

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Victoria Sosa por haber dirigido este trabajo de investigación, su amistad, apoyo y consejos durante la realización del mismo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Carla Gutiérrez, Dr. Germán Carnevali, por sus acertadas sugerencias y revisión crítica que permitieron el enriquecimiento del trabajo.

Al Dr. Alejandro Espinosa y Dr. Javier García-Cruz, por su participación como miembros del Jurado y por la revisión del documento final de tesis.

A mis compañeros de laboratorio Eva, Lalo, Etel, Pablo y Flor por su apoyo y paciencia.

A mi familia (Víctor Angulo, Beatriz Pérez, Susana O´Horán, Diego O´Horán, Aida Manzanilla) por su apoyo incondicional y cariño.

Al Instituto de Ecología A.C. por los conocimientos transmitidos y permitirme realizar el trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al CONACYT por la beca de manutención (204519) proporcionada durante el periodo 2006-2008.

A Zuemi Cervera por su paciencia, comprensión y apoyo durante la realización de este trabajo.

A Nikte-ha por ser mi pedacito de inspiración.

A Gerardo Arceo y Manuel Cach, por soportarme dos años de su vida y por su gran amistad.

Al Chaneke por soportar mis histerias en los malos momentos y su amistad incondicional.

DEDICATORIA

Con amor a *Zuemi* y *Nikte-ha*

DECLARACIÓN

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Diego Francisco Angulo Pérez como estudiante de la carrera de Maestría en Ciencias (Sistemática) entre Agosto de 2006 y Agosto del 2008, bajo la supervisión de la Dra. Victoria Sosa Ortega.

Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Candidato: _____
Diego Francisco Angulo Pérez

Director de tesis: _____
Victoria Sosa Ortega

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL	13
Literatura citada.....	21
CAPITULO II. LA FILOGENIA DE <i>BARKERIA</i> (ORCHIDACEAE), UN PEQUEÑO LINAGE DENTRO DE LA ALIANZA <i>EPIDENDRUM</i>	27
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Material and methods.....	34
<i>Taxon sampling and outgroup selection</i>	34
<i>Molecular characters</i>	36
<i>Sequence Alignment</i>	36
<i>Phylogenetic Analyses</i>	37
Results	38
Discussion.....	40
Acknowledgements	43
Literature cited	44
CAPITULO III. CONCLUSIONES GENERALES.....	62
Literatura citada.....	68

LISTA DE APENDICES, FIGURAS Y TABLAS

CAPITULO II

Fig 1. *Barkeria* (A. B) Habit A. *B. vanneriana* B. *B. uniflora* (C) *B. uniflora* in its habitat (D) *B. obovata* flower, frontal view showing the verrucose keels. (E) Lip callus of *B. whartonianiana* (F) *B. melanocaulon* flower, frontal view showing the wing column.54

Fig 2. Strict consensus tree of 168 MPT retrieved by the combined chloroplast analysis (*rpl32F-trnL^{UAG}*, *trnL trnL-F* (IGS), *matK*). (L=197, CI=0.65, RI=0.82). Numbers above branches indicate jackknife support. Numbers below branches indicate Bayesian posterior probabilities from 2,000,000 generations.55

Fig 3. Strict consensus tree of 112 MPT retrieved by ITS analysis (L=326, CI=0.47, RI=0.65). Numbers above branches indicate jackknife support. Numbers below branches indicate Bayesian posterior probabilities from 1,000,000 generations.56

Table 1. Characteristics of cpDNA and nrDNA-ITS sequences. L = length; MPT = most parsimonious trees; CI= consistency index; RI= retention index.57

Appendix 1. Species, vouchers and GenBank accessions in the *Barkeria* phylogenetic study. Vouchers were deposited at XAL.58

RESUMEN

Barkeria es un pequeño género Mesoamericano de orquídeas que se distribuye en la vertiente del Pacífico mexicano y amplía su distribución hasta Panamá. Con base en evidencia molecular, se ha clasificado en un grupo llamado informalmente “Alianza *Epidendrum*”, en el cual también se encuentran los géneros *Epidendrum*, *Caularthron* y *Orleanesia*.

En el presente trabajo se llevaron a cabo análisis de parsimonia y bayesianos con secuencias de ADN nuclear y de cloroplasto para entender las relaciones filogenéticas de *Barkeria*, así como determinar si puede considerarse como un género independiente de cualquiera de los miembros de la Alianza *Epidendrum*. Los objetivos planteados en esta investigación fueron: 1) probar si marcadores moleculares de ADN de cloroplasto tales como *rpl32F-trnLUAG*, *trnL trnL-F* (IGS), y *matK* (gen), así como el ITS nuclear presentan variabilidad suficiente para resolver las relaciones filogenéticas entre las especies de *Barkeria* y entre los miembros de la Alianza *Epidendrum*; 2) establecer si el género *Barkeria* debe ser reconocido como un grupo monofilético y 3) determinar si taxa adicionales pueden formar parte de la Alianza *Epidendrum*.

La hipótesis de relaciones filogenéticas con mayor soporte fue recuperada del análisis combinado del ADN de cloroplasto. El análisis de ITS recupera a *Barkeria* como un grupo polifilético. El resultado del análisis combinado del ADN de cloroplasto, demuestra que dos linajes conforman al género *Barkeria*, los cuales comparten caracteres morfológicos y se distribuyen en zonas adyacentes. Los resultados también indican que el género monotípico *Microepidendrum* (*M. subulatifolium*), debe formar

parte de la Alianza *Epidendrum*. Caracteres moleculares adicionales y un mayor muestreo son necesarios para establecer el estatus taxonómico y la delimitación genérica de los miembros de la alianza.

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

Los resultados de estudios sistemáticos y evolutivos recientes basados tanto en caracteres morfológicos como moleculares, han ocasionado cambios drásticos en la clasificación de las Orchidaceae (e.g., Dressler 1993; Cameron et al. 1999; Freudenstein y Rasmussen 1999; Freudenstein et al 2004; van den Berg et al. 2005a). Entre los grupos de orquídeas que más modificaciones han sufrido en su composición está la tribu Epidendreae (van den Berg et al. 2005a). Se reconoce ahora que Epidendreae esta constituida por cinco subtribus: Laeliinae, Pleurothallidinae, Bletiinae, Ponerinae y Chysinae (Goldman et al. 2001; van den Berg et al. 2005a). Las subtribus Neotropicales Pleurothallidinae y Laeliinae, son las más diversas con aproximadamente 4000 y 1466 especies respectivamente (Pridgeon et al. 2001; Dressler 1993).

La distribución de las Laeliinae comprende regiones tropicales y subtropicales del continente americano, incluyendo el Caribe. La distribución más septentrional se encuentra en la costa oriental de Carolina del Norte y en Sudamérica algunas especies de *Cattleya* y *Epidendrum* alcanzan Uruguay y la región norte de Argentina (van den Berg. 2005b). En este grupo, están algunos de los géneros más importantes desde el punto de vista ornamental como *Cattleya* y *Laelia*, que debido a sus vistosas flores han sido objeto de cultivo a gran escala (Dressler 1993, van den Berg et al. 2000). En diversidad, *Epidendrum* es el género con mayor número de especies en esta subtribu (Dressler 1993) y junto con *Encyclia* y *Prosthechea* constituyen una gran parte de la orquideoflora del Neotrópico (van den Berg et al. 2000).

La enorme diversidad tanto en caracteres vegetativos como en caracteres florales en Laeliinae ha dificultado establecer su clasificación y ésta ha sufrido modificaciones dependiendo de los criterios de los especialistas. Originalmente Laeliinae fue descrita por Bentham (1881), pero ubicó algunos elementos en otra subtribu, Stenoglossinae, con base en diferencias de las caudículas en los polinarios. Pfitzer (1889) unió las dos subtribus y propuso las series Ponereae y Cattleyeae basándose en la presencia o ausencia de un pie de columna. Dressler (1981) dividió la subtribu en alianzas. Posteriormente Szlachetko (1995) en su clasificación ubica a los miembros de Laeliinae en tres subtribus: Epidendrinae, que incluía taxa con una columna fusionada al labelo; Ponerinae, incluía especies con un pie de columna y Laeliinae para el remanente de las especies (van den Berg et al. 2005b). Sin embargo, la clasificación de Laeliinae se comenzó a clarificar con estudios moleculares recientes (van den Berg et al. 2000; Goldman et al. 2001; van den Berg et al. 2005a). Secuencias de ITS (van den Berg et al. 2000) y una matriz combinada de ITS, *rbcL*, *trnL-F* y *matK* (van den Berg et al. 2005a), resultaron insuficientes para resolver las relaciones filogenéticas de los principales grupos en Laeliinae. Sin embargo, con base en los resultados de los análisis con estas secuencias de ADN, se clasificaron los géneros informalmente en las siguientes alianzas: Alianza *Cattleya*, Alianza *Epidendrum*, Alianza *Broughtonia*, Alianza *Scaphyglottis*, Alianza *Encyclia*, Alianza *Isabelia*, Alianza *Domingoa* y *Homalopetalum*, Alianza *Laelia* y en la última agrupó a los taxa que no fueron incluidos en estos grupos (van den Berg et al. 2000).

A pesar de que es muy clara la posición de Laeliinae dentro de las Epidendreae, las relaciones filogenéticas dentro de las alianzas permanecen inciertas (van den Berg et al. 2000). La Alianza *Epidendrum* ha sido uno de los grupos con más problemas de

clasificación y está constituida por géneros como: *Epidendrum*, *Barkeria*, *Caularthron* y *Orleanesia* (van den Berg et al. 2000). *Epidendrum* con más de mil especies, es todavía un problema para los botánicos y la historia de su clasificación infragenérica está estrechamente relacionada a la historia de los grupos segregados (Hágsater y Soto-Arenas 2005). Según Dressler (1984) gran parte del problema de debe a una falta de observación cuidadosa de los caracteres florales de *Epidendrum*, por lo que constantemente surgen nuevos géneros basados en características mal interpretadas o inadvertidas.

A través de la historia taxonómica del género *Epidendrum* se han propuesto varias clasificaciones infragenéricas. El primer intento fue realizado por La Llave y Lexarza (1825) quienes lo dividieron en especies bulbíferas y caulescentes, actualmente circunscritas en los géneros *Encyclia* y *Prosthechea* respectivamente. Lindley (1841), basándose en características vegetativas y florales reconoció diez subgéneros. Posteriormente Bentham (1883) propuso otra clasificación infragenérica reconociendo secciones; mientras que Ames et al. (1936), reconoció las secciones: *Barkeria*, *Encyclium* y *Epidendrum*, las cuales con algunas modificaciones son actualmente géneros reconocidos independientemente. Posteriormente otros autores han establecido clasificaciones infragenéricas modificando la circunscripción del género, proponiendo géneros segregados (e.g. *Epidanthus*, *Nanodes*, *Pleuranthium*, *Oerstedella*) (Brieger 1976, 1977). En años más recientes Hágsater (1985), reconoció 40 grupos en *Epidendrum* y posteriormente Hágsater y Soto-Arenas (2005) en el compendio "Genera Orchidacearum", presentan una hipótesis filogenética con base en caracteres moleculares, sin embargo los análisis no se describieron y las secuencias no

fueron depositadas en una base de datos pública. Su árbol de consenso muestra cuatro grandes clados dentro de *Epidendrum*.

Barkeria es uno de los géneros segregados de *Epidendrum*, que mejor atención ha recibido, ya que fue revisado por Thien y Dressler (1970) y ampliamente tratado por Halbinger (1972-1977), por lo que la morfología y taxonomía son bien conocidas, sin embargo, las relaciones filogenéticas aun no han sido esclarecidas. Es un pequeño género neotropical de hierbas epífitas o raramente terrestres, con tallos formando delgados pseudobulbos cubiertos por brácteas escariosas, con dos a siete hojas; flores en racimos o panículas, cuatro polinios y usualmente un callo formado por tres quillas. Actualmente se reconocen 15 especies y se distribuyen principalmente en México, a lo largo de la vertiente del pacífico desde Sinaloa hasta Panamá, en áreas con un periodo de estacionalidad seca (Thien and Dressler 1970; Halbinger 1977; Salazar and Arguijo 1993; Withner 1998; Soto-Arenas 2005). *Barkeria lindleyana* es endémica de Costa Rica (Pupulin 2005), mientras que *Barkeria obovata* es la especie con la más amplia distribución, desde la vertiente del pacífico mexicano hasta Panamá (Pupulin 2005; Salazar and Arguijo 1993).

Algunas especies de *Barkeria* se encuentran enlistadas en la Norma Oficial Mexicana de especies amenazadas (NOM 59). *Barkeria dorotheae* es conocida solamente de una pequeña área en la frontera de Jalisco y Colima, mientras que *Barkeria fritz-halbingeriana* y *B. shoemakeri* han sido colectadas únicamente en sitios muy localizados en Oaxaca y Michoacán respectivamente. Otras especies como *Barkeria scandens* y *B. skinneri*, son frecuentemente extraídas de su hábitat natural por coleccionistas o para ser vendidas en mercados locales.

El género *Barkeria* fue descrito por Knowles y Westcott (Floral Cabinet 2: 7. 1838), basándose en *Barkeria elegans* (= *B. uniflora*). El epíteto genérico fue asignado en honor a George Barker, un naturalista inglés quien colectó e importó la planta tipo de México (Thien y Dressler, 1970; Halbinger, 1972).

Reichenbach, f. en su obra "Anales de la Botánica", había organizado las especies y géneros de orquídeas y en 1862 unió *Barkeria* al género *Epidendrum* con base en caracteres florales (Halbinger 1972). Ames et al. (1936) conservan el género *Barkeria* como una sección de *Epidendrum*. Thien y Dressler (1970), restituyen *Barkeria* como un género independiente argumentando que contrario a *Epidendrum* presenta una columna libre o adnada al labelo en la mitad de su longitud. Así también, una columna alada, el rostelo en forma de lengua y la carencia de un viscidium, sugiriendo una afinidad con *Caularthron*. Baker (1972) basado en caracteres anatómicos sugirió una afinidad con *Orleanesia* y *Microepidendrum* (como *Encyclia subulatifolia*). Basado fundamentalmente en los resultados de Baker y la similitud vegetativa, *Barkeria* fue ubicada en una pequeña alianza junto con *Caularthron* y *Orleanesia* (Dressler 1981). Sin embargo la propuesta de Thien y Dressler (1970) ha sufrido cambios, ya que Halbinger (1972; 1973a-i; 1974a-e) y Soto-Arenas (1993) elevaron las subespecies propuestas por estos autores a la categoría de especie.

En cuanto a estudios que proponen relaciones entre las especies de *Barkeria*, Halbinger (1977) utilizó un diagrama para plantear las relaciones de las especies de *Barkeria* usando caracteres tales como la longitud de la columna y tomando en cuenta su distribución geográfica. El estudio filogenético de van den Berg et al. (2000) incluyó únicamente dos especies de *Barkeria* en su análisis de las Laeliinae, y concluyó que este género forma parte de la alianza *Epidendrum*. Soto-Arenas (2005) propone en el

compendio “Genera Orchidacearum” una hipótesis de relaciones filogenéticas entre las especies de *Barkeria*, basándose en caracteres morfológicos; sin embargo, no es posible comprobar esta hipótesis ya que no se mencionan ni los métodos de análisis, ni los caracteres morfológicos que se codificaron.

Existe controversia en la forma de abordar la delimitación genérica y la determinación de relaciones filogenéticas de las especies de grupos muy diversos. Algunos autores proponen iniciar su análisis filogenético con grupos pequeños hasta completar todos (Berry et al. 2005). Otros autores proponen considerar el mayor número de taxa posible de los géneros para su análisis (Frodin 2004).

Este estudio propone entender las relaciones filogenéticas de *Barkeria*, así como determinar si puede considerarse como un género independiente de cualquiera de los miembros de la Alianza *Epidendrum*. Los siguientes objetivos fueron planteados: 1) probar si marcadores moleculares de ADN de cloroplasto tales como *rpl32F-trnLUAG*, *trnL trnL-F* (IGS), y *matK* (gen) así como el ITS nuclear presentan una variabilidad suficiente para resolver las relaciones filogenéticas entre las especies de *Barkeria* y entre los miembros de la Alianza *Epidendrum*; 2) establecer si el género *Barkeria* debe ser reconocido como un grupo monofilético y 3) determinar si taxa adicionales pueden formar parte de la Alianza *Epidendrum*.

Literatura citada

Ames, O., Hubbard, F. T., Schweinfurth, C., 1936. The genus *Epidendrum* in the United States and middle America. Botanical Museum, Harvard Univ., Cambridge, Massachusetts, 223 pp.

Baker, R. K., 1972. Foliar anatomy of the Laeliinae (Orchidaceae). Ph.D. thesis. Whashington University, St Louis, Missouri.

Bentham, G., 1881. Notes on Orchideae. Journal of the Linnean Society, Botany, 18, 281-360.

Bentham, G., 1883. Orchideae genera plantarum. In: G. Bentham and Hooker J. D. (Eds.), Reeve and Co., London.

Berry, P. E., A. L. Hipp, K. J. Wurdack, B. van Ee, R. Riina., 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* DNA sequence data. Am. J. Bot. 92, 1520-1534.

Brieger, F. T., 1976-77. Subtribu: Epidendrinae. In: R. Schlechter (Brieger, Maatsch y Senghas), Die Orchideen, ed. 3, 1 (8, 9), 460-576.

Cameron, K. M., Chase, M. W., Whitten, W. M., Kores, P. J., Jarrell, D. C., Albert, V. A., Yukawa, T., Hills, H. G., Goldman, D. H., 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *Am. J. Bot.* 86, 208–224.

Dressler, R. L., 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press.

Dressler, R. L., 1984. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. *Orquidea (Méx.)* 9 2, 277-290.

Dressler, R. L., 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides press. Portland, Oregon. 314 pp.

Freudenstein, J. V., Rasmussen, F. N., 1999. What does morphology tell us about orchid relationships?: a cladistic analysis. *Amer. J. Bot.* 86, 225-248.

Freudenstein, J. V., van den Berg, C., Goldman, D. H., Kores, P. J., Molvray, M., Chase, M. W., 2004. An expanded plastid DNA phylogenetic analysis of Orchidaceae and analysis of jackknife clade support strategy. *Am. J. Bot.* 91, 149–157.

Frodin, D. G., 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53, 753-776.

Goldman, D. H., Freudenstein, J. V., Kores, P. J., Molvray, M., Jarrell, D. C., Whitten, W. M., Cameron, K. M., Jansen, R. K., Chase, M. W., 2001. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences. *Syst. Bot.* 26, 670–695.

Hágsater, E., 1985. Toward an understanding of the genus *Epidendrum*. Proceeding of the 11th. World Orchid Conference. International press, Singapore. pp. 195-201 in K. Tan (Editor).

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., 2005. *Epidendrum*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P., Chase, J. M. W., and Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendreae*. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 236-251.

Halbinger, F., 1972. Historia y estudios preliminares sobre el género *Barkeria*. *Orquídea (Méx)* 2 7, 177-191.

Halbinger, F., 1973a. *Barkeria barkeriola*. *Orquídea (Méx)* 3, 229-233.

Halbinger, F., 1973b. *Barkeria chinensis*. *Orquídea (Méx)* 3, 13-20.

Halbinger, F., 1973c. *Barkeria elegans*. *Orquídea (Méx)* 3, 195-199.

Halbinger, F., 1973d. *Barkeria halbingeri*. *Orquídea (Méx)* 3, 195-199.

Halbinger, F., 1973e. *Barkeria halbingeri*. *Orquídea (Méx)* 3, 99-109.

Halbinger, F., 1973f. *Barkeria melanocaulon*. Orquídea (Méx) 3, 131-137.

Halbinger, F., 1973g. *Barkeria naevosa*. Orquídea (Méx) 3, 77-83.

Halbinger, F., 1973h. *Barkeria palmeri*. Orquídea (Méx) 3, 37-44.

Halbinger, F., 1973i. *Barkeria skinneri*. Orquídea (Méx) 3, 163-168.

Halbinger, F., 1974a. *Barkeria cyclotella*. Orquídea (Méx) 3, 299-305.

Halbinger, F., 1974b. *Barkeria lindleyana* ssp. *lindleyana*. Orquídea (Méx) 3, 335-357.

Halbinger, F., 1974c. *Barkeria lindleyana* ssp. *vanneriana*. Orquídea (Méx) 3, 367-373.

Halbinger, F., 1974d. *Barkeria naevosa* ssp. *strophinx*. Orquídea (Méx) 3, 374-379.

Halbinger, F., 1974e. *Barkeria spectabilis*. Orquídea (Méx) 3, 265-271.

Halbinger, F. 1977. Síntesis gráfica del género *Barkeria*. Orquídea (Méx).

6 11, 340-345.

Knowles, C. B., Westcott, F., 1838. *Barkeria elegans*. The Floral Cabinet. 2, 7-8.

Pfitzer, E. H., 1889. Orchidaceae. In: Die natürlichen pflanzenfamilien, ii, VI (ed. H. G. A. Engler and K. A. E. Prantl) p. 154. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Pridgeon, A. M., Solano, R., Chase, M. W., 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* 88 12, 2286-2308.

Pupulin, F., 2005. Vanishing beauty: native Costa Rican Orchids Vol.1 - *Acianthera-Kegelella*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José. p. 421.

Salazar, G. A., Arguijo, J. C., 1993. Notas sobre *Barkeria obovata* (Orchidaceae: Laeliinae) en Veracruz. *Orquídea (Méx.)* 13 1-2, 195-200.

Soto-Arenas, M. A. 1993. *Barkeria melanocaulon* y *Barkeria whartonianana*. *Orquídea (Méx)* 13, 233-244.

Soto-Arenas, M. A., 2005. *Barkeria*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendreae*. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 199-205.

Szlachetko, D. L., 1995. *Systema orchidalium*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica, Supplementum*. 3, 1-152.

Thien, L. B., Dressler R. L., 1970. Taxonomy of *Barkeria* (Orchidaceae). *Brittonia* 22, 289-302.

van den Berg, C., Higiins, W., Dressler, R., Whitten, M., Soto-Arenas, M., Culham, A., Chase, M. W., 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15, 96-114.

van den Berg, C., Douglas, G. H., Freudenstein, J., Pridgeon, A., Cameron, K., Chase, M. W., 2005a. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 92, 613-624.

van den Berg, C. 2005b. Laeliinae. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendreae*. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 181-186.

Withner, C. L., 1998. The cattleyas and their relatives. Vol. V. *Brassavola*, *Encyclia* and other genera of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. pp. 198

**CAPITULO II. LA FILOGENIA DE *BARKERIA* (ORCHIDACEAE), UN
PEQUEÑO LINAJE DENTRO DE LA ALIANZA *EPIDENDRUM*.**

Con el formato de la revista *Organisms, Diversity & Evolution*

The phylogeny of *Barkeria* (Orchidaceae), a small lineage within the complex *Epidendrum* alliance

Diego F. Angulo and Victoria Sosa *

Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A. C., Apartado Postal 63, 91000 Xalapa,
Veracruz, Mexico

*Corresponding author. E-mail address: victoria.sosa@inecol.edu.mx

Abstract

Barkeria a Mesoamerican orchid genus in the "*Epidendrum* alliance" was investigated to determine the phylogenetic relationships of its fifteen species as well as relationships with the representative species of the rest of genera of this alliance (*Epidendrum*, *Caularthron*, *Orleanesia*). Molecular evidence was gathered (nuclear ITS, and chloroplast (*rpl32F-trnL*^{UAG}, *trnL trnL-F* intergenic spacer (IGS) and, *matK*). Parsimony and bayesian analyses were performed for the combined plastid matrix and for the ITS matrix. The most supported hypothesis of relationships was retrieved from the combined chloroplast DNA analysis. Results indicate that the monotypic genus *Microepidendrum* (*M. subulatifolium*) forms part of the "*Epidendrum* alliance". *Barkeria* was retrieved as a monophyletic group by the chloroplast analyses. Further sampling and additional molecular characters are needed to settle the generic delimitation and taxonomic status of the members of the alliance.

Keywords: *Orleanesia*, *Microepidendrum*, *Caularthron*, Laeliinae, Epidendreae

Introduction

In the light of recent DNA studies in the Orchidaceae, the tribe Epidendreae is now recognized as including subtribes Bletiinae, Chysiinae, Laeliinae, Ponerinae, and Pleurothallidiinae (van den Berg et al. 2000, 2005a; Goldman et al. 2001; Pridgeon et al. 2001; Sosa 2007). Subtribe Laeliinae, the second largest in this tribe, is a group which consists of some of the showiest orchids in the Neotropics like *Laelia* Lindl., *Barkeria* Knowles & Westc. and *Cattleya* Lindl.

A long debate has preceded circumscription of genera in Laeliinae as well as recognition of groups within the subtribe. However, based on recent molecular evidence, the subtribe has been informally arranged in nine assemblages whose relationships are still unresolved (van den Berg 2000, 2005a, b). One of them, defined as the “*Epidendrum* alliance”, consists of the vast genus *Epidendrum* with small segregated genera such as *Barkeria*, *Caularthron*, and *Orleanesia* (van den Berg 2005b).

Vegetative characters of the segregated genera are similar to *Epidendrum* but differ in floral characters of the lip and rostellum (van den Berg 2005b).

To provide an initial understanding of the relationships of the taxa that comprise the *Epidendrum* alliance, we focused in *Barkeria* and conducted phylogenetic analyses. *Barkeria* is a Mesoamerican group of epiphytes, lithophytes or more rarely terrestrial orchids. Plants of *Barkeria* are small (with exception of *Barkeria fritz-halbingeriana*) with stems usually forming slender pseudobulbs, bearing leaf sheaths, and having two to seven leaves arranged on the upper portion of the stem or arranged along the stem (Thien and Dressler 1970; Withner 1998). The flowers are in a terminal raceme or panicle with four pollinia and usually with a callus with three veins (Figure 1) (Thien and

Dressler 1970; Halbinger 1977; Withner 1998; Soto-Arenas 2005). The fifteen known species of *Barkeria* have been well documented (Halbinger 1972, 1973a-i, 1974a-e; Soto-Arenas 1993).

The genus is distributed mainly in Mexico, along the Pacific coast from Sinaloa to Chiapas and Central America in seasonal dry habitats (Thien and Dressler 1970; Halbinger 1977; Salazar and Arguijo 1993; Withner 1998; Soto-Arenas 2005). *Barkeria lindleyana* is endemic to Costa Rica and *B. obovata* is the species with the broadest distribution, from the Pacific watersheds of Mexico to Panama (Pupulin 2005; Salazar and Arguijo 1993).

The genus was described in honour of the horticulturalist George Barker by Knowles and Westcott in 1838 and it was considered by most authors as a group within *Epidendrum*. However, Thien and Dressler (1970) re-established the genus arguing that contrary to *Epidendrum*, *Barkeria* possess a column adnate to the lip for up to half of the length of the column, while in some cases it is totally free. Furthermore, the column is winged and the rostellum is tongue-shaped without a viscidium, suggesting a relationship with *Caularthron*. Baker (1972) based on epidermal, cuticular, and stomatal characters suggested an affinity of *Barkeria* with *Orleanesia* and *Microepidendrum* (as *Encyclia subulatifolia*). *Barkeria* was later considered to be part of a small alliance together with *Caularthron* and *Orleanesia*, as a separate genus from *Epidendrum* (Dressler 1981).

Furthermore, Halbinger (1977) based on the size of the column considered that two groups can be recognized in *Barkeria*. The first group comprises *B. obovata*, *B. shoemakeri*, *B. palmeri*, *B. naevosa*, *B. skinneri* and *B. strophinx* with columns from 2-7 mm. The second group formed by *B. melanocaulon*, *B. dorotheae*, *B. scandens*, *B.*

lindleyana, *B. vanneriana*, *B. barkeriola*, *B. uniflora* and *B. spectabilis* has larger columns (8-20 mm).

Previous phylogenetic studies have focused in the entire tribe Epidendreae (van den Berg et al. 2005a), in the subtribe Laeliinae (van den Berg et al. 2000), or in other members of this subtribe, like *Encyclia* (Higgins et al. 2003) or *Microepidendrum* (Higgins 2002), and only two species of *Barkeria* have been included in these analyses. In the “Genera Orchidacearum” compendium, Hágsater and Soto-Arenas (2005b) displayed an unpublished molecular consensus tree (ITS +*matK*) in the phylogenetics section of *Epidendrum* that included the taxa in the *Epidendrum* alliance with three *Barkeria* species. However the tree is mostly unresolved. Moreover, in the same volume, Soto-Arenas (2005) also presented an unpublished morphological consensus tree of the *Barkeria* species, but the outgroup was not displayed. Unfortunately, analyses and characters from both generic treatments were not described, and DNA sequences were not submitted to public molecular databases.

We therefore concentrated in *Barkeria* to begin understanding how this complex alliance of taxa are related and to determine if it constitutes a monophyletic group based on molecular phylogenetic analyses.

Material and methods

Taxon sampling and outgroup selection.

A total of 37 taxa were integrated in analyses. As ingroup, fourteen of the fifteen species recognized in *Barkeria* were considered. *Barkeria fritz-halbingeriana* was not included because it is known from a single collection and was not located again. We

regarded *B. strophinx* as a synonym of *B. naevosa*, because the only differentiating character is the size of the flowers, which according to our observations is a variable attribute. Moreover, both taxa have been reported from Michoacan, Mexico. As outgroups representative taxa of the *Epidendrum* alliance were analyzed. Out of the ten and two species that *Orleanesia* and *Caularthron* respectively have, they were represented by two species each in analyses. The segregated monotypic *Microepidendrum* (*M. subulatifolium*) was also included. *Epidendrum* is a diverse genus of ca. 1500 species and its infrageneric classification has been controversial. Hágsater (1985) divided the genus into 40 groups, without giving them formal treatment. More recently, Hágsater and Soto-Arenas (2005b) in their generic treatment of *Epidendrum* displayed an unpublished molecular consensus tree, with four main clades (all unsupported), indicating that that they will analyze further with additional character sets to define an infragenetic classification of the genus. With such a complex and controversial taxon, it was problematical to select taxa, however 12 species of *Epidendrum* were selected based on this latest proposal. *Dinema polybulbon* and *Dimerandra emarginata* (Laeliinae, *Broughtonia* alliance), *Hagsatera brachycolumna* (Laeliinae, *Encyclia* alliance), *Jacquiniella teretifolia* (Laeliinae, *Scaphyglottis* clade), *Nemaconia striata* and *Ponera exilis* (Ponerinae), *Bletia purpurea* (Bletiinae), *Scaphosepalum gibberosum* (Pleurothallidinae), and *Chysis bractescens* (Chysiinae) were selected as external groups to the *Epidendrum* alliance based in van den Berg et al (2000, 2005a), Pridgeon et al. (2001), Hágsater and Soto-Arenas (2005) and Sosa (2007). Trees were rooted with *Chysis bractescens*, the most distantly related outgroup taxon (van den Berg et al. 2005a). Vouchers and GenBank accessions are listed in Appendix 1.

Molecular characters

Total genomic DNA was isolated from fresh or from silica gel dried leaf and flower tissue using either the modified 2X CTAB method (Cota-Sánchez et al. 2006) or the DNeasy DNA Extraction Kit (Qiagen, Valencia, California), following manufacturer's protocol. The *matK* region was amplified and sequenced as a single piece, using the primers 1R and 3F (Lee et al., 2007). The *rpl32F-trnL* intergenic spacer was amplified and sequenced using primers *trnL(UAG)* and *rpl32F* following the protocols of Shaw et al. (2007). The *trnL-F* IGS was amplified and sequenced using the primers *trn-e* and *trn-f* based on Taberlet et al. (1991). The entire ITS region including the 5.8S gene was amplified and sequenced using primers ITS5 and ITS4 (White et al. 1990). Amplified products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, California, USA) following the manufacturers' protocols. Clean products were sequenced using BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on an ABI 310 automated DNA sequencer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, California, USA). All DNA fragments were sequenced in both directions.

Sequence Alignment

DNA chromatograms were proofed, edited and assembled using Sequencher 4.1 (Gene Codes, Ann. Arbor, Michigan). Each one of the four matrices, the combined cpDNA data matrix and the ITS matrix were initially aligned in Clustal X (Higgins and Sharp 1988; Thompson et al. 1997); later they were edited by eye with Se-Al v. 2.0a11 (Rambaut 2002) and data matrices were constructed with this program.

Phylogenetic Analyses

To assess character congruence between the matrix of combined plastid regions and the ITS matrix, the incongruence length difference (ILD) test (Farris et al. 1994) was performed. As implemented in Winclada, the test was performed with 500 replicates, each with 10 random additions with TBR (tree bisection and reconnection) branching swapping algorithm. Results of ILD found that the combined plastid and the ITS partitions were not congruent ($P=0.0020$). Therefore two parsimony and bayesian analyses were performed, one with the plastid matrix and another with the ITS matrix. Parsimony analyses were completed using only potentially informative characters with TNT (Goloboff et al. 2003). “Traditional searches” were carried out with 10000 replicates of random addition sequence holding 100 trees at each step, followed by TBR. The most parsimonious trees (MPT) found were collected. Support was evaluated by jackknifing by resampling 1,000 replicates using TNT with TBR set with a removal probability of 30%. A strict consensus was calculated using the “Nelsen” option in WinClada (Nixon 2002). A Bayesian inference was also conducted. Model evaluation was done using ModelTest v. 3.06 (Posada and Crandall 1998) to find the best fit according to the Akaike information criterion (Akaike 1974). Four Markov chains starting with a random tree were run simultaneously for 1,000,000 generations for the ITS matrix and 2,000,000 generations for the combined plastid matrix using MrBayes v. 3.04 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Trees were sampled every 100th generation. Trees prior to stationarity were excluded and the remaining trees were used to calculate the Bayesian posterior probabilities (PP).

Results

Phylogenetic analyses

Number of taxa in every analysis, base pairs, parsimony informative characters, models of evolution, and tree statistics for parsimony and bayesian analyses are included in Table 1. For the *rpl32F-trnL* intergenic spacer data set four indels (154-161, 267-275, 561-574, 716-721) were found and scored as four independent characters following the simple coding method indicated by Simmons and Ochoterena (2000).

The parsimony strict consensus tree of combined plastid regions shows the *Epidendrum* alliance weakly supported (jackknife (jk) support: 50%) (Figure 2). The relationships within the *Epidendrum* alliance were mostly unresolved and only a few clades received support; the two *Orleanesia* species were in a clade (jk: 92%); *Caularthron bilamellatum* and *Epidendrum avicula* (jk: 62%) were in another clade, and the species of *Barkeria* were in another clade (jk:63%). Two subclades were formed within this group; the first (jk: 87%) included *Barkeria shoemakeri*, *B. uniflora*, *B. barkeri* and *B. dorotheae*. The second included the rest of the species (jk: 74%). Within this subclade there was a small well supported group formed by *B. obovata*, *B. palmeri* and *B. naevosa* (jk: 90).

The ITS parsimony strict consensus tree showed the *Epidendrum* alliance weakly supported (jk: 53). The two *Caularthron* species were in a well supported clade (jk: 99%) as well as the two *Orleanesia* species (jk: 97%). *Barkeria dorotheae*, *B. shoemakeri*, *B. barkeri*, *B. uniflora* formed a small clade (jk: 100%). The rest of species of *Barkeria* were in a separate clade (jk: 99), with two subclades, the first (jk: 98%) included

Barkeria obovata and *B. palmeri* and the second included *B. skinneri* and *B. whartonianiana* (jk: 84%) (Figure 3).

The bayesian 50% majority rule consensus of the 316,540 trees for the combined plastid matrix provided estimates of posterior clade probabilities. Four well supported nodes (e.g., posterior probabilities (PP) > 95%) were found in the topology for the *Epidendrum* alliance taxa (Figure 2): 1) the clade of the Laeliinae subtribe (PP 100%); 2) the clade of the *Epidendrum* alliance (PP 96%); 3) the clade of the two species of *Orleanesia* (PP 100%), and 4) the *Barkeria* clade (PP 98%). Within the *Barkeria* clade two subclades received posterior probabilities, one formed by *B. barkeriola*, *B. schoemakeri*, *B. uniflora* and *B. dorotheae* (pp 100%); another formed by the rest of species (PP 99%). With regard to the *Barkeria* clade, the parsimony plastid analysis retrieved the same subclades.

The 50% majority rule consensus tree of the 97035 trees for the ITS matrix provided estimates of posterior clade probabilities. Six well supported nodes were found in the topology for the *Epidendrum* alliance taxa (Figure 3): 1) the clade of the representative taxa of the Laeliinae tribe (PP 100%), 2) the Laeliinae excepting *Hagsatera brachycaulon* (PP 99%), 3) the clade formed by the two species of *Caularthron* (PP 100%), 4) the small clade of four *Epidendrum* species (*E. ibaguense*, *E. pseudepidendrum*, *E. polyanthum* and *E. raniferum*) (PP 99%), 5) a clade in *Barkeria* (*B. melanocaulon*, *B. obovata*, *B. palmeri*, *B. skinneri*, *B. whartonianiana*, *B. spectabilis* and *B. vanneriana*) (PP 100%), and 6) a clade with two subclades (PP 94%), one with four *Barkeria* species (*B. barkeriola*, *B. dorotheae*, *B. schoemakeri* and *B. uniflora*) (PP 100%) and the second subclade with the two species of *Orleanesia* (PP 100%). Results

of parsimony and bayesian analyses with ITS coincide in retrieving the two clades in which the *Barkeria* species were grouped.

Discussion

Parsimony and bayesian analyses performed with chloroplast and with nuclear DNA retrieved trees with conflicting topologies. In the chloroplast analyses, *Barkeria* was retrieved as a monophyletic group, while in the nuclear analyses *Barkeria* species were grouped in two separate clades, the genus then retrieved as a polyphyletic group. ITS sequences have been problematic in phylogenetic analyses in a number of cases. Among reasons to explain difficulties in the use of this nuclear region are the effect of secondary structure on base substitution in ITS, resulting in non-independence of characters. Additional matters are high levels of homoplasy due to rapid evolution, as well as confounding effects when two or more paralogous copies of ITS exist in the same genome because homogenization (Alvarez and Wendel 2003; Mort et al. 2007). Paralogous copies have been reported in other Laeliinae, like in *Basiphyllaea*, and they were so different that ITS sequences of species with these copies were not used in alignment (Sosa 2007). Moreover, ITS has shown a rapid evolution and caused incongruence in the topologies retrieved from phylogenetic studies of orchid taxa (van der Niet and Linder 2008). Yet, further analyses will discard if a rapid evolution or a secondary structure in ITS caused incongruences in the *Epidendrum* alliance. In our study, parsimony and bayesian ITS analyses recovered less resolved topologies, and therefore we based our conclusions on the plastid matrix analyses.

Microepidendrum was validated by Higgins (2002), as a segregate genus from *Epidendrum*, comprising only *M. subulatifolium*. In a phylogenetic study of *Encyclia*, *Microepidendrum* was retrieved as the sister group to the rest of the Laeliinae (Higgins et al. 2003). However, our parsimony and bayesian analyses of chloroplast DNA indicated that in addition to *Epidendrum*, *Barkeria*, *Caularthron* and *Orleanesia*, the monotypic genus *Microepidendrum* should be included in the *Epidendrum* alliance. This taxon was not incorporated in this alliance by van den Berg (2005b), in the most recent proposal of classification within Laeliinae. Hågsater and Soto-Arenas (2005b) also indicated that *Microepidendrum* should be part of the *Epidendrum* alliance, but they did not provide information on analyses to support this hypothesis.

Parsimony and bayesian combined chloroplast DNA analysis supported the monophyly of *Barkeria*. Two clades were retrieved within this group. Clade A included taxa with a caespitose habit and a column appressed against the lip with widely spreading yellow wings with dark purple spots. The species are distributed in the northern area of distribution of *Barkeria*, along the Mexican Pacific and the clade is composed by *B. dorotheae*, *B. shoemakeri*, *B. barkeri* and *B. uniflora*. The second group, clade B, comprises the remainder of species, with variable vegetative and floral morphology, although they share the floral character of three simple column keels. Species in clade B have a broader distribution from Nayarit to Panama. *Barkeria palmeri*, *B. naevosa* and *B. obovata* which comprised a subclade, share characters such as three verrucose keels with the lateral veins of the lip also verrucose and conspicuous, a concave lip and have the smallest columns in the genus. The *Barkeria* clades recovered in our analyses did not coincide with the two groups proposed by Halbinger (1977). *B. shoemakeri*, which was included in a first group by Halbinger (1977), formed

part of a different assemblage in our results. Furthermore, our results neither coincided with the clades shown in the consensus by Soto-Arenas (2005); groups had different combinations in *Barkeria* than the clades retrieved here.

Although *Barkeria* was retrieved as monophyletic in combined plastid parsimony and bayesian analyses, its relationships with the rest of the taxa in the *Epidendrum* alliance remains unresolved. A systematic sampling of *Epidendrum*, with representative taxa of all its groups is required to determine status of the lineages in the alliance. Furthermore, in addition to increase the number of taxa, additional molecular characters will be needed. The combination of DNA regions such as the plastid *atpB-rbcL* intergenic spacer and the flanking *trnK* intron, the gene *matK* and the *rpoC1* gene, have been useful in determining relationships in *Maxillaria* species, a large genus of more than 500 species (Whitten et al. 2007). Study of large complex groups (like the *Epidendrum* alliance) pose huge taxonomic challenges and unparalleled opportunities to study phenomena such as changes in evolutionary diversification rates, adaptive radiations, key innovations, and chromosomal rearrangements (Berry et al. 2005). Two strategies to define taxonomic status of groups within large genera in angiosperms have been proposed. A comprehensive study including all lineages and their relatives or limited studies with certain lineages within large genera (Frodin 2004), like our study of *Barkeria*.

Acknowledgements

We thank Germán Carnevali, Alejandro Espinosa, Javier García-Cruz and Carla Gutiérrez for their valuable review to an earlier version of the manuscript. We also thank Octavio Suárez, Eleazar Carranza, Juan Castillo, Etelvina Gándara and Eduardo Ruíz for their valuable help in fieldwork. We are grateful to Ana Robles, Eva Piedra, Pablo Carrillo and Feliciano García for providing samples. The first author gratefully acknowledges support from CONACYT (scholarship 204519).

Literature cited

Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans. Automat. Contr. 19, 716-729.

Álvarez, I., Wendel, J. F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol. Phylogenet. Evol. 29, 417-434.

van der Niet, T., Linder, H. P., 2008. Dealing with incongruence in the quest for the species tree: A case study from the orchid genus *Satyrium*. Mol. Phylogenet. Evol. 47, 154-174.

Berry, P. E., Hipp, A. L., Wurdack, K. J., van Ee, B., Riina, R., 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* DNA sequence data. Am. J. Bot. 92, 1520-1534.

Cota-Sánchez, H., Remarchuk, K., Ubayasena, K., 2006. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. Plant Mol. Biol. 24, 161-167.

Dressler, R. L., 1981. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press.

Dressler, R. L., 1967. The genera *Amblostoma*, *Lanium*, and *Stenoglossum* (Orchidaceae). *Brittonia* 19, 237-243.

Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.

Frodin, D. G., 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53, 753-776.

Goldman, D. H., Freudenstein, J. V., Kores, P. J., Molvray, M., Jarrell, D. C., Whitten, W. M., Cameron, K. M., Jansen, R. K., Chase, M. W., 2001. Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences. *Syst. Bot.* 26, 670–695.

Goloboff, P.A., Farris, J., Nixon, K., 2003. TNT: Tree analysis using new technology. Program and documentation available from the authors. url <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny>.

Lee, H-L, J-S., Kim, Yi D-K., H-T Kim., S-Y Yang., K-H Weon., K-J Kim., 2007 Phylogeny of *Panax* (Araliaceae) based on complete chloroplast DNA sequences and the development of DNA barcoding markers at species level. *Botany 2007 abstracts*. <http://www.2007.botanyconference.org/engine/search/index.php?func=detail&aid=2175>.

Hágsater, E. 1985. Toward an understanding of the genus *Epidendrum*. In K. Tan (ed.). *Proceeding of the 11th. World Orchid Conference*. International press, Singapore. pp. 195-201.

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., 2005a. Transfers to *Epidendrum* from *Oerstedella* Rchb.f. Lankesteriana 5, 73-75.

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., 2005b. *Epidendrum*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P., Chase, J. M. W., and Rasmussen, F. N. (Eds.) Genera Orchidacearum: Epidendreae. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 236-251.

Halbinger, F., 1972. Historia y estudios preliminares sobre el género *Barkeria*. Orquídea (Méx) 2 7, 177-191.

Halbinger, F., 1973a. *Barkeria barkeriola*. Orquídea (Méx) 3, 229-233.

Halbinger, F., 1973b. *Barkeria chinensis*. Orquídea (Méx) 3, 13-20.

Halbinger, F., 1973c. *Barkeria elegans*. Orquídea (Méx) 3, 195-199.

Halbinger, F., 1973d. *Barkeria halbingeri*. Orquídea (Méx) 3, 195-199.

Halbinger, F., 1973e. *Barkeria halbingeri*. Orquídea (Méx) 3, 99-109.

Halbinger, F., 1973f. *Barkeria melanocaulon*. Orquídea (Méx) 3, 131-137.

Halbinger, F., 1973g. *Barkeria naevosa*. Orquídea (Méx) 3, 77-83.

Halbinger, F.,1973h. *Barkeria palmeri*. Orquídea (Méx) 3, 37-44.

Halbinger, F.,1973i. *Barkeria skinneri*. Orquídea (Méx) 3, 163-168.

Halbinger, F.,1974a. *Barkeria cyclotella*. Orquídea (Méx) 3, 299-305.

Halbinger, F.,1974b. *Barkeria lindleyana* ssp. *lindleyana*. Orquídea (Méx) 3, 335-357.

Halbinger, F.,1974c. *Barkeria lindleyana* ssp. *vanneriana*. Orquídea (Méx) 3, 367-373.

Halbinger, F.,1974d. *Barkeria naevosa* ssp. *strophinx*. Orquídea (Méx) 3, 374-379.

Halbinger, F.,1974e. *Barkeria spectabilis*. Orquídea (Méx) 3, 265-271.

Halbinger, F. 1977. Síntesis gráfica del género *Barkeria*. Orquídea (Méx).
6, 340-345.

Higgins, D. G., Sharp, P. M., 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 237-244.

Higgins, W. E., van den Berg, C., Whitten, W. M., 2003. A combined molecular phylogeny of *Encyclia* (Orchidaceae) and relationships within Laeliinae. *Selbyana* 24, 165-179.

Higgins, W. E. 2002. Validation of *Microepidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae). *Acta Botánica Mexicana* 60, 19-24.

Mort, M. E., Archibald, J. K., Randle, C. P., Levens, N. D., O'Leary, T. R., Topalov, K., Wiegand, C. M., Crawford, D. J., 2007. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *Am. J. Bot.* 94, 173-183.

Nixon, K. C., 2002. Winclada ver. 1.00.08, Ithaca, NY. Published by the author.

Nixon, K. C., Carpenter, J., 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics* 12, 221–241.

Pupulin, F., 2005. Vanishing beauty: native Costa Rican Orchids Vol.1 - *Acianthera-Kegeliella*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José. p. 421.

Pridgeon, A. M., Solano, R., Chase, M. W., 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* 88, 2286-2308.

Rambaut, A., 2002. Se-Align Sequence Alignment Editor, V2.0a11. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford.

Salazar, G. A., Arguijo, J. C., 1993. Notas sobre *Barkeria obovata* (Orchidaceae: Laeliinae) en Veracruz. Orquídea (Méx.) 13, 195-200.

Shaw, J., Lickey, E., Edward, E., Schilling, E., Small, R. L., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. Am. J. Bot. 94, 275-288.

Simmons, M. P., Ochoterena, H., 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Syst. Biol. 49, 369-381.

Sosa, V., 2007. A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Bletinae (Epidendreae, Orchidaceae). Syst. Bot. 32, 34-42.

Soto-Arenas, M. A. 1993. *Barkeria melanocaulon* y *Barkeria whartonianana*. Orquídea (Méx) 13: 233-244.

Soto-Arenas, M. A., 2005. *Barkeria*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.) Genera Orchidacearum: Epidendreae. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 199-205.

Taberlet, P., Ludovic, G., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17, 1105-1109.

Thien, L. B., Dressler R. L., 1970. Taxonomy of *Barkeria* (Orchidaceae).

Brittonia 22, 289-302.

Thompson, J.D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins D. G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Res. 24, 4876-4882

van den Berg, C., Higiins, W., Dressler, R., Whitten, M., Soto, M., Culham, A., Chase, M. W., 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Lindleyana 15, 96-114.

van den Berg, C., Douglas, G. H., Freudenstein, J., Pridgeon, A., Cameron, K., Chase, M. W., 2005a. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). Am. J. Bot. 92, 613-624.

van den Berg, C. 2005b. Laeliinae. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.) Genera Orchidacearum: Epidendreae. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 181-186.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and

T. White (eds.). PCR: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California. pp 315-322.

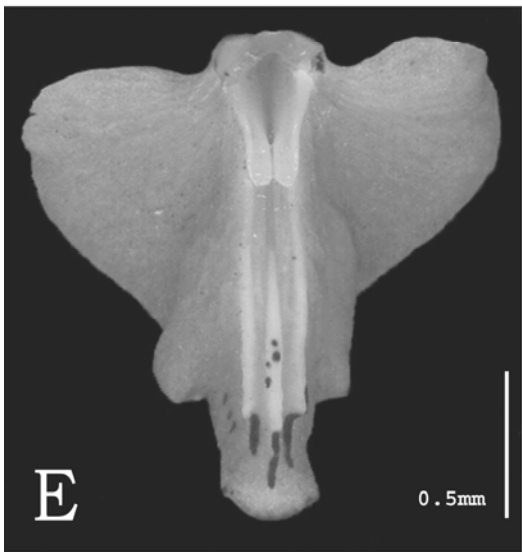
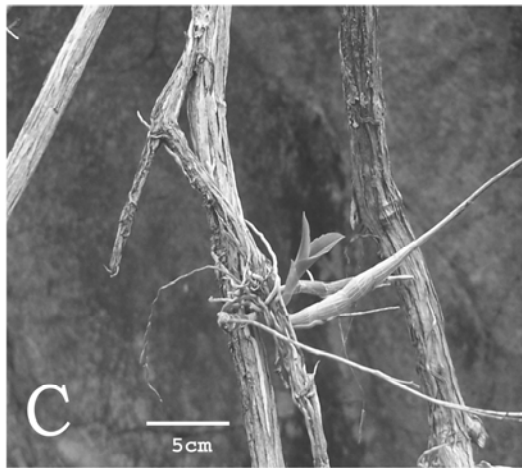
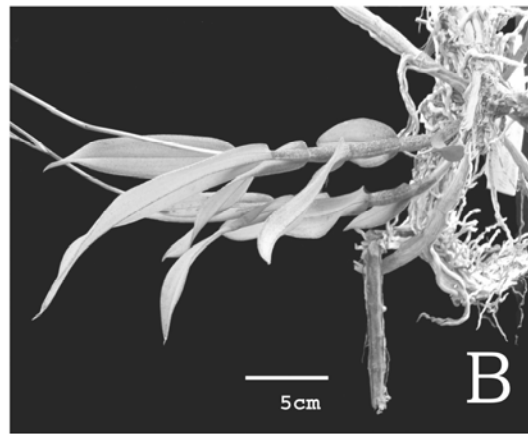
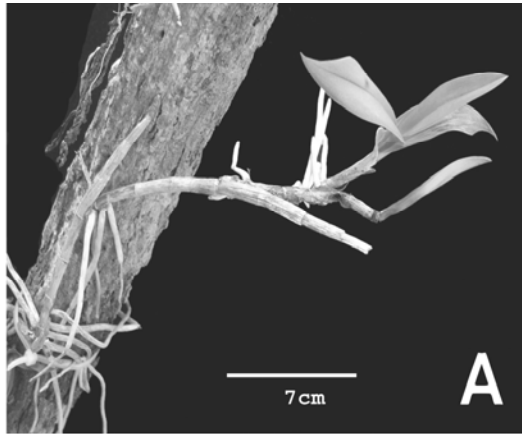
Whitten, W. M., Blanco, M. A., Williams, N. H., Koehler, S., Carnevali, G., Singer, R. B., Endara, L., Neubig, K. M., 2007. Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) based on combined molecular data sets. Am. J. Bot. 94, 1860-1889.

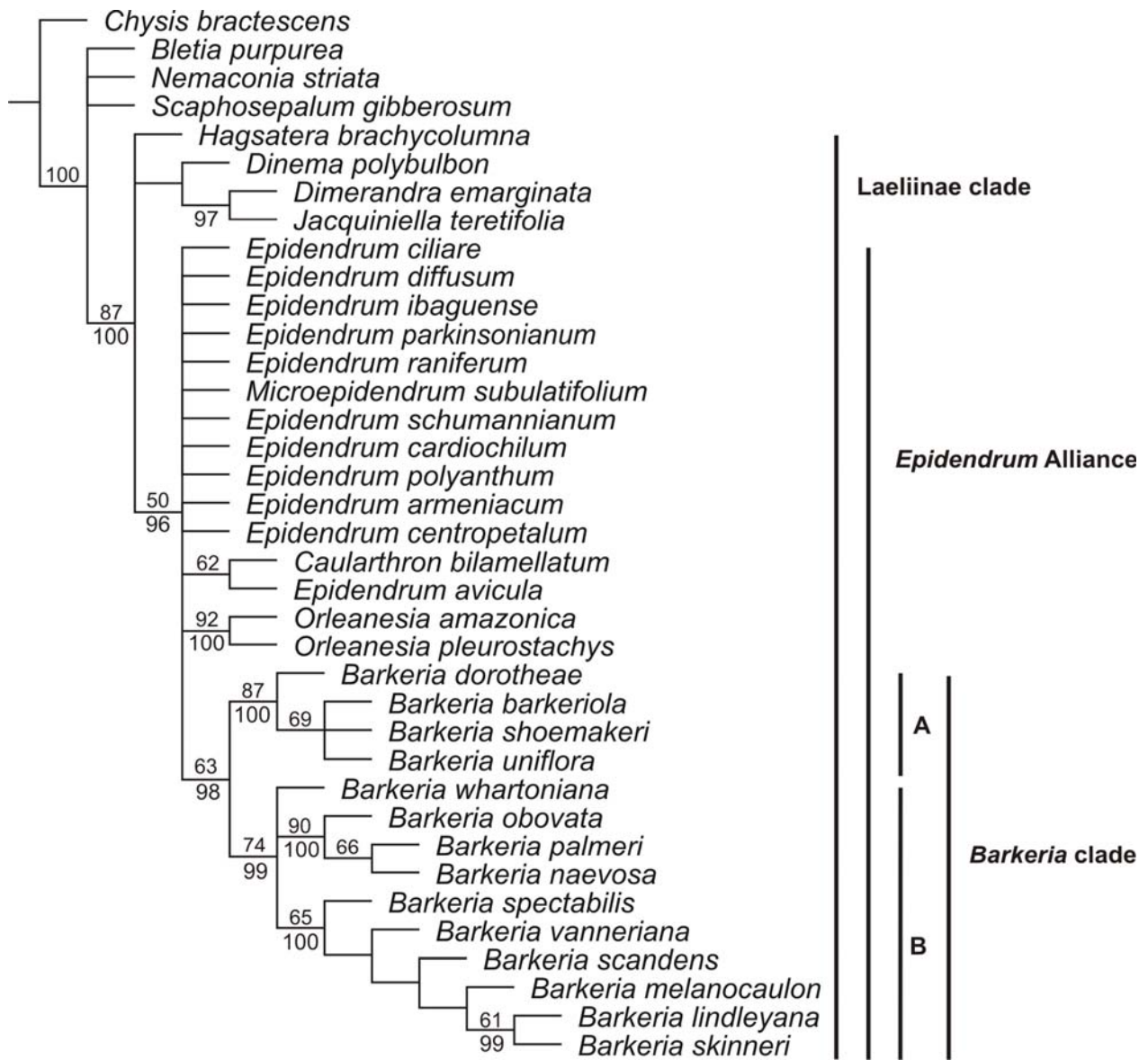
Withner, C. L., 1998. The cattleyas and their relatives. Vol. V. *Brassavola*, *Encyclia* and other genera of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. pp. 198

Fig 1. *Barkeria* **(A. B)** Habit **A.** *B. vanneriana* **B.** *B. uniflora* **(C)** *B. uniflora* in its habitat **(D)** *B. obovata* flower, frontal view showing the verrucose keels. **(E)** Lip callus of *B. whartonianiana* **(F)** *B. melanocaulon* flower, frontal view showing the wing column.

Fig 2. Strict consensus tree of 168 MPT retrieved by the combined chloroplast analysis (*rpl32F-trnL^{UAG}*, *trnL trnL-F* (IGS), *matK*). (L=197, CI=0.65, RI=0.82). Numbers above branches indicate jackknife support. Numbers below branches indicate Bayesian posterior probabilities from 2,000,000 generations.

Fig 3. Strict consensus tree of 112 MPT retrieved by ITS analysis (L=326, CI=0.47, RI=0.65). Numbers above branches indicate jackknife support. Numbers below branches indicate Bayesian posterior probabilities from 1,000,000 generations.





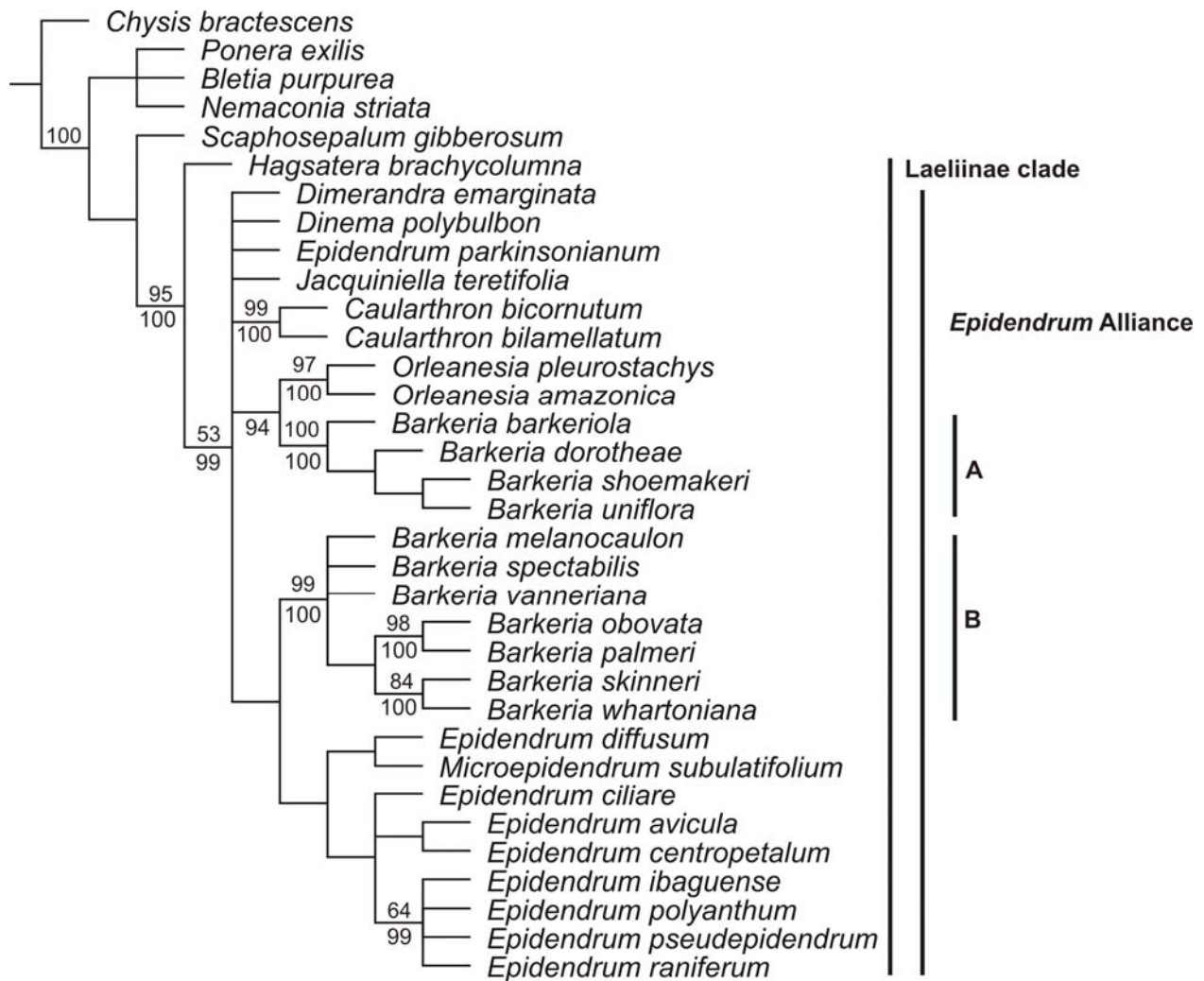


Table 1. Number of most parsimonious trees, models of evolution and tree statistics in the parsimony and bayesian analyses of the *Epidendrum* alliance. L = length; MPT = most parsimonious trees CI= consistency index; RI= retention index.

	Number of taxa	Base pairs	Parsimony informative sites	Trees in Bayesian analyses	MPT	L	CI	RI	Model of evolution
ITS matrix	34	529	116	97,035	112	326	0.47	0.65	HKY
Chloroplast matrix (<i>matK+rp132F-trnL^{UAG}+trnL-F</i> IGS)	37	2068	117	31,6540	168	197	0.65	0.82	TVMef

Appendix 1. Species, vouchers and GenBank accessions in the *Barkeria* phylogenetic study. Vouchers were deposited at XAL.

Barkeria barkeri Rchb. f.; D. Angulo, E. Ruiz and E. Gándara. 317 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria melanocaulon*** A. Rich. and Galeotti; A. Robles s/n (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria naevosa*** Schltr.; P. Carrillo-Reyes and I. Torres. 5313 (IEB); P. Carrillo and J. E. Lomeli. 5106 (IEB) (requested to GenBank); ***Barkeria obovata*** (Presl.) Christenson; D. Angulo and F. García. 209 (XAL) (requested to GenBank); D. Angulo and O. Suárez. 303 (XAL) (requested to GenBank); E. M. Piedra. 286 (XAL); ***Barkeria palmeri*** Schltr.; D. Angulo, E. Ruiz and E. Gándara. 318 (XAL) (requested to GenBank); D. Angulo, E. Ruiz and E. Gándara. 320 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria scandens*** Dressler & Halb.; D. Angulo and O. Suárez. 300 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria spectabilis*** Bateman; D. Angulo and O. Suárez. 308 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria shoemakeri*** Halb.; D. Angulo and O. Suárez. 301 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria skinneri*** Paxton; AF260171, van den Berg, C et al. (2000); AF267067, van den Berg, C. (2000); D. Angulo. 302 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria uniflora*** Dressler and Halb.; D. Angulo, E. Ruiz and E. Gándara. 309 (XAL); D. Angulo, E. Ruiz and E. Gándara. 316 (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria vanneriana*** Rchb. f.; Octavio Suárez (s/n) (XAL) (requested to GenBank); ***Barkeria whartonia*** (C. Schweinf.) Soto Arenas; AF263754, C. van den Berg (unpublished); AY008517, C. van den Berg et al. (2000); Germán Carnevali s/n (CICY) (requested to GenBank); ***Barkeria dorotheae*** Halb.; D. Angulo, E. Ruiz and E. Gándara 319 (XAL) (requested to GenBank); ***Bletia purpurea*** (Lam.) DC.; DQ445828, V. Sosa (2007); AY121719, C. van den Berg (unpublished); AY008452, C. van den Berg

(unpublished); ***Chysis bractescens*** Lindl.; AF260150, C. van den Berg et al. 2000
(unpublished); EF079351, M. Gorniak and D.L. Szlachetko (unpublished); AF266971, C.
van den Berg (unpublished); ***Caularthron bilamellatum*** (Rchb. f.) R.E. Schult.;
AF260173, C. van den Berg et al. (unpublished); AF263780, C. van den Berg
(unpublished); AF267001, C. van den Berg (unpublished); ***Caularthron bicornutum***
Raf.; AY008518, C. van den Berg et al. (2000); ***Dimerandra emarginata*** (G. Mey.)
Hoehne; AF260179, W.E. Higgins et al. (2003); AY425795, W.E. Higgins et al. (2003);
AF267008, C. van den Berg (unpublished); ***Dinema polybulbon*** Lindl.; AY429399,
W.E. Higgins et al. (2003); AY396110, W.E. Higgins et al. (2003); AY422413, W.E.
Higgins et al. (2003); ***Epidendrum armeniacum*** Lindl.; AF266993, C. van den Berg
(unpublished); ***Epidendrum avicula*** Lindl.; AF266998, C. van den Berg (unpublished);
AF260169, C. van den Berg et al. (unpublished); ***Epidendrum cardiochilum*** L. O.
Williams.; D. Angulo. 326 (XAL) (requested to GenBank); ***Epidendrum centropetalum***
Rchb. f.; AF260175, C. van den Berg et al. (unpublished); AF267003, C. Van Den Berg
(unpublished); ***Epidendrum ciliare*** L.; AY008503, C. van den Berg et al. (2000); D.
angulo. 322 (XAL) (requested to GenBank); ***Epidendrum diffusum*** Sw. D. Angulo. 327;
Epidendrum ibaguense Kunth; AY422382, W.E. Higgins et al. (2003); AY008505, C.
van den Berg et al. (2000); AY396079, W.E. Higgins et al. (2003); ***Epidendrum***
parkinsonianum Hook. D. Angulo. 325 (XAL) (requested to GenBank); ***Epidendrum***
polyanthum Lindl.; D. Angulo. 324 (XAL) (requested to GenBank); ***Epidendrum***
pseudepidendrum Rchb. f.; AF266986 C. van den Berg et al. (unpublished);
AF260160, C. van den Berg et al. (unpublished); AF263753, C. van den Berg et al.
(unpublished); ***Epidendrum raniferum*** Lindl. D. Angulo. 323 (XAL) (requested to
GenBank); ***Epidendrum schumannianum*** Schltr.; EU214416, R. Lahaye et al. (2008-

In press); **Hagsatera brachycolumna** (L.O. Williams) R. González; AY396088, W.E. Higgins et al. (2003); AY422391, W.E. Higgins et al (2003); AY008515, C. van den Berg et al. (2000); **Jacquiiniella teretifolia** (Sw.) Britton and P. Wilson; AY008519, C. van den Berg et al. (2000); AY396087, W.E. Higgins et al. (2003); AY422390, W.E. Higgins et al. (2003); **Microepidendrum subulatifolium** (A. Rich. and Galeotti) W. E. Higgins; AY429417, W.E. Higgins et al. (2003); AY396137, W.E. Higgins et al. (2003); AY422441, W.E. Higgins et al. (2003); **Nemaconia striata** Lindl.; AY008484, C. van den Berg et al. (2000); AY396077, W.E. Higgins et al. (2003); AY422380, W.E. Higgins et al. (2003); **Orleanesia amazonica** Barb. Rodr.; AF260176, W.E. Higgins et al. (2003); AY425799, W.E. Higgins et al. (2003); AY422450, W.E. Higgins et al. (2003); **Orleanesia pleurostachys** (Linden and Rchb. f.) Garay and Dunst.; AY008525, C. van den Berg et al. (2000); AY425800, W.E. Higgins et al. (2003); AY422451, W.E. Higgins et al. (2003); **Ponera exilis** Dressler; AF260144, C. van den Berg et al. (unpublished); AF266964, C. van den Berg (unpublished); **Scaphosepalum gibberosum** Rolfe; A.M. AF262817, Pridgeon et al. (2001); AF265458, A.M. Pridgeon et al. (2001); AF265503, A.M. Pridgeon et al. (2001);

CAPITULO III. CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Los análisis de parsimonia y bayesianos de ADN de cloroplasto combinado recuperan al género *Barkeria* como un grupo monofilético, mientras que la región de ITS nuclear es recuperada como un grupo polifilético en ambos análisis. Sin embargo, ya se ha evidenciado en diversos trabajos que la región de ITS presenta dificultades con el alineamiento, altos niveles de homoplasia debido a su rápida evolución, así como la presencia de dos o más copias parálogas en el mismo genoma, que podrían ocasionar confusión en el análisis (Alvarez y Wendel 2003; Mort et al. 2007).

La prueba de ILD (Farris et al. 1994) detectó incongruencia entre la matriz combinada de regiones de cloroplasto y la matriz de la región nuclear, por lo que no fueron combinadas para un análisis de evidencia total.

Los análisis de parsimonia y bayesianos de ADN de cloroplasto recuperan a *Barkeria* como un grupo monofilético. Dos clados fueron recuperados dentro de este grupo. El primero denominado “clado A” (figura 2), está conformado por taxa con un hábito de crecimiento cespitoso, una columna adpresa al labelo, alas amarillas prominentes y con puntos rojo-púrpura. Este clado incluye a *Barkeria dorotheae*, *B. shoemakeri*, *B. barkeriola* y *B. uniflora*, que presentan la distribución más septentrional del género.

El segundo grupo, aquí denominado “clado B”, está conformado por el remanente de especies en el género que presentan características vegetativas y florales muy variables y solo comparten la característica morfológica de tres quillas glabras. En este grupo la posición de *Barkeria warthoniana* queda sin resolución. Las

especies que conforman este clado presentan la más amplia distribución de Nayarit a Panama. *Barkeria palmeri*, *B. naevosa* (no incluida en ITS) y *B. obovata*, conforman un subclado con características morfológicas muy particulares como quillas verrucosas, así como venas laterales verrucosas en el labelo, éste es cóncavo y con la columna más pequeña para el género. Un segundo subclado incluye especies distribuidas del sureste de Oaxaca y Chiapas hasta Centroamérica. Conforman este clado *B. vanneriana*, *B. scandens*, *B. melanocaulon*, *B. skinneri*, *B. spectabilis* y *Barkeria lindleyana*, esta última endémica de Costa Rica. Este grupo presenta una gran variación en los caracteres tanto vegetativos como florales, algunas especies son epífitas y otras litófitas, unas presentan hábito de crecimiento cespitoso y otras un hábito de crecimiento escandente con el nuevo pseudobulbo naciendo del tercer o cuarto entrenudo del pseudobulbo anterior.

Los clados recuperados en nuestros análisis no coinciden con los grupos propuestos por Halbinger (1977) y Soto-Arenas (2005). Sus resultados muestran diferentes agrupaciones respecto a los clados encontrados en este estudio. Como se mencionó anteriormente, la propuesta de Halbinger (1977) se basó únicamente en caracteres morfológicos y algunos ecológicos, agrupados por criterios subjetivos. En el caso del análisis filogenético morfológico de Soto-Arenas (2005) no se detallaron ni los caracteres utilizados, ni los métodos cladísticos de análisis. Esto puede explicar las diferencias encontradas.

A pesar de que *Barkeria* se recupera como un grupo monofilético en el análisis combinado de cloroplasto, la relación con el resto de las especies de la alianza *Epidendrum* no fue resuelta con los caracteres usados en este estudio. La combinación de más regiones de DNA de cloroplasto como el espaciador *atpB-rbcL*, el intron *trnK* y

el gen *rpoC1*, podrían mejorar la resolución en la alianza *Epidendrum*, ya que han sido probados para delimitar las relaciones filogenéticas en las especies de *Maxillaria*, un género de más de 500 especies (Whitten et al. 2007).

En el estudio filogenético del género *Encyclia* (Higgins et al. 2003), las dos secuencias de *Microepidendrum* utilizadas en el análisis, fueron recuperadas en un clado hermano del resto de las Laeliinae. Sin embargo, nuestros resultados de análisis de parsimonia y bayesianos de ITS y ADN de cloroplasto, señalan que en adición a *Epidendrum*, *Barkeria*, *Caularthron* y *Orleanesia*, el género monotípico *Microepidendrum* (*Microepidendrum subulatifolium*) debe ser incluido en la Alianza *Epidendrum*. Hágater y Soto-Arenas (2005) también demuestran que *Microepidendrum* podría ser parte de la alianza *Epidendrum*, pero como mencionamos antes, las secuencias de ADN y los análisis no fueron publicados para validar esta hipótesis. Este taxón no fue incorporado en esta alianza por van den Berg (2005a, b), en la más reciente propuesta de clasificación de las Laeliinae.

En conclusión los resultados de nuestro estudio demuestran que *Barkeria* constituye un linaje en la Alianza *Epidendrum*. Sin embargo, los marcadores moleculares no arrojaron suficiente variabilidad para resolver su estatus taxonómico, por lo que nuevos marcadores que han resultado variables en otros grupos podrían ser probados.

Un mayor esfuerzo de muestreo de las especies en *Epidendrum*, incluyendo taxa representativos de todos los grupos, así como la inclusión en el análisis de caracteres

morfológicos y moleculares adicionales, son necesarios para esclarecer el estatus taxonómico de los géneros en la alianza.

Literatura citada

Álvarez, I., Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417-434.

Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.

Hágsater, E., Soto-Arenas, M. A., 2005. *Epidendrum*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P., Chase, J. M. W., and Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendreae*. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 236-251.

Halbinger, F. 1977. Síntesis gráfica del género *Barkeria*. *Orquídea (Méx.)* 6, 340-345.

Higgins, W. E., van den Berg, C., Whitten, W. M., 2003. A combined molecular phylogeny of *Encyclia* (Orchidaceae) and relationships within Laeliinae. *Selbyana* 24, 165-179.

Mort, M. E., Archibald, J. K., Randle, C. P., Levens, N. D., O'Leary, T. R., Topalov, K., Wiegand, C. M., Crawford, D. J., 2007. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *Am. J. Bot.* 94, 173-183.

Soto-Arenas, M. A., 2005. *Barkeria*. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendreae*. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 199-205.

van den Berg, C., Douglas, G. H., Freudenstein, J., Pridgeon, A., Cameron, K., Chase, M. W., 2005a. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 92, 613-624.

van den Berg, C. 2005b. Laeliinae. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera Orchidacearum: Epidendreae*. Oxford University Press, Oxford. Part 1, Vol. 4. pp. 181-186.

A, W. M., Blanco, M. A., Williams, N. H., Koehler, S. Carnevali, G., Singer, R., Endara, L., Neubig, K. M., 2007 . Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) based on combined molecular data set. *Am. J. Bot.* 94, 1860-1889.

