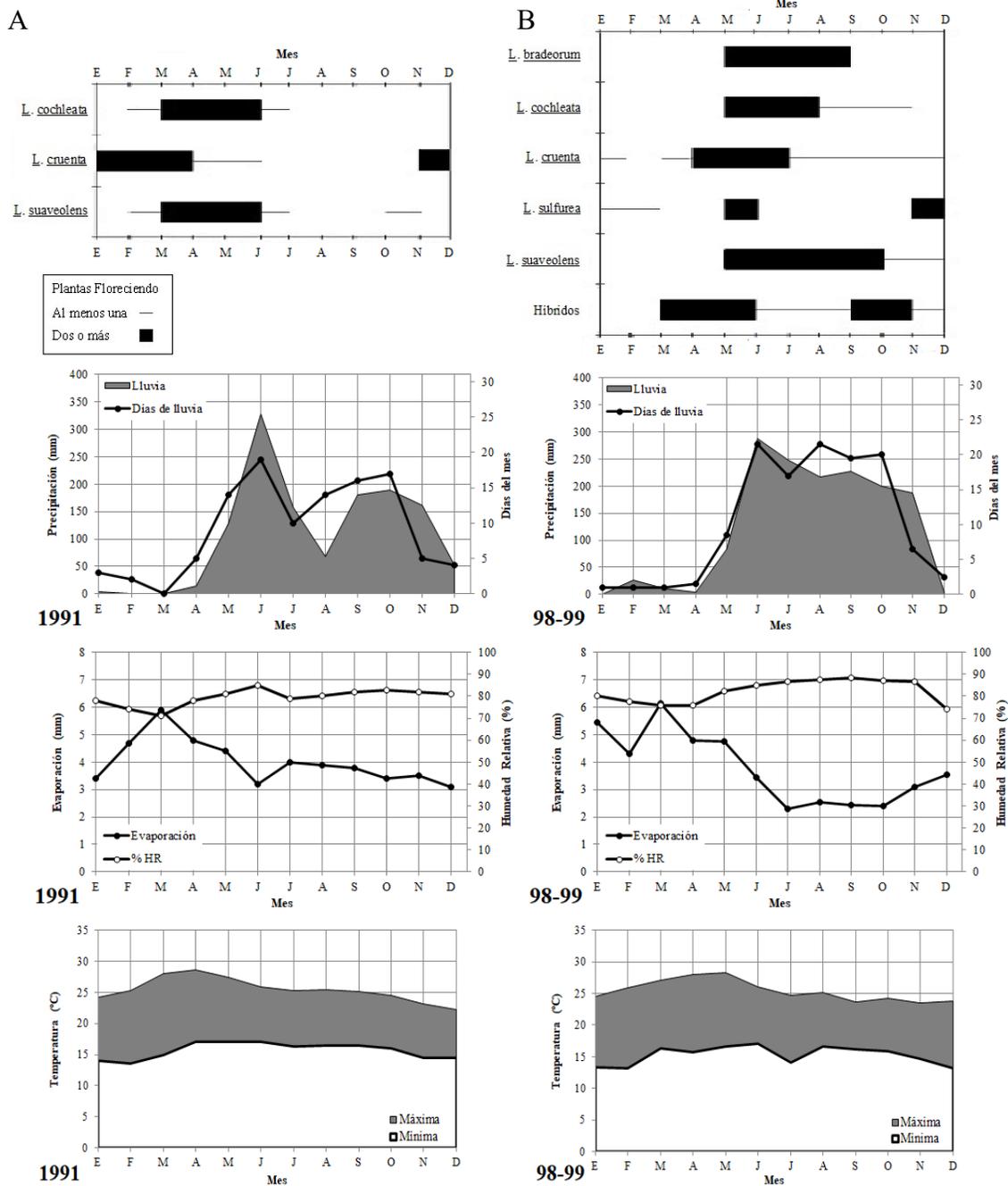
<sup>2</sup> comunidad a elevaciones de hasta de 900m s. n. m.

Fuente: Elaboración propia.

Las poblaciones que presentan híbridos naturales se encuentran en elevaciones entre 1,100 y 1,740 m s.n.m. Las poblaciones alopátricas de L. cochleata se encuentran hasta una altura máxima de 900 m s.n.m. y L. cruenta hasta 1,750 m s.n.m. (ver Anexo D.). En Jutiapa tenemos reporte de otra población alopátrica de L. cruenta, a 1600 m s.n.m. (Bailey y Monzón en 1998), pero son necesarias visitas subsecuentes al área para poder confirmar la presencia de una sola especie. Se trató de localizar otra población en Chiquimula, cercana a Esquipulas reportada a finales de la década de los 70, pero el área donde se encontraba es actualmente un balneario y casi no hay árboles con orquídeas en las cercanías. Una tercera parte de la población del muestreo preliminar, de 1996 en Zacapa, desapareció en los incendios forestales de 1997. Los problemas encontrados para el mantenimiento de las poblaciones son la colecta indiscriminada de especímenes para venta, avance de la frontera agrícola y ganadera, tala inmoderada y los incendios forestales.

Las plantas rescatadas durante estos viajes de campo fueron depositadas en el jardín botánico del Departamento de Biología de la UVG. Estos individuos fueron colectados en áreas de pastoreo intensivo y lugares donde el bosque fue talado, para extracción de madera o para abrir espacio a plantaciones y/o construcciones. Estas plantas estaban en malas condiciones y estaban en riesgo de ser comidas por el ganado o desecadas por el sol.

Los períodos de floración de 1998 a 1999 mostrados en la Figura 17B, se atrasaron por tres meses en relación con los reportados por Dix y Dix (Figura 17A, 1992), pero siguen el mismo patrón para L. cochleata, L. cruenta y L. suaveolens. Al comparar los patrones de lluvia de los años preliminares a la toma de datos de floración notamos que hay mayor cantidad de precipitación pluvial en los primeros meses del periodo 1998-1999. Los patrones de humedad relativa, porcentaje de evaporación y temperaturas, máxima y mínima, presentan el mismo patrón en los periodos comparados (Figura 17).



**Figura 17.** Período de floración de *Lycaste* spp. y datos climáticos de los años de toma de datos.

**A.** Floraciones reportadas por Dix y Dix (1992) y datos climáticos para 1991; **B.** Floración observada entre 1998 y 1999 en invernaderos UVG (1,502 m s.n.m.) y datos climáticos del periodo 1998-1999.

Fuente: Floración 1991: Dix y Dix (1992); floración 1998-1999 elaboración propia; datos climáticos INSIVUMEH 2001.

## B. Polinización

Se polinizaron, se puso polinias en el estigma a 287 flores (ver Cuadro 6 y Cuadro 7). El estigma se cerró en el 69% de las flores polinizadas y 35% desarrollaron cápsula (fecundadas). Se encontró diferencia significativa,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=287)} = 2.73$ ;  $0.05 > p > 0.10$ , entre el éxito obtenido de la polinización cruzada y de la autopolinización de las especies, donde a pesar de que un mayor número de flores con polinización cruzada cerraron el estigma (72% cruzada vs. 54% autopolinizadas), las flores autopolinizadas tuvieron mayor éxito al desarrollar cápsula (33% cruzada vs. 43% autopolinizadas).

**Cuadro 6.** Resultados de la polinización cruzada entre *Lycaste cochleata*, *L. cruenta*, *L. suaveolens* y sus híbridos putativos.

Especie de las flores polinizadas		Polinizadas	Estigma cerrado		Formó cápsula		$\chi^2$	
Columna (madre)	Polinias (padre)		Total	% <sup>1</sup>	Total	% <sup>1</sup>		
Híbrido	<i>L. cochleata</i>	11	8	72.7%	6	54.5%	4.533	
Híbrido	<i>L. cruenta</i>	13	12	92.3%	8	61.5%		
Híbrido	<i>L. suaveolens</i>	13	11	84.6%	6	46.2%		
Híbrido	Híbrido	18	15	83.3%	6	33.3%		
<i>L. cochleata</i>	Híbrido	11	9	81.8%	2	18.2%		
<i>L. cruenta</i>	Híbrido	15	12	80.0%	5	33.3%		
<i>L. suaveolens</i>	Híbrido	15	10	66.7%	6	40.0%		
<b>Total, éxito para híbridos</b>		<b>96</b>	<b>77</b>	<b>80.2%</b>	<b>39</b>	<b>40.6%</b>		
<i>L. cochleata</i>	<i>L. cochleata</i>	26	17	65.4%	8	30.8%		5.128
<i>L. cochleata</i>	<i>L. cruenta</i>	11	7	63.6%	1	9.1%		
<i>L. cochleata</i>	<i>L. suaveolens</i>	14	12	85.7%	7	50.0%		
<i>L. cochleata</i>	Híbrido	11	9	81.8%	2	18.2%		
Híbrido	<i>L. cochleata</i>	11	8	72.7%	6	54.5%		
<i>L. cruenta</i>	<i>L. cochleata</i>	15	10	66.7%	5	33.3%		
<i>L. suaveolens</i>	<i>L. cochleata</i>	15	9	60.0%	4	26.7%		
<b>Total, éxito para <i>L. cochleata</i></b>		<b>103</b>	<b>72</b>	<b>69.9%</b>	<b>33</b>	<b>32.0%</b>		
<i>L. cruenta</i>	<i>L. cochleata</i>	15	10	66.7%	5	33.3%	13.499	
<i>L. cruenta</i>	<i>L. cruenta</i>	15	12	80.0%	6	40.0%		
<i>L. cruenta</i>	<i>L. suaveolens</i>	15	8	53.3%	2	13.3%		
<i>L. cruenta</i>	Híbrido	15	12	80.0%	5	33.3%		
Híbrido	<i>L. cruenta</i>	13	12	92.3%	8	61.5%		
<i>L. cochleata</i>	<i>L. cruenta</i>	11	7	63.6%	1	9.1%		
<i>L. suaveolens</i>	<i>L. cruenta</i>	16	7	43.8%	2	12.5%		
<b>Total, éxito para <i>L. cruenta</i></b>		<b>100</b>	<b>68</b>	<b>68.0%</b>	<b>29</b>	<b>29.0%</b>		
<i>L. suaveolens</i>	<i>L. cochleata</i>	15	9	60.0%	4	26.7%		9.966
<i>L. suaveolens</i>	<i>L. cruenta</i>	16	7	43.8%	2	12.5%		
<i>L. suaveolens</i>	<i>L. suaveolens</i>	24	19	79.2%	8	33.3%		
<i>L. suaveolens</i>	Híbrido	15	10	66.7%	6	40.0%		
Híbrido	<i>L. suaveolens</i>	13	11	84.6%	6	46.2%		
<i>L. cochleata</i>	<i>L. suaveolens</i>	14	12	85.7%	7	50.0%		
<i>L. cruenta</i>	<i>L. suaveolens</i>	15	8	53.3%	2	13.3%		
<b>Total, éxito para <i>L. suaveolens</i></b>		<b>112</b>	<b>76</b>	<b>67.9%</b>	<b>35</b>	<b>31.3%</b>		
<b>Total</b>		<b>247</b>	<b>178</b>	<b>72.1%</b>	<b>82</b>	<b>33.2%</b>	<b>5.890</b>	

<sup>1</sup> Los porcentajes se calcularon según el total de flores polinizadas para cada pareja.

\*\*\*\*  $P \geq 0.01$ ; \*\*\*  $P \geq 0.05$ ; \*\*  $P \geq 0.10$ ; \*  $P \geq 0.15$ ; - No existe diferencia significativa entre ninguno.

Fuente: Elaboración propia.

Del total de las polinizaciones cruzadas encontramos diferencia significativa  $\chi^2_{(g.l.=3, N=247)} = 5.890$ ;  $0.10 > p > 0.15$  (Cuadro 6); al volver a analizar los datos comparando los híbridos contra el resto esa diferencia se vuelve mayor,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=247)} = 5.536$ ;  $0.01 > p > 0.05$ , explicando que los híbridos presentan un mayor número de columnas cerradas (80%) y mayor formación de cápsulas (41%). Los cruces entre especies distintas solo desarrollaron cápsulas el 29% de las veces,  $\chi^2_{(g.l.=8, N=151)} = 10.953$ ;  $p \ll 0.15$ , sin diferencia significativa entre ellas.

Al comparar el éxito en la formación de cápsulas de cada especie ante las otras y los híbridos naturales (Cuadro 6), L. cochleata,  $\chi^2_{(g.l.=6, N=103)} = 5.128$ ,  $p \ll 0.15$ ; y los híbridos,  $\chi^2_{(g.l.=6, N=96)} = 4.533$ ,  $p \ll 0.15$ ; no presentan diferencia significativa. Con L. cruenta,  $\chi^2_{(g.l.=6, N=100)} = 13.499$ ,  $0.01 > p > 0.05$ ; encontramos que al cruzarse con híbridos naturales como madres tiene mayor éxito en la formación de híbridos (62%). Con L. suaveolens,  $\chi^2_{(g.l.=6, N=112)} = 9.966$ ;  $0.10 > p > 0.15$ ; encontramos que cuando se cruza con L. cruenta, como madre o como padre, presenta menor éxito en la formación de cápsulas (13%) y con L. cochleata como madre es mayor (50%).

Al analizar el éxito en la producción de cápsulas de los cruces con otras especies, los tres presentan diferencias estadísticamente significativas: L. cochleata,  $\chi^2_{(g.l.=4, N=81)} = 10.796$ ;  $0.01 > p > 0.05$ , L. cruenta,  $\chi^2_{(g.l.=4, N=72)} = 8.399$ ;  $0.05 > p > 0.10$ , y con L. suaveolens,  $\chi^2_{(g.l.=4, N=84)} = 10.953$ ;  $0.05 > p > 0.10$ . Donde, los cruces entre L. cochleata × L. suaveolens presentan la mayor cantidad de columnas cerradas y producción de cápsulas, 86% y 50%, respectivamente. Los cruces entre L. cruenta × L. cruenta tienen más éxito en la producción de cápsulas (40%); y L. suaveolens × L. cruenta tienen la menor producción de cápsulas (13%). No hubo diferencia significativa entre el éxito de formación de cápsula entre los cruces entre L. cochleata × L. cruenta,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=26)} = 1.625$ ;  $p \ll 0.15$ , L. cochleata × L. suaveolens,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=29)} = 1.701$ ;  $p < 0.15$ , o L. cruenta × L. suaveolens,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=31)} = 0.151$ ;  $p \ll 0.15$ .

De las 40 flores autopolinizadas (Cuadro 7), 53% cerraron el estigma, y solamente el 43% desarrollaron cápsula,  $\chi^2_{(g.l.=3, N=40)} = 2.437$ ;  $p \ll 0.15$ . (Cuadro 7). Cuando se utilizaron híbridos como plantas madre se alcanzó un porcentaje de polinización y fecundación del 84% para cruces interespecíficos y del 54% para autopolinización, mientras que cuando son los donadores de polinias (padres) son 76% y 32%, respectivamente,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=78)} = 2.459$ ;  $0.10 > p > 0.15$ . En la autofecundación con polinias de la misma planta se encontró que los híbridos tenían un éxito de fecundación del 60%, para L. suaveolens del 43%,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=28)} = 0.167$ ;  $p \ll 0.15$ , para L. cruenta del 40%,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=28)} = 0.611$ ;  $p \ll 0.15$ , y para L. cochleata del 22%,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=22)} = 2.059$ ;  $p < 0.15$ . (Cuadro 7). También se polinizaron flores con sus propias polinias (Cuadro 7), obteniendo un éxito en la polinización de 100% en L. cochleata, 75% en L. cruenta, 50% en los híbridos y 20% para L. suaveolens,  $\chi^2_{(g.l.=3, N=14)} = 4.113$ ;  $p \ll 0.15$ .

**Cuadro 7.** Resultados de autopolinización de flores de Lycaste spp.

Especie	Fuente de las polinias	Polinizada N	Estigma cerrado		Formó cápsula		g.l.	$\chi^2$
			n	% <sup>1</sup>	N	% <sup>1</sup>		
Híbrido		5	3	60	3	60		
<u>L. cochleata</u>	<b>misma</b>	9	4	44	2	22		
<u>L. cruenta</u>	<b>planta</b>	5	4	80	2	40		
<u>L. suaveolens</u>		7	3	43	3	43		
<b>Total, misma planta</b>		<b>26</b>	<b>14</b>	<b>54</b>	<b>10</b>	<b>39</b>	<b>3</b>	<b>2.233</b>
Híbrido	<b>misma flor</b>	4	2	50	2	50		
<u>L. cochleata</u>		2	2	100	2	100		
<u>L. cruenta</u>		3	2	67	2	67		
<u>L. suaveolens</u>		5	1	20	1	20		
<b>Total, misma flor</b>		<b>14</b>	<b>7</b>	<b>50</b>	<b>7</b>	<b>50</b>	<b>3</b>	<b>4.133</b>
<b>Total, autopolinización</b>		<b>40</b>	<b>21</b>	<b>53</b>	<b>17</b>	<b>43</b>	<b>3</b>	<b>2.437</b>

<sup>1</sup> Los porcentajes se calcularon según el total de flores polinizadas. No existe diferencia significativa entre ninguno.

Fuente: Elaboración propia.

Los híbridos naturales presentan mayor éxito en la fecundación cruzada, pero al autopolinizarse tienen un éxito entre 50 y 60% no aceptan su propio polen, por lo que las barreras para la fecundación más importante se encuentran en el estigma y la menor está en la fertilización cruzada (Cuadro 8). *L. cochleata* presenta más barreras para la fertilización cruzada y la menor para la autofecundación con polinias de la misma flor. *L. cruenta* parece ser la fácilmente polinizada con polinias de híbridos y otras especies, además la autofecundación presenta la barrera más importante. *L. suaveolens* desarrolla pocas cápsulas después de aceptar las polinias y cerrar el estigma, pero tiene una buena tasa de fecundación con los híbridos.

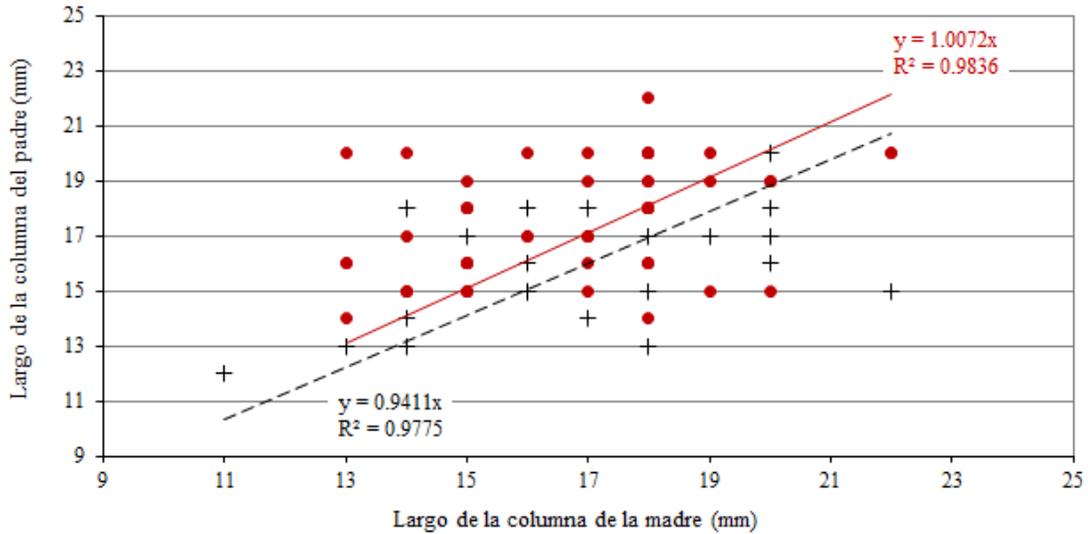
**Cuadro 8.** Posible ordenación de las barreras para la fecundación por especie de *Lycaste* y en híbridos naturales.

Posible barrera	Ordenamiento de la importancia de las barreras por especie madre				
	híbridos naturales	<i>L. suaveolens</i>	<i>L. cruenta</i>	<i>L. cochleata</i>	En general
En el estigma	4	4	4	2	4
Fertilización cruzada (diferentes plantas, misma especie)	1	3	1	1	1
Autofecundación misma planta	3	2	2	3	2
Autofecundación misma flor	2	1	3	4	3

1 a 4 en orden decreciente.

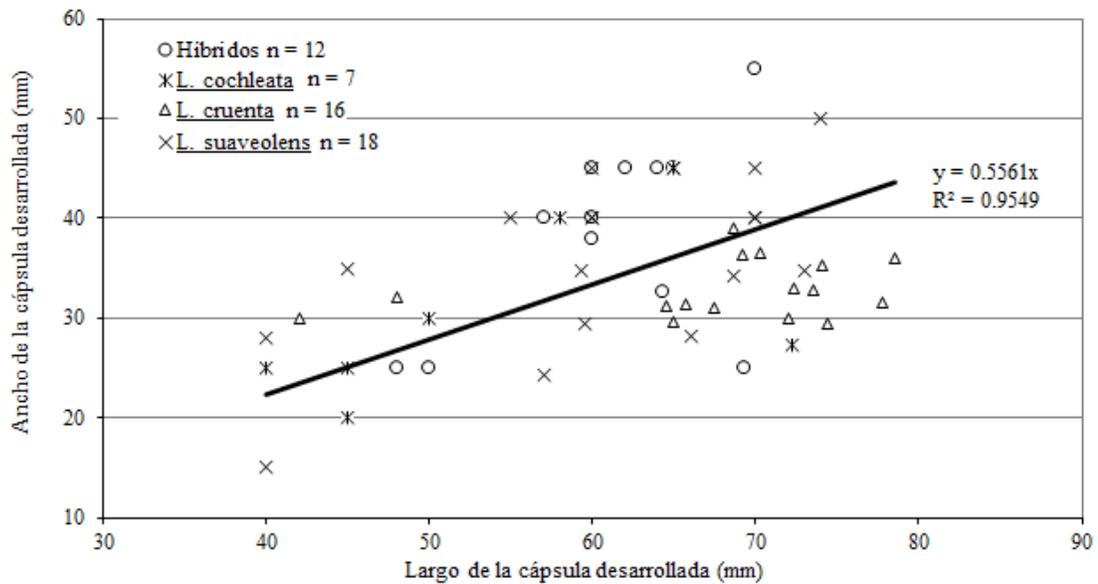
Fuente: Elaboración propia.

Las correlaciones entre largo de las columnas de ambos padres no difieren entre los cruces que desarrollaron cápsula y los que no ( $R^2=0.9836$  y  $R^2=0.9775$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia en el 0 para ambas, (ver Figura 18), siendo la relación casi de uno a uno.



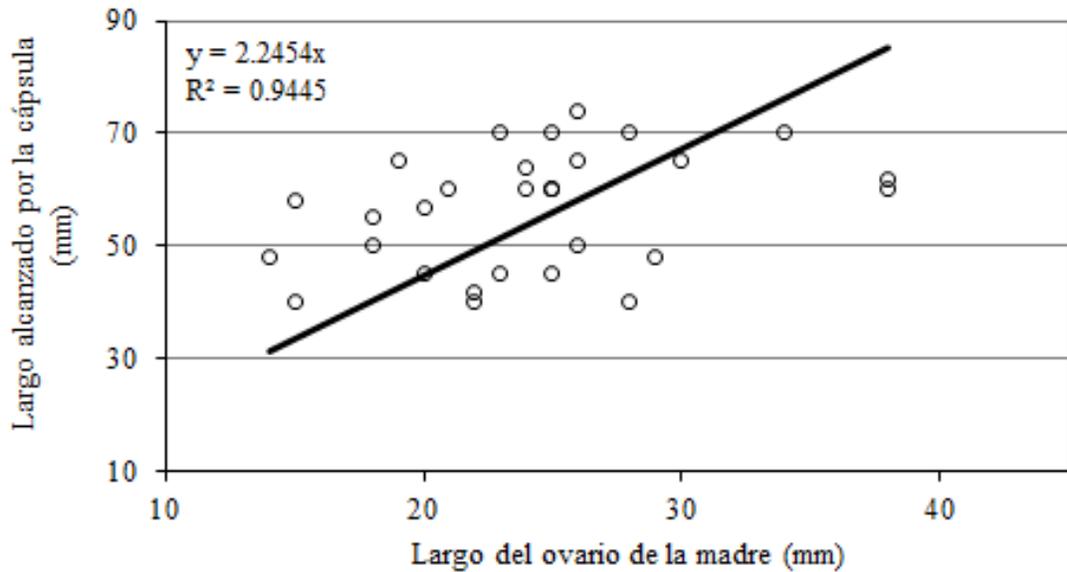
**Figura 18.** Comparación y regresión lineal entre el largo de las columnas de ambos padres, en fertilización artificial de *Lycaste spp.*  
Se incluyen datos de las flores que produjeron cápsula (+, n=35) y las que cerraron el estigma, pero no produjeron cápsula (●, n=90).  
Fuente: Elaboración propia.

*L. cruenta* produce las cápsulas más largas y los híbridos las más anchas. Hay una correlación positiva ( $R^2=0.9549$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia en el 0), donde el ancho es poco mayor de la mitad del largo de la cápsula (Figura 19).



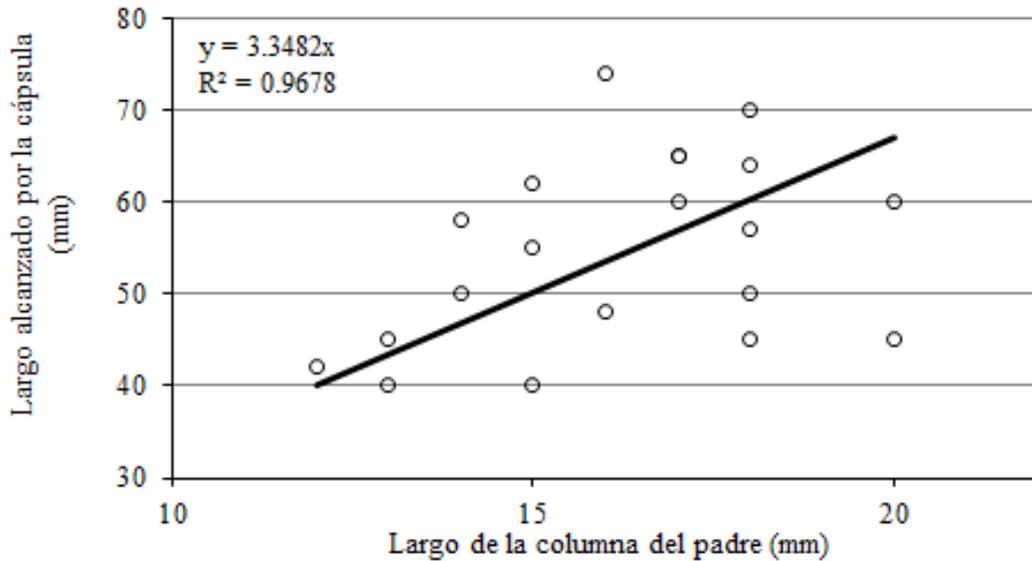
**Figura 19.** Comparación y regresión lineal, por especie madre, entre el largo y el ancho de las cápsulas formadas (n=90), después de la polinización artificial de *Lycaste spp.*  
Fuente: Elaboración propia.

El largo alcanzado por la cápsula guarda relación de poco más de dos veces (2.25) el largo del ovario antes de ser fecundado ( $R^2=0.9445$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia en el 0, Figura 20).

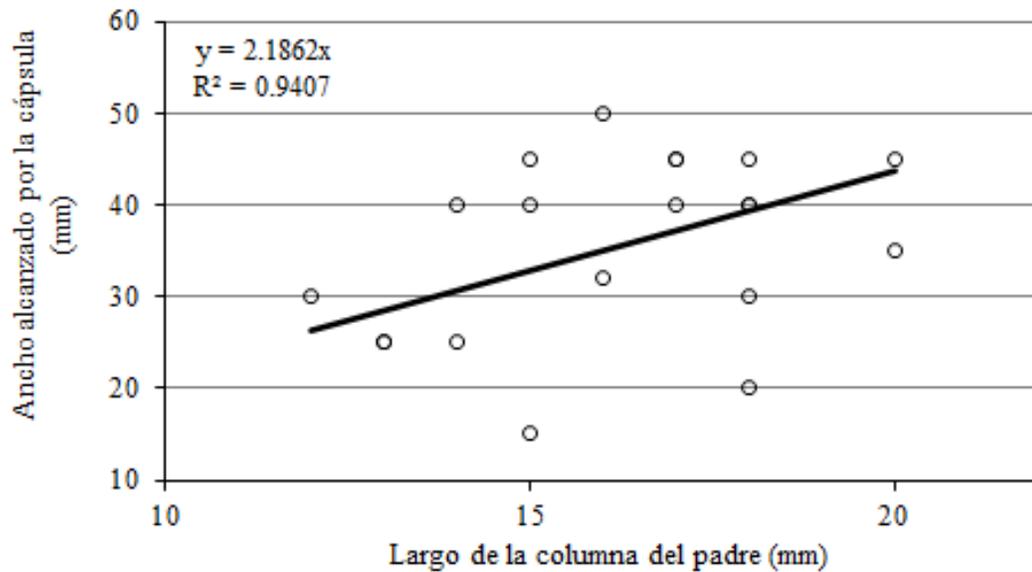


**Figura 20.** Comparación y regresión lineal entre el largo del ovario de la flor madre y el largo que alcanzó la cápsula, en fertilización artificial de *Lycaste spp.* (n=53).  
Fuente: Elaboración propia.

El largo de los tubos polínicos determina si los óvulos pueden ser alcanzados para su polinización, se supone una correlación entre el largo de la columna del padre con el largo mínimo de los tubos polínicos. El largo alcanzado por la cápsula es poco más de tres veces con el largo de la columna del padre ( $y=3.3482x$ ,  $R^2=0.9678$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia a pasar por 0, Figura 21) y poco más de dos veces el ancho que llegue a tener la cápsula ( $y=2.1862x$ ,  $R^2=0.9407$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia a pasar por 0, Figura 22).

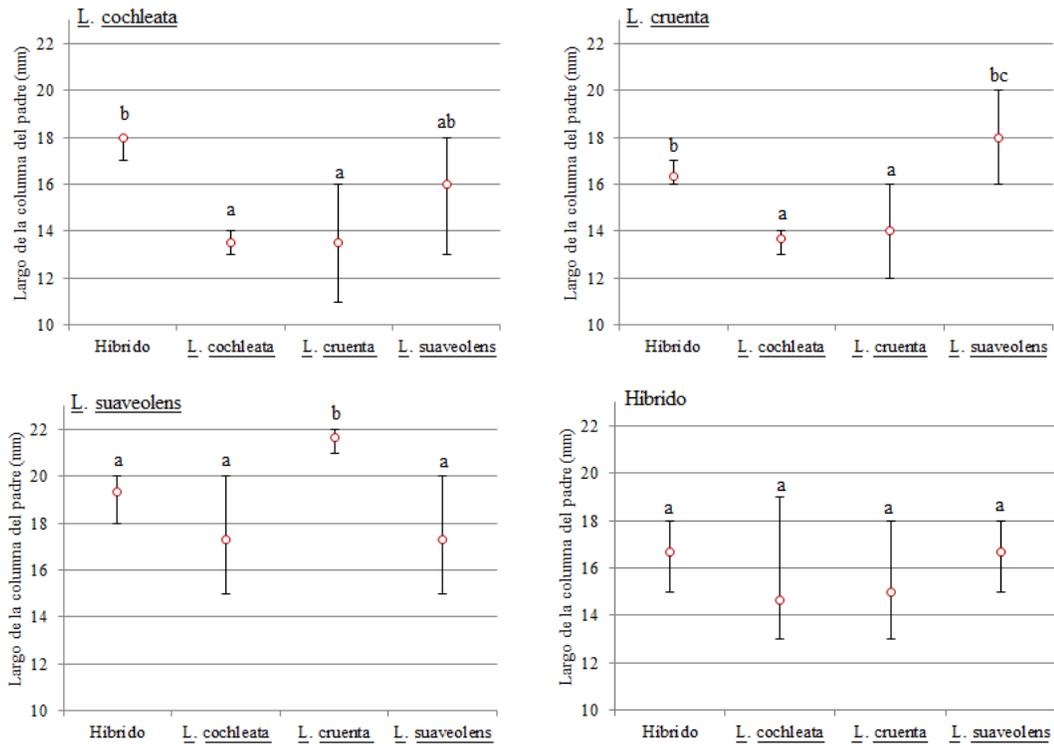


**Figura 21.** Comparación y regresión lineal entre el largo de la columna de la flor padre y el largo alcanzado por la cápsula, en fertilización artificial de *Lycaste spp.* (n=35).  
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 22.** Comparación y regresión lineal entre el largo de la columna de la flor padre y el ancho alcanzado por la cápsula, en fertilización artificial de *Lycaste spp.* (n=35).  
Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 23 se muestra el largo, mínimo, máximo y promedio de la columna del padre que fecundó efectivamente flores de las especies en estudio. *L. suaveolens* fue fecundada por las polinias de flores con columnas más largas y los híbridos naturales con las polinias provenientes de flores con columnas más cortas, *L. cochleata* y *L. cruenta* no presentan ninguna tendencia.



**Figura 23.** Largo promedio, máximo y mínimo de las columnas de flores donadoras de polinias que formaron cápsula en Lycaste cochleata, L. cruenta, L. suaveolens e híbridos naturales. Las letras sobre los máximos denotan diferencia significativa entre el largo de las columnas de los padres. Fuente: Elaboración propia.

### C. Análisis morfológico

Las especies mayoritarias en las poblaciones estudiadas son: L. cochleata, L. cruenta, L. suaveolens, L. sulfurea y sus posibles híbridos. Para el grupo de especies hermanas se midieron flores de L. aromatica, L. bradeorum, L. consobrina, L. deppei, L. lasioglossa (sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae). Como grupo externo se utilizaron flores de L. dowiana, L. macrophylla subs. xanthocheila y L. skinneri (sect. Macrophyllae). No se midieron flores de plantas de la sect. Deciduosae subsect. Paradeciduosae (e.g. L. tricolor o L. luminosa) por no estar presentes en el país. El valor de los intervalos, media y desviación estándar, para cada característica cuantitativa se encuentra en el Cuadro 9, y la diferencia de cada característica entre diferentes pares de especies está en Cuadro 10, y la moda mayor del 55%, para las características discontinuas se encuentra en el Cuadro 11.

**Cuadro 9.** Media y desviación estándar (DE) e intervalo de los valores (todos en mm) para los caracteres continuos medidos en *Lycaste cruenta*, *L. cochleata*, *L. suaveolens*, *L. sulfurea* e híbridos.

El número total de individuos es de 252, n indica el número de flores medidas para cada especie. Los valores en **negritas** separan esa especie del resto. No se marca ninguno entre los híbridos por tener características de varias especies.

Caracteres	<i>L. cruenta</i> (n=32)			<i>L. cochleata</i> (n=54)			<i>L. suaveolens</i> (n=90)			<i>L. sulfurea</i> (n=9)			Híbridos (n=67)		
	Media ± DE	Intervalo		Media ± DE	Intervalo		Media ± DE	Intervalo		Media ± DE	Intervalo		Media ± DE	Intervalo	
Ancho de la flor	57.9	13.0	12.0-80.0	38.7	14.3	15.0-71.0	39.0	14.2	12.0-95.0	40.8	19.0	26.0-60.0	42.4	15.0	18.0-75.0
Largo de la base de la flor	14.1	2.3	11.0-21.0	12.1	2.9	8.0-19.0	12.7	2.1	10.0-20.0	16.8	1.5	15.0-20.0	1.4	2.9	9.0-20.0
Largo del labelo	24.4	3.7	19.0-32.0	23.4	4.2	16.0-31.0	26.6	3.0	21.0-35.0	28.7	2.4	24.0-32.0	27.1	5.5	20.0-40.0
Ancho del labelo	22.0	6.2	10.0-32.0	17.9	3.1	10.0-24.0	19.5	3.5	10.0-30.0	24.0	4.4	19.0-32.0	20.6	4.8	11.0-42.0
Largo de la columna	15.0	2.4	10.0-20.0	16.8	2.4	12.0-22.0	17.4	2.3	10.0-23.0	17.9	1.4	15.0-20.0	17.9	2.5	9.0-24.0
Ancho de la columna	6.0	1.6	3.0-9.0	3.2	0.4	3.0-4.0	3.8	0.8	3.0-7.0	5.6	0.9	4.0-7.0	4.1	0.9	3.0-7.0
Largo del callo	2.5	0.8	0.5-4.0	4.7	1.9	2.0-10.0	4.2	1.3	1.0-8.0	3.1	1.1	2.0-5.0	4.7	2.1	1.0-11.0
Ancho del callo	3.4	1.1	2.0-6.0	6.1	1.7	2.0-11.0	6.2	1.8	3.0-11.0	4.0	0.7	3.0-5.0	5.8	1.7	2.0-10.0
Largo de los lóbulos laterales del labelo	1.1	0.7	0.5-5.0	5.8	0.9	4.0-8.0	5.8	2.0	1.0-15.0	1.1	0.3	1.0-2.0	4.4	2.2	1.0-8.0
Ancho de los lóbulos laterales del labelo	7.1	1.6	5.0-12.0	5.1	1.0	3.0-9.0	5.5	1.0	2.0-8.0	6.8	1.0	5.0-8.0	6.2	1.3	4.0-10.0
Ancho del Istmo del lóbulo medio	6.8	2.4	1.0-11.0	5.7	1.2	3.0-10.0	6.4	1.7	4.0-12.0	6.6	1.6	4.0-9.0	6.9	1.8	4.0-13.0
Largo del lóbulo medio	10.7	2.2	7.0-15.0	11.8	3.4	8.0-17.0	13.9	2.4	8.0-20.0	11.3	1.9	9.0-15.0	13.6	4.0	10.0-25.0
Ancho del lóbulo medio	9.8	2.2	5.0-14.0	10.4	3.4	8.0-16.0	11.5	2.5	7.0-16.0	9.3	2.6	6.0-13.0	11.7	2.5	8.0-16.0
Largo del sépalo lateral	36.8	9.0	22.0-52.0	28.9	3.4	21.0-36.0	31.6	4.5	22.0-48.0	39.3	2.7	37.0-43.0	35.2	6.9	22.0-52.0
Ancho del sépalo lateral	17.4	5.0	8.0-27.0	12.0	2.4	6.0-20.0	12.8	2.3	8.0-24.0	16.0	2.6	11.0-20.0	13.9	2.4	9.0-19.0
Largo del sépalo dorsal	35.5	8.4	21.0-58.0	26.4	4.7	18.0-32.0	27.7	8.5	21.0-40.0	39.0	3.2	33.0-43.0	32.7	6.3	21.0-47.0
Ancho del sépalo dorsal	16.3	4.5	6.0-26.0	11.6	2.0	7.0-18.0	12.9	2.4	8.0-18.0	15.7	1.7	13.0-18.0	13.8	2.2	8.0-22.0
Largo del pétalo	30.9	6.5	18.0-44.0	23.3	2.7	12.0-27.0	25.2	3.2	19.0-33.0	32.2	1.5	30.0-35.0	27.8	4.6	20.0-38.0
Ancho del pétalo	16.9	5.8	6.0-34.0	11.4	1.6	8.0-15.0	12.5	2.2	7.0-16.0	15.3	2.5	11.0-19.0	14.5	2.5	8.0-20.0
Largo del ovario	23.5	5.8	13.0-39.0	22.2	6.9	10.0-36.0	21.5	8.8	7.0-40.0	27.6	5.9	18.0-37.0	25.0	6.5	12.0-38.0
Largo de la bráctea floral	20.7	4.4	13.0-30.0	17.2	4.0	11.0-29.0	18.7	3.9	10.0-28.0	24.5	7.5	18.0-37.0	20.3	4.4	12.0-40.0
Largo del 1 <sup>er</sup> segmento del escapo	37.2	8.2	17.0-55.0	35.9	8.8	20.0-55.0	40.8	10.2	17.0-63.0	46.0	11.1	33.0-65.0	41.6	11.4	24.0-70.0
Proporción entre (Prop.) largo (L) - ancho (A) de base de la flor	1.7	1.6	0.4-5.0	0.8	0.6	0.4-3.5	1.3	1.3	0.1-6.0	1.1	0.8	0.5-2.9	0.9	0.8	0.3-4.5
Prop. L-A del labelo	1.2	0.4	0.8-2.5	1.4	0.3	0.9-2.1	1.4	0.3	0.8-2.3	1.2	0.2	1.0-1.6	1.4	0.4	0.8-3.0
Prop. L-A de la columna	2.6	0.7	1.3-4.3	5.3	0.8	3.8-7.3	4.8	1.0	2.0-7.7	3.5	0.9	2.1-5.3	4.6	1.2	1.8-6.7
Prop. L-A del callo	0.8	0.3	0.3-1.5	0.9	0.7	0.3-4.0	0.8	0.4	0.3-2.7	0.8	0.2	0.5-1.3	0.9	0.5	0.3-2.7
Prop. L-A del lóbulo lateral	1.1	0.2	0.8-1.8	1.1	0.2	0.8-2.0	1.2	0.2	0.7-1.9	1.3	0.5	0.9-2.5	0.8	0.4	0.1-1.6
Prop. L-A del lóbulo medio	0.2	0.1	0.1-0.8	1.2	0.3	0.7-1.8	1.1	0.4	0.1-3.0	0.1	0.1	0.1-0.3	1.2	0.4	0.7-2.8
Prop. L-A del sépalo lateral	2.2	0.4	1.2-3.4	2.5	0.6	1.1-4.9	2.5	0.5	0.9-3.8	2.4	0.7	1.0-3.8	2.6	0.5	1.4-4.0
Prop. L-A del sépalo dorsal	2.3	0.6	1.3-4.5	2.4	0.4	1.6-3.6	2.3	0.4	1.3-3.5	2.5	0.3	2.2-3.0	2.4	0.5	1.3-3.8
Prop. L-A del pétalo	2.0	0.6	0.9-3.7	2.1	0.4	1.2-3.3	2.1	0.4	1.3-3.3	2.1	0.3	1.7-2.7	2.0	0.4	1.1-3.2
Prop. L-L entre ovario y bráctea floral	1.1	0.2	0.7-1.6	1.4	0.4	0.7-2.4	1.3	0.3	0.6-2.1	1.2	0.4	0.8-1.7	1.3	0.3	0.7-1.9
Prop. L-L entre callo e istmo	0.6	0.6	0.3-4.0	1.1	0.4	0.3-2.0	1.0	0.4	0.3-2.5	0.7	0.4	0.3-1.5	0.9	0.4	0.1-2.0

Fuente: Elaboración propia.

## 1. t de Student pareada

El Cuadro 10 muestra los posibles valores de los caracteres continuos para L. cochleata, L. cruenta, L. suaveolens, L. sulfurea y sus posibles híbridos. La proporción entre largo y ancho de la columna es el carácter cuya media es significativamente diferente entre todas las especies ( $P \leq 0.05$ ), aun así, los intervalos de los valores encontrados se traslapan entre las diferentes especies. Los caracteres que no presentan ninguna diferencia significativa y no sirven para diferenciar entre especies son el ancho de la flor y las proporciones entre largo y ancho del callo, del lóbulo medio del labelo, del sépalo dorsal y de los pétalos.

En el Cuadro 10 podemos ver las características que son significativamente diferentes entre las parejas de especies. L. suaveolens y L. cochleata son muy parecidas, pero se diferencian entre ellas por 14 caracteres y del resto de las especies por 20 caracteres en total.

L. cruenta difiere del resto de las especies por el largo de la base de la flor, el largo de la columna y la proporción entre largo y ancho de la columna ( $P \leq 0.05$ ). A L. sulfurea, la separan del resto de especies el largo de la base de la flor, el largo del labelo y la proporción entre largo y ancho de la columna ( $P \leq 0.05$ ). Además, L. cruenta y L. sulfurea son separadas entre sí, pero no del resto de especies, por el largo del 1<sup>er</sup> segmento del escapo ( $P \leq 0.10$ ). Esto hace que únicamente sean 5 caracteres cuantitativos, en total, las que las diferencian a ambas de las otras especies.

**Cuadro 10.** Prueba de t de Student pareada para las especies de *Lycastes* amarillas presentes en el país.

Caracteres	Parejas de especies <sup>1</sup>					
	cru–coc	cru–sua	cru–sul	coc–sua	coc–sul	sua–sul
Ancho de la flor <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
Largo de la base de la flor	***	**	***	-	***	***
Largo del labelo	-	***	**	***	***	**
Ancho del labelo	***	**	-	**	**	**
Largo de la columna	***	***	***	-	*	-
Ancho de la columna	***	***	-	***	***	***
Largo del callo	***	***	-	-	**	**
Ancho del callo	***	***	-	-	***	***
Largo de los lóbulos laterales del labio	***	***	-	-	***	***
Ancho de los lóbulos laterales del labio	***	***	-	-	***	**
Ancho del istmo del lóbulo medio	**	-	-	**	-	-
Largo del lóbulo medio	-	***	-	***	-	**
Ancho del lóbulo medio	-	***	-	**	-	**
Largo de los sépalos laterales	***	**	-	***	***	***
Ancho de los sépalos laterales	***	***	-	-	***	**
Largo del sépalo dorsal	***	***	-	-	***	***
Ancho del sépalo dorsal	***	***	-	**	***	***
Largo de los pétalos	***	***	-	***	***	***
Ancho de los pétalos	***	***	-	***	***	**
Largo del ovario	-	-	-	-	**	**
Largo de la bráctea floral	**	**	-	-	**	**
Largo del 1 <sup>er</sup> segmento del escapo	-	-	*	**	**	-
Proporción entre el (Prop.) Largo (L) – Ancho (A) de base de la flor	**	-	-	**	-	-
Prop. L-A del labelo	**	**	-	-	*	*
Prop. L-A de la columna <sup>3</sup>	***	***	**	***	***	**
Prop. L-A del callo <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
Prop. L-A del lóbulos laterales	***	***	-	-	***	***
Prop. L-A del lóbulo medio <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
Prop. L-A del sépalos laterales	**	***	-	-	**	**
Prop. L-A del sépalo dorsal <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
Prop. L-A de los pétalos <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
Prop. L-L entre ovario y bráctea floral	***	-	-	**	-	-
Prop. L-L entre callo e istmo	***	***	-	-	-	-
Caracteres diferentes por parejas de especies	23	23	5	14	21	22

<sup>1</sup> Abreviaturas para las especies: cru *L. cruenta*; coc *L. cochleata*;  
sua *L. suaveolens*; sul *L. sulfurea*.

\*\*\* P ≤ 0.001; \*\* P ≤ 0.05; \* P < 0.10; - No existe diferencia significativa.

<sup>2</sup> No hay diferencia significativa entre ninguna de las especies

<sup>3</sup> Hay diferencia significativa entre todas las especies

Fuente: Elaboración propia.

## 2. Moda de los caracteres discontinuos

En el Cuadro 11, los caracteres: abertura del labelo; lóbulos laterales de labelo en vista ventral y lateral; forma de la columna; tricomas en las partes distal y media de la columna, y el traslape de los pétalos atrás de la columna, separan dos grupos. Al igual que los caracteres continuos, agrupan a L. cruenta y L. sulfurea y las separan de L. suaveolens y L. cochleata. El ancho relativo de la indentación en la base del labelo separa a L. sulfurea de L. cruenta, pero la forma de la base del labelo no separa a L. cochleata de L. suaveolens.

Los caracteres que son polimodales en cada especie no ayudan a diferenciar entre las mismas. Entre esas encontramos los siguientes caracteres: presencia de mentón, tricomas en el callo, forma del ápice del lóbulo medio del labelo, forma de la columna, tricomas en la base de la columna y posición de los sépalos.

Los caracteres discontinuos que son muy variables y no muestran diferencia entre las especies de la subsect. *Xanthanthae* son la presencia de mentón, tricomas en el callo, forma del ápice del lóbulo medio del labelo, forma de la columna, tricomas de la base de la columna y la posición relativa de los sépalos con el resto de la flor.

Los caracteres discontinuos que no muestran variación entre las especies de *lycastes* amarillas son: la forma del labelo en vista ventral, los tricomas de la cara interna del labelo, la vista frontal y el ápice del callo. El resto de los análisis se realizaron únicamente con 50 caracteres de los medidos a las flores, porque la cubierta de la antera de la columna se cae fácilmente y estaba ausente en 217 de 283 las flores analizadas.

**Cuadro 11.** Características discontinuas más representativas (moda mayor o igual al 55%) de especies de *Lycastes* amarillas (n= 252).

En el paréntesis, a la par del estado de carácter, aparece el porcentaje de individuos con estos caracteres que suman 55% o más.

Característica		<u>L. cochleata</u> (n=54)	<u>L. suaveolens</u> (n=90)	<u>L. cruenta</u> (n=32)	<u>L. sulfurea</u> (n=9)	<b>híbridos</b> (n=67)
Labelo	Abertura	0, 1 (80)	0,1 (75)	3,4,5 (80)	4 (75)	0,1,2 (75)
	Forma <sup>1</sup>	1, 2 (80)	1,2 (85)	0,1 (75)	3,4 (65)	1,2 (65)
	Mentón <sup>2</sup>	1 (100)	1 (98)	1 (100)	1 (80)	1(80)
	Ancho de la indentación	0 (98)	0 (55)	3 (85)	2 (90)	0,1,2 (98)
	Tricomas en la cara interna <sup>1</sup>	1, 4 (60)	1,3,5 (60)	3,4,5 (68)	0,1,6 (80)	3,4,5 (67)
Callo	Vista frontal <sup>1</sup>	1, 3 (88)	3 (80)	1,3 (80)	0,1 (75)	1,3 (80)
	Ápice <sup>1</sup>	2,3,4 (80)	0,3 (75)	1,2 (75)	0 (75)	0,2 (60)
	Tricomas <sup>2</sup>	1 (60)	1 (58)	1 (78)	1 (78)	0,1 (90)
Lóbulos laterales del labelo	Vista lateral	4 (75)	4,5 (78)	0,2 (85)	2 (68)	3,4,6 (65)
	Vista ventral	1,2 (95)	1 (70)	0 (100)	0 (90)	0,1 (78)
Ápice del lóbulo medio del labelo <sup>2</sup>		2 (55)	0,2 (78)	2 (68)	1,2 (100)	1,2 (80)
Columna	Forma	1,2 (90)	1,2 (100)	0 (68)	0 (55)	1,2 (90)
	Posición de la cubierta de la antera <sup>3</sup>	2 (60)	2 (70)	0,2 (80)	1 (100)	2 (65)
	Tricomas parte distal	3,5 (75)	3,5 (75)	4,5 (65)	3,4,6 (80)	3,5 (70)
	Tricomas parte media	2,4 (75)	2,4 (70)	5,6 (70)	3,5 (65)	1,2,4,5 (80)
	Tricomas base <sup>2</sup>	1 (70)	1 (75)	1 (70)	1 (68)	1 (70)
Posición de los sépalos en relación con la forma de la flor <sup>2</sup>		0,1 (62)	0 (55)	0 (65)	0 (60)	0,1 (80)
Traslape de los pétalos atrás de la columna		0 (78)	0 (70)	1 (95)	1 (68)	0,1 (100)

<sup>1</sup> Estado de carácter muy variable entre especies, puede utilizarse para clasificación.

<sup>2</sup> No hay diferencia entre las distintas especies

<sup>3</sup> Fue excluida del resto del análisis porque muy pocos especímenes presentaban esta característica

Fuente: Elaboración propia.

### 3. Análisis discriminante

En el Cuadro 12 están las proporciones correctas de identificación basadas en la función discriminante obtenida para las especies utilizadas. *L. cochleata* es la que presenta menor porcentaje de identificaciones, *a priori*, correctas. Este análisis predice que hay individuos de *L. suaveolens* mal identificados, ingresados a la colección como *L. cochleata*. Al agregar los híbridos (Cuadro 12B) se encuentran menos individuos de especies puras identificados correctamente y en poblaciones simpátricas se pueden confundir los híbridos con *L. suaveolens* o con *L. cochleata*. *L. cruenta* tiene 3 individuos que posiblemente sean híbridos, aunque esta especie es fácilmente reconocida (100% de identificaciones correctas según la función discriminante para especies puras).

**Cuadro 12.** Clasificación *a priori* y predicciones de la función discriminante para flores de Lycaste sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae en Guatemala.

A. individuos de especies puras; B. individuos de especies puras e híbridos. Las filas presentan las identificaciones *a priori* y las columnas, las categorías predichas por la función discriminante.

A. Individuos de especies puras

<b>Especies</b>	<b><u>L. cochleata</u></b>	<b><u>L. cruenta</u></b>	<b><u>L. suaveolens</u></b>	<b><u>L. sulfurea</u></b>	<b>Total</b>	<b>% correcto</b>
<u>L. cochleata</u>	28	0	8	0	36	78
<u>L. cruenta</u>	0	26	0	0	26	100
<u>L. suaveolens</u>	8	0	50	0	58	86
<u>L. sulfurea</u>	0	1	0	8	9	89
Total	36	27	58	6	129	88

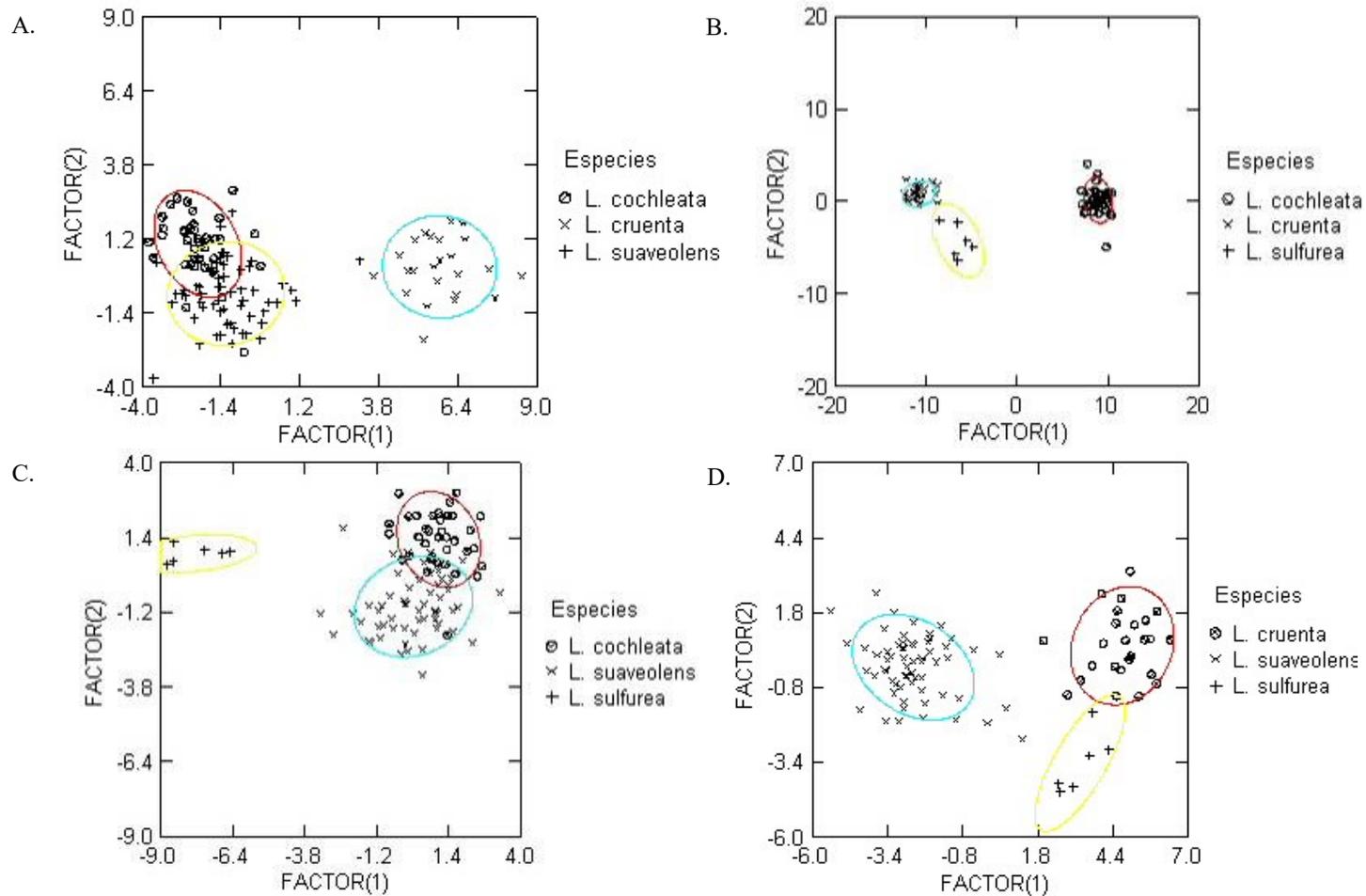
B. Individuos de especies puras e híbridos

<b>Especies</b>	<b>híbrido</b>	<b><u>L. cochleata</u></b>	<b><u>L. cruenta</u></b>	<b><u>L. suaveolens</u></b>	<b><u>L. sulfurea</u></b>	<b>Total</b>	<b>% correcto</b>
híbrido	33	5	0	13	0	51	65
<u>L. cochleata</u>	3	26	0	7	0	36	72
<u>L. cruenta</u>	3	0	21	0	0	24	88
<u>L. suaveolens</u>	6	12	0	40	0	58	69
<u>L. sulfurea</u>	0	0	1	0	8	9	89
Total	45	43	22	60	8	178	72

Fuente: Elaboración propia.

El análisis discriminante de la Figura 24 (A y C) muestra un traslape muy marcado entre L. suaveolens y L. cochleata, mayor que entre L. cruenta y L. sulfurea (Figuras 24B y D). Esto sugiere que L. sulfurea es una especie separada de L. cruenta. Aun así, el análisis discriminante no logra separar otros tipos o subespecies dentro de L. cruenta con las características medidas en este estudio.

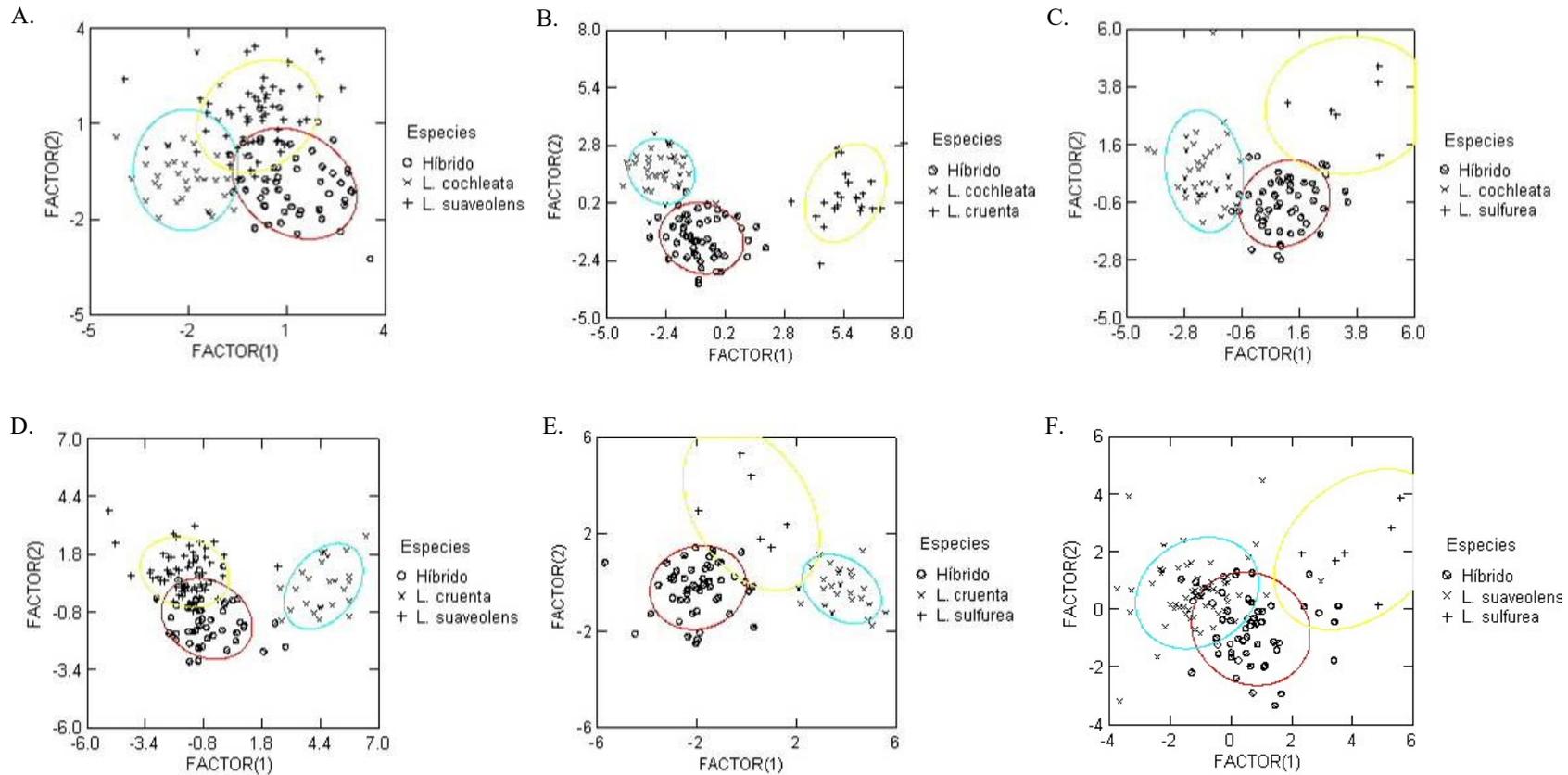
El análisis discriminante de la Figura 25 muestra que los híbridos tienen una distribución de varianza de los caracteres más cercana a L. cochleata y L. suaveolens (A). L. sulfurea (C) está apartada de los híbridos, pero se traslapa con algunos en E y F, quedando intermedia entre los híbridos y L. cruenta. Esto sugiere que L. sulfurea y L. suaveolens provienen de un complejo de especies. L. cruenta se separa fácilmente de los híbridos (Figuras 25B, D y E).



**Figura 24.** Análisis discriminante de 50 caracteres morfométricos en flores de *Lycaste cruenta*, *L. cochleata*, *L. suaveolens* y *L. sulfurea*.

Las elipses representan el 95% de confianza en la distribución de varianzas combinadas para todos los caracteres de cada especie. La comparación se realiza entre las especies A. *L. cochleata*, *L. cruenta* y *L. suaveolens*; B. *L. cochleata*, *L. cruenta* y *L. sulfurea*; C. *L. cochleata*, *L. suaveolens* y *L. sulfurea*; D. *L. cruenta*, *L. suaveolens* y *L. sulfurea*. Trabajado en SYSTAT 8.0.

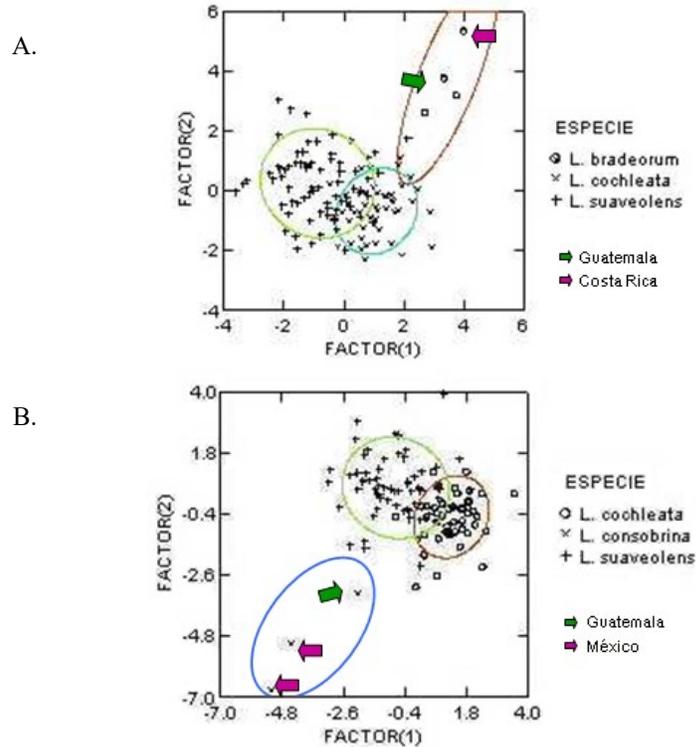
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 25.** Análisis discriminante de 50 caracteres morfométricos en flores de *Lycaste cruenta*, *L. cochleata*, *L. suaveolens*, *L. sulfurea* y los híbridos putativos. Las elipses representan el 95% de confianza en la distribución de varianzas combinadas para todos los caracteres de cada especie. La comparación se realiza entre las especies A. Híbridos, *L. cochleata*, y *L. suaveolens*; B. Híbridos, *L. cochleata* y *L. cruenta* C. Híbridos, *L. cochleata* y *L. sulfurea*; D. Híbridos, *L. cruenta* y *L. suaveolens*; E. Híbridos, *L. cruenta* y *L. sulfurea*; F. Híbridos, *L. suaveolens* y *L. sulfurea*. Trabajado en SYSTAT 8.0.

Fuente: Elaboración propia.

Se encontraron unos pocos especímenes parecidos a L. bradeorum y a L. consobrina. En la Figura 26 se comparan estos individuos con especímenes puros de localidades de Costa Rica y México, respectivamente, con las flores de L. cochleata y L. suaveolens que son las especies guatemaltecas más parecidas morfológicamente.



**Figura 26.** Análisis discriminante entre individuos de Lycaste bradeorum y L. consobrina encontrados en Guatemala y especímenes de otros países y L. cochleata y L. suaveolens de poblaciones guatemaltecas. Las flechas resaltan el origen de las plantas **A.** L. bradeorum de Guatemala comparada con especímenes de Costa Rica. La flecha rosada señala una planta costarricense, la verde las guatemaltecas. **B.** L. consobrina de Guatemala comparada con las flores de la misma planta proveniente de México. La flecha rosada más extrema señala la flor de la planta recién traída de México y la flecha rosada intermedia la flor de la misma planta aclimatada en Guatemala.

Fuente: Elaboración propia.

Las flores de L. bradeorum de Costa Rica son más grandes que las de Guatemala. Las de L. consobrina sugieren una plasticidad morfológica mayor, porque dos flores de la misma planta, una flor que venía de México y otra cuando la planta floreció, cultivada en Guatemala, salen muy separadas, disminuyendo el tamaño de sus características en el nuevo hábitat. La planta de L. consobrina, originaria de Guatemala produce flores más pequeñas.

#### 4. Conteo de caracteres

El valor crítico de la prueba de signos cuando se tienen 23 caracteres, a comparar con un nivel de confianza del 95% es de 7, o sea al menos 16 características intermedias ( $C_{0.05(1), 23}=7$ ). Al analizar las poblaciones de Zacapa (Cuadro 13) encontramos un total de 18 características intermedias de los híbridos entre L. cruenta y L. suaveolens, lo que nos indica que estos híbridos se originaron a partir de estas dos especies con un 99% de confianza ( $C_{0.01(1), 23}=5$ ), teniendo caracteres más parecidos a L. cruenta (10 de 23) que a L. suaveolens (4 de 23). Se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ).

**Cuadro 13.** Conteo de caracteres intermedios (en mm) para flores de Lycaste cruenta, L. suaveolens y los híbridos de la localidad de Zacapa (n=72). Los caracteres intermedios están resaltados en **negritas**.

Caracteres	<u>L. cruenta</u> (1) <sup>a</sup> n=3		Híbridos n=17		<u>L. suaveolens</u> (2) <sup>a</sup> n=52		Híbridos	
	Media (mm)	DE	Media (mm)	DE	Media (mm)	DE	Diferentes de:	Intermedios
<b>Largo de la base de la flor</b>	14.0	1.7	12.6	2.7	12.5	1.6	-	+
<b>Largo del labelo</b>	23.3	1.5	25.4	7.4	26.8	2.7	-	+
<b>Ancho del labelo</b>	21.3	2.3	20.7	3.9	19.0	2.6	-	+
<b>Largo de la columna</b>	15.3	2.3	16.8	1.6	17.8	2.2	2	+
Ancho de la columna	6.0	1.0	3.7	0.5	3.8	0.8	1	Menor
Largo del callo	2.0	0.0	4.6	1.4	4.2	1.1	1	Mayor
<b>Ancho del callo</b>	4.0	1.0	6.0	1.5	6.2	1.7	1	+
<b>Largo de los lóbulos laterales del labio</b>	1.0	0.0	5.1	1.8	6.1	2.1	1, 2	+
<b>Ancho de los lóbulos laterales del labio</b>	5.7	0.6	5.5	1.0	5.4	0.9	-	+
<b>Largo del lóbulo medio</b>	12.7	0.6	12.9	5.2	14.4	2.4	-	+
<b>Ancho del lóbulo medio</b>	11.0	1.0	11.4	3.3	11.7	2.5	-	+
<b>Largo del sépalo lateral</b>	35.7	1.2	32.6	4.5	31.7	4.3	-	+
<b>Ancho del sépalo lateral</b>	17.7	0.6	13.3	2.4	13.1	2.6	1	+
<b>Largo del sépalo dorsal</b>	32.7	2.1	30.1	4.7	27.6	9.1	-	+
<b>Ancho del sépalo dorsal</b>	17.3	1.2	14.2	2.0	12.8	2.6	1, 2	+
<b>Largo del pétalo</b>	29.0	4.6	25.4	4.0	25.1	3.2	-	+
<b>Ancho del pétalo</b>	22.0	6.1	14.1	1.7	12.7	2.3	1, 2	+
Largo de la bráctea floral	24.3	3.1	18.6	3.9	18.9	4.4	1	menor
<b>Proporción entre el (Prop.) largo (L) – ancho (A) del labelo</b>	1.1	0.2	1.4	0.3	1.4	0.2	-	+
<b>Prop. L-A de la columna</b>	2.6	0.8	4.6	0.6	4.8	0.9	1	+
Prop. L-A del lóbulo lateral	1.2	0.1	1.2	0.2	1.2	0.2	-	igual
Prop. L-A del sépalo lateral	1.0	0.2	1.3	0.4	1.2	0.2	-	mayor
<b>Prop. L-L del callo y el istmo</b>	0.4	0.1	0.9	0.3	1.0	0.4	1	+
<b>Total</b>							10 (1)	18/23
							4 (2)	

<sup>a</sup>1 o 2 se refieren a uno de los posibles padres, “?” a las que tienen una DE =0 y no se pueden comparar y “-” a ninguno de los dos. Mayor y menor se refieren a la comparación de las medias entre los híbridos y ambas especies, “+” indica que son intermedios.

Fuente: Elaboración propia.

En la población de Chiquimula (Cuadro 14), solo se encontraron especímenes de L. suaveolens e híbridos con otra especie. Se realizó la prueba de conteo de caracteres con L. cochleata, especie reportada en el área en 1975 y 1976 (refiérase al Anexo C.). Pero únicamente 4 de los 14 caracteres son intermedios ( $C_{0.05(1),14}=2$ ) por lo que los híbridos han de haberse formado a partir del cruce de L. suaveolens con otra especie, no encontrada en ninguno de los viajes realizados al área. Se acepta  $H_0$ .

**Cuadro 14.** Conteo de caracteres intermedios (en mm) para flores de Lycaste cochleata, L. suaveolens e híbridos de la localidad de Chiquimula (n=25). Los caracteres intermedios están resaltados en **negritas**.

Caracteres	<u>L. cochleata</u> (1)		Híbridos		<u>L. suaveolens</u> (2)		Híbridos <sup>a</sup>	
	n=15		n=4		n=5		Diferentes de:	Intermedios
	Media (mm)	DE	Media (mm)	DE	Media (mm)	DE		
Largo del labelo	25.1	2.4	26.0	2.7	25.2	2.0	-	mayor
Ancho del labelo	18.9	2.3	21.0	2.6	18.2	2.5	-	mayor
Ancho de la columna	3.5	0.5	4.0	0.0	3.4	0.5	?	mayor
Ancho del istmo del lóbulo medio	6.1	1.1	6.5	1.3	6.4	0.9	-	mayor
Largo del lóbulo medio	13.9	2.2	14.5	3.3	13.6	2.2	-	mayor
Ancho del lóbulo medio	12.1	2.1	14.5	1.7	10.8	2.6	1, 2	mayor
Largo del sépalo lateral	31.6	2.3	33.0	7.7	31.4	2.3	-	mayor
Ancho del sépalo dorsal	12.3	2.2	14.3	4.2	12.0	1.6	-	mayor
<b>Largo del pétalo</b>	28.5	1.1	28.0	4.3	26.4	1.9	1	+
Ancho del pétalo	11.8	1.8	16.0	5.4	11.4	0.9	1,2	mayor
Largo del 1er. segmento del escapo	42.0	5.8	30.0	0.0	46.8	6.1	?	menor
<b>Proporción entre el (Prop.) largo (L) – ancho (A) de base de la flor</b>	0.5	0.1	0.5	0.1	1.4	1.0	1	+
<b>Prop. L-A de la columna</b>	5.5	0.8	5.1	0.5	5.0	0.7	-	+
<b>Prop. L-L del ovario y bráctea floral</b>	1.2	0.2	1.2	0.0	1.6	0.3	?	+
<b>Total</b>							4 (1) 2(2)	4/14

<sup>a</sup>1 o 2 se refieren a uno de los posibles padres, “?” a las que tienen una DE =0 y no se pueden comparar y “-” a ninguno de los dos. Mayor y menor se refieren a la comparación de las medias entre los híbridos y ambas especies, “+” indica que son intermedios.

Fuente: Elaboración propia.

La población de Jutiapa (Cuadro 15) presentó individuos de L. suaveolens, L. sulfurea e híbridos. Al realizar el conteo de caracteres con estos especímenes encontramos divergencia entre los grupos ( $C_{0.05(1),22}=7$ ), se rechaza  $H_0$ , ya que solo 4 caracteres son intermedios. Los híbridos no se originaron entre estas dos especies.

**Cuadro 15.** Conteo de caracteres intermedios (en mm) para flores de *Lycaste sulfurea*, *L. suaveolens* e híbridos de la localidad de Jutiapa (n=18). Los caracteres intermedios están resaltados en **negrillas**.

Caracteres	<i>L. sulfurea</i> (1)		Híbridos		<i>L. suaveolens</i> (2)		Híbridos <sup>a</sup>	
	n=3		n=13		n=2		Diferentes de:	intermedios
	Media (mm)	DE	Media (mm)	DE	Media (mm)	DE		
<b>Largo de la base de la flor</b>	16.0	1.0	14.1	2.5	12.5	0.7	-	+
<b>Largo del labelo</b>	28.0	1.7	27.4	3.8	24.0	2.8	-	+
<b>Ancho del labelo</b>	23.3	1.2	19.2	4.5	16.5	2.1	-	+
Ancho de la columna	5.7	0.6	4.9	1.1	5.0	0.0	?,-	menor
<b>Largo del callo</b>	3.3	0.6	2.9	1.3	1.5	0.7	-	+
Ancho del callo	4.7	0.6	5.7	1.8	4.0	0.0	1	mayor
Largo de los lóbulos laterales del labio	1.0	0.0	2.4	1.1	1.0	0.0	1,2	mayor
Ancho del istmo del lóbulo medio	5.0	1.0	6.8	2.5	4.5	0.7	-	mayor
Largo del lóbulo medio	11.3	3.2	12.5	1.6	11.5	2.1	-	mayor
Ancho del lóbulo medio	7.3	1.5	10.5	1.9	9.5	0.7	2	mayor
<b>Largo del sépalo lateral</b>	40.7	3.2	36.2	6.6	30.0	1.4	-	+
<b>Ancho del sépalo lateral</b>	14.3	2.9	13.5	2.3	11.0	1.4	-	+
<b>Largo del sépalo dorsal</b>	39.3	2.1	32.5	6.1	25.0	4.2	2	+
<b>Ancho del sépalo dorsal</b>	16.7	1.5	13.0	1.2	11.0	1.4	1,2	+
<b>Largo del pétalo</b>	31.3	1.5	28.7	4.2	26.0	0.0	1	+
<b>Ancho del pétalo</b>	14.3	3.1	14.2	2.8	11.0	1.4	-	+
<b>Largo del ovario</b>	21.7	3.2	24.8	6.3	25.0	0.0	-	+
Largo de la bráctea floral	21.5	0.7	21.7	7.1	18.0	0.0	1	mayor
<b>Proporción entre el (Prop.) largo (L) – ancho (A) del labelo</b>	1.2	0.1	1.5	0.5	1.5	0.4	-	+
<b>Prop. L-A de la columna</b>	4.0	1.2	3.6	1.0	2.6	0.8	-	+
Prop. L-A del lóbulo lateral	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	0.0	1,2	mayor
<b>Total</b>							5(1)	13/22
							5 (2)	

<sup>a</sup>1 o 2 se refieren a uno de los posibles padres, “?” a las que tienen una DE =0 y no se pueden comparar y “-” a ninguno de los dos. Mayor y menor se refieren a la comparación de las medias entre los híbridos y ambas especies, “+” indica que son intermedios.

Fuente: Elaboración propia.

## 5. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales combina las características continuas en 10 factores (Cuadro 16) y las discontinuas en 6 factores (Cuadro 17) diferentes que agrupan más del 60% de la varianza de todas las características medidas (78.2% y 69.7%, respectivamente). Para las características continuas (Cuadro 16) encontramos un primer factor que agrupa el ancho de la columna, largo y ancho de los sépalos laterales, sépalo

dorsal y pétalos (25.4% de varianza total); por eso podríamos decir que este factor está compuesto por el cáliz, los pétalos de las flores y el ancho de la columna. El segundo factor está formado por el largo del labelo, columna y del lóbulo medio, que podría relacionarse con las estructuras de aterrizaje de las abejas (13.7% de varianza). El tercero tan solo agrupa el ancho del istmo del lóbulo medio y el ancho del lóbulo medio (7.6% de la varianza total).

**Cuadro 16.** Análisis de componentes principales de los caracteres discretos de las flores de *Lycaste spp.* medidas.

Los valores en negrillas son los más importantes para cada factor. Los caracteres de importancia para alguno de los factores están resaltados en **negrillas**.

Caracteres	Factores principales									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ancho de la flor <sup>2</sup>	0.234	-0.025	0.019	0.022	-0.099	0.050	-0.181	<b>0.404</b>	-0.089	0.224
Largo de la base de la flor	0.544	0.140	0.289	-0.243	0.157	0.286	0.043	0.245	0.066	0.036
<b>Largo del labelo</b>	0.434	<b>0.668</b>	0.172	0.061	0.251	0.219	0.061	-0.060	0.110	0.095
<b>Ancho del labelo</b>	0.535	0.235	0.067	-0.190	-0.151	-0.648	0.085	<b>-0.420</b>	-0.108	0.021
<b>Largo de la columna</b>	-0.011	<b>0.619</b>	0.220	0.004	0.105	-0.026	-0.005	<b>0.391</b>	-0.200	-0.168
<b>Ancho de la columna</b>	<b>0.820</b>	-0.278	-0.002	-0.038	0.000	-0.011	0.092	-0.074	0.026	0.126
Largo del callo	-0.152	0.577	0.246	0.493	-0.220	0.000	0.058	0.225	0.088	0.081
Ancho del callo	-0.367	0.471	0.039	-0.553	0.248	-0.173	-0.185	-0.053	0.075	-0.051
Largo de los lóbulos laterales del labio	-0.618	0.523	0.208	0.065	0.257	-0.034	0.037	-0.189	-0.150	-0.008
Ancho de los lóbulos laterales del labio	0.644	0.067	-0.181	-0.083	0.057	-0.090	0.012	0.249	0.126	-0.130
<b>Ancho del istmo del lóbulo medio</b>	0.288	0.054	<b>0.624</b>	-0.128	-0.373	0.123	-0.159	-0.235	0.192	0.013
<b>Largo del lóbulo medio</b>	0.086	<b>0.770</b>	0.026	0.274	0.206	-0.043	0.132	<b>-0.305</b>	0.072	0.114
<b>Ancho del lóbulo medio</b>	-0.047	0.407	<b>0.689</b>	-0.186	0.006	0.180	-0.211	-0.013	-0.144	0.247
<b>Largo de los sépalos laterales</b>	<b>0.832</b>	0.344	-0.100	0.001	0.015	0.064	-0.070	0.005	-0.093	-0.127
<b>Ancho de los sépalos laterales</b>	<b>0.777</b>	-0.170	0.186	0.031	0.356	-0.052	0.066	0.000	-0.119	0.246
<b>Largo del sépalo dorsal</b>	<b>0.863</b>	0.317	-0.111	0.012	0.012	-0.015	-0.006	0.026	-0.082	0.075
<b>Ancho del sépalo dorsal</b>	<b>0.781</b>	-0.104	0.206	0.138	0.384	-0.040	0.055	0.022	-0.136	-0.111
<b>Largo de los pétalos</b>	<b>0.837</b>	0.217	-0.075	0.041	-0.019	0.051	0.009	0.028	-0.220	0.078
<b>Ancho de los pétalos</b>	<b>0.771</b>	-0.046	0.350	0.052	0.206	-0.015	0.009	0.049	0.204	-0.174
Largo del ovario	0.380	0.346	0.190	-0.398	-0.320	0.277	0.420	-0.093	0.004	-0.094
Largo de la bráctea floral	0.633	0.251	0.017	-0.036	-0.170	0.085	-0.382	-0.258	0.028	-0.060
Largo del 1er segmento del escapo	0.435	0.473	0.039	-0.116	-0.123	0.074	-0.057	-0.076	-0.132	-0.182
<b>Proporción entre el (Prop.) largo (L) – ancho (A) de base de la flor</b>	0.115	-0.325	-0.035	0.262	0.021	0.197	0.035	-0.095	<b>-0.596</b>	<b>-0.399</b>
<b>Prop. L-A del labelo</b>	-0.198	0.117	-0.168	0.223	0.348	<b>0.802</b>	-0.045	0.037	0.187	0.103
Prop. L-A de la columna <sup>3</sup>	-0.643	0.185	0.129	0.035	0.078	0.028	-0.099	0.295	-0.114	-0.190
<b>Prop. L-A del callo</b>	0.069	0.148	0.229	<b>0.770</b>	-0.317	-0.039	0.149	0.254	0.055	0.161
Prop. L-A de los lóbulos laterales	-0.698	0.380	0.221	0.091	0.222	0.003	0.037	-0.231	-0.174	0.051
Prop. L-A del lóbulo medio	0.133	0.383	-0.525	0.400	0.164	-0.226	0.296	-0.265	0.183	-0.115
<b>Prop. L-A de los sépalos laterales</b>	-0.135	0.472	-0.312	0.030	<b>-0.406</b>	0.112	-0.178	0.060	0.114	<b>-0.452</b>
<b>Prop. L-A del sépalo dorsal</b>	0.033	0.451	-0.386	-0.137	<b>-0.495</b>	0.037	-0.083	-0.012	0.070	0.237
<b>Prop. L-A de los pétalos</b>	-0.164	0.167	-0.548	-0.048	-0.273	0.088	-0.019	-0.094	<b>-0.492</b>	<b>0.359</b>
Prop. L-L del ovario y bráctea floral	-0.225	0.087	0.163	-0.431	-0.151	0.199	<b>0.787</b>	0.148	-0.026	-0.005
<b>Prop. L-L del callo y el istmo</b>	-0.292	0.300	-0.306	-0.371	<b>0.425</b>	-0.284	-0.045	0.227	0.032	0.097
<b>Varianza explicada por componente</b>	<b>8.385</b>	<b>4.510</b>	<b>2.524</b>	<b>2.211</b>	<b>1.947</b>	<b>1.664</b>	<b>1.302</b>	<b>1.143</b>	<b>1.080</b>	<b>1.028</b>
<b>% de la varianza total explicada</b>	<b>25.411</b>	<b>13.668</b>	<b>7.648</b>	<b>6.698</b>	<b>5.901</b>	<b>5.043</b>	<b>3.945</b>	<b>3.465</b>	<b>3.273</b>	<b>3.118</b>

Fuente: Elaboración propia.

El cuarto factor está compuesto únicamente por la proporción de largo a ancho del callo (6.7% de varianza) que no fue una característica útil en la separación de especies. El quinto se basa en la proporción entre ancho del istmo y del callo, con un 5.9% de la varianza y los dos valores más altos que se relacionan negativamente con este son las proporciones entre largo y ancho de los sépalos laterales y dorsal. La proporción entre largo y ancho del labelo también es una característica muy variable, contribuye con un 5.0% a la varianza total entre las flores de Lycaste y constituye el sexto factor.

El cuarto, sexto y séptimo factor muestran la alta variabilidad de la proporción de largo contra el ancho del callo (6.7% de varianza), la proporción entre largo y ancho del labelo (5.0% de varianza) y la proporción entre el largo del ovario y el largo de la bráctea floral (3.9% de varianza). Estos caracteres no fueron útiles en la separación de especies por ser muy variables.

El séptimo factor se incluye la proporción del largo del ovario el de la bráctea floral, contribuyendo con un 3.9% de la varianza total. El ancho de la flor y el largo de la columna se agrupan para formar el octavo factor (3.5% de varianza) y se ven inversamente relacionados con el largo del lóbulo medio. El ancho de los pétalos y la proporción largo-ancho de los lóbulos laterales (3.3% de varianza) se relacionan inversamente con la proporción largo-ancho del pétalo. El décimo factor (3.1% de varianza total) se compone de la proporción largo-ancho del pétalo y éste se relaciona inversamente con el ancho de los pétalos y la proporción largo-ancho de los sépalos laterales.

En las características discontinuas (Cuadro 17) el primer factor agrupa las características del labelo (abertura desde el frente, forma de la base, ancho de la indentación del mentón y los forma de los lóbulos laterales) con la forma de la columna y la forma de los tricomas en la mitad proximal de la columna. Al igual que en los caracteres continuos, el primer factor agrupa caracteres relacionados a la posible entrada de polinizadores a la flor, con un 25.2% de varianza. El segundo factor agrupa los tricomas, en el interior del labelo y el callo, con el ápice del callo. Estos caracteres también pueden estar relacionados con el aterrizaje del polinizador (13.4% de varianza).

La posición de los sépalos en relación con el resto de la flor y la densidad y forma de los tricomas en la mitad distal de la columna son muy variables y forman por sí solos el tercer (10.0% de varianza) y cuarto (8.2% de varianza) factor, respectivamente. El mentón del labelo y el corte transversal del callo se agrupan en el quinto factor con un 6.6% de varianza. El sexto factor agrupa la abertura y la forma de la base del labelo (6.2% de varianza), lo cual indica que están muy relacionados.

**Cuadro 17.** Análisis de componentes principales de los caracteres discontinuos de las flores de *Lycaste spp.* medidas.  
Los valores en **negrillas** muestran las características que forman cada factor.

Caracteres	Factores principales					
	1	2	3	4	5	6
<b>Abertura del labelo</b>	<b>-0.607</b>	-0.234	0.122	-0.387	0.094	<b>0.504</b>
<b>Forma del labelo</b>	<b>0.623</b>	0.090	-0.076	-0.121	0.306	<b>0.495</b>
<b>Mentón</b>	-0.088	0.486	0.543	0.094	<b>-0.440</b>	0.198
<b>Ancho de la indentación del labelo</b>	<b>-0.844</b>	0.159	0.136	-0.241	0.064	0.099
<b>Tricomas en la cara interna del labelo</b>	0.030	<b>0.633</b>	-0.329	0.360	-0.010	0.205
<b>Corte transversal del callo</b>	0.489	0.308	-0.040	-0.097	<b>0.474</b>	0.248
<b>Ápice del callo</b>	0.242	<b>-0.646</b>	0.201	-0.113	0.325	-0.346
<b>Tricomas del callo</b>	0.181	<b>0.665</b>	-0.005	0.039	0.177	-0.288
<b>Vista Lateral de lóbulos laterales</b>	<b>0.728</b>	-0.021	0.044	0.312	-0.268	-0.067
<b>Vista ventral de lóbulos laterales</b>	<b>0.790</b>	0.019	0.030	0.145	-0.198	0.067
Ápice del lóbulo medio	-0.165	0.254	0.524	0.149	0.393	-0.073
<b>Forma de la columna</b>	<b>0.737</b>	0.030	0.205	-0.165	0.017	0.239
Posición de la cubierta de la antera	0.366	0.296	0.386	-0.052	0.245	-0.088
<b>Tricomas ½ distal de la columna</b>	-0.325	-0.239	0.181	<b>0.713</b>	0.228	0.173
<b>Tricomas ½ proximal de la columna</b>	<b>-0.710</b>	-0.057	0.119	0.542	0.093	0.143
Tricomas base de la columna	0.223	-0.461	-0.474	0.179	-0.074	0.318
<b>Posición de los sépalos en relación con la forma de la flor</b>	0.198	-0.266	<b>0.716</b>	-0.097	-0.315	0.179
Traslape de los pétalos atrás de la columna	-0.425	0.484	-0.262	-0.287	-0.169	0.004
<b>Varianza explicada por componente</b>	<b>4.544</b>	<b>2.411</b>	<b>1.805</b>	<b>1.481</b>	<b>1.183</b>	<b>1.116</b>
<b>% de la Varianza total explicada</b>	<b>25.25</b>	<b>13.40</b>	<b>10.03</b>	<b>8.23</b>	<b>6.57</b>	<b>6.20</b>

Fuente: Elaboración propia.

Cuando se combinan ambos grupos de datos (Cuadro 18) los caracteres se dividen en 14 factores, con un porcentaje de varianza total del 75.0%. Los factores obtenidos en este análisis coinciden con los obtenidos en el análisis por separado.

**Cuadro 18.** Análisis de componentes principales de todos los caracteres medidos de las flores de *Lycaste spp.* medidas. Los caracteres agrupados en cada factor están en **negrillas**.

Caracteres	Factores principales													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Continuos</b>														
Ancho de la flor	0.260	0.027	-0.037	-0.121	-0.041	0.045	0.016	0.157	0.106	-0.026	0.103	0.262	0.130	0.280
Largo de la base de la flor	0.471	0.331	-0.140	0.304	0.343	0.241	0.141	0.160	0.015	-0.093	-0.186	0.014	0.254	0.023
<b>Largo del labelo</b>	0.224	<b>0.785</b>	-0.032	0.286	0.095	0.116	-0.126	0.163	-0.116	-0.006	-0.052	-0.003	0.067	-0.072
<b>Ancho del labelo</b>	0.471	0.348	0.081	-0.275	0.126	<b>-0.308</b>	-0.075	-0.358	-0.182	-0.249	-0.175	-0.263	0.223	-0.004
Largo de la columna	-0.152	0.554	0.121	-0.165	-0.065	-0.104	0.291	0.083	-0.179	0.050	0.233	0.212	0.200	-0.213
<b>Ancho de la columna</b>	<b>0.868</b>	-0.051	0.051	0.012	0.026	-0.119	0.012	-0.035	0.050	0.056	0.005	-0.032	-0.145	0.127
<b>Largo del callo</b>	-0.270	0.487	0.031	-0.371	<b>-0.531</b>	0.010	-0.020	0.106	-0.193	-0.121	-0.086	0.110	0.038	0.215
<b>Ancho del callo</b>	-0.483	0.334	0.191	-0.092	<b>0.538</b>	-0.237	0.033	0.020	0.134	-0.072	-0.118	0.161	-0.028	-0.059
<b>Largo de los lóbulos laterales del labio</b>	<b>-0.770</b>	0.365	0.212	0.099	-0.048	-0.130	0.007	0.016	0.002	0.075	0.087	-0.139	-0.004	0.058
Ancho de los lóbulos laterales del labio	0.629	0.273	-0.194	0.039	0.148	-0.074	0.104	0.084	-0.107	-0.063	0.034	0.092	-0.026	-0.138
<b>Ancho del istmo del lóbulo medio</b>	0.285	0.079	0.521	-0.376	-0.070	<b>0.308</b>	-0.021	0.060	0.147	0.053	-0.188	-0.241	0.000	<b>-0.329</b>
<b>Largo del lóbulo medio</b>	-0.137	<b>0.768</b>	0.112	0.069	-0.148	-0.124	-0.294	0.025	-0.181	0.028	0.090	0.019	-0.147	-0.045
<b>Ancho del lóbulo medio</b>	-0.141	0.305	<b>0.680</b>	-0.244	0.057	0.156	0.031	0.222	0.084	0.037	0.218	-0.096	0.165	0.019
Largo de los sépalos laterales	0.696	0.581	-0.024	0.061	0.012	0.010	0.020	-0.029	0.135	0.056	0.058	-0.013	-0.024	0.013
<b>Ancho de los sépalos laterales</b>	<b>0.760</b>	0.084	0.237	0.238	-0.041	-0.264	0.158	0.089	-0.031	-0.019	0.123	-0.111	0.060	0.143
<b>Largo del sépalo dorsal</b>	<b>0.730</b>	0.553	-0.030	0.050	0.023	-0.041	0.003	-0.026	0.071	-0.036	0.051	-0.047	0.051	0.188
<b>Ancho del sépalo dorsal</b>	<b>0.734</b>	0.163	0.285	0.300	-0.148	-0.259	0.113	0.041	-0.074	0.103	0.039	-0.015	-0.036	0.010
<b>Largo de los pétalos</b>	<b>0.745</b>	0.443	-0.043	0.005	-0.022	-0.043	0.013	0.029	0.058	0.175	0.086	-0.113	0.095	0.134
<b>Ancho de los pétalos</b>	<b>0.711</b>	0.202	0.362	0.115	-0.133	-0.127	0.186	0.093	0.075	-0.084	-0.189	0.060	-0.141	0.001
<b>Largo del ovario</b>	0.277	0.399	0.222	-0.279	0.305	<b>0.377</b>	0.178	-0.222	-0.110	0.157	0.081	-0.016	<b>-0.360</b>	0.086
<b>Largo de la bráctea floral</b>	0.538	0.393	0.096	-0.094	0.006	0.127	-0.141	-0.116	<b>0.358</b>	-0.104	0.184	0.078	0.025	-0.165
Largo del 1er segmento del escapo	0.275	0.549	0.163	-0.128	0.082	0.111	0.016	-0.097	0.113	-0.013	0.113	0.105	-0.033	0.095
<b>Proporción entre el (Prop.) largo (L) – ancho (A) de base de la flor</b>	0.142	-0.195	0.029	0.335	-0.272	0.100	0.125	-0.443	0.223	<b>0.403</b>	-0.021	0.179	0.205	0.219
<b>Prop. L-A del labelo</b>	-0.236	0.086	-0.098	<b>0.489</b>	-0.072	<b>0.372</b>	0.000	<b>0.515</b>	0.102	0.234	0.169	0.252	-0.192	-0.006
<b>Prop. L-A de la columna</b>	<b>-0.750</b>	0.286	0.025	-0.068	-0.070	0.027	0.180	0.144	-0.083	-0.015	0.117	0.110	0.194	-0.188
<b>Prop. L-A del callo</b>	0.043	0.157	-0.043	-0.229	<b>-0.800</b>	0.166	-0.049	0.131	-0.231	-0.065	-0.030	-0.047	0.049	0.268
<b>Prop. L-A del lóbulos laterales</b>	<b>-0.808</b>	0.192	0.232	0.096	-0.086	-0.091	-0.019	0.001	0.040	0.071	0.055	-0.166	0.013	0.127
Prop. L-A del lóbulo medio	0.005	0.466	-0.453	0.228	-0.196	-0.262	-0.273	-0.180	-0.248	-0.009	-0.104	0.085	-0.262	-0.105
<b>Prop. L-A del sépalos laterales</b>	-0.224	0.390	-0.323	-0.235	0.000	<b>0.315</b>	-0.167	-0.054	0.181	0.046	-0.077	0.148	-0.144	-0.145
Prop. L-A del sépalo dorsal	-0.063	0.394	-0.407	-0.344	0.188	0.279	-0.134	-0.104	0.193	-0.138	0.031	-0.031	0.097	0.199
<b>Prop. L-A de los pétalos</b>	-0.155	0.080	<b>-0.525</b>	-0.121	0.182	0.116	-0.270	-0.111	-0.035	<b>0.330</b>	<b>0.351</b>	-0.234	0.277	0.100
<b>Prop. L-L del ovario y bráctea floral</b>	-0.240	0.006	0.136	-0.164	0.383	0.277	0.321	-0.130	<b>-0.439</b>	0.223	-0.072	-0.133	<b>-0.363</b>	0.275
<b>Prop. L-L del callo y el istmo</b>	-0.357	0.190	-0.131	0.066	<b>0.480</b>	<b>-0.437</b>	-0.011	0.115	-0.023	-0.200	0.071	0.266	-0.041	<b>0.314</b>

(Cuadro 18. Continuación)

Caracteres	Factores principales													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Discontinuos</b>														
Abertura del labelo	0.631	-0.208	-0.038	-0.073	-0.152	0.075	0.200	0.087	0.010	-0.104	-0.023	0.164	-0.169	0.024
<b>Forma del labelo</b>	-0.210	0.360	0.008	0.077	0.036	0.133	0.184	-0.282	-0.068	0.120	<b>-0.365</b>	<b>0.376</b>	<b>0.308</b>	-0.080
Mentón	-0.118	-0.476	0.459	-0.202	0.149	-0.087	-0.151	0.018	0.066	-0.017	0.146	0.247	0.034	0.177
<b>Ancho de la indentación del labelo</b>	<b>0.780</b>	-0.196	-0.110	0.103	0.092	0.099	-0.152	-0.058	0.120	0.026	0.049	0.001	-0.016	-0.010
<b>Tricomas en la cara interna del labelo</b>	-0.019	-0.162	0.326	0.070	0.199	0.199	<b>-0.553</b>	0.215	-0.155	-0.030	-0.217	-0.019	0.164	0.239
<b>Corte transversal del callo</b>	-0.333	0.320	0.164	0.167	-0.113	0.155	-0.256	-0.234	0.280	0.057	<b>-0.365</b>	0.086	-0.122	0.169
<b>Ápice del callo</b>	-0.203	0.311	<b>-0.420</b>	-0.189	-0.038	-0.141	0.208	0.198	0.230	0.011	0.013	-0.170	-0.199	0.049
<b>Tricomas del callo</b>	-0.142	0.073	0.361	0.102	-0.022	-0.022	<b>-0.509</b>	0.071	0.166	-0.246	-0.026	0.078	-0.167	-0.018
Vista Lateral de Lóbulos laterales	-0.664	0.365	0.130	0.173	0.003	-0.179	0.084	-0.008	0.126	0.088	0.010	-0.146	0.010	0.108
Vista ventral de lóbulos laterales	-0.705	0.311	0.056	0.034	0.104	-0.132	0.076	0.123	0.076	0.155	-0.047	-0.060	-0.007	0.027
<b>Ápice del lóbulo medio</b>	0.161	0.000	0.010	<b>-0.487</b>	-0.011	-0.189	-0.167	-0.109	-0.293	0.198	-0.010	<b>0.386</b>	-0.040	-0.080
Forma de la columna	-0.460	0.018	0.261	0.395	-0.038	0.002	0.162	-0.257	-0.056	0.160	-0.162	-0.059	0.035	-0.028
<b>Tricomas ½ distal de la columna</b>	0.180	0.153	-0.125	-0.287	0.012	<b>-0.307</b>	-0.073	<b>0.374</b>	0.150	<b>0.581</b>	<b>-0.317</b>	-0.093	-0.004	-0.061
<b>Tricomas ½ proximal de la columna</b>	0.479	-0.262	-0.067	-0.268	0.140	-0.228	-0.184	<b>0.321</b>	-0.015	<b>0.335</b>	<b>-0.306</b>	0.017	0.093	0.035
<b>Tricomas base de la columna</b>	0.052	0.047	-0.186	0.061	0.109	<b>0.337</b>	0.323	<b>0.325</b>	-0.193	-0.288	<b>-0.311</b>	-0.055	0.134	0.106
<b>Posición de los sépalos en relación con la forma de la flor</b>	-0.134	-0.130	0.014	-0.391	-0.133	-0.180	<b>0.406</b>	<b>-59.000</b>	<b>0.417</b>	-0.024	-0.050	0.133	-0.027	0.123
<b>Traslape de los pétalos atrás de la columna</b>	0.475	-0.151	0.269	0.031	0.144	0.118	-0.118	-0.032	<b>-0.331</b>	0.233	0.197	0.158	0.069	-0.059
<b>Varianza explicada por componente</b>	<b>10.868</b>	<b>5.737</b>	<b>3.002</b>	<b>2.491</b>	<b>2.317</b>	<b>1.962</b>	<b>1.882</b>	<b>1.649</b>	<b>1.519</b>	<b>1.420</b>	<b>1.268</b>	<b>1.181</b>	<b>1.113</b>	<b>1.054</b>
<b>% de la Varianza total explicada</b>	<b>21.74</b>	<b>11.47</b>	<b>6.00</b>	<b>4.98</b>	<b>4.63</b>	<b>3.92</b>	<b>3.76</b>	<b>3.30</b>	<b>3.04</b>	<b>2.84</b>	<b>2.54</b>	<b>2.36</b>	<b>2.23</b>	<b>2.11</b>

Fuente: Elaboración propia.

## 6. Clave dicotómica

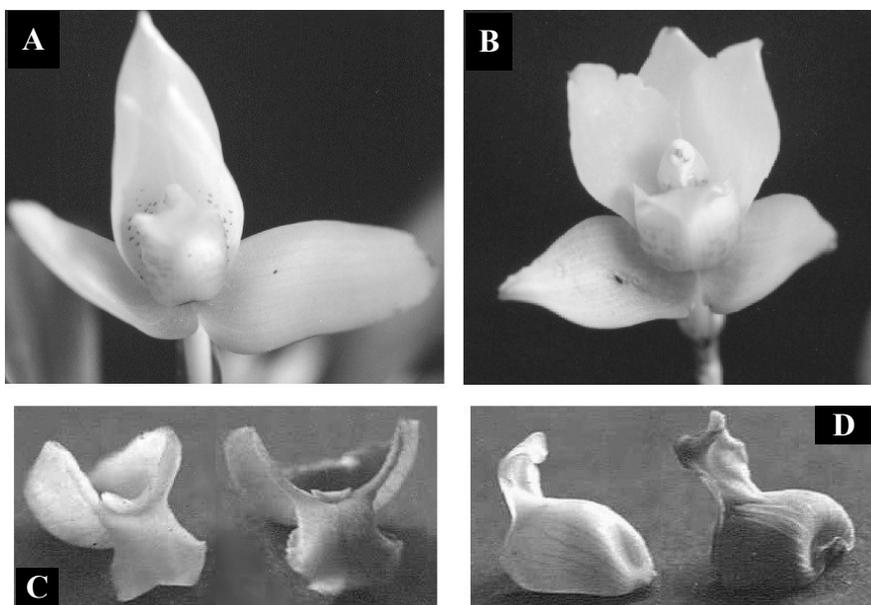
Se realizó la siguiente clave dicotómica para la identificación de las especies presentes en Guatemala, se tomaron solo las características de las especies puras para no hacerla complicada. Todas las especies aquí incluidas pueden tener manchas rojizas, pequeñas, desde la base del labelo hasta llegar al istmo y algunas veces en los sépalos y pétalos. Todas pueden reproducirse entre sí y sus híbridos pueden presentar características de las especies padres o nuevas que aparentan ser intermedias. Esta clave es muy simple como para tomar en cuenta todas las variantes, que hay en flores de plantas de origen híbrido, estas características deben ser tomadas en cuenta por quien esté tratando de identificarlas.

### Clave dicotómica entre las especies de Lycaste (sección Deciduosae, subsección Xanthanthae) presentes en Guatemala:

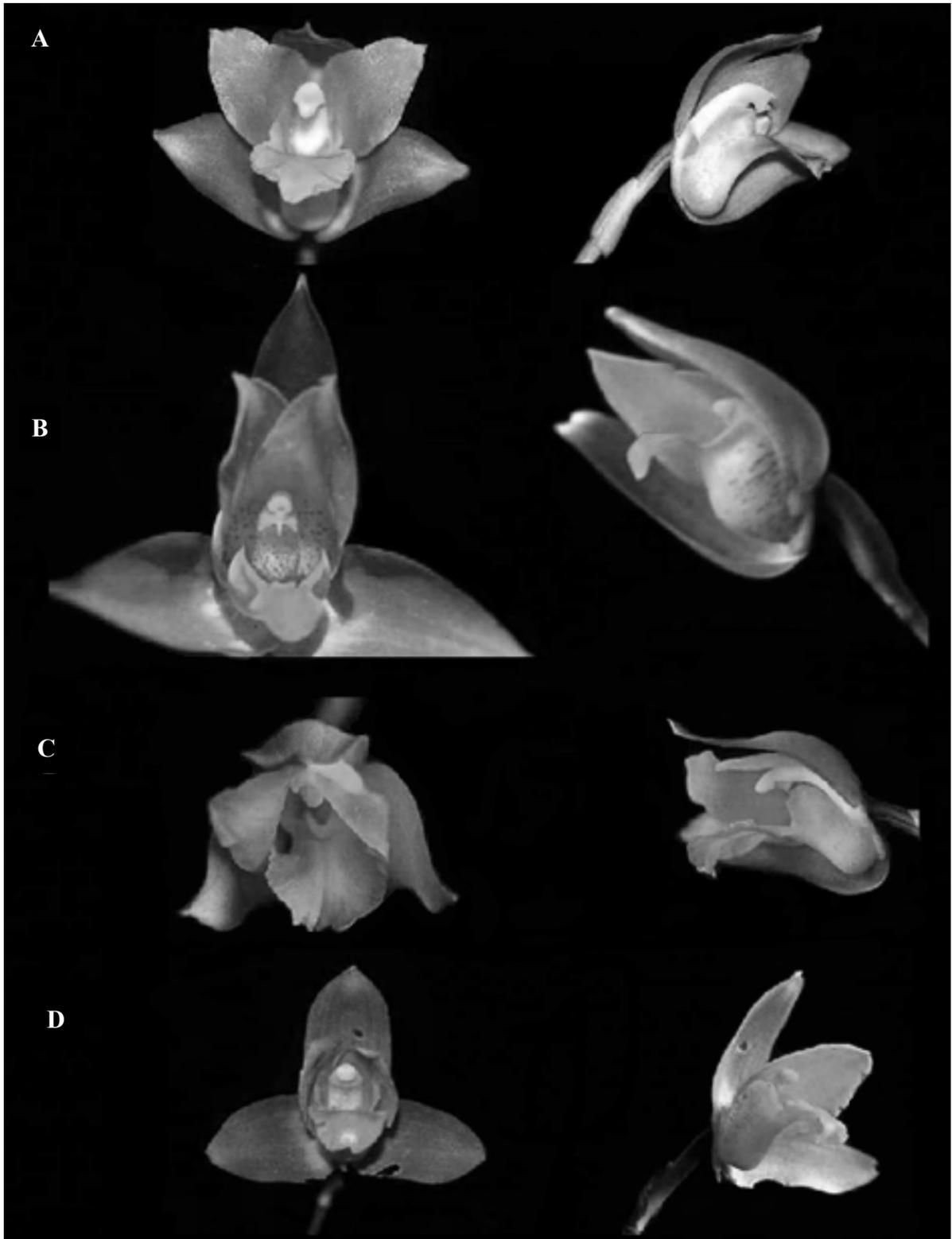
1. Columna ancha, gruesa y erecta, lóbulos laterales del labelo poco visibles o ausentes (Figura 14A y C); callo corto y casi plano, poco notable (Figura 12E y G).  
.....2
2. La indentación en la base del labelo ocupa todo el ancho de este. Puede presentar o no una mancha roja bien definida en la cara interna de la base del labelo (Figura 11E, 27 y 28B).  
..... **L. cruenta**
- 2'. La indentación en la base del labelo ocupa de 1/4 a 1/2 del ancho total del mismo. No presenta una mancha roja en la cara interna de la base del labelo, pero sí manchitas rojas en todo el labelo (Figura 11D y 27).  
..... **L. sulfurea**
- 1'. Columna delgada y arqueada, tiene lóbulos laterales bien definidos (Figuras 14D-G); callo largo y no se ve plano, fácilmente observable.  
.....3
3. En vista lateral el callo se observa sobrepasar los lóbulos laterales.  
.....4
4. El callo es cuneado y la punta es más ancha que el istmo del lóbulo medio; los lóbulos laterales del labelo tienen ápices agudos que se proyectan hacia el frente (Figura 14E).  
.....**L. aromatica** (al momento solo ha sido encontrada en México)

- 4'. El callo es en forma de "V" (ligulado, Figura 13E) y su punta no es más ancha que el istmo del lóbulo medio; los lóbulos laterales tienen ápices redondeados y se doblan rodeando la columna.  
 .....**L. consobrina** (las flores de las plantas encontradas más al norte, en México, huelen a manzana verde (M. A. Soto Arenas, *com. pers.*), pero podemos encontrar flores con esta forma de callo entre las **L. cochleata** de las Verapaces e híbridos de Chiquimula).
- 3'. En vista lateral el callo no sobrepasa los lóbulos laterales.  
 .....**5**
5. En vista frontal, callo doblado en forma de "V", carnoso, Figuras 13D y 28C.  
 ..... **L. suaveolens**
- 5'. En vista frontal, callo poco doblado o doblado en forma de "U", es poco carnoso.  
 .....**6**
6. El callo ocupa el mismo ancho del istmo del lóbulo medio, los lóbulos laterales no se traslapan con el lóbulo medio del labelo si se aplana la flor (Figura 12F).  
 ..... **L. bradeorum**
- 6'. El callo es más angosto que el lóbulo medio, lóbulos laterales se traslapan con el lóbulo medio del labelo si se aplana la flor (Figura 13 y 28A).  
 ..... **L. cochleata**

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 27.** Comparación entre flores de *Lycaste sulfurea* y *L. cruenta*. *L. sulfurea* siempre está a la izquierda. **A.** Flor completa de *L. sulfurea*, **B.** Flor completa de *L. cruenta*, **C.** vista frontal de los labelos, **D.** vista inferior de los labelos.  
 Fuente: Elaboración propia.

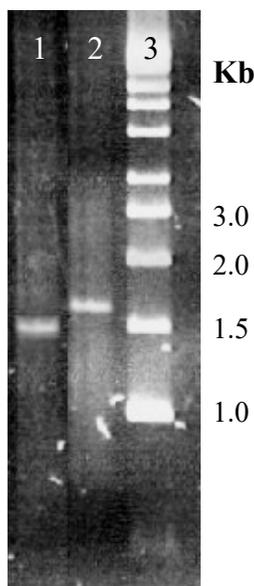


**Figura 28.** Vistas frontal y lateral de flores típicas de *Lycaste*.  
A. *L. cochleata*; B. *L. cruenta*; C. *L. suaveolens* y D. híbrido *L. suaveolens* × *cruenta*.  
Fuente: Elaboración propia.

## D. Análisis genético

Se compararon las extracciones de los métodos de Edwards, Johnstone y Thompson (1991) y una modificación de Doyle y Doyle (1990), donde se extrajeron aproximadamente  $0.037 \pm 0.028$  ng/ $\mu$ l y  $0.070 \pm 0.057$  ng/ $\mu$ l de ADN total, respectivamente. Se escogió el método de Doyle y Doyle (1990) para la extracción de ADN de las muestras, por la mayor cantidad de ADN extraído. La concentración recomendada de ADN para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sin problemas por falta de ADN está entre 0.05 a 2.00 ng/ $\mu$ l (Hoy 1994).

Los artefactos más comunes durante la obtención de los fragmentos del gen *ndhF* del ADNcp fueron la poca cantidad de ADN total obtenida al final de la extracción. El color pardo de las extracciones se debe la existencia de interferentes, como polisacáridos y polifenoles. Por esta razón se aumentó la cantidad de solución tampón de CTAB (Olmstead y Palmer 1994) a 700 $\mu$ l en lugar de 600 $\mu$ l como el procedimiento original, además se agregó polivinil pirrolidona (PVP- 40T) al 1% para evitar que los polifenoles se unan al ADN (Torres, Weeden y Martín 1993).



Los dos distintos haplotipos encontrados pueden observarse en la Figura 29. Asumiendo que los individuos de poblaciones alopátricas no han sufrido introgresión, ni otra forma de recombinación genética, los haplotipos para el gen *ndhF* del ADNcp son: L. cochleata (Izabal) 1,700pb y L. cruenta (Santa Rosa) 1,500pb. En Zacapa el haplotipo más abundante es el de 1,700pb.

**Figura 29.** Posibles haplotipos en el gen *ndhF* de *Lycaste spp.*

El carril 1 muestra el haplotipo de 1500pb, el carril 2 muestra el haplotipo de ~1700pb, el tercer carril muestra el marcador de pesos moleculares 1Kb de Sigma©. Los números muestran el tamaño de los fragmentos de ADN de doble hebra del marcador de pesos moleculares en miles de pares de bases (Kb).

Fuente: Elaboración propia.

Hasta el momento, se han analizado 27 plantas de especies de flores amarillas, los datos por especie y localidad analizada están en el Cuadro 19. Se han analizado plantas de L. deppei (2 de Baja Verapaz, Cuadro 19), que presenta el haplotipo de 1700pb y una de L. lasioglossa (Izabal) que presenta el haplotipo de 1500pb.

Los haplotipos encontrados por departamento pueden observarse en el Cuadro 19. En poblaciones simpátricas encontramos los dos haplotipos (Izabal, Chiquimula, Jutiapa y Zacapa), en poblaciones alopátricas encontramos solo uno de los dos (Escuintla, Izabal y Santa Rosa). En Izabal solo encontramos el haplotipo grande para L. cochleata, pero L. lasioglossa tiene el haplotipo pequeño. L. deppei en Baja Verapaz tiene el haplotipo grande al igual que las otras especies de Lycaste de la zona. La presencia de ambos haplotipos en L. suaveolens y L. cruenta apoya la teoría de que la mayoría de los híbridos se origina con estas dos especies como uno de los parentales.

**Cuadro 19.** Posible haplotipo del gen *ndhF* para *Lycastes* amarillas y su distribución por localidad.

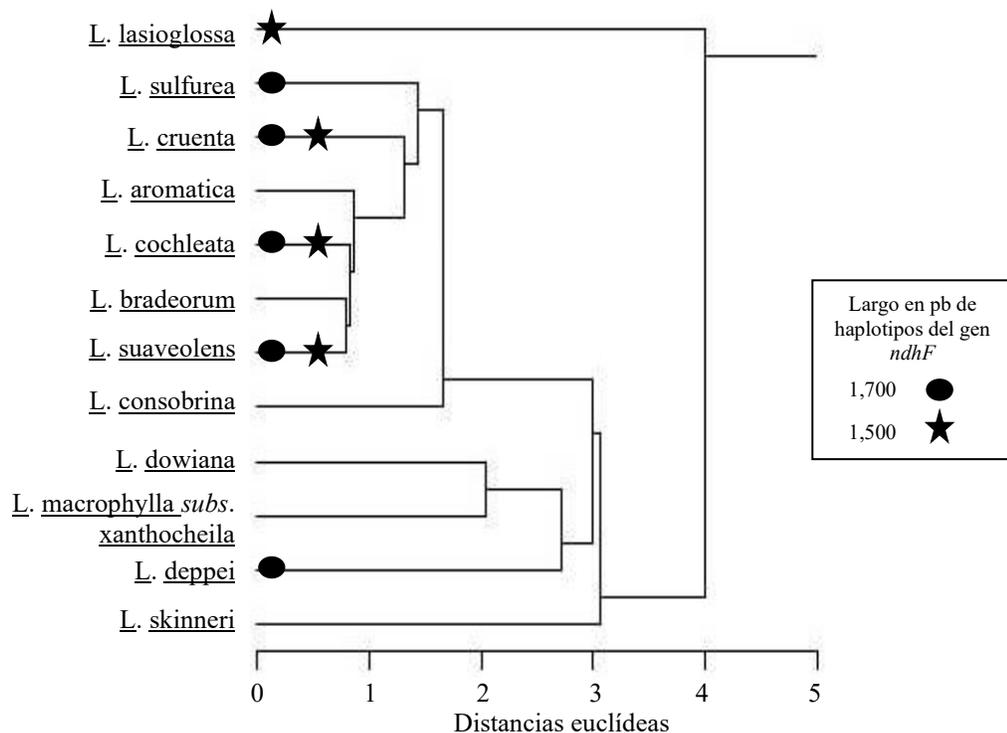
Especie	Localidad	Haplotipo gen <i>ndhF</i> (pb)		Total
		1500	1700	
<u>L. cochleata</u>	Escuintla (Es)		+ (2)	2
	Cq		+	1
	Iz		+ (3)	3
<u>L. cruenta</u>	Jutiapa (Ju)	+ (1)	+ (2)	3
	Santa Rosa (SR)	+		1
<u>L. suaveolens</u>	Za	+ (1)	+ (7)	8
	Cq	+ (1)	+ (1)	2
	Localidad desconocida		+ (3)	3
<u>L. sulfurea</u>	Cq		+ (3)	3
<u>L. deppei</u>	BV		+(2)	2
<u>L. lasioglossa</u>	Iz		+	1
Especie desconocida <sup>1</sup>	Za		+	1
<b>TOTAL</b>		<b>4</b>	<b>26</b>	<b>30</b>

<sup>1</sup> Plantas que no tienen material floral con el cual identificarlas.  
Fuente: Elaboración propia.

## E. Cladograma

El cladograma de la Figura 30 fue realizado basándose en 50 caracteres florales de las especies de *Lycaste* presentes en el país y se incluyen los haplotipos encontrados en cada especie. Hay dos grupos, uno entre *Lycaste* amarillas, las más cercanas son *L. suaveolens*, *L. bradeorum*, *L. cochleata* y *L. aromatica* (ordenadas de más similares a diferentes). También, se puede observar que *L. cruenta* y *L. sulfurea* están cercanamente relacionadas, pero están más separadas que el resto de las especies con flores amarillas. *L. consobrina* es la especie menos relacionada dentro del grupo de especies amarillas.

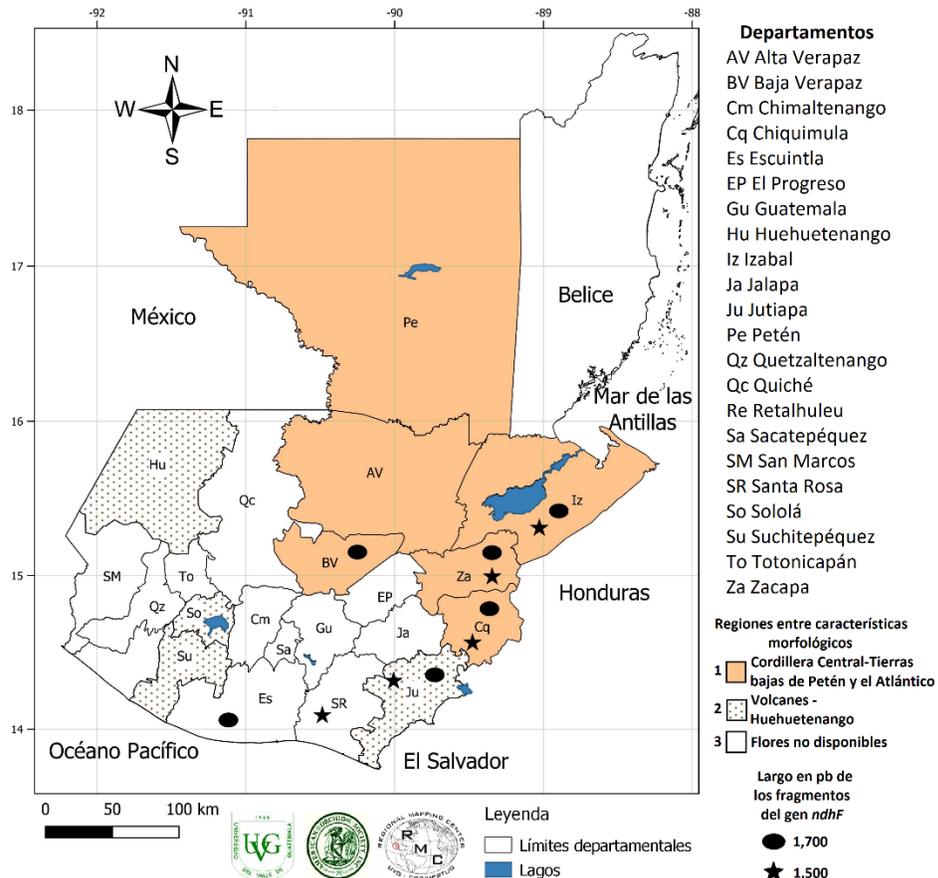
El otro grupo está formado por *L. dowiana* y *L. macrophylla subs. xanthocheila*, que están muy relacionadas entre ellas. Las menos relacionadas morfológicamente con las demás especies presentes en Guatemala son *L. deppei*, *L. skinneri* y *L. lasioglossa*.



**Figura 30.** Cladograma de disimilitud entre especies de *Lycaste*. Se utilizaron 50 caracteres morfológicos en 283 flores; unido por el método de unión simple (UPGM), con distancias euclídeas y que muestra los haplotipos del gen *ndhF* para cada especie  
Fuente: Elaboración propia. .

## F. Análisis geográfico de distribución de las especies

La Figura 31 muestra la distribución de caracteres morfométricos y de los haplotipos en Guatemala. Morfológicamente hay dos zonas, una formada por Alta y Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Izabal, Petén y Zacapa. La otra región incluye poblaciones de tierras volcánicas de la costa sur (Suchitepéquez, Sololá y Jutiapa) y Huehuetenango. Para este análisis no se incluyeron las flores provenientes de México, Honduras y Costa Rica. La región geográfica más variable, tanto en características morfológicas, como genéticas es el nororiente del país, donde convergen ambas zonas de distribución de caracteres morfológicos y podemos encontrar ambos haplotipos del gen *ndhF*.



**Figura 31.** Mapa de Guatemala que presenta la distribución geográfica de los haplotipos del gen *ndhF* y las posibles regiones a encontrar, basadas en los caracteres morfométricos para especies de *Lycaste* amarillas. Estos especímenes representan especies amenazadas. Las localidades específicas no han sido georeferenciadas para protegerlas de la colecta desmedida.  
Fuente: Elaboración propia.

## IV. DISCUSIÓN

### A. Muestreo

Cuatro de las siete poblaciones analizadas, entre 1997 y 1999, presentan más de una especie de Lycaste. Las especies más abundantes en la naturaleza son L. suaveolens, híbridos naturales y L. cruenta (Cuadro 5). Durante estos viajes de campo no se encontraron poblaciones alopátricas de L. suaveolens, ni de L. sulfurea. Este hecho sugiere que estas especies se han desarrollado a partir de conglomerados de híbridos. Los períodos de floración se traslapan entre todas las especies (Figura 17), además comparten polinizadores (Euglossa spp., Dix y Dix 1992). Esto facilita la hibridación interespecífica en zonas simpátricas.

Los factores que más influyen en la desaparición de individuos de estas especies en el campo, en orden de importancia, son los incendios forestales, el cambio de uso de la tierra para usos agrícolas y ganaderos o centros poblados, y la colecta indiscriminada de individuos para la venta. Pero no solo estas especies se ven afectadas por estas actividades. Se ha reportado que la amenaza más grande para la comunidad de epífitas es la deforestación. El número de orquídeas nativas exportadas es mínimo en comparación con la pérdida por operaciones madereras. Las litófitas también son destruidas por la maquinaria y equipo de tala, y porque al quedar sin cubierta boscosa son desecadas por el sol. Al desaparecer el bosque también lo hacen miles de helechos y epífitas (Koopowitz y Kaye 1990).

El impacto producido por los coleccionistas expertos en cultivo (aficionados a las orquídeas, que tienen cultivos *ex situ*) es pequeño (Koopowitz y Kaye 1990), pero también se han reportado casos en los que los coleccionistas novatos han limpiado las ramas de

árboles en pie, sacando plantas que no sobreviven el impacto del viaje y el trasplante. Otro grupo que representa presión sobre las poblaciones en el campo son los “colectores profesionales”, que extraen plantas ilegalmente para la venta. Los “colectores expertos en cultivo” han reportado que, al regresar a áreas ricas en orquídeas, han encontrado que los “colectores profesionales” han extraído plantas, llevando poblaciones a niveles cercanos a la extinción (Dix y Dix, *com. pers*).

En los departamentos de Zacapa, Izabal, Chiquimula y Jutiapa fueron reportadas, por varios autores, las localidades donde obtuvieron las flores para hacer las descripciones posteriores a la descripción original de la especie (Ames y Correll 1953; Fowlie 1970; Tinschert 1983; Dix y Dix 1992). Estas localidades son cercanas o están en áreas protegidas, aun así, las poblaciones han mermado (Zacapa, Izabal, Chiquimula) o desaparecido (Esquipulas en Chiquimula). Se deben implementar medidas de protección más efectivas en los lugares que aún quedan relictos de las poblaciones naturales, como los bosques de pino y encino en la Reserva de Biosfera Sierra de las Minas y la Zona de Veda Definitiva de los Volcanes Chingo e Ipala.

Las distribuciones altitudinales, teóricas, de L. cochleata y L. cruenta se traslapan entre los 1,000 y los 1,800 m s.n.m. (Cuadro 21 en el Anexo A.). En las poblaciones estudiadas encontramos estas dos especies entre 800 y 1,750 m s.n.m. Los híbridos de Lycaste amarillas se encuentran entre 1,100 y 1,740 m s.n.m. Esta forma de distribución de híbridos ha sido ampliamente documentada (Arnold 1997; Fægri y van der Pijl 1971), ya que especies que normalmente no se hibridan, lo hacen en zonas de contacto interespecífico.

L. suaveolens se ha encontrado en intervalos altitudinales y localidades reducidas en comparación con L. cochleata y L. cruenta. Según la relación que existe con poblaciones de L. cruenta se cree que se originó como un híbrido, pero actualmente sus densidades son mayores. Esto sugiere que presenta vigor híbrido.

Se ha demostrado que algunos híbridos presentan características con una adecuación biológica (fitness) mayor que la de sus padres y pueden contribuir genéticamente a las futuras generaciones (Cruzan y Arnold 1994, Grant y Grant 1996, Emms y Arnold 1997; Carney *et al.* 2000; Burke y Arnold 2001). Especies relacionadas cercanamente pueden tener requerimientos de germinación muy diferentes (Harper *et al.* 1965) que pueden diferenciar especies que son muy parecidas cuando adultas (Grubb 1977).

Las consecuencias de especiación simpátrica dependen de un polimorfismo estable, el cual involucra la evolución de una asociación entre este polimorfismo y alelos en loci que afecten su reproducción (casi siempre por la selección de hábitat o recursos). Si ocurre especiación simpátrica en una sola localidad dentro del intervalo de distribución de un ancestro ampliamente distribuido, la especie hija, que ha cambiado a un nuevo hábitat o recurso puede diseminarse. El resultado, en términos de patrones de variación genética molecular, puede no ser distinguible de los producidos por un efecto fundador, i.e. una especie tendrá un subgrupo de la variación encontrada en la especie hermana, el patrón específico depende de la estructura poblacional del ancestro.

Alternativamente, en casos de especies hermanas simpátricas en un área amplia, las distribuciones actuales pueden reflejar eventos de especiación múltiples. En casos de especiación por hibridación se pueden encontrar bajos niveles de variación en las secuencias, sugiriendo que estas son de origen cercano, que al ser perennes hacen que estas diferencias se mantengan por periodos más prolongados (Harrison 1991).

## **B. Polinización**

Se cerró el estigma del 69% de las flores polinizadas. Esto implica que las barreras para la fecundación se incrementan después de esta estructura (Cuadro 6 y Cuadro 7), ya que solo se formaron cápsulas en un 35%. Esto sugiere un proceso de heterostilia (esto es que el largo de la columna varía entre flores de la misma especie) en el grupo, ya que se desarrollan tubos polínicos, pero no llegan a fecundar los óvulos (Fægri y van der Pijl

1971). En general, el porcentaje de éxito en la polinización cruzada entre estas especies es bajo, 33%, y presenta diferencia significativa con las flores polinizadas por su misma especie, 43%,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=287)} = 2.73$ ;  $0.05 > p > 0.10$ .

Las barreras para la autopolinización en estas especies pueden ser bajas porque los machos de las abejas del género Euglossa spp. marcan las flores con trazos de olor de corta duración para poder regresar a recoger olores (“trap-lining behavior”). Estos polinizadores no están interesados en obtener alimento de las flores (Dodson *et al.* 1969; Simpson 1966). Esto asegura que la abeja regresará en corto tiempo a la misma flor, después de pasar por otras, promoviendo la fertilización cruzada y que baje la probabilidad de la autopolinización. Esta asociación con abejas de la tribu Euglossini, que son voladoras fuertes y de distancias largas, asegura la fertilización cruzada en poblaciones con bajas densidades de individuos y/o pocas flores producidas (Janzen 1971).

Durante los experimentos de polinización se encontraron machos de Euglossa cf. viridissima visitando y polinizando flores de Lycaste amarillas, hasta ese momento no se había reportado la presencia de estas abejas a esta elevación (1,502 m s.n.m.), ya que su intervalo de distribución en el área de la meseta central estaba reportado hasta 1,200 m s.n.m. (M. A. Dix, pers. com.). Este dato apoya los registros de ampliación de rango de distribución de especies de insectos debido al calentamiento climático en las pasadas décadas (Thomas *et al.* 2001). La presencia de polinizadores naturales interfiere con los experimentos de polinización ya que disminuye la disponibilidad de flores para los mismos.

Los híbridos presentan un mayor número de columnas cerradas (80%) y mayor formación de cápsulas (41%) en los experimentos de polinización cruzada,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=247)} = 5.536$ ;  $0.01 > p > 0.05$ . Al cruzar L. cruenta con híbridos naturales como madres hubo mayor éxito en la formación de híbridos (62%),  $\chi^2_{(g.l.=6, N=100)} = 13.499$ ,  $0.01 > p > 0.05$ , lo que la hace una buena candidata para posible parental en los enjambres de híbridos en poblaciones simpátricas que presentan introgresión. Esto es apoyado también por el éxito que tiene al cruzarse con L. cochleata como madre (50%). En contraste, al hacer cruces usando a L. suaveolens, como madre o como padre, hay menor éxito en la formación de

cápsulas (13%),  $\chi^2_{(g.l.=6, N=112)} = 9.966$ ;  $0.10 > p > 0.15$ ; ambas especies se encuentran en simpatria, lo que hace poco probable la formación de híbridos naturales entre ellas.

En poblaciones muy diversas como las de Zacapa, con 6 especies de lycastes amarillas (Cuadro 5), y en la que L. suaveolens es mayoría (66%) y L. cruenta minoría (3%), encontramos un alta cantidad de híbridos naturales (24%). Las plantas híbridas que fueron polinizadas, con polinias de otros híbridos o especies, presentan un porcentaje de fecundación mayor que el resto 41% (Cuadro 6). Esto implica que sus barreras para la polinización cruzada son menores. También presentan una alta tasa de producción de cápsulas por autopolinización (5 de 9 flores polinizadas, 56%). En este estudio, los híbridos producen semillas más fácilmente que las especies bien establecidas, lo que puede dar lugar a que la proporción de individuos híbridos en las poblaciones se incremente (ver Cuadro 5), pero no implica que las semillas se establezcan más fácilmente, ni que los individuos nuevos sean fértiles entre sí o por retrocruzamiento.

En las poblaciones donde se encontraron híbridos naturales (Zacapa, Jutiapa y Chiquimula) estos presentan más barreras para fertilización por retrocruzamiento, por lo que se debe analizar más material de estas localidades y hacer análisis de polinizadores y fragancias en las mismas.

Los cruces entre L. cochleata  $\times$  L. suaveolens presentan la mayor cantidad de columnas cerradas y producción de cápsulas, 86% y 50%, respectivamente (Cuadro 6),  $\chi^2_{(g.l.=4, N=81)} = 10.796$ ;  $0.01 > p > 0.05$ . Los cruces entre L. cruenta  $\times$  L. cruenta tienen más éxito en la producción de cápsulas (40%),  $\chi^2_{(g.l.=4, N=72)} = 8.399$ ;  $0.05 > p > 0.10$ . L. suaveolens  $\times$  L. cruenta tienen la menor producción de cápsulas (13%),  $\chi^2_{(g.l.=4, N=84)} = 10.953$ ;  $0.05 > p > 0.10$ .

En experimentos de autopolinización de las 40 flores autopolinizadas solamente 53% cerraron el estigma, pero el 43% desarrollaron cápsula, ligeramente mayor que en la polinización cruzada,  $\chi^2_{(g.l.=3, N=40)} = 2.437$ ;  $p \ll 0.15$  (Cuadro 7). Al polinizar las columnas de híbridos se alcanzó un porcentaje de polinización y fecundación del 84% para cruces

interespecíficos y del 54% para autopolinización, mientras que cuando son los donadores de polinias son 76% y 32%, respectivamente,  $\chi^2_{(g.l.=1, N=78)} = 2.459$ ;  $0.10 > p > 0.15$ . L. cochleata presenta más barreras para la autofecundación con polinias de otra flor en la misma planta (22% con cápsulas desarrolladas), que para L. cruenta del 40%, para L. suaveolens del 43%, y los híbridos tenían un éxito de fecundación del 60%. Es interesante que, aunque la tasa de aceptación de polen (cerrado de estigma) de las flores polinizadas con sus propias polinias es ligeramente más baja (50%), todas produjeron cápsula, haciendo que tenga el éxito de polinización mayor (Cuadro 7). Al polinizar flores con sus propias polinias, el éxito en la polinización es de 100% en L. cochleata, 67% en L. cruenta, 50% en los híbridos y 20% para L. suaveolens,  $\chi^2_{(g.l.=3, N=14)} = 4.113$ ;  $p \ll 0.15$ .

Durante los muestreos preliminares y análisis de plantas, se tuvo acercamiento con socios de las asociaciones de orquideología (ej. O. Mittlesteadt, M. Behar y O. Tinschert), todos hicieron énfasis en que antes de hacer polinizaciones entre diferentes especies de orquídeas, se mida el largo de la columna de ambos padres para confirmar si el largo de la del padre es al menos del mismo largo que la de la madre, esto aumenta las probabilidades de que la polinización sea exitosa (Dressler 1981). La correlación entre los largos de las columnas de las flores polinizadas artificialmente es alta,  $R^2=0.9836$  cuando son polinizadas y ligeramente menor,  $R^2=0.9411$ , cuando solo se cierra el estigma (Figura 18), sin diferencia estadísticamente significativa, por lo que no puede utilizarse como indicativo para el éxito de la polinización artificial. El ancho de las cápsulas es poco más de la mitad del largo ( $y=0.5561x$ , forzando la intersección en 0, con  $R^2=0.9549$ , Figura 19), donde los híbridos tienen las cápsulas más anchas y L. suaveolens las más delgadas y cortas, las más largas son de L. cruenta.

El tubo polínico debe ser de largo mayor al largo de la columna de la madre, para alcanzar a los óvulos en el ovario. Al llegar a la madurez la cápsula alcanza 2.2 veces el largo original del ovario de la flor fecundada- ( $y=2.2454x$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia a pasar por 0,  $R^2=0.9445$ , Figura 20).

El largo de la cápsula madura es más de 3 veces el largo de la columna del padre ( $y=3.3482x$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia a pasar por 0,  $R^2=0.9678$ , Figura 21) y poco más de dos veces el ancho final de la cápsula ( $y=2.1862x$ , cuando se fuerza la intersección de la línea de tendencia a pasar por 0,  $R^2=0.9407$ , Figura 22), se puede determinar, por el largo de la columna del padre, si se producirán mayor o menor cantidad de semillas.

En la Figura 23 se muestra el largo de la columna del padre que fecundó efectivamente flores de las especies en estudio. L. suaveolens fue fecundada por las polinias de flores con columnas más largas, por lo que sugiere que, al ser más difícil de polinizar con polinias de flores de columnas más cortas, formará menos híbridos naturales, ya que restringe las posibles especies a ser padres efectivos. Los híbridos naturales fueron polinizados con las polinias provenientes de flores con columnas más cortas, lo que sugiere mayor susceptibilidad a ser polinizadas por L. cruenta y otras especies con columnas más cortas.

## **C. Análisis morfológico**

### **1. Características florales importantes para descripción de especies**

La característica floral más importante para la separación de todas las especies de la subsect. *Xanthanthae* presentes en Guatemala, son la proporción entre largo y ancho de la columna, y la forma del callo del labelo. Las características más variables dentro de las especies son el ancho de la flor y las proporciones entre largo y ancho del callo, del lóbulo medio del labelo, del sépalo dorsal y de los pétalos. Los intervalos de valores para cada característica son tan amplios que se traslapan entre ellos (Cuadro 9).

L. suaveolens y L. cochleata presentan 14 caracteres continuos con diferencia significativa (Cuadro 10,  $P \leq 0.05$ ). A pesar de esto, al hacer el análisis discriminante (Figuras 24 y 25), parecen estar más relacionadas en tamaño y forma que L. cruenta y L. sulfurea que solo tienen 5 caracteres continuos que las diferencian estadísticamente

(Cuadro 10,  $P \leq 0.10$ ). Los híbridos no se ven tan relacionados a L. cruenta como a otras especies, por lo que se necesita más análisis para poder dilucidar mejor el origen de estos (Figura 25). Los caracteres discontinuos en su mayoría separan las dos parejas de especies antes mencionadas (Cuadro 11), pero el ancho de la indentación del labelo separa nuevamente L. sulfurea de L. cruenta. Los análisis discriminantes también nos hacen notar la `plasticidad fenotípica de L. bradeorum de Costa Rica (Figura 26)

Las características que presentan las flores polinizadas por abejas son estructuras para aterrizaje, y entradas estrechas hacia la fuente del atrayente (Fægri y van der Pijl 1971). El análisis de componentes principales agrupa las características continuas en 10 factores (78.2% de varianza, Cuadro 16), de estos 7 agrupan estructuras por las cuáles puede aterrizar y entrar la abeja. Los tres primeros factores de las características continuas agrupan el cáliz y los pétalos de las flores; largo del labelo, columna y del lóbulo medio, y el ancho del istmo del lóbulo medio y el ancho del lóbulo medio. Estos factores pueden estar relacionados con las características que atraen de las abejas por la forma de las estructuras de aterrizaje, agrupando un 46.7% de la varianza total. La tinción de flores para mostrar los osmóforos de L. cochleata apoya esta suposición (Ryan 2001).

Las características discontinuas se agrupan en 6 factores diferentes (Cuadro 17) que agrupan el 69.7% de la varianza de todas las características medidas. Los factores sirven para agrupar características con las mismas tendencias, si la varianza se debe solo a una característica en un factor, es despreciable para este análisis. En el primer y segundo factor se agrupan al igual que en los continuos, caracteres relacionados a la posible entrada de polinizadores a la flor, con un 38.6% de varianza total.

El mentón del labelo y el vista frontal del callo se agrupan en el quinto factor con un 6.6% de varianza, estos caracteres se pueden tomar como los lugares donde se pueden parar o resbalar las abejas al visitar la flor. El sexto factor agrupa la abertura y la forma de la base del labelo (6.2% de varianza), lo cual indica que están directamente relacionados, mientras más abierto esté el labelo más ancha es su base.

La posición de los sépalos en relación con el resto de la flor y los tricomas en la parte distal de la columna son muy variables y forman por sí solos el tercer (10.0% de varianza) y cuarto (8.2% de varianza) factor, respectivamente siendo poco útiles en la separación de las especies. Cuando se combinan ambos grupos de datos, los caracteres se dividen en 14 factores (Cuadro 18), con un porcentaje de varianza total del 75.0% y confirman las observaciones tomadas en los grupos de caracteres separados.

## 2. Posible origen de los híbridos

Según la función discriminante para todas las especies de la subsect. *Xanthanthae* los especímenes que crean más confusión (o que son mal identificados, Cuadro 12) son los híbridos naturales (65% de identificaciones correctas), *L. suaveolens* (69%) y *L. cochleata* (72%). En este análisis se incluyeron todas las flores de *L. suaveolens*, *L. cruenta*, *L. cochleata* e híbridos naturales. Los híbridos por tener características intermedias desequilibran las proporciones de *L. suaveolens* (86%) y *L. cochleata* (78%), obtenidas a partir del análisis de las especies originales. *L. sulfurea* diverge a partir de los híbridos y de *L. cruenta* (Figura 25E), teniendo poca relación con *L. cochleata* y *L. suaveolens* (Figuras 25C y F, respectivamente).

Se encontraron pocos individuos de *L. bradeorum* y de *L. consobrina*. En localidades simpátricas se encontraron características parecidas a estas especies, en los híbridos. Esto sugiere que en alguna época *L. bradeorum* y *L. consobrina* estuvieron presentes en mayor proporción en poblaciones simpátricas. Aun así, las flores de los individuos encontrados de estas dos especies son de menor tamaño que aquellas flores obtenidas de especímenes de Costa Rica y México (Figura 26, ver Anexo C.). Se ha encontrado que a veces las plantas que están en nuevos ambientes tienden a presentar cambios en su expresión fenotípica, muchas veces disminuyendo su tamaño ya que no está en un ambiente óptimo. La plasticidad puede tener una ventaja en su adecuación biológica (Baker 1965, Thébaud y Simberloff 2001). En este caso se puede deber a que la cantidad de lluvia y humedad relativa son menores que en las poblaciones originales.

El conteo de caracteres intermedios para especies puras con posibles híbridos de localidades de Zacapa, Jutiapa y Chiquimula (Cuadro 13, Cuadro 14 y Cuadro 15) muestra que las especies más probables como padres para los híbridos son L. suaveolens y L. cruenta. El conteo de caracteres intermedios entre especies de Zacapa apoya la idea de que los híbridos naturales se han desarrollado a partir de L. suaveolens y L. cruenta, en esta localidad. Como no se encontraron suficientes individuos de L. cochleata en compañía de L. cruenta e híbridos naturales no puede asegurarse que ambas formen híbridos naturales al encontrarse simpátricamente. Se necesita más material floral de poblaciones en las que se encuentre a L. cochleata y L. cruenta simpátricamente con híbridos naturales para poder confirmar o no la posible hibridación entre ambas.

Si la especie L. suaveolens proviene de híbridos entre L. cochleata y L. cruenta, como se ha sugerido, se debe buscar una comunidad en la que se encuentren estas tres especies simpátricamente con más de un individuo de L. cochleata, al momento no podemos hacer inferencias sobre el origen de L. suaveolens. El conteo de caracteres intermedios realizado para la población de Chiquimula entre L. suaveolens y L. cochleata demostró divergencia entre estas especies y los híbridos encontrados en la localidad. Esto sugiere que los híbridos naturales encontrados en Chiquimula se han desarrollado entre L. suaveolens, porque tienen más características en común, y al menos una especie no encontrada en esta localidad durante este estudio.

El encontrar divergencia entre L. suaveolens, L. sulfurea y los híbridos naturales en la población de Jutiapa, confirma la identificación *a priori* de que la segunda es una especie nueva que ha surgido del cruce de híbridos entre L. suaveolens y L. cruenta por retrocruzamiento. Esto es apoyado por el análisis discriminante (Figuras 25E y F) y el cladograma de la Figura 30. La presencia de L. cruenta en el área se confirma con una población cercana, así como también L. skinneri (A. C. Bailey y J. Monzón Sierra *com. pers.*, viaje de campo en 1998).

### 3. Clave dicotómica

Las claves dicotómicas para especies de la Sect. *Deciduosae* Subsect. *Xanthanthae*, encontradas en la literatura (Fowlie 1970; Ames y Correll 1953, quitando las especies que no están en la Sect. *Deciduosae*) hacen mucho énfasis en el color y distribución de las posibles manchas en el labelo. Ambas usan el tamaño y forma del callo y la forma de los lóbulos laterales del labelo, pero en general le dan mucho énfasis a la coloración del labelo y las características usadas son confusas.

Las plantas almacenadas en herbarios son aplanadas y han perdido los colores originales, por estas razones es difícil identificar las flores de este grupo con las claves existentes, en especial diferenciar entre *L. cruenta* y *L. sulfurea*. Además, la columna y el callo de todas las especies cambian de forma al ser deshidratados. Al ser rehidratados recuperan parcialmente la forma y ancho original, y algunas veces no se recupera la forma de la indentación del labelo. Esto hace que las identificaciones basadas en este material sean poco confiables.

La clave que se presentó en este trabajo hace énfasis en flores frescas o almacenadas en líquido, que son las dos opciones más fáciles para identificar individuos que están en este enjambre de híbridos. Se usan características que puedan ser usadas por orquideólogos aficionados, respetando la terminología científica.

Para futuros organismos que sean ingresados a la colección de Orquídeas UVG, se sugiere hacer una ficha de fotografías digitales de las distintas características representativas de cada individuo que vaya a ser herborizado y sea adjuntada a su hoja de herbario, ya que el espacio necesario para almacenar especímenes en líquido y el mantenimiento que estos requieren pueden ser prohibitivos en los herbarios establecidos.

#### 4. Híbridos naturales descritos

Los híbridos naturales descritos y registrados, en donde ambos padres pertenecen a la Sect. Deciduosae, Subsect. Xanthanthae (Cuadro 20), son: L. × cobani (L. cruenta × L. cochleata) Oakeley, L. × longibractea (L. cruenta × L. cochleata) Oakeley, L. × michelii (L. lasioglossa × L. cochleata) Oakeley, L. × cookii (L. aromatica × L. cochleata) Oakeley y L. × hartleyi (L. aromatica × L. suaveolens) Oakeley. En el análisis morfológico se incluyeron individuos de L. × cobani, L. × longibractea y L. × michelii, donde uno de los supuestos padres es L. cochleata, pero no sobresalieron dentro del grupo de híbridos.

En el Cuadro 20 se incluyen características continuas, descritas para estos tres híbridos y L. cruenta encontrados en Oakeley (1993), también las medias de esos caracteres obtenidas para L. sulfurea y L. cruenta.

**Cuadro 20.** Comparación entre características (medidas en mm) de híbridos naturales, descritos para Guatemala, y las obtenidas para L. sulfurea y L. cruenta en el presente estudio.

Especie	Promedio de la característica medida							
	largo del escapo	largo del ovario	flor		sépalos dorsal		sépalos lateral	
			ancho	largo de base	largo	ancho	largo	ancho
<u>L. × longibractea</u> <sup>1</sup>	190	25	90	50 a 70	60	21	60	21
<u>L. × cobani</u> <sup>1</sup>	100	45	85	35	40	16	45	16
<u>L. × michelii</u> <sup>1</sup>	100	24	100	27	40	18	45	18
<u>L. cruenta</u> <sup>1</sup>	80	27	65	14	40	20	40	20
<u>L. cruenta</u> <sup>2</sup>	NC <sup>3</sup>	24	58	21	36	16	37	17
<u>L. sulfurea</u> <sup>2</sup>	NC <sup>3</sup>	28	41	24	39	16	39	16

Especie	Promedio de la característica medida								Fuente de datos
	Pétalo		Labelo		Lóbulo medio del labelo		Callo del labelo		
	largo	Ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	
<u>L. × longibractea</u> <sup>1</sup>	40	21	30	-	16	10	-	-	Oakeley 1993
<u>L. × cobani</u> <sup>1</sup>	35	17	25	-	12	12	3	3	
<u>L. × michelii</u> <sup>1</sup>	33	17	30	-	15	10	7	3	
<u>L. cruenta</u> <sup>1</sup>	32	19	27	13	13	12	2	3	
<u>L. cruenta</u> <sup>2</sup>	31	17	24	22	11	10	2	3	Mediciones actuales
<u>L. sulfurea</u> <sup>2</sup>	32	15	29	24	11	9	3	4	

NC, No son comparables, Oakeley 1993 mide el largo del escapo desde la base del pseudobulbo, en este estudio se midió solamente el segmento más cercano al ovario por ser el que estaba presente en la mayoría de las flores almacenadas.

Fuente: híbridos naturales y L. cruenta<sup>1</sup> descritos para Guatemala por Oakeley (1993), otras<sup>2</sup> elaboración propia.

El largo del escapo no es comparable porque la mayoría de las flores encontradas en líquido en el herbario presentan tan solo el primer fragmento del escapo a partir del ovario de la flor. El Dr. Oakeley utiliza material fresco para sus descripciones, midiendo todo el largo del escapo hasta la base del pseudobulbo.

En general las flores de L. cruenta medidas en este estudio son más pequeñas que las de Oakeley (1993). Al comparar a L. sulfurea con estas mediciones, se encontró que el ancho de la flor, sépalos, pétalos y el largo y ancho del lóbulo lateral son más pequeños que los del resto. El ancho del callo del labelo es mayor en L. sulfurea. El largo del ovario, el largo de la base de la flor, el ancho del sépalo dorsal y el largo del labelo de L. sulfurea es intermedio entre los híbridos y L. cruenta. Los caracteres de L. sulfurea que se encuentran dentro del intervalo de valores encontrado para las dos descripciones de L. cruenta son el largo de los sépalos y de los pétalos

## **5. Identificación de especímenes nuevos**

Con la función discriminante se pueden ingresar nuevos organismos y averiguar a cuál especie pertenecen. SYSTAT puede comparar todas las especies a la vez, pero al hacerlo los gráficos obtenidos se vuelven confusos, y es difícil observar un organismo en particular. Para poder analizar más fácilmente estos datos se colocan tres especies por corrida del análisis con el programa.

Para especímenes nuevos se debe asignar otro código y compararlos con pares de especies conocidas. Esto se puede hacer para confirmar la identificación obtenida con la clave dicotómica. Al tratar de identificar híbridos naturales se debe tener en cuenta que la distribución de sus caracteres tiende a acercarse a alguna de las especies padre y puede dar lugar a identificaciones erróneas.

## D. Análisis genético

L. cochleata presenta el haplotipo de 1,700pb y L. cruenta el haplotipo de 1,500pb en poblaciones alopátricas (Cuadro 19). En poblaciones simpátricas encontramos ambos haplotipos.

El haplotipo más común fue el de 1,700pb (entre 90 y 85% por muestreo respectivo, Cuadro 1, Cuadro 19 y Figura 29), lo cual indica que la planta madre que tuvo más descendencia en las poblaciones simpátricas presentaba este haplotipo. L. cochleata y L. cruenta presentan ambos haplotipos lo que apoya que estas especies son las posibles especies que dieron lugar a los híbridos naturales. L. suaveolens también presenta ambos haplotipos, pero al no haber sido encontrada en poblaciones alopátricas sugiere que es una nueva especie que viene de un híbrido entre las anteriores.

L. sulfurea presenta únicamente el haplotipo de 1,700pb, esto, aunado a sus características similares a L. cruenta sugiere que esta especie surgió de un complejo de especies y fue aislada de plantas con el haplotipo pequeño.

En L. deppei, se encontró el haplotipo de 1,700pb y en L. lasioglossa el de 1,500pb. Esto sugiere que el antecesor común de este género no está muy aislado genéticamente, ya que en ADN haploide las mutaciones más encontradas son debidas a cambios en el largo de la secuencia por inserciones o deleciones que incluyen desde 1 a 10 pares de bases de largo (Palmer 1987).

## E. Cladograma

El cladograma (Figura 30) muestra dos grupos definidos: el de las plantas con flores amarillas: L. consobrina, L. sulfurea, L. cruenta, L. aromatica, L. cochleata, L. bradeorum y L. suaveolens, listadas de mayor a menor diferencia, y otro conformado por L. dowiana y L. macrophylla subs. xanthocheila. Las especies más alejadas morfológicamente entre ellas y de las otras especies del género son L. skinneri, L. lasioglossa y L. deppei. Al

contrastar con los resultados de los cladogramas basados en caracteres morfológicos de Ryan (2001), encontramos que hay mayor resolución al utilizar características florales comparables entre todas las Lycaste. Además, con los cladogramas basados en secuencias del gen *ITS* de ribosomas nucleares, encontramos agrupadas a las lycastes amarillas, dentro de un grupo más grande que incluye a las Lycaste de Mesoamérica, que es comparable con los resultados aquí presentados.

Las secuencias del gen cloroplásmico *matK* (Ryan 2001), al igual que las del gen *ndhF*, no presentan suficiente variación para poder explicar la complejidad de este joven género, en términos de tiempo evolutivo, pero pueden darnos nociones del origen de las mismas. Esta falta de variabilidad puede deberse a que varias especies divergieron en un corto tiempo de un ancestro polimórfico, y que este proceso fue tan rápido que todavía no hay diferencias en estas secciones de los cloroplastos; o las pocas mutaciones que existen nos presentan ideas conflictivas debido a paralelismos y regresiones por hibridación (Neyland y Urbatsch 1996a). Ante estos resultados, se sugiere incluir las mismas especies e híbridos naturales en todos los análisis, haciéndolos totalmente comparables, ya que Graybeal (1998) ha demostrado que se puede mejorar significativamente la resolución de los cladogramas al incluir más taxones, que cuando se incluyen más características.

Los caracteres morfológicos de las flores de L. macrophylla subs. xanthocheila encontradas en Guatemala sugieren que es más diferente de otras subespecies de L. macrophylla. Esto puede ser sugerido también por la posición de esta subespecie en los resultados de Ryan (2001). En ambos trabajos se puede encontrar similitudes de esta subespecies con L. dowiana. Por lo que será importante seguir tratando de entender la distribución geográfica y relaciones genéticas de estas especies.

## **F. Análisis geográfico de distribución de las especies**

Al analizar los datos morfológicos por localidad se encontró que hay dos grupos definidos (Figura 31). El primero conformado por las poblaciones de la cordillera central que desemboca en el Atlántico (Verapaces, Chiquimula, El Progreso, Izabal, Petén y

Zacapa). El otro por la cordillera volcánica de la costa sur (Suchitepéquez, Sololá y Jutiapa) y Huehuetenango. Al asociar estas localidades con regiones delimitadas por características vegetales las encontramos en algunos bosques de las planicies del Petén, bosques lluviosos del Atlántico, bosques húmedos de Alta Verapaz, bosques de coníferas, bocacosta y planicies del Pacífico. Siendo las tres áreas de distribución de la vegetación, según Standley y Steyermark (1945) y Steyermark (1950), en las que no las encontramos las sabanas, desiertos y chaparrales, así como los bosques templados y fríos de tierras altas, donde la disponibilidad de agua es menor y sirvieron como barreras geográficas (Figura 5).

La distribución de las especies de escarabajos pasálidos endémicos muestra al menos 8 regiones en Guatemala (Schuster *et al.* 2000), estas especies tienen intervalos de distribución más restringidos que las orquídeas, pero para escarabajos que no tienen distribuciones restringidas se ha notado que la distribución puede agregarse como “superárea norte”, que incluye que incluye a la Sierra de los Cuchumatanes, Sierra Norte de Chiapas, Sierra de Santa Cruz y Sierra de las Minas (regiones 3 y 5). Al traslapar la distribución de las poblaciones analizadas y revisar el agrupamiento según los caracteres morfológicos las orquídeas hacen dos grandes grupos, uno formado por las regiones 3, 4, 7c, posiblemente 2 y 1, y otro agrupando 5, 6, 7a, 7b y 8. Esta diferencia puede enfatizar la necesidad de estas plantas a un periodo diario de rocío.

Un grupo más parecido a las orquídeas en sus requerimientos de agua pueden ser los anfibios, en especial las ranas, ya que son susceptibles a desecación. En general las distribuciones de comunidades de organismos de áreas montañas son muy parecidas (Figuras 3 a 5, Savage 1982), pero al estudiar grupos más reducidos encontramos otras especies que se comportan como las orquídeas Lycaste amarillas, por ejemplo, la rana Ptychohyala euthysanota (Duellman 1963). Esta rana se distribuye en la cordillera volcánica del Pacífico, Huehuetenango y las montañas de Chiapas (México y Guatemala), solamente. Esta distribución sugiere que, aunque su capacidad de dispersión es mayor, no alcanzó a pasar las barreras de las montañas de los Cuchumatanes y tampoco los valles más secos al norte de la cordillera volcánica, que se notan en la Figura 5, al igual que las Lycaste amarillas, aislando esas poblaciones de las otras de áreas de mayor diversidad como lo son

las de bosques húmedos de Alta Verapaz, Sierra de las Minas y Sierra del Merendón. Sus dos subespecies presentan la misma agrupación que las lycastes, Ptychohyla euthysanota euthysanota está en la cordillera volcánica y las montañas cercanas a las fronteras de El Salvador y Honduras y P. e. macrotympanum se distribuye entre Huehuetenango y los altos de Chiapas (Duellman 1963), por lo que esta distribución sugiere que, aunque su capacidad de movilidad es mayor, no pudo pasar las barreras de las montañas de los Cuchumatanes y tampoco los valles más secos al norte de la cordillera volcánica, que se notan en la Figura 5.

Al sobreponer los haplotipos encontrados en cada población (Figura 31) se encuentra una mayor diversidad genética en el oriente de Guatemala donde se encuentran hábitats de ambas vertientes, Pacífico y Atlántico. Esta red de poblaciones distribuidas a través de distintos ambientes forma una metapoblación. El encontrar ambos haplotipos en una población nos confirma que los polinizadores están promoviendo la polinización entre especies distintas.

La localidad con más plantas analizadas es Zacapa y encontramos que de los 63 individuos analizados solo uno presenta el haplotipo de 1,500pb. En esta localidad encontramos una distribución de especies identificadas y utilizadas para el análisis morfológico del 66% para L. suaveolens (1 con haplotipo de 1,500pb; las otras 41 con haplotipo de 1,700pb), 24% para híbridos naturales, 3% para L. cruenta, 3% L. bradeorum, 2% L. consobrina y 2% L. cochleata. Lo que la hace la comunidad con mayor diversidad morfológica de lycastes amarillas (5 especies, Cuadro 5) y su enjambre de híbridos naturales.

Por la diversidad de especies también se deben tomar en cuenta los bosques de Baja Verapaz (4 especies e híbridos) y Alta Verapaz (4 especies e híbridos) y por su especificidad los bosques de Jutiapa, Petén (2 especies e híbridos, ambos) y Huehuetenango (1 especie, pero área de unión con bosques amenazados de México), las cuales necesitan estrategias de protección conjunta, más eficaces. Las poblaciones alopatricas que necesitan protección son las tierras bajas y altas de Izabal, donde también

se encontró un individuo de L. macrophylla subs. xanthocheila, y la franja de bosques de pino encino de Suchitepéquez.

Entender este aspecto de la estructura de las poblaciones es importante para la protección de las especies en estudio, porque cada una de las poblaciones que nos importa proteger depende a largo plazo del cruzamiento ocasional con otras poblaciones con las cuáles forma una metapoblación (Endangered Species Act 1995). En los departamentos que tenemos la mayor diversidad genotípica y morfológica de Lycaste amarillas, encontramos que tienen menos del 1% de su área total protegida (Jutiapa, Chiquimula y Huehuetenango, Dix y Dix 2001).

La distribución y sobrevivencia de orquídeas epífitas en bosques perturbados están influenciadas por la densidad de sus soportes (forofitos) y el microclima del bosque (Hietz 1999). La mayoría de las Lycaste encontradas eran epífitas y las plantas rescatadas provienen de árboles talados. En lugares muy perturbados como las localidades de Chiquimula solo encontramos plantas litófitas, porque las piedras las protegieron de la quema y el uso intensivo de la tierra para agricultura y pastoreo.

Durante los incendios de 1997-98 se perdió cobertura forestal y hábitats para orquídeas, desde México hasta los macizos montañosos de Honduras y El Salvador (Pasos *et al.* 1998), que es el posible corredor para el intercambio genético de las Lycaste de Guatemala y el resto de la región. Estos incendios fueron de gran importancia, porque en el área protegida de las Lagunas de Montebello en Chiapas, se perdió la única localidad de L. dowiana conocida para México (Soto Arenas 2001, Soto Arenas *et al.* 2001), confirmando así el alto grado de amenaza de las poblaciones naturales de estas especies.

Estos datos pueden utilizarse como indicadores o guías de manejo en los bosques de usos múltiples, para minimizar el impacto de las prácticas de aprovechamiento, sobre la biodiversidad. Hay que buscar incentivos para la preservación de orquídeas *in situ*; como parques, áreas de reserva, restauración de hábitats, paseos turísticos y fotográficos, así

como diseñar material didáctico que pueda ser usado para varios niveles culturales y educativos (Beckner 1998).

Además de los alrededores de la Laguna de Yalambojoch y cenotes de Huehuetenango, áreas como el volcán Chingo, las cadenas montañosas del Trifiño y Sierra Caral son lugares donde se debe aumentar la protección de los bosques naturales, para protección de estas especies y la biodiversidad asociada.

## V. CONCLUSIONES

Las amenazas que tienen las poblaciones estudiadas son los incendios forestales, el cambio del uso de la tierra, ganadería y la extracción selectiva. Las comunidades de Lycaste han estado sujetas a extinciones y depredación: la población reportada para las cercanías de Esquipulas en los 70's desapareció por cambio de uso de la tierra, un tercio de la población experimental de Zacapa fue quemada en los incendios de 1997 y en menor escala fue sujeta a extracción selectiva.

Los períodos de floración se traslapan entre todas las especies de Lycaste estudiadas y difieren ligeramente entre años. L. sulfurea es la que tiene un periodo de floración entre noviembre y diciembre, atípico para el resto.

Cerraron el estigma 71% de las flores polinizadas. El porcentaje de fecundación cruzada total fue del 33%, difiere significativamente del total de las flores que produjeron cápsulas al ser autopolinizadas (44%),  $\chi^2$  (g.l.= 1, N=301) = 4.24,  $0.01 > p > 0.05$ . Las barreras precigóticas son mayores después del cierre del estigma y ensanchamiento de la columna.

Los híbridos naturales tienen un éxito ligeramente mayor en la fecundación con otras Lycaste (47%),  $\chi^2$  (g.l.= 2, N=37) = 8.09,  $0.01 > p > 0.05$ , lo que facilita el establecimiento de enjambres de híbridos en las poblaciones simpátricas. L. cochleata,  $\chi^2$  (g.l.= 3, N=62) = 4.87,  $0.15 > p > 0.20$ , y L. suaveolens,  $\chi^2$  (g.l.= 3, N=70) = 4.27,  $0.20 > p > 0.25$ , produjeron menos (29%).

Los caracteres que mejor separan las especies de Lycaste con flores amarillas son: la proporción largo contra ancho de la columna y el ancho de la indentación del labelo.

De las especies de la subsect. *Xanthanthae* los especímenes que crean más confusión al ser identificados junto con los híbridos naturales son L. suaveolens (68% bien identificadas) y L. cochleata (72% bien identificadas). Hay muy pocos especímenes disponibles de L. bradeorum y L. consobrina como para mejorar su descripción significativamente.

El conteo de caracteres intermedios entre especímenes de Zacapa apoya la teoría de que los híbridos naturales de esta región se han desarrollado a partir de L. suaveolens y L. cruenta.

Se necesita más material floral de poblaciones en las que se encuentre a L. cochleata y L. cruenta simpátricamente para poder confirmar o no la posible hibridación entre ambas y si L. suaveolens proviene de híbridos entre las mismas.

El conteo de caracteres intermedios entre L. suaveolens y L. cochleata y los híbridos encontrados en Chiquimula, muestra divergencia entre las dos especies y los híbridos, hay otra especie involucrada, no detectada en los muestreos actuales.

La divergencia encontrada entre L. suaveolens y L. sulfurea (población de Jutiapa) sugiere que la segunda es una especie nueva que pudo haber surgido del cruce de la primera y otra especie, posiblemente L. cruenta.

Para determinar los caracteres útiles para identificar a los padres de híbridos en una población se necesita comparar las medias de las características observadas de individuos puros y hacer un conteo de caracteres con los híbridos. Estas características varían entre poblaciones.

El análisis de factores principales agrupa con la mayor varianza a estructuras asociadas con el aterrizaje o entrada de polinizadores a la flor y separa a los caracteres poco informativos, por alta o ninguna variabilidad.

En poblaciones alopátricas de L. cruenta (Izabal y Santa Rosa), se encontró el haplotipo de 1,500pb para el gen *ndhF*. En las poblaciones de L. cochleata (Izabal) el haplotipo mide 1,700pb. En poblaciones simpátricas encontramos ambos fragmentos. L. suaveolens presenta ambos haplotipos.

L. sulfurea solo presenta el haplotipo de 1,700pb por posible introgresión, también presenta divergencia de L. cruenta en características morfológicas y época de floración, por lo que se deberá hacer la descripción taxonómica pertinente.

En Baja Verapaz y Escuintla solo se encontró el haplotipo de 1,700pb, lo que sugiere procesos de introgresión. En Izabal, Zacapa, Chiquimula y Jutiapa se encontraron ambos. Estas son las localidades con mayor variabilidad genética.

Las localidades en donde las flores de las especies estudiadas están más relacionadas morfológicamente son las Verapaces, Chiquimula, El Progreso, Izabal, Petén y Zacapa. Existe otro grupo de localidades formado por Huehuetenango, Jutiapa, Sololá y Suchitepéquez.

Hay más diversidad entre las especies de Lycaste amarillas del oriente de Guatemala que incluye hábitats de la vertiente del Pacífico y el Atlántico.

Las áreas prioritarias para protección de germoplasma de Lycaste de flores amarillas están en Huehuetenango, Chiquimula, Jutiapa e Izabal.

## VI. RECOMENDACIONES

Realizar viajes de campo para localizar y analizar otras localidades de las especies de interés (e.g. Volcanes Chingo e Ipala en Jutiapa; bosques del Trifinio; Volcán Atitlán; Escuintla; Las Vegas y Santa Rosalía del Mánmol en Zacapa; bosques de la Sierra de Santa Cruz), completando con estos datos los análisis de hibridación por conteo de caracteres intermedios. Por ejemplo, localidades donde se encuentren L. cochleata y L. cruenta simpátricamente. Además, se completaría la distribución de las especies en otros departamentos de Guatemala para poder confirmar la distribución de morfologías y de haplotipos del gen *ndhF*.

Muchas poblaciones de *Lycaste* han desaparecido de los bosques naturales. Se necesita crear bancos de germoplasma donde se almacenen semillas de las distintas comunidades que todavía existen. Además, se debe fortalecer la conservación *ex situ* en colecciones privadas, ya que al ser atractivas para los horticultores y cultivadores de orquídeas se pueden encontrar especímenes poco comunes en cultivo. Seguir reportando los períodos de floración para confirmar los cambios que hay entre los períodos de las plantas en el campo y las de los invernaderos de la UVG. Al combinarlos de los jardines con los datos climáticos de la institución pueden servir para análisis fenológicos relacionados con el cambio climático.

Describir y especificar otros estados de carácter que diferencien las especies como podrían ser las proyecciones del estigma, la forma del disco viscoso de la base de las polinias. También se pueden asociar el ancho de las hojas y el largo de las espinas en varios años para asociarlo con los datos climáticos.

Para poder medir las curvas de dispersión de semillas se pueden utilizar trampas de semillas y hacer análisis genético para poder determinar su alcance y realizar áreas de dispersión potencial para estas especies. Al hacer análisis con marcadores moleculares nucleares también podemos obtener los patrones genéticos del polen y se puede completar el análisis de dispersión con los patrones de migración de polen y sus polinizadores (Cain *et al.* 2000). Así como experimentos de germinación de semillas de las cápsulas desarrolladas y confirmar si presentan barreras para el retrocruce.

Los datos poblacionales pueden servir para nuevos proyectos que incluyan la modelación de características geográficas y climáticas, prediciendo así la localización de poblaciones poco conocidas o relictuales. A este tipo de modelación se le llama distribución estática y depende en el diseño y la selección apropiada de variables. La calificación del modelo depende primariamente en las metas del estudio que definen los criterios y potencial uso del modelo, más que en las estadísticas asociadas (Guisan y Zimmermann 2000). Estos modelos requieren la integración de datos de germinación, reproducción, dispersión y mortalidad en el contexto de perturbación, interacciones con otras plantas, pérdida y fragmentación de hábitat (Higgins y Richardson 1999, Davis 1987).

Medir más flores para confirmar la utilidad del análisis discriminante y la clave dicotómica para la identificación de las especies. Y en estos análisis incluir flores de L. × cookii, L. × hartleyi y L. × groganii, híbridos descritos que no fueron incluidos en este análisis por no tener material disponible para las mediciones morfométricas y genéticas. Hay que mejorar también los descriptores de L. bradeorum y L. consobrina utilizando más especímenes de localidades en Costa Rica y México, respectivamente. Y debe confirmarse el largo del fragmento del gen *ndhF* amplificado en otras especies del género Lycaste, para poder incluirlas en el cladograma. Se deben buscar diferencias dentro de los fragmentos obtenidos del gen *ndhF* en geles de poliacrilamida, por análisis de conformación de banda simple (SSCP) o por secuenciación de estos. Se deben realizar comparaciones entre otros genes, tanto de cromosomas de organelos, como nucleares. Para comparar con los resultados de Ryan *et al.* (2000) deben amplificarse fragmentos del gen cloroplásmico *matK* y/o nucleares de *ITS*.

## VII. LITERATURA CITADA

- Aceto, S., *et al.* 1999a. «Phylogeny and evolution of Orchis and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (1): 67–76.
- Aceto, S., *et al.* 1999b. «Pollination flow in hybrid formation between Orchis morio and Orchis papilionacea (Orchidaceae) in two different habitats». *International Journal of Plant Sciences*. 160 (6): 1153–1156.
- Aceto, S., *et al.* 2000. «Molecular approach to the identification and characterization of natural hybrids between Orchis pauciflora Ten. and Orchis quadripunctata Cyr. ex Ten. (Orchidaceae)». *Botanica Helvetica*. 110 (1): 31-39.
- Ackerman, J. D. 1981. *The phenological relationships of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) and their orchid fragrance host*. Tesis Ph. D. Florida State University [Tallahassee]. 123pp.
- Ackerman, J. D. 1983. «Specificity and the mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction». *Biological Journal of the Linnean Society*. 20: 301-314.
- Adams, R. P. 1982. «A comparison of multivariate methods for the detection of hybridization». *Taxon*. 31 (4): 646-661.
- Albert, M. E.; C. M. D'Antonio, y K. A. Schierenbeck. 1997. «Hybridization and introgression in Carpobrotus spp. (Aizoaceae) in California. I. Morphological evidence». *American Journal of Botany*. 84 (8): 896-904.
- Allen, P. H. 1950. «Pollination in Coryanthes speciosa». *American Orchid Society Bulletin*. 19 (10): 526-536.
- Allen, P. H. 1954. «Pollination in Gongora maculata». *Ceiba*. 4:121-125.
- Ames, O y D. S. Correll. 1953. «Orchids of Guatemala». *Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany*. 26 (2): 549-557.

- Anderson, E., 1949. *Introgressive hybridization*. John Wiley and Sons. New York. 109pp.
- Arduino, P., *et al.* 1996. «Genetic variation and natural hybridization between *Orchis laxiflora* and *Orchis palustris* (Orchidaceae)». *Plant Systematics and Evolution*. 202 (1): 87-109.
- Armbruster, W. S. y G. L. Webster. 1979. «Pollination of two species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by Euglossine bees». *Biotropica*. 11: 278-283.
- Armbruster, W. S. y K. D. McCormick. 1990. «Diel foraging patterns of male Euglossine bees: Ecological causes and evolutionary response by plants». *Biotropica*. 22 (2): 160-171.
- Arnold, M. L. 1994. «Natural hybridization and Louisiana Irises: defining a major factor in plant evolution». *BioScience*. 44 (3): 41-147.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press. New York. 215pp.
- Ayala, F. J. 1976. *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland [Massachusetts]. 277pp.
- Baker, H. G. 1965. «Characteristics and modes of origin of weeds». En *The genetics of colonizing species; Proceedings of the First International Union of Biological Sciences Symposia on General Biology* de H. G. Baker y G.L. Stebbins. Academic Press, New York. Pp. 147-169.
- Beckner, J. 1998. «Orchid conservation beyond the nineteenth century». *Selbyana*. 19 (1): 1-7.
- Behar, M. y O. Tinschert. 1998. *Guatemala y sus orquídeas*. Bancafé, Grupo Financiero del País (20° aniversario). Guatemala. 240pp.
- Benham, F. y P. Rowe. 1992. «Use of Alu-PCR to characterize hybrids containing multiple fragments and to generate new Xp21.3-p22.2 markers». *Genomics*. 12 (2): 368-376.
- Bennett, F. D. 1972. «Baited McPhail fruit fly traps to collect euglossine bees». *Journal of New York Entomological Society*. 80: 137-145.
- Benzing, D.H. 1976. «Bromeliad trichomes: structure, function, and ecological significance». *Selbyana*. 1 (4): 330-348.

- Borba, E. L.; J. R. Trigo y J. Semir. 2001. «Variation of diastereoisomeric pyrrolizidine alkaloids in Pleurothallis (Orchidaceae)». *Biochemical Systematics and Ecology*. 29: 45-52.
- Brown, J. H.; G. C. Stevens y D. M. Kaufman. 1996. «The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure». *Annual Review Ecological Systematics*. 27: 597-623.
- Burke, J.M. y M.L. Arnold. 2001. «Genetics and the fitness of hybrids». *Annual Review of Genetics*. 35: 31-52.
- Cain, M. L.; B. G. Milligan y A. E. Strand. 2000. «Long distance seed dispersal in plant populations». *American Journal of Botany*. 87:1217-1227.
- Cameron, K. M., *et al.* 1999. «A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences». *American Journal of Botany*. 86 (2): 208-224.
- Carney, S. E.; D. E. Wolf y L. H. Rieseberg. 2000. «Hybridisation and forest conservation». En *Forest conservation genetics: principles and practice* de A. Young, D. Boshier y T. Boyle. CSIRO. CABI Publishing. Wallingford [UK]. Pp. 167-182.
- Case, M. A. 1994. «Extensive variation in the levels of genetic diversity and degree of relatedness among five species of Cypripedium (Orchidaceae)». *American Journal of Botany*. 81 (2): 175-184.
- Casey, D. 1992. «Glossary». *1991-92 DOE Human Genome Program Report. Human Genome Management Information System*. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge [Tennessee]. 6pp.
- Catalá, R.; B. Sabater y A. Guéra. 1997. «Expression of the plastid *ndhF* gene product in photosynthetic and non-photosynthetic tissues of developing barley seedlings». *Plant Cell Physiology*. 38 (12): 1382-1388.
- Catalán P.; E. A. Kellogg y R. G. Olmstead. 1997. «Phylogeny of Poaceae Subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences». *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8 (2): 150-166.
- Center for Plant Conservation. 1991. «Genetic sampling guidelines for conservation collections of endangered plants». En *Genetics and Conservation of Rare Plants*

- de D. A. Falk y K. E. Holsinger. Oxford University Press, New York. Pp. 225-238.
- Chase, M. W. y J. D. Palmer. 1989. «Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae». *American Journal of Botany*. 76 (12): 1720-1730.
- Christenson, E. A. y M. Whitten. 1995. «*Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson, a segregate from *P. violacea* Witte (Orchidaceae: Aeridinae)». *Brittonia*. 47 (1): 57-60.
- CIAT. 1999. *Background: Genética Molecular para el inventario y la caracterización de la biodiversidad*. Centro Internacional de Agricultura Tropical - Unidad de Biotecnología, Cali [Colombia]. 68pp.
- Clark, J. S., *et al.* 1998. «Reid's paradox of rapid plant migration: dispersal theory and interpretation of palaeoecological records». *Bioscience*. 48: 13-24.
- Clark, L. G.; W. Zhang y J. F. Wendel. 1995. «A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on *ndhF* sequence data». *Systematic Botany*. 20 (4): 436-460.
- Corriveau, J. L. y A. W. Coleman. 1988. «Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species». *American Journal of Botany*. 75 (10): 1443-1458.
- Cox, A. V., *et al.* 1998. «Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae)». *American Journal of Botany*. 85 (5): 681-687.
- Cozzolino, S., *et al.* 1998. «Characterization of *Orchis x dietrichiana* Bogenh., a natural orchid hybrid». *Plant Biosystems*. 132 (1): 71-76.
- Cramer, W., *et al.* 2001. «Global response of terrestrial ecosystem structure and function to CO<sub>2</sub> and climate change: results from six dynamic global vegetation models». *Global Change Biology*. 7: 357-373.
- Cruzan, M. B. y M. L. Arnold. 1994. «Assortative mating and natural selection in an *Iris* hybrid zone». *Evolution*. 48: 1946-1958.
- Cruzan, M.B., *et al.* 1993. «cpDNA inheritance in interspecific crosses and evolutionary inference in Louisiana irises». *American Journal of Botany*. 80 (3): 344-350.

- Dafni, A. 1983. «Pollination of Orchis caspia - A nectarless plant which deceives the pollinators of nectariferous species from other plant families». *Journal of Ecology*. 71: 467-474.
- Dafni, A. e Y. Ivri. 1979. «Pollination ecology of, and hybridization between, Orchis coriophora L. and O. collina Sol. ex Russ. (Orchidaceae) in Israel». *New Phytologist*, 83: 181-187.
- Daniel, W. W. 1992. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa. México, D. F. 667pp.
- Davis, J. I. 1999. «Monophyly, populations and species». Capítulo 8. En *Molecular systematics and plant evolution* de P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman y R. J. Gornall. Taylor & Francis, Londres. Pp. 139-170.
- Davis, M. B. 1987. «Invasions of forest communities during the Holocene: beech and hemlock in the Great Lakes region». En *Colonization, succession, and stability: the 26th Symposium of the British Ecological Society held jointly with the Linnean Society of London* de A. J. Gray, M. J. Crawley y P. J. Edwards. Blackwell, Oxford. Pp. 373-393.
- Davis, M. B. y R. G. Shaw. 2001. «Range shifts and adaptative responses to Quaternary climate change». *Science*. 292: 673-679.
- De Brito, C. M. S. y M. M. C. Rêgo. 2001. «Community of male Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in a secondary forest, Alcântara, M.A., Brazil». *Brazilian Journal of Biology*. 61 (4): 631-638.
- Dinerstein, E., et al. 1995. *A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean*. WWF y The World Bank. Washington, D.C. 149pp.
- Dix, M. A. y M. W. Dix. 2000. «Orchids of Guatemala: a revised annotated checklist». *Monographs in Systematic Botany* 78, Missouri Botanical Garden Press, Missouri. 61pp.
- Dix, M. A. y M. W. Dix. 2001. «La distribución de orquídeas y su implicación en cuanto al diseño de sistemas de áreas protegidas». *Programa del 2º Seminario mesoamericano de orquideología y conservación: resúmenes de ponencias*. San José [Costa Rica]. Pp. 16.

- Dix, M. A., *et al.* 1998. «Estudio ecológico preliminar de la Cuenca del Río Pasabién y región aledaña, Zacapa, Sierra de las Minas». *Memoria de Labores*. Defensores de la Naturaleza, Guatemala. 8pp.
- Dix, M. W. y M. A. Dix. 1992. «Radiation of the genus Lycaste in Northern Mesoamerica». *Selbyana*. 13 (Abstracts of contributed oral and poster papers at the Symposium on the Biology and Conservation of Epiphytes): 151.
- Dodson, C. H. y G. P. Frymire. 1961. «Preliminary studies in the genus Stanhopea (Orchidaceae)». *Annals of the Missouri Botanical Gardens*. 48: 137-172.
- Dodson, C. H., *et al.* 1969. «Biologically active compounds in orchid fragrances». *Science*. 164: 1243-1249.
- Domínguez, C. A., *et al.* 1998. «Flower morphometry of Rhizophora mangle (Rhizophoraceae): Geographical variation in Mexican populations». *American Journal of Botany*. 85 (5): 637-643.
- Donnell-Smith, J. 1889. «226 Lycaste skinneri». *Enumeratio Plantarum Guatemalensium*. 1: 43.
- Donnell-Smith, J. 1903. «1395 Lycaste cruenta, 1394 Lycaste deppei». *Enumeratio Plantarum Guatemalensium*. 6: 48.
- Donnell-Smith, J. 1905. «8760. Lycaste cochleata, 2636 Lycaste cruenta, 3501 Lycaste cruenta». *Enumeratio Plantarum Guatemalensium*. 7: 42.
- Dowling, T. E., *et al.* 1996. «Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites». En *Molecular Systematics*. 2ª edición de D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable. Sinauer, Sunderland (MA). Pp. 249-320.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1990. «Isolation of plant DNA from fresh tissue». *FOCUS*. 12 (1): 13-15.
- Dressler, R. L. 1968a. «Observations on orchids and euglossine bees in Panama and Costa Rica». *Revista de Biología Tropical*. 15: 143-183.
- \_\_\_\_\_; 1968b. «Pollination by euglossine bees». *Evolution*. 22: 202-210.
- Dressler, R. L. 1981. *The Orchids: Natural History and Classification*. Harvard University Press, Massachusetts. 332pp.
- Dressler, R. L. 1982. «Biology of the Orchid Bees (Euglossine)». *Annual Review Ecology and Systematics*. 13: 373-394.

- Duellman, W. E. 1963. «A review of the Middle American tree frogs of the genus Ptychohyala». *University of Kansas Publications, Museum of Natural History*. 15 (7): 297-349.
- Dufrêne, M.; J. L. Gathoye y D. Tyteca. 1991. «Biostatistical studies on western European Dactylorhiza (Orchidaceae) - the D. maculata group». *Plant Systematics and Evolution*. 175: 55-72.
- Edwards, K.; C. Johnstone y C. Thompson. 1991. «A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis». *Nucleic Acids Research*. 19: 1349.
- Emms, S. K. y M. L. Arnold. 1997. «The effect of habitat on parental and hybrid fitness: transplant experiments with Louisiana irises». *Evolution*. 51: 1112-1119.
- Endangered Species Act. 1995. *Science and the Endangered Species Act*. Committee on Scientific Issues in the Endangered Species Act, National Research Council. National Academy Press, Washington, DC. 288pp.
- Estabrook, G. F.; N. L. Gil-ad y A. A. Reznicek. 1996. «Hypothesizing hybrids and parents using character intermediacy, parental distance, and equality». *Taxon*. 45 (4): 647-662.
- Fægri, K. y L. van der Pijl. 1971. *The Principles of Pollination Ecology*. 2ª edición. Pergamon Press, Braunschweig. 291pp.
- Flores Vindes, E.M. 1989. *La Planta: estructura y función*. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago [Costa Rica]. 501pp.
- Fowlie, J. A. 1970. *The Genus Lycaste: its speciation, distribution, literature, and cultivation; a monographic revision*. Day Printing Corporation, California. 90pp.
- Freudestein, J. V. y J. J. Doyle. 1994. «Plastid DNA, morphological variation and the phylogenetic species concept: The Corallorhiza maculata (Orchidaceae) complex». *Systematic Botany*. 19 (2): 273-290.
- Funk, V. A. y D. R. Brooks. 1990. *Phylogenetic systematics: as the basis of comparative biology*. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. 45pp.
- Gauch, Jr., H. G. 1982. *Multivariate analysis in community ecology*. Cambridge University Press, Nueva York. 298pp.

- Gentry, A. 1974. «Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae». *Biotropica*. 6: 64-68.
- Goodman, M. M. 1967. «The identification of hybrids plants in segregating populations». *Evolution*. 21 (2): 334-340.
- Grant, B. R. y P. R. Grant. 1996. «High survival of Darwin's finch hybrids: effects of beak morphology and diets». *Ecology*. 77: 500-509.
- Grant, V. 1989. *Especiación Vegetal*. Editorial Limusa, México, D. F. 587pp.
- Graybeal, A. 1998. «Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? » *Systematic Biology*. 47 (1): 9-17.
- Grubb, P. J. 1977. «The maintenance of species richness in plant communities. The importance of regeneration niche». *Biology Reviews*. 52: 107-145.
- Grünanger, P., *et al.* 1998. «Molecular (RAPD) analysis on Italian taxa of the *Ophrys bertolonii* aggregate (Orchidaceae)». *Plant Systematics and Evolution*. 212: 177–184.
- Guisan, A. y N. E. Zimmermann. 2000. «Predictive habitat distribution models in ecology». *Ecological Modelling*. 135: 147-186.
- Hamer, F. 1974. *Las Orquídeas de El Salvador*. Tomo II. Ministerio de Educación, San Salvador. Pp. 71-84, Lámina 8.
- Hamer, F. 1981. *Las Orquídeas de El Salvador*. Tomo III. Suplemento. The Marie Selby Botanical Gardens. Sarasota (Florida). Pp. 148-151; 270-271.
- Hamer, F. 1983. «Plates *Lycaste aromatica* 827, *Lycaste cochleata* 828 y *Lycaste suaveolens* 831, *Lycaste bradeorum* 1228». *Icones Plantarum Tropicarum*. The Marie Selby Botanical Garden.
- Hamer, F. 1988. «Orchids of Central America: An Illustrated Field Guide». *Selbyana*. 10 (suplemento, 1): 407-421.
- Harper, J. L.; J. T. Williams y G. R. Sagar. 1965. «The behavior of seeds in soil. I. The heterogeneity of soil surfaces and its role in determining the establishment of plants from seed». *Journal of Ecology*. 53: 273-286.
- Harris, J. G. y M. W. Harris. 2000. *Plant identification terminology: an illustrated glossary*. 2ª edición. Spring Lake Publishing. Spring Lake, Utah. 206pp.

- Harrison, R. G. 1991. «Molecular Changes at Speciation». *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 281-308.
- Hedrén, M. 1996. «Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European Dactylorhiza (Orchidaceae): Evidence from allozyme markers». *Plant Systematics and Evolution*. 201: 31-55.
- Hedrén, M.; M. F. Fay y M. W. Chase. 2001. «Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in Dactylorhiza (Orchidaceae)». *American Journal of Botany*. 88 (10): 1868-1880.
- Hietz, P. 1998. «Diversity and conservation of epiphytes in a changing environment». *International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization. Abstract of Invited Lecturers*. Phuket, Thailand. 23-27 November 1997. International Union of Pure and Applied Chemistry. 11pp.  
URL:<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hietz.html>.
- Higgins K. y D.M. Richardson. 1999. «Predicting plant migration rates in a changing world: the role of long distance dispersal». *American Naturalist*. 153: 464-475.
- Hiratsuka, J., *et al.* 1989. «The complete sequence of the rice (Oryza sativa) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes account for major plastid DNA inversion during the evolution of cereals». *Molecular and General Genetics*. 217: 185-194.
- Hooker, W. J. 1827. «Maxillaria aromatica». *Exotic Flora*. 3: Plate 219.
- Hoy, M. A. 1994. *Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications*. Academic Press, San Diego. 546pp.
- Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología (INSIVUMEH). 2001. Parámetros meteorológicos. Ministerio de Comunicaciones Infraestructura y Vivienda. Guatemala.  
<http://www.insivumeh.gob.gt/meteorologia/ESTACIONES/GUATEMALA/IINSIVUMEH%20PARAMETROS.htm>. Última actualización 30 de enero de 2001.
- International Association for Plant Taxonomy (IAPT). 2000. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. Sixteenth International Botanical Congress, St Louis, Missouri, July-August 1999.

<https://archive.bgbm.org/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0001ICSLContents.htm>. Última actualización 12 de febrero de 2001.

- Jameson, R. 1826. «Dr. Graham's list of rare plants. *Maxillaria aromatica*». *The Edinburgh New Philosophical Journal*. 1: 173- 174.
- Janzen, D. H. 1971. «Euglossine bees as long distance pollinators of tropical plant». *Science*. 171: 203-205.
- Judd, W. S., *et al.* 1999. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland [MA]. 410pp.
- Kim, K. J. y R. K. Jansen. 1995. «*ndhF* sequence evolution and major clades in the sunflower family». *The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS, EE.UU.)*. 92: 10379-10383.
- Koopowitz, H. y H. Kaye. 1990. *Plant extinction: a global crisis*. 2ª edición. Christopher Helm. London. 208pp.
- Kores, P. J.; M. Molvray y S. P. Darwin. 1993. «Morphometric variation in three species of *Cyrtostylis* (Orchidaceae)». *Systematic Botany*. 18 (2): 274-282.
- Kores, P. *et al.* 1997. «The phylogenetic relationships of Orchidoideae and Spiranthoideae (Orchidaceae) as inferred from *rbcL* plastid sequences». *Lindleyana*. 12 (1): 1– 11.
- Kores, P. J., *et al.* 2001. «A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data». *American Journal of Botany*. 88 (10): 1903-1914.
- Larson, R.J. 1992. «Population dynamics of *Encyclia tampensis* in Florida». *Selbyana*. 13: 50-56.
- Lawrence, G. H. M. 1951. *Taxonomy of vascular plants. Appendix II. Illustrated Glossary of Taxonomic Terms*. The MacMillan Company, New York. Pp. 737-775.
- Le Corre, V., *et al.* 1997. «Colonization with long-distance seed dispersal of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study». *Genetical Research*. 69: 117–125.
- Lenz, L. W. y D. E. Wimber. 1959. «Hybridization and inheritance in orchids». En *The Orchids* de C. Withner. The Ronald Press Co. New York. Pp. 261-275.

- Lindley, J. 1836. «Maxillaria aromatica». *Edwards's Botanical Register*. 9: Plate 1871 (2pp.).
- Lindley, J. 1842. «Maxillaria cruenta». *Edwards's Botanical Register*. 28: Plate 13 (3pp.).
- MacDade, L. 1990. «Hybrids and phylogenetic systematics. I. Patterns of character expression in hybrids and their implications for cladistic analysis». *Evolution*. 44 (6): 1685-1700.
- McCarty, J. P. 2001. «Ecological consequences of recent climate change». *Conservation Biology*. 15: 320-331.
- Miller, K.; E. Chang y N. Johnson. 2001. *En busca de un enfoque común para el Corredor Biológico Mesoamericano*. World Resources Institute. Washington, D.C. 50pp.
- Molina Cano, J. L. 1977. *Introducción a la Taxonomía Numérica. Monografía 52*. Departamento de Biología Vegetal, ETS Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid. 80pp.
- Moore, W. S. y D. B. Buchanan. 1985. «Stability of the Northern Flicker hybrid zone in historical times: implications for adaptive speciation theory». *Evolution*. 39 (1): 135-151.
- Morel, C. 1855. *Culture des Orchidées*. Dusacq, Libraire Agricole de la Maison Rustique, Paris. 196pp.
- Nelson, D. L., *et al.* 1989. «*Alu* polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources». *PNAS (EE. UU.)*. 86 (17): 6686-6690.
- Neyland, R. y L. E. Urbatsch. 1995. «A terrestrial origin for the Orchidaceae suggested by a phylogeny inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences». *Lindleyana*. 10 (4): 244-251.
- Neyland, R. y L. E. Urbatsch. 1996a. «Phylogeny of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae) inferred from *ndhF* chloroplast gene sequences». *American Journal of Botany*. 83 (9): 1195-1206.
- \_\_\_\_\_; 1996b. «The *ndhF* chloroplast gene detected in all vascular plant divisions». *Planta*. 200: 273-277.

- O'Neill, S. D. 1997. «Pollination regulation of flower development». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 547-574.
- Oakeley, H. F. 1991a. «Cultivation of Lycastes and Anguloas – 2». *American Orchid Society Bulletin*. 60 (2): 126-137.
- \_\_\_\_\_; 1991b. «A survey of Lycastes – 1: Lycaste aromatica, its allies and their hybrids». *American Orchid Society Bulletin*. 60 (3): 222-231.
- \_\_\_\_\_; 1991c. «Lycaste skinneri: Hybridization in nature and in cultivation». *American Orchid Society Bulletin*. 60 (8): 738-747.
- Oakeley, H. F. 1993. *Lycaste species: the essential guide*. Vigo Press, Londres. 34pp.
- Olmstead, R. G. y J. D. Palmer. 1994. «Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis». *American Journal of Botany*. 81 (9): 1205-1224.
- Olmstead, R. G. y P. A. Reeves. 1995. «Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences». *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82 (2): 176-193.
- Olmstead, R. G.; J. A. Sweere y K. H. Wolfe. 1993. «Ninety extra nucleotides in *ndhF* gene in tobacco chloroplast DNA: A summary of revisions to the 1986 genome sequence». *Plant Molecular Biology*. 22 (6): 1191-1193.
- Palmer, J. D. 1987. «Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation». *The American Naturalist*. 130 (suplemento): S6-S29.
- Palmer, J. D., *et al.* 1988. «Chloroplast DNA variation and plant phylogeny». *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 1180-1206.
- Palumbi, S. R. 1996. «Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction». En *Molecular Systematics*. 2ª edición de D. M. Hills, C. Moritz y B. K. Marble. Sinauer. Sunderland (MA). Pp. 205-247.
- Pasos, R.; J. Rodríguez y A. Salas. 1998. *Incendios forestales y agrícolas en Centroamérica: Balance de 1998*. Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo (CCAD) y Consejo Centroamericano de Bosques y Áreas Protegidas (CCAB/CCAP). San Salvador. 11pp.
- Paxton, J. 1836. «Maxillaria deppei». *Paxton's Magazine of Botany*. 2: 268 y Plate.

- Peakall, R., *et al.* 1997. «Confirmation of the hybrid origin of Chiloglottis × pescottiana (Orchidaceae: Diurideae). I. Genetic and morphometric evidence». *Australian Journal Botany*. 45 (5): 839–855.
- Pellegrino, G., *et al.* 2001. «Isolation and characterization of microsatellite loci from the orchid Serapias vomeracea (Orchidaceae) and cross-priming to other Serapias species». *Molecular Ecology Notes*. 1 (4): 279-280.
- Petit, R. J., *et al.* 1997. «Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks». *PNAS (EE. UU.)*. 94: 9996-10001.
- Piperno, D. R. y D. M. Pearsall. 1998. *The origins of agriculture in the lowland Neotropics*. Academic Press, San Diego. 400pp.
- Poe, S. 1998. «The Effect of Taxonomic Sampling on Accuracy of Phylogeny Estimation: Test Case of a Known Phylogeny». *Molecular Biology and Evolution*. 15 (8): 1086-1090.
- Puertas Gallego, M. J. 1999. *Genética: fundamentos y perspectivas*. 2ª edición. MacGraw-Hill Interamericana, Madrid. 812pp.
- Reichenbach f., H. G. 1882. «Lycaste sulphurea». *Gardeners' Chronicle*. 17 new. series. (425): 218.
- Richard, A. 1847. «Lycaste balsamea». *Portefeuille des horticulteurs*. 1: 131–132.
- Rieseberg, L. H. 1991. «Hybridization in rare plants: insights from case studies in Cercocarpus and Helianthus». En *Genetics and Conservation of Rare Plants* de D. A. Falk y K. E. Holsinger. Oxford University Press, New York. Pp. 171-181.
- Rieseberg, L. H. 1995. «The role of hybridization in evolution: old wine in new skins». *American Journal of Botany*. 82 (7): 944-953.
- Rieseberg, L. H. y N. C. Ellstrand. 1993. «What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization?» *Critical Reviews in Plant Sciences*. 12 (3): 213–241.
- Rojas, W.; P. Barriga y H. Figueroa. 2000. «Multivariate analysis of the genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm». *Plant Genetic Resources Newsletter*. 122: 16-23.
- Rolfe, R. A. y C. C. Hurst. 1909. *The Orchid Stud-Book: An enumeration of hybrid orchids of artificial origin*. Kew Gardens, Londres. 327pp.

- Rossi, R. E., *et al.* 1992. «Geostatistical tools for modeling and interpreting ecological spatial dependence». *Ecological Monographs*. 62 (2): 277-314.
- Ryan, A. 2001. *A phylogenetic assessment of Lycaste and Anguloa (Orchidaceae)*. Tesis Ph.D. Department of Chemistry, University College London. 328 pp.
- Ryan, A., *et al.* 2000. «A phylogenetic assessment of Lycaste and Anguloa (Orchidaceae: Maxillarieae)». *Lindleyana*. 15 (1): 33-45.
- Sauder, J. D. 1988. *Plant Migration: The dynamics of geographic patterning in seed plants species*. University of California Press, Berkeley. 298pp.
- Savage, J.M. 1982. «The enigma of the Central American herpetofauna: dispersals or vicariance? » *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 69 (3): 464-547.
- Schaal, B. A.; W. J. Leverich y S. H. Rogstad. 1991. «A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology». En *Genetics and Conservation of Rare Plants* de D. A. Falk y K. E. Holsinger. Oxford University Press, New York. Pp. 123-134.
- Schlechter, R. 1918. «Kritische aufzählung der bisher aus Zentral-Amerika bekanntgewordenen Orchidaceen». *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*. 36 (3): 321-520 (Guatemala 343-349).
- Schlegel, M., *et al.* 1989. «Interspecific relationship of ten European orchid species as revealed by enzyme electrophoresis». *Plant Systematics and Evolution*. 163: 107–119.
- Schuster, J. C.; E. B. Cano y C. Cardona. 2000. «Un método sencillo para priorizar la conservación de los bosques nubosos de Guatemala, usando Passalidae (Coleoptera) como organismos indicadores». *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*. 80: 197-209.
- Simpson, J. 1966. «Repellency of the mandibular gland scent of worker honey bees». *Nature*, 209 (5022): 531-532.
- Smith, J. F. y S. Atkinson. 1998. «Phylogenetic analysis of the tribes Gloxinieae and Gesnerieae (Gesneriaceae): data from *ndhF* sequences». *Selbyana*. 19 (1): 122-131.
- Smouse, P. E. 1972. «The canonical analysis of multiple species hybridization». *Biometrics*. 28 (2): 361-371.

- Soto Arenas, M. A. 2001. *Diversidad de orquídeas en la región El Momón-Margaritas-Montebello, Chiapas, México*. Instituto Chinoín AC. Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R225. México D. F. 84pp.
- Soto Arenas, M.; G. Salazar y E. Hagsater. 2001. «Orquídeas Mesoamericanas: evolución, experiencias y perspectivas de conservación». *Programa del 2º Seminario Mesoamericano de Orquideología y Conservación, San José (Costa Rica, resumen de ponencias)*. Pp. 33.
- SPSS. 1998. *SYSTAT 8.0. Software and User's Manuals*. Prentice-Hall. New Jersey. 432pp.
- Standley, P. C. y J. A. Steyermark. 1945. «The vegetation of Guatemala, a brief review». En *Plants and plant science in Latin America* de F. Verdoorn. Ronald Press, New York, NY. Pp. 275–278.
- Standfield, W. D. 1992. *Genética*. 3ª ed. MacGraw-Hill Interamericana, México. 574pp.
- Stebbins, G. L. y L. Ferlan. 1956. «Population variability hybridization, and introgression in some species of *Ophrys*». *Evolution*. **10**: 32-46.
- Steyermark, J. A. 1950. «Flora of Guatemala». *Ecology*. **31**: 368–372.
- Summerhayes, V. S. 1931. «*Lycaste suaveolens*». *Botanical Magazine*. **154** (3): t9231. 4pp.
- Terry, R. G.; G. K. Brown y R. G. Olmstead. 1997. «Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*». *American Journal of Botany*. **84** (5): 664-670.
- Thébaud, C. y D. Simberloff. 2001. «Are plants really larger in their introduced ranges?». *American Naturalist*. **157**: 231-236.
- Theriot, E. y E. F. Stoermer. 1984. «Principal component analysis of variation in *Stephanodiscus rotula* and *S. niagarae* (Bacillariophyceae)». *Systematic Botany*. **9** (1): 53-59.
- Thomas C. D., *et al.* 2001. «Ecological and evolutionary processes at expanding range margins». *Nature*. **411**: 577-581.
- Tinschert, O. 1983. «Lycastes of Guatemala – some natural hybrids, some species, and many questions». *American Orchid Society Bulletin*. **52** (9): 908-916.

- Torres, A. M.; N. F. Weeden y A. Martín. 1993. «Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in Vicia faba». *Theoretical and Applied Genetics*. 85: 973-945.
- Tyteca, D. y M. Dufrêne. 1993. «On the Use of Distance in the Taxonomic Study of Critical Plant Groups - Case Studies of Western European Orchidaceae». *Annals of Botany*. 71 (3): 257-277.
- Whitham, T.G., *et al.* 1999. «Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure». *Ecology*. 80 (2): 416-428.
- Williams, N. H. y C. H. Dodson. 1972. «Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow». *Evolution*. 26: 84-95.
- Williams, N. H. y W. M. Whitten. 1983. «Orchid floral fragrances and male euglossine bees. methods and advances in the last sesquidecade». *Biological Bulletin*. 164: 355-395.
- Wilson, P. 1992. «On inferring hybridity from morphological intermediacy». *Taxon*. 41 (1): 11-23.
- Winkler, M. y P. Hietz. 2001. «Population structure of three epiphytic orchids (Lycaste aromatica, Jacquiniella leucomelana, and J. teretifolia) in a Mexican humid montane forest». *Selbyana*. 22 (1): 27-33.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4ª edición. Prentice-Hall. New Jersey. 663pp.
- Zotz, G. 1995. «How fast does an epiphyte grow?» *Selbyana*. 16 (2): 150-154.

## **VIII. ANEXOS**

## Anexo A.

Características morfológicas de Lycaste cochleata, L. cruenta, L. suaveolens, L. aromatica, L. consobrina y L. bradeorum (sect. Deciduosae, subsect. Xanthanthae), presentes en Mesoamérica, según descripciones taxonómicas y localidades reportadas.

En el Cuadro 21 se resumen los caracteres más importantes para poder identificar a las especies más comunes de Lycaste con flores amarillas y espinas en los pseudobulbos, admitidas para este informe. Se muestra también su época de floración aproximada, y posible hábitat en donde se pueden encontrar. Es un compendio de las descripciones existentes y las localidades reportadas para cada especie.

<b>Cuadro 21.</b> Características morfológicas basadas en descripciones taxonómicas de <u>Lycaste cochleata</u> , <u>L. cruenta</u> , <u>L. suaveolens</u> , <u>L. aromatica</u> , <u>L. consobrina</u> , <u>L. sulphurea</u> y <u>L. bradeorum</u>	
Nombre científico y descriptor	<u>Lycaste cruenta</u> (Lindl.) Lindl. <u>L. cochleata</u> Lindl.
Columna	Corta y ancha <sup>2</sup> Delgada y curvada <sup>2, 5</sup>
Color del labelo	Amarillo con una mancha roja grande en la base y pequeñas marcas rojas, alineadas en la base <sup>2, 4</sup> Amarillo naranja y, a veces, una marca rojiza en la base <sup>2</sup>
Lóbulos laterales del labelo	Redondeados y truncados <sup>2</sup> Elípticos grandes, redondeados a sub-agudos <sup>2</sup>
Callo del labelo	Cuneado a subcuadrado, pequeño      Plano, ancho, liso, grande y redondeado <sup>2</sup> o bifido distalmente <sup>4</sup>
Época de floración	nov-abr (- jun) <sup>2, 6</sup> (feb -) mar-jun (- jul) <sup>3, 4, 6</sup>
Altitud (m s.n.m.)	1000-1850 (-2200) <sup>1, 2, 6, 10, 11</sup> 200-1800 <sup>1, 4, 6, 11</sup>
Hábitat	Bosque seco a húmedo <sup>1</sup> Bosque húmedo con estación seca marcada <sup>1</sup>
Distribución guatemalteca	AV, BV, Cq, Es, Gu, Ju, Pr, Sa, SR, Su, Za <sup>1, 7, 10, 11</sup> AV, BV, Cq, Es, Gu, Iz, Ja, Pe, Za <sup>1, 7, 11</sup>
Distribución mesoamericana	ES, G, H, M, N <sup>2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12</sup> ES, G, H, M, N <sup>2, 3, 6, 7, 8, 11, 12</sup>

**Cuadro 21** (continuación).

Nombre científico y descriptor	<u>L. aromatica</u> (Graham ex Hooker) Lindl.	<u>L. consobrina</u> Reichb. f.	<u>L. suaveolens</u> Summerh.
Columna	Ligeramente curvada <sup>2</sup>	Ligeramente curvada, delgada <sup>2</sup>	Alargada y delgada <sup>2,9</sup>
Color del labelo	Amarillo naranja <sup>2</sup>	Amarillo fuerte, llegando a naranja, con marcas rojizas en la base <sup>2</sup>	Amarillo con manchas rojas desde la base al ápice del callo <sup>9</sup>
Lóbulos laterales del labelo	Cortos con ápices agudos proyectados <sup>2,5</sup>	Cortos con ápices redondeados, se doblan alrededor de la columna. <sup>2</sup>	Chicos con ápices redondeados <sup>5</sup>
Callo del labelo	Prominente (se ve de lado saliente con relación a los LL), ancho y curvado <sup>2,4,5</sup>	Largo, casi tan ancho como el istmo, acusado, en forma de "V" (ligulado), está unido al labelo en 2/3 de su largo, el resto descansa libre sobre el lóbulo medio <sup>2,4</sup>	Doblado profundamente y grande <sup>1,2</sup>
Época de floración	nov – abr (-jun) <sup>3,4</sup>	abr - jun (jul - oct) <sup>1,2</sup>	(feb -) mar-jun (- jul)
Altitud (m s.n.m.)	1,000 a 1,700 <sup>2,4</sup>	300 a 1,000 (1,500) <sup>2,6</sup>	1300-1800 <sup>1,4,6</sup>
Hábitat	Pendientes calizas húmedas ligeramente sombreadas en bosques fríos <sup>4</sup>	Bosques tibios, con sombra ligera, con estación seca marcada <sup>2</sup>	Bosque húmedo de encino y pino <sup>6</sup>
Distribución guatemalteca	AV, Iz (no confirmadas en la actualidad) <sup>1,2</sup>	Ja (no confirmada en la actualidad) <sup>2</sup>	AV, BV, Pr, Za <sup>1,7</sup>
Distribución mesoamericana	G, H, M, N <sup>2,3,4</sup>	G, M <sup>2,4</sup>	ES, G, N <sup>3,6,7,8,12</sup>

**Cuadro 21** (continuación).

Nombre científico y descriptor	<u>L. sulfurea</u> ( <i>sensu</i> Hamer 1988, <i>non</i> Reichb.f.)	<u>L. bradeorum</u> Schltr.
Columna	Ancha, corta, parecida a la de <u>L. cruenta</u> , pero menos peluda en la base <sup>3, 12, 13, 14</sup>	Ligeramente arqueada <sup>2</sup>
Color del labelo	de color azufre pálido, con una mancha púrpura entre los lados <sup>3, 12, 13, 14</sup>	Amarillo naranja con ligero tinte rojizo <sup>2</sup>
Lóbulos laterales del labelo	cortos y encorvados <sup>3, 12, 13</sup>	Redondeados a truncados <sup>2</sup>
Callo del labelo	pequeño, elevado, truncado <sup>3, 12, 13</sup>	Ligeramente cóncavo con forma de lengua y del ancho del Istmo, pero no sobrepasa los lóbulos laterales <sup>5</sup>
Época de floración	jun - jul, nov - dic <sup>3, 12, 13</sup>	abr - jun (sep - oct) <sup>2</sup>
Altitud (m s.n.m.)	1550-1700 <sup>3, 12, 13</sup>	700 a 1,200 <sup>2</sup>
Hábitat	bosque latifoliado, templado y húmedo <sup>3, 12, 13</sup>	Bosque Tropical, tibio y húmedo <sup>2</sup>
Distribución guatemalteca	Ju	Iz, Pe, Za <sup>2, 6, 7</sup>
Distribución mesoamericana	ES <sup>3, 12, 13</sup> , G	CR, G, H, N <sup>2, 3, 4, 7</sup>

Fuentes: Ames y Correll 1953<sup>1</sup>, Dix y Dix 1992<sup>6</sup> y 2000<sup>7</sup>, Donnell-Smith 1903<sup>10</sup> y 1905<sup>11</sup>, Fowlie 1970<sup>2</sup>, Hamer 1974<sup>12</sup>, 1981<sup>13</sup>, 1983<sup>8</sup> y 1988<sup>3</sup>; Oakeley 1991b<sup>4</sup> y 1993<sup>5</sup>; Reichenbach f. 1882<sup>14</sup>, Summerhayes 1931<sup>9</sup>.

## **Anexo B.**

### **Métodos de análisis de ADN.**

Antes de empezar coloque en la autoclave todos los materiales (puntas de pipetas, frascos, etc.), agua destilada y los tampones de extracción, no las enzimas, por lo menos 15 min. a 120°C.

#### **A. Extracción de ADN total**

##### **1. Método de Edwards, Johnstone y Thompson (1991)**

Las muestras para PCR (usualmente tejido foliar) son colectadas usando la tapadera de un tubo Eppendorf de 1.5ml para sacar un disco de material para el tubo. Esto asegura el tamaño uniforme de la muestra y reduce también la posibilidad de contaminación por el manejo del tejido.

Congele la muestra con nitrógeno líquido. Si lo guarda en hielo, coloque en nitrógeno líquido rápidamente y luego a -70°C o empiece el proceso de aislamiento tan pronto como las muestras lleguen al laboratorio. También puede utilizar material seco.

Macere la muestra de hoja en 25µl de Tampón de Extracción (200mM Tris HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5 % SDS, y ddH<sub>2</sub>O hasta completar el volumen) por 15 a 30 segundos, con un macerador desechable que se acople a un tubo de 1.5ml. Agregue 375µl más del tampón de extracción al tubo.

Colóquelo en el mezclador vórtex por 5 segundos. Esta mezcla puede mantenerse a temperatura ambiente hasta que se termine con las otras muestras (Parada, 1 hora máximo).

Centrifugue por un minuto, a 13,000 revoluciones por minuto, en microcentrífuga a temperatura ambiente. Transfiera 300µl del sobrenadante a un nuevo tubo.

Agregue 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente y deje reposar por dos minutos a temperatura ambiente.

Colóquelo en una microcentrífuga, a 13,000 r.p.m., por cinco minutos a temperatura ambiente. Saque el sobrenadante y seque al vacío déjelo secar durante la noche. En este momento puede parar el procedimiento por tiempo prolongado de hasta 12 horas (aquí puede hacer una parada larga, sin afectar sus resultados).

Suspenda en 100µl (puede variar) de agua destilada estéril o 1X TE (1.0ml TrisHCl 1.0M, pH 8.0; 100µl de EDTA 0.1M, pH 8.0, ajustando a 100.0ml con agua destilada, esterilice antes de usar). Este ADN es estable a 4°C por más de un año, pero es mejor guardarlo a -20°C o -70°C. Para una PCR de 50µl es suficiente 2.5 µl de la mezcla anterior. Si el tejido utilizado es viejo se puede incrementar esta cantidad hasta 25µl sin ningún efecto deletéreo en la PCR.

## **2. Método de Doyle y Doyle (1990)**

Colecte el material vegetal usando la tapadera de un tubo Eppendorf de 1.5ml. Si el material está seco pese entre 0.004 a 0.005g; si está fresco entre 0.5 a 0.1g. Etiquete.

Agregue 700µl de solución tampón de CTAB (50ml TrisHCl, 1.0M, pH 8.0; 20ml de EDTA 0.5M; 140ml NaCl 5M; 10g CTAB, 5g de polivinilpirrolidona – 40T; 0.5g de bisulfito sódico, lleve a volumen de 500ml con agua destilada, mezcle bien y esterilice, a temperatura ambiente agregue 4% de β-mercaptoetanol) a 65°C y homogenice.

Agítelo en un vórtex e incúbelo por 50 min a 65°C en el horno en agitación constante. Puede estar hasta 1 hora si es material fresco y 1 hora ½ si es material muy viejo.

Agregue un 500 µl de cloroformo y agite por inversión, suavemente al menos 20 veces en la campana de extracción.

Centrifugue por 5 min entre 6,000 a 8,000 rpm.

Extraiga la fase acuosa, no la interfase, y pase a un nuevo tubo etiquetado.

Agregue 2/3 del volumen de Isopropanol a -20°C y mezcle suavemente para precipitar el ADN, con cuidado para evitar romper las cadenas largas de ADN.

Centrifugue de 8 a 10 min. a 12,000 rpm y decante el sobrenadante, después lave el precipitado con 100µl de etanol 70%.

Seque durante la noche o al vacío (aquí puede hacer una parada larga, sin afectar sus resultados).

Suspenda en 30 a 50 µl de TE o agua destilada estéril y deje reconstituir a 4°C. Guarde para uso rápido a 4°C o máximo un año a -20°C.

## **B. Medición por fluorimetría de la concentración de ADN total**

Se utilizó el minifluorímetro TKO 100 (revisar el manual el procedimiento de uso antes de empezar).

Encender el aparato 15 min antes de empezar las mediciones.

Usar celdas plásticas desechables, marcadas para poner siempre el mismo lado hacia el haz de luz, para la muestra, blanco y solución estándar de ADN (100µg/ml). Usar hasta que se noten marcas en el plástico, o máximo 10 veces cada una.

Para reconstituir el ADN de timo de ternera se hacen los cálculos estequiométricos y hay que dejarlo reconstituir en solución de TE por una noche, se confirma la concentración con el espectrofotómetro y se hacen alícuotas de 200ng/ml.

Calibrar 0 y 100µg/ml, al inicio y al cambiar muestras. Calibrar de nuevo el 0µg/ml: Al iniciar la lectura de las muestras.

A cada muestra se mide la concentración por cuadruplicado y se toma la media. Calibrar entre cada dos mediciones.

### C. Amplificación por PCR

En un tubo Eppendorf de 0.5ml nuevo agregue de 2 a 3µl de la mezcla de ADN total extraído.

Agregue 1µl de mezcla de deoxinucleótidos 10 mM (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Utilice 1µl de cada cebador (concentración inicial de 10µM) para cada reacción. Los cebadores, de la UGA (Neyland y Urbastch 1995), utilizados en este protocolo son:

+607 (P14) – 5' - ACCAAGTTCAATGTTAGCGAGATTAGTC – 3'  
1201 (P7) – 5' - AGGTACACTTTCTCTTTGCGGTATTCC – 3'

Agregue cerca de 2.5 unidades de Taq polimerasa (0.3µl), 3µl de solución tampón Promega 10X y 3µl de cloruro de magnesio 1.5mM; para un volumen final de 30µl, asegúrese de que la enzima sea agregada al final de la mezcla y antes de empezar con la desnaturalización.

Las amplificaciones se corren en el termociclador (PTC-100 de MJ Research, Inc.)

así:

Paso	Actividad	Temperatura (°C)	Tiempo(min.)
1	Temperatura de Inicio	94	1
2	Desnaturalización	94	1
3	Alineación	55	2
4	Extensión	72	2
5	Repetición de ciclos 2 a 4		30 veces
6	Extensión final	72	10
7	Remojo	4	24 horas

Fuente: Arnold (1996).

Este procedimiento solo sirve para cebadores adecuados que tengan un máximo de 3 errores por cada 20 bases. Todos los reactivos de la amplificación deben guardarse al menos a -20°C (Palumbi 1996).

## D. Visualización de fragmentos obtenidos

### 1. Electroforesis en gel de agarosa

(Depto. de Biología Vegetal, 1996)

Prepare las siguientes soluciones:

EDTA 0.5 M (pH 8): EDTA 186.1 g, NaOH (hojuelas) 20 g, ddH<sub>2</sub>O hasta 1000 ml.

1 litro de tampón 10X TBE (108.0 g Tris Base, 55.0 g ácido bórico, 40.0 ml EDTA, 0.5M (pH 8.0); ajustar a 100ml con agua destilada.

Mezcle las cantidades necesarias para una concentración del 1% (p/v), y caliente hasta que se vea transparente la solución.

Elaboración de Gel de Agarosa al 1.0% (P/V).

Ingredientes	Cantidades	
	Pequeña	Grande
Solución tampón 1X TBE	45.0 ml	90 ml
Agarosa en polvo	0.45 g	0.9 g

Fuente: Depto. de Biología Vegetal (1996)

Agite hasta enfriar a 60°C y vierta en un molde; no espere mucho tiempo pues empieza a gelificarse en el erlenmeyer, pero si está muy caliente se puede agrietar el molde. Gelifica en menos de 30 min.

Llene la cámara con una solución 1X de TBE, si es una cámara grande necesitará aproximadamente un litro de solución.

Dependiendo del ancho de los dientes del peine colocados en la gel será la cantidad de mezcla de ADN y solución madre de colorante [(full strength) 50mM EDTA, 30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilene cianole], usada como frente de corrida, necesaria para correr en el gel, revise las especificaciones.

Cantidad de ADN y colorante a mezclar, para colocar en los pozos de una gel de agarosa, dependiendo del ancho de los dientes del peine utilizado.

Diámetro de los Dientes (mm)	Volumen de ADN extraído ( $\mu$ l)	Solución madre de colorante ( $\mu$ l)
1	7	1.4
1.5	10	2

Fuente: Depto. de Biología Vegetal (1996).

Se llenan los pozos del gel con las muestras dentro de la cámara electroforética. En uno o varios pozos se pone un marcador de kilobases de peso conocido. De tal manera que, por comparación con las bandas de marcador que aparezcan en el gel, después de la

electroforesis, podamos saber el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN amplificados de las muestras.

Se enchufan los electrodos a una fuente eléctrica, de tal manera que las muestras migren desde los pocitos al ánodo (borde negro al rojo). Se le aplica una corriente de 4 v por cada cm de distancia entre los bordes. La electroforesis dura unas dos horas y media.

## **2. Revelado**

(Depto. de Biología Vegetal, 1996)

Teñir con bromuro de etidio.

Para esto, poner el gel, después de la electroforesis, en un baño de 0.5µg/ml de bromuro de etidio y agitar por 20 min.

Después colocar otros 10 min. en agua del grifo, para eliminar el exceso de colorante.

Visualice los resultados bajo luz UV y fotografíe.

### Anexo C.

Flores en líquido usadas para determinar características morfológicas, encontradas en Herbario de Orquídeas, Departamento de Biología, UVG.

Todas las plantas incluidas en el estudio están guardadas en líquido (FAAG, o las más recientes en una solución de 75% etanol, 20% agua y 5% glicerina). Se colocó el país de origen si no eran de un departamento en Guatemala. Las plantas extranjeras incluidas pueden ser de México (MEX), Belice (BEL), Honduras (HON) y Costa Rica (CR). Los hábitos de las plantas pueden ser epífitas (E) o litófitas (L). Los espacios en blanco son datos que no pudieron ser encontrados. En total fueron medidas 283 flores de 206 plantas.

Número Dix y Dix	Especie	No. de colecta	Depto. o país	Hábito (E/L)	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Flores medidas
503	<u>L. cochleata</u>	Ly41	BV		1,400	31-oct-76	2
506	<u>L. cochleata</u>	Ly56	Cq			25-abr-76	4
507	Híbrido	Ly42					2
2096	<u>L. suaveolens</u>	R513	Za			26-abr-81	1
4095	<u>L. cruenta</u>	Ly58	Za			1-jun-78	1
4215	<u>L. cochleata</u>	Ly51	Cq			26-abr-76	6
4226	Híbrido	Ly88	AV			12-abr-79	1
4227	Híbrido		Za			26-abr-81	1
4237	Híbrido	Ly65	Pe			17-ago-76	1
4238	Híbrido		Gu			--oct-73	1
4645	<u>L. suaveolens</u>		BV			31-oct-76	2
4649	<u>L. suaveolens</u>	Ly49	BV			1-jun-75	2
4650	Híbrido	Ly91A	Cq			15-abr-76	1
4652	<u>L. cochleata</u>	G71	Iz			2-jul-78	1
4653	<u>L. suaveolens</u>	R518	BV			31-oct-76	1
4658	<u>L. suaveolens</u>		Za	E		7-may-90	1
4667	<u>L. suaveolens</u>	Ly67				31-oct-76	1
4668	Híbrido	Ly62	BV	E		--dic-75	2
4669	Híbrido		7			16-sep-77	2
4670	<u>L. cochleata</u>						1
4824	Híbrido	R509	BV			7-feb-83	1
4836	<u>L. cochleata</u>	R503	BV			18-feb-83	1
4890	<u>L. sulfurea</u>						1
4901	<u>L. cruenta</u>	R506	Za	E	1,740		2
4903	Híbrido	R517					2
5079	<u>L. cochleata</u>		AV			--ene-80	1
5106	<u>L. macrophylla</u> subs. <u>xanthocheila</u>		Iz				2
5141	<u>L. bradeorum</u>		CR			2-mar-86	1
5878	<u>L. suaveolens</u>	R514					1
6150	<u>L. cochleata</u>	Ly48	Cq			1-jun-75	3
6200	<u>L. dowiana</u>						1
6267	<u>L. sulfurea</u>	G73	BV			--sep-84	1

Número Dix y Dix	Especie	No. de colecta	Depto. o país	Hábito (E/L)	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Flores medidas
6390	<u>L. aromatica</u>		MEX			6-may-90	2
6421	Híbrido		Za		1,740	--jun-86	2
6422	Híbrido		Za		1,740	--jun-86	1
6423	Híbrido		Za		1,740	--jun-86	1
6424	<u>L. consobrina</u>		MEX			--ago-88	2
6425	<u>L. bradeorum</u>					--mar-86	3
6426	<u>L. sulfurea</u>		Gu			---73	1
6435	<u>L. cochleata</u>		Za		1,300	15-sep-81	1
6645	<u>L. suaveolens</u>		BV	E		8-jun-85	3
6647	<u>L. cochleata</u>		Pe	E		3-jul-89	1
6652	Híbrido		BV				1
6656	<u>L. cruenta</u>		BV	E			2
6756	<u>L. cochleata</u>		Pe	E			2
6774	<u>L. suaveolens</u>		Za			25-ago-91	1
6775	<u>L. suaveolens</u>		Za			25-ago-91	1
6776	<u>L. suaveolens</u>		Za		1,400	25-ago-91	1
6823	<u>L. cochleata</u>		AV			--feb-89	1
6837	<u>L. cruenta</u>		BV			12-dic-91	1
6838	<u>L. cochleata</u>		AV			9-dic-91	1
6935	<u>L. suaveolens</u>		Za		1,450	3-may-92	3
7097	<u>L. cochleata</u>						2
7223	<u>L. dowiana</u>		AV			3-ene-93	1
7270	Híbrido		BV			14-abr-84	1
7395	<u>L. cochleata</u>					--mar-84	4
7431	<u>L. consobrina</u>						2
7454	<u>L. suaveolens</u>		Za	E	1,500	11-sep-94	3
7455	<u>L. suaveolens</u>		Za	E		11-sep-94	1
7522	<u>L. suaveolens</u>		Za	E	1,300	10-sep-94	1
7709	<u>L. skinneri</u>		AV			10-sep-94	2
7766	<u>L. cruenta</u>		AV			--sep-94	1
7784	<u>L. skinneri</u>	JA-69	BV			--nov-94	1
7859	Híbrido	G8_				--feb-95	1
7912	Híbrido		AV			24-may-95	2
7990	<u>L. suaveolens</u>		Za		1,725	12-ago-95	1
8214	Híbrido		HON	E		23-oct-96	1
8215	Híbrido		HON	E		23-oct-96	1
8223	<u>L. cochleata</u>		Iz	E	200	3-nov-96	2
8240	<u>L. lasioglossa</u>		Iz				1
8250	<u>L. lasioglossa</u>		Iz				2
8545	<u>L. suaveolens</u>	G2	Za	L	1,100	13-jun-96	1
8546	<u>L. suaveolens</u>	G13	Za	L	1,100	13-jun-96	1
8547	Híbrido	G17	Za	L	1,100	13-jun-96	1
8548	<u>L. suaveolens</u>	GY	Za	E	1,100	13-jun-96	1
8549	<u>L. bradeorum</u>	GZ	Za	L	1,100	13-jun-96	1
8550	Híbrido	G42	Za	E	1,500	13-jun-96	1
8551	Híbrido	G54	Za	E	1,500	13-jun-96	1
8552	Híbrido	G61	Za	E	1,500	13-jun-96	2
8589	Híbrido	G147	Ju	E	1,550	21-dic-97	1
8590	Híbrido	G148	Ju	E	1,550	21-dic-97	2
8591	Híbrido	G163	Ju	E	1,610	21-dic-97	1
8592	<u>L. suaveolens</u>	G166	Ju	E	1,650	21-dic-97	2
8601	<u>L. cruenta</u>		AV			25-feb-98	1
8602	<u>L. bradeorum</u>		AV			25-feb-98	1
8609	<u>L. sulfurea</u>	G158	Ju	E	1,550	21-dic-97	3

Número Dix y Dix	Especie	No. de colecta	Depto. o país	Hábito (E/L)	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Flores medidas
8610	<u>L. suaveolens</u>		Za	E	1,720	12-abr-97	1
8668	<u>L. skinneri</u>		Gu			25-mar-97	1
8670	Híbrido					25-mar-97	1
8697	<u>L. cochleata</u>	G205	Iz	E	950	--nov-97	1
8698	<u>L. cochleata</u>	G204	Iz	E	950	--nov-97	2
8699	<u>L. cochleata</u>	G203	Iz	E	950	--nov-97	1
8700	<u>L. suaveolens</u>		Za	E	1,740	4-jul-98	1
8701	<u>L. suaveolens</u>	G217	Za	E	1,740	4-jul-98	1
8702	<u>L. suaveolens</u>	G215	Za	E	1,740	4-jul-98	2
8712	<u>L. suaveolens</u>	G49	Za	E	1,500	13-jun-96	1
8715	Híbrido	G155	Ju	E	1,550	21-dic-97	2
8726	<u>L. suaveolens</u>	G62	Za	E	1,500	13-jun-96	1
8755	<u>L. cruenta</u>		So			4-jul-98	1
8756	<u>L. suaveolens</u>	G36	Za	E	1,700	13-jun-96	1
8757	<u>L. suaveolens</u>		Za	E	1,700	4-jul-98	1
8758	<u>L. suaveolens</u>		Za	E	1,700	4-jul-98	1
8759	<u>L. suaveolens</u>	G194	Za	E	1,200	24-jun-98	2
8934	<u>L. suaveolens</u>					17-abr-77	1
8975	<u>L. cochleata</u>	HFO G12	AV			--nov-98	1
8976	<u>L. cochleata</u>	HFO D33	MEX			--nov-98	2
8977	<u>L. cochleata</u>	HFO D27	MEX			--nov-98	1
8978	Híbrido	HFO J26	AV			--nov-98	1
8979	<u>L. sulfurea</u>	HFO J24	BEL			--nov-98	2
8980	<u>L. cruenta</u>	HFO J29	AV			--nov-98	1
8981	Híbrido	HFO J27	AV			--nov-98	2
8982	Híbrido	HFO J25	AV			--nov-98	2
8983	<u>L. suaveolens</u>	HFO D56	Za			--nov-98	1
8985	Híbrido		Za	E		--abr-88	1
8986	<u>L. suaveolens</u>					15-oct-77	1
8987	Híbrido		AV			--sep-87	1
8988	<u>L. suaveolens</u>	Ly61	MEX			14-abr-75	2
8989	<u>L. cochleata</u>	96-11	Iz	E	950	--oct-91	2
8990	<u>L. cruenta</u>					16-jun-90	1
8991	<u>L. cruenta</u>					16-jun-90	1
8992	<u>L. sulfurea</u>					16-jun-90	1
8993	<u>L. cochleata</u>	Ly503	Qc			2-mar-98	1
8994	<u>L. cruenta</u>	R545	BV			1-dic-96	1
8995	<u>L. cochleata</u>		Iz	E		1-dic-96	1
8996	<u>L. cochleata</u>	96-12	Iz	E	950	--nov-96	2
8997	<u>L. suaveolens</u>	-1	Za	E	1,475	12-abr-98	1
8998	<u>L. suaveolens</u>	-2	Za	E	1,475	12-abr-98	1
8999	<u>L. cochleata</u>	virus/VS	Iz		900	1-nov-96	1
9000	<u>L. cochleata</u>	G82	Iz	E	500	--feb-81	2
9001	<u>L. suaveolens</u>	G224	Cq	E	1,300	23-may-98	2
9003	<u>L. suaveolens</u>	G56	Za	E	1,500	13-jun-96	1
9004	<u>L. bradeorum</u>	G68	Cq		1,650	14-jun-96	1
9005	Híbrido	G132	Ju	E	1,400	21-dic-97	1
9006	Híbrido	G136	Ju	E	1,400	21-dic-97	1
9007	<u>L. cruenta</u>	G261				1-ene-99	1
9008	<u>L. suaveolens</u>	R505	BV			11-dic-84	1
9011	<u>L. suaveolens</u>	R510	Za			--oct-84	1
9012	<u>L. suaveolens</u>	R515	Za				1
9013	<u>L. suaveolens</u>	G222	Cq	E	1,150	23-may-98	1
9022	Híbrido	G196	Za	E	900	16-oct-98	1

Número Dix y Dix	Especie	No. de colecta	Depto. o país	Hábito (E/L)	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Flores medidas
9023	<u>L. suaveolens</u>	G41	Za	E	1,500	13-jun-96	1
9048	Híbrido	G165	Ju	E	1,650	21-dic-97	1
9049	Híbrido	G174	Ju	E	1,650	21-dic-97	1
9050	Híbrido	G176	Ju	E	1,650	21-dic-97	2
9051	<u>L. suaveolens</u>	G195	Za	E	900	16-oct-98	3
9052	<u>L. suaveolens</u>	G197	Za	E	900	16-oct-98	2
9053	<u>L. cruenta</u>	G233	Hu	E	1,100	20-sep-98	1
9054	<u>L. cruenta</u>	G234	Hu	E	1,100	20-sep-98	1
9055	<u>L. cruenta</u>	G238	Hu	E	1,100	20-sep-98	2
9056	<u>L. cruenta</u>	G239	Hu	E	1,100	20-sep-98	1
9057	<u>L. cruenta</u>	G240	Hu	E	1,100	20-sep-98	1
9092	<u>L. dowiana</u>		AV	L	1,000	--sep-76	1
9093	<u>L. dowiana</u>		AV	L	1,000	--sep-76	1
9114	<u>L. suaveolens</u>	G101	Za	E	1,750	----97	1
9126	<u>L. suaveolens</u>	G89	Za	E	1,750	----97	1
9129	Híbrido	G126	Za	E	1,750	----97	1
9130	Híbrido	G102	Za	E	1,750	----97	1
9138	<u>L. suaveolens</u>	G107	Za	E	1,750	----97	1
9139	<u>L. bradeorum</u>						1
9140	<u>L. suaveolens</u>	G87	Za	E	1,750	----97	1
9151	Híbrido	G198	Za	E	1,750	----97	1
9183	<u>L. cruenta</u>	G281	Su	E	1,300	17-jun-99	1
9207	<u>L. suaveolens</u>	7	Za		1,050	13-jun-96	2
9208	<u>L. suaveolens</u>	10	Za		1,740	21-jun-96	1
9209	<u>L. suaveolens</u>	9	Za		1,050	13-jun-96	1
9210	<u>L. bradeorum</u>	6				11-jun-96	1
9233	<u>L. cruenta</u>	G297	Su	E	1,300	17-jun-99	1
9234	<u>L. cruenta</u>	G310	Su	E	1,300	17-jun-99	1
9237	<u>L. cruenta</u>	G298	Su	E	1,300	17-jun-99	1
9238	Híbrido	G138	Ju	E	1,450	21-dic-97	1
9239	<u>L. suaveolens</u>	G193	Za	E	900	16-oct-98	1
9240	<u>L. suaveolens</u>	G199	Za	E	900	16-oct-98	1
9241	<u>L. suaveolens</u>	G225	Cq	E	1,200	23-may-98	1
9242	<u>L. suaveolens</u>	G228	Za	E	1,740	1-jul-98	1
9243	<u>L. cruenta</u>	G241	Hu	E	1,100	20-sep-98	2
9244	<u>L. cruenta</u>	G242	Hu	E	1,100	20-sep-98	2
9245	<u>L. suaveolens</u>	G254	Gu			--jul-98	2
9247	<u>L. aromatica</u>	G264	MEX			--oct-93	2
9248	<u>L. suaveolens</u>	G265					1
9249	<u>L. suaveolens</u>	OTRO DIX				----84	1
9250	<u>L. cruenta</u>						2
9251	<u>L. bradeorum</u>		Za				1
9252	<u>L. deppei</u>	uv98-479JH				6-sep-99	1
9253	<u>L. dowiana</u>	VS-int	AV	L	1,000	--sep-76	1
9254	<u>L. dowiana</u>						1
9255	<u>L. macrophylla</u>		CR			10-sep-99	1
Ly33	Híbrido	Ly33	BV			13-abr-75	1
Ly34	Híbrido	Ly34	BV	E		19-ene-74	1
Ly47	<u>L. suaveolens</u>	Ly47	Hu	L		7-dic-73	1
Ly54	Híbrido	Ly54	Cq			28-abr-76	3
Ly55	<u>L. cochleata</u>	Ly55	Pe			17-jul-76	1
Ly57	<u>L. cochleata</u>	Ly57	Cq			26-abr-76	2
ME1	<u>L. aromatica</u>	ME1					2
R100	Híbrido	R100	Za			26-abr-81	1

Número Dix y Dix	Especie	No. de colecta	Depto. o país	Hábito (E/L)	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Flores medidas
R502	Híbrido	R502	BV		1,100	6-abr-79	1
R507	Híbrido	R507				--dic-96	1
R511	Híbrido	R511	Za			12-abr-79	1
R512	Híbrido	R512				--dic-96	1
R516	<u>L. cruenta</u>	R516					1
R519	<u>L. bradeorum</u>	R519	Cq			13-abr-83	1
	<u>L. cruenta</u>	1				11-jun-96	1
	<u>L. suaveolens</u>	2				11-jun-96	1
	<u>L. suaveolens</u>	3				11-jun-96	1
	Híbrido	4				11-jun-96	1
	<u>L. suaveolens</u>	5				11-jun-96	1
	Híbrido						3

Fuente: Datos de colecta consignados en los especímenes en líquido, elaboración propia.

### Anexo D.

Plantas código "G", de las que se obtuvo material foliar, incluye localidades de origen y las localidades visitadas durante los viajes de campo, entre 1996 y 1999

Código G	Especie	Localidad	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Colectores
1 a 63	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	1,100	12-jun-96	MADix, MWDix, MArnold, MLMaldonado
64	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, Cq, Esquipulas	1,250	14-abr-83	MADix, MWDix
65 a 66	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½, Cq, Esquipulas	1,250	14-abr-83	MADix, MWDix
67	<u>L. sulfurea</u>	En cultivo, km 14 ½, Cq, Esquipulas	1,250	14-abr-86	MADix, MWDix
68	<u>L. bradeorum</u>	En cultivo, km 14 ½, Cq, Esquipulas	1,650	14-abr-86	MADix, MWDix
69	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, Za, Río Hondo	1,740		MADix, MWDix
70	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½, Cq, Esquipulas	1,650	14-abr-83	MADix, MWDix
71	<u>L. bradeorum</u>	En cultivo, km 14 ½, Iz		02-jul-78	MADix, MWDix
72	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, Ju, Volcán Moyuta		12-oct-91	MADix, MWDix
73	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, BV		15-sep-84	MADix, MWDix
74	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½		01-jun-75	MADix, MWDix
75	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½, Cq, Esquipulas		24-abr-76	MADix, MWDix
76	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, Za, Río Hondo	1,750	14-sep-81	MADix, MWDix
77	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½, Volcán de Pacaya		18-ago-74	MADix, MWDix
78	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, BV			MADix, MWDix
79	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, BV		---74	MADix, MWDix
80	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, Za, Río Hondo	1,750	14-sep-81	MADix, MWDix
81	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½, BV		01-jun-75	MADix, MWDix
82	<u>L. cochleata</u>	En cultivo, km 14 ½, Iz, Río Dulce		--feb-81	MADix, MWDix
83	<u>L. cruenta</u>	En cultivo, km 14 ½, SR		--may-76	MADix, MWDix
86 a 131	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	1,750 a 1,800	--may-97	MWDix, MPalmieri, MMéndez, MLMaldonado

Código G	Especie	Localidad	Altitud (m s.n.m.)	Fecha (dd/mm/aa)	Colectores
132 a 183	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. sulfurea</u> e híbridos	Ju, Volcán Chingo	1,400 a 1,700	21-dic-97	MWDix, RDix, MLMaldonado
184 a 191	<u>L. cruenta</u>	Iz, Morales	1,100 a 1,300	01-may-98	MWDix, MLMaldonado
192 a 202	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	900	16-oct-98	MWDix, RBlanco, NCabrera
203 a 205	<u>L. cochleata</u>	Iz, Puerto Barrios	950	01-nov-96	MWDix
206 a 209	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	1,740	05-jul-98	MWDix, MMéndez
210 a 212	<u>L. cruenta</u>	Ju, Trifinio	1,600	---98	JMonzón, ACBailey
213	<u>L. cochleata</u>	Iz, Puerto Barrios	950	01-nov-96	MWDix
214 a 219	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	1,740	05-jul-98	MWDix, MMéndez
220 a 226	<u>L. suaveolens</u> , híbridos	Cq, Olopa	1,150	23-may-98	MWDix, MLMaldonado
227 a 230	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	1,740	05-jul-98	MWDix, MMéndez
231	<u>L. cruenta</u> , <u>L. dowiana</u>	Hu, Nentón	1,100 a 1,200	20-sep-98	MWDix, NCabrera, MMaldonado
251 a 254	<u>L. suaveolens</u>	Cultivo UVG		--jul-98	
255		Cultivo UVG			MWDix, MADix
256		Cultivo UVG			MWDix, MADix
257		Cultivo UVG			MWDix, MADix
258		Cultivo UVG			MWDix, MADix
259		Cultivo UVG			MWDix, MADix
260		Cultivo UVG			MWDix, MADix
261	<u>L. cruenta</u>	Cultivo UVG, BV			MWDix, MADix
262		Cultivo UVG			MWDix, MADix
263		Cultivo UVG			MWDix, MADix
264	<u>L. aromatica</u>	Cultivo UVG, México, Veracruz, Xalapa		--oct-93	MWDix, MADix
265	<u>L. suaveolens</u>	Cultivo UVAL			MWDix, MADix
266 a 269	<u>L. cruenta</u>	Su, Santa Bárbara	1,300 a 1,750	26-mar-99	MADix, MWDix, JHazard, ECastellanos, MLMaldonado
270 a 275	<u>L. cruenta</u>	Iz, Morales	1,100 a 1,300	01-abr-99	MADix, MWDix, RDix, AMDix, KMDix
276	<u>L. cruenta</u>	Su, Santa Bárbara	1,300 a 1,750	17-jun-99	MWDix
311 a 317	<u>L. suaveolens</u> , <u>L. cruenta</u> e híbridos	Za, Río Hondo	1,500	13-jun-96	MADix, MWDix, MArnold, MLMaldonado

Fuente: Elaboración propia.

## Anexo E. Glosario

- Agarosa:** Polímero lineal extraído de un alga marina y se compone de D-galactosa y 3,6 anhídrido L-galactosa que al calentarse forman una malla que permite separar moléculas en un intervalo de 0.2 a 50 Kb (CIAT 1999).
- Agudo:** Extremo afilado y penetrante, con los lados del ápice rectos o ligeramente convexos (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de extremos de partes florales.
- Alopátrico:** Suceso que ocurre en áreas separadas geográficamente (Grant 1989).
- Alu I:** Endonucleasa de restricción, enzima capaz de encontrar trozos cortos de ADN y volverlos más pequeños para inutilizarlos. En general, los sitios de restricción son de 4 o 6 pares de bases que son palíndromos. En *Alu I* la secuencia inicial (secuencia diana) es AGCT, esto quiere decir que corta en AG+CT, dejando un borde no pegajoso ("blunt end", Casey 1992). Las secuencias palíndromas que corta son:
- $$\begin{array}{l} 5' \text{ AGCT } 3' \\ 3' \text{ TCGA } 5' \end{array}$$
- Alu-PCR:** Procedimiento basado en la amplificación simultánea de secuencias de ADN flanqueadas entre elementos *Alu*, que consisten en elementos cortos, entremezclados, repetitivos, dispersos a lo largo del genoma. Es una técnica para detección de polimorfismos (Nelson *et al.* 1989).
- Análisis de componentes principales (PCA):** Método por el cual se trata de resumir un grupo de datos multivariados en pocos grupos relacionados (Theriot y Stoermer 1984).
- Análisis de factores principales:** Método por el cual se pueden descomponer grupos de datos multivariados por una matriz de covarianzas y son relacionados entre sí (Molina Cano 1977).
- Apomorfía:** Característica novedosa, derivada de otra característica ancestral, cercano filogenéticamente (Brown *et al.* 1996).
- Bífido:** Extremo que termina en dos puntas (Lawrence 1956). Aquí es usado como descriptor de extremos de partes florales.
- Bootstrap:** Método estadístico usado para estimar confianza en intervalos de ramas de un árbol filogenético, basado en tomar repetitivamente muestras de datos (SPSS 1998).
- Bráctea:** Hoja reducida, regularmente asociada con las flores; morfológicamente un órgano foliar (Lawrence 1951).
- Callo:** Prominencia o protuberancia dura, en este caso en el labelo; pero también puede referirse a lastimaduras cubiertas por tejido nuevo (Lawrence 1951).
- Carácter, estado de:** Aspecto específico de una característica, el cual está presente en un grupo taxonómico (Molina Cano 1977).
- Carácter:** Característica heredable y variable (morfológica o molecularmente) presente en un grupo de taxones el cual puede ser usado para inferir relaciones, al ser hipotetizada como homóloga (Molina Cano 1977).
- Cebador (primer):** Oligonucleótido, fragmento corto de ADN de cadena única (usualmente entre 10 a 30 bases) al cual pueden unirse nuevos desoxirribonucleótidos con ayuda de una ADN polimerasa; frecuentemente usado como iniciador para secuenciación de ADN o PCR (CIAT 1999).

- Clado:** Grupo de organismos de todos los descendientes de un antecesor común (Brown *et al.* 1996).
- Cladograma:** Árbol que muestra las relaciones históricas o evolutivas entre taxones; la longitud de cada rama es arbitraria, solamente muestra relaciones filogenéticas (Molina Cano 1977).
- Cloroplasto, genoma del:** Hebra de ADN doble, circular; no se encuentra encerrada por membranas, ni asociada con histonas (Puertas Gallego 1999).
- Cloroplastos:** Organelos que contienen las enzimas para la fotosíntesis y son característicos únicamente de las células vegetales, son heredados maternalmente en dos tercios de las especies vegetales (Puertas Gallego 1999).
- Columna:** Cuerpo formado de la unión de estambres, estilo y estigmas en las orquídeas (Lawrence 1951).
- Comunidad:** Son ensambles de especies de plantas y animales viviendo juntos (Gauch, Jr. 1982).
- Cromosoma:** Estructura filamentosa donde se ubica la cromatina condensada (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, detergente catiónico que solubiliza polisacáridos (Casey 1992, CIAT 1999).
- Cuadrado:** Extremo recto de cualquier extremidad de la planta, sin protuberancias o curvas (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de extremos de partes florales.
- Diploide:** Organelo u organismo con 2 juegos haploides y homólogos, de cromosomas (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Electroforesis:** Método de separación de moléculas grandes presentes en una mezcla por diferencias en carga y tamaño en un medio con un campo eléctrico (CIAT 1999).
- Epífita:** *Epi* sobre, *phytos* planta; planta que crece sobre otra planta (Lawrence 1951).
- Escapo:** Tallo sin hojas y con flores, que se eleva sobre el suelo, algunas veces con pequeñas hojas en forma de escama (Lawrence 1951).
- Especie biológica:** Unidad de organismos que consiste en la suma de individuos que se aparean entre sí, siendo la más inclusiva de la reproducción biparental (Grant 1989).
- Evolución:** Cambio en la frecuencia de los genes (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- FAAG:** Solución de almacenamiento de material orgánico compuesta por 85% etanol, 4% formalina (formaldehído 37%), 5% ácido acético y 1% glutaraldehído.
- Fenograma:** Árbol que muestra el grado de similitud entre los taxones (Molina Cano 1977).
- Fenotipo:** Característica medible o rasgo distintivo que posee un organismo (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Filogenia:** Ciencia que trata de inferir las relaciones evolutivas de y entre taxones (Molina Cano 1977).
- Filograma:** Árbol que muestra las relaciones históricas entre los taxones, y la longitud de las ramas refleja la cantidad de cambio de los caracteres (Molina Cano 1977).
- Fluorimetría:** Método de cuantificación de ADN por fluorescencia. El fluorímetro calcula la fluorescencia del ADN en análisis comparándola con la de una cantidad específica de ADN en solución estándar (CIAT 1999).
- Gen:** Unidad física y funcional de la herencia. Es un secuencia ordenada de deoxinucleótidos localizados en una posición particular de un cromosoma y codifica para un producto específico, que puede ser proteína o molécula de ARN (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Genotipo:** Un tipo (individuo o población) determinado por caracteres genéticos (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).

- Glabrato:** Casi sin vellosidades, o en algunos casos llega a perderlas al madurar (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.
- Glabro:** Sin pelos, papiloso, a menudo usado incorrectamente en el sentido de liso (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.
- Grupo externo (Outgroup):** Uno o más grupos que se supone está afuera, filogenéticamente, de los taxones de interés (CIAT 1999).
- Grupo interno (Ingroup):** Grupo presuntamente monofilético que contiene los taxones de interés (CIAT 1999).
- Haploide:** Organelo u organismo con un juego único de cromosomas (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Haplotipo:** Combinación de alelos en loci cercanamente relacionados que son heredados usualmente como unidad y son utilizados como marcadores para una región cromosómica (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Herencia extracromosómica:** Material que constituye el plasma que es heredado la mayoría de las veces de un solo progenitor. Pueden ser heredados de esta forma las mitocondrias, cloroplastos y plasmagenes. En dos tercios de las especies mundiales de plantas, los cloroplastos, son heredados estrictamente por la madre (Grant 1989, Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Heterostilia:** Con estilos de diferentes largos en flores de la misma especie (Harris y Harris 2000).
- Híbrido, conglomerado o complejo:** Proceso de especiación por hibridación que se repite independientemente en diferentes linajes, de modo que se originan dos o más especies nuevas, de tres o más especies originales (Grant 1989).
- Híbrido:** Planta resultante de un cruce entre padres que no son iguales genéticamente; en taxonomía descriptiva son los hijos de dos especies diferentes o unidades infraespecíficas (Grant 1989).
- Introgresión:** Retrocruce repetido de un híbrido natural con una o ambas poblaciones progenitoras, dando como resultado la transferencia de genes de una especie o semiespecie a otra a través de una barrera reproductiva (Grant 1989, Lenz y Wimber 1959).
- Isoenzimas:** Proteínas con propiedades enzimáticas iguales, pero diferentes en su estructura primaria (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).
- Kilobases (Kb):** Término utilizado para describir el tamaño de fragmentos de ADN igual a mil nucleótidos (CIAT 1999).
- Labelo:** Labio, parte del perianto, particularmente se le llama así al pétalo basal, que es diferente en las orquídeas (Lawrence 1951).
- Lanado:** Lanoso, con pelos largos, entremezclados y curvos (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.
- Litófita:** Planta que crece sobre piedras (Lawrence 1951).
- Mentón:** Prominencia, en este caso de la base del labelo (Lawrence 1951).
- Mesoamérica:** Región geográfica que tiene una extensión total de 768.990 km<sup>2</sup>, que abarcan los cinco estados del sur de México (Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Chiapas) y los siete países centroamericanos, Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Miller *et al.* 2001).
- Metapoblación:** Poblaciones disjuntas que pueden intercambiar material genético (Cain *et al.* 2000).
- Migración:** Es cualquier cambio en la distribución espacial de una especie o taxón a través del tiempo. En el caso de las orquídeas y demás plantas con semillas, el embrión diploide es móvil, mientras que los juveniles y adultos son sedentarios (Sauder 1988)

**Monomorfismo:** Elemento genético o locus con una frecuencia de aparición igual o mayor a 0.99 (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).

**Morfología:** Estudio de la forma y estructura de los individuos (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).

***ndhF*:** Gen del ADN circular, encontrado en los cloroplastos. Localizado en la región única y no repetida, subunidad F de la NADP deshidrogenasa (Judd *et al.* 1999; Neyland y Urbastch 1995; 1996a; 1996b).

**OTU:** Unidad taxonómica operacional, es cada uno de los individuos utilizados para hacer el análisis (Molina Cano, 1977).

**Par de bases (bp):** Par de bases nitrogenadas (adenina y timina o guanina citosina) unidas juntas por enlaces débiles (CIAT 1999).

**Parsimonia:** Convención por la cual se busca el menor número de pasos para producir un cambio, haciéndolo el más probable de aparición (CIAT 1999).

**Pétalo:** Unidad de la envoltura floral interna o corola en flores polipétalas, usualmente coloreado y vistoso (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.

**Piloso:** Superficie con pelos suaves y abundantes (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.

**Población:** Grupo de organismos, diferenciables de todos los otros organismos por carias características morfológicas o moleculares, y aisladas reproductivamente de todos los otros grupos de organismos (Davis 1999)

**Polimerasa, ADN:** Enzima encargada de abrir el ADN en dos hebras para su replicación (CIAT 1999).

**Polimorfismo:** Dos o más elementos genéticos contrastante en una población, con frecuencias mayores a las que pueden ser debidas a mutaciones recurrentes. Puede darse a escala cromosómica, génica o en la longitud de fragmentos de restricción (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).

**Puberulento:** Superficie cubierta con pelos diminutos, suaves, rectos, erectos, casi invisibles para el ojo desnudo (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.

**Puntiagudo:** Terminación con una punta tiesa y aguda (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de extremos de partes florales.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Método utilizado para amplificación de ADN *in vitro*, en pocas horas, a partir de ciclos repetidos de temperaturas, con cebadores dirigidos para la síntesis de una secuencia blanco, usando una ADN polimerasa estable al calor, se obtienen miles de copias de un segmento específico (CIAT 1999).

**Redondeado:** Terminación con forma semicircular (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de extremos de partes florales.

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio, detergente aniónico que solubiliza proteínas, tejidos y membranas (Casey 1992, CIAT 1999).

**Sépalo:** Cada una de las partes del cáliz, usualmente verdes y con forma de hojas (Lawrence 1951).

**Simpátrico:** Grupo de casos que ocurren en la misma área geográfica (Grant 1989).

**Sistemática:** Ciencia dedicada a descubrir, organizar, e interpretar la diversidad biológica (Puertas Gallego 1999, Standsfield 1992).

**Taq polimerasa:** ADN polimerasa termoestable proveniente de la arqueobacteria *Thermus aquaticus* (Casey 1992, CIAT 1999).

- Taxón:** (Pl. taxones) Término general aplicado a cualquier elemento taxonómico, población o grupo, sin relación con su nivel de clasificación (Grant 1989).
- Taxonomía:** Ciencia dedicada a la descripción y clasificación de organismos biológicos en el sistema jerárquico de Linnaeus (Standfield 1992).
- Tipo:** Organismo en el cual se basan las descripciones de una especie y que se registra para su estudio. Es un elemento al que el nombre del taxon estará permanentemente unido, así sea correcto o un sinónimo. No necesariamente es la forma más típica o representativa de un taxón. (Lawrence 1951, IAPT (Saint Louis Code) 2000).
- Tomentoso:** Densamente lanudo o pubescente, con pelos suaves y enmarañados (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.
- Tricomias:** Pelo o bigote (Lawrence 1951). Son apéndices epiteliales uni- o multicelulares y pueden ser de distintas formas, como pelos, escamas o papilas. Todos los estados de transición que se dan durante el crecimiento de la pared epidérmica son llamadas células papilosas y son comunes en pétalos y muchas hojas (Flores Vindes 1989; Benzing 1976).
- UPGMA:** Método de medias aritméticas entre pares no ordenados para realizar agrupaciones de individuos; unweighted, paired, grouped media analysis en inglés (Molina Cano 1977).
- Velutinoso:** Superficie velluda con pelos erectos, rectos y moderadamente firmes (Lawrence 1951). Aquí es usado como descriptor de superficies de partes florales.