

**RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE GENEROS DE LA SUBTRIBU
ONCIDIINAE (EPIDENDROIDEAE: ORCHIDACEAE) Y UN NUEVO GÉNERO:
SANTANDERELLA**

Sonia Rocío Quintanilla Quintero¹

Alberto Gómez Gutiérrez²

Pedro Ortiz Valdivieso, s.j.³

Jaime Eduardo Bernal Villegas⁴

Resumen

Santanderella, es un nuevo género de orquidea de Colombia con la especie tipo *santanderella amado-rinconiana*, la cual fenotípicamente está relacionada con *Notylia* y con *Macroclinium*. Se realizó un análisis filogenético molecular utilizando secuencias de ADN del cloroplasto (*matK-trnK*) y secuencias de ADN ribosomal (*ITS1-5.8S-ITS2*). También se desarrolló un análisis filogenético combinando los datos moleculares y los datos de los caracteres morfológicos que se usan como clave taxonómica. Los resultados sugieren que *Santanderella* es un nuevo género desde el punto de vista fenotípico, ecológico y molecular, que no puede incluirse

¹ Bacterióloga y laboratorista clínico UCMC- Bogotá Colombia, Maestría en Ciencias -Biología UNAL – Bogotá Colombia, Docente Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, squintanilla@javeriana.edu.co, 3208320 ext. 2787

² Biólogo y Microbiólogo U. Andes- Bogotá Colombia, Doctorado en bioquímica/ inmunología Université De Paris VII – París Francia, Docente Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, agomez@javeriana.edu.co, 3208320 ext. 2792

³ Doctorado Pontificio Instituto Bíblico- Roma Italia, Sociedad Bogotana de Orquideología, Colombia, porval@gmail.com, 3208320 ext. 5832

⁴ Doctor en medicina PUJ, Doctorado Department of Human Genetics University of Newcastle upon Tyne (UK), Director Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, jebernal@gmail.com, 3208320 ext. 2794

dentro del género *Macroclinium* ni en el género *Notylia* que además es una especie endémica colombiana.

Abstract

Santanderella is a new genus of orchid from Colombia with the species *santanderella amado-rinconiana*, which is related phenotypically to *Macroclinium* and *Notylia*. We conducted a molecular phylogenetic analysis using chloroplast DNA sequences (*matK-trnK*) and ribosomal DNA sequences (*ITS1-5.8S-ITS2*). Also, we developed a phylogenetic analysis combining molecular data and morphological data that are used as taxonomic key. The results suggest that *Santanderella* is a new genre from the phenotypic, ecological and molecular point of view, which cannot be included within the *Macroclinium* or *Notylia* genre, which is also an endemic species in Colombia.

Palabras claves

Orchidaceae, Oncidiinae, *Santanderella*, Colombia, *matK-trnK*, *ITS1-5.8S-ITS2*.

Keywords

Orchidaceae, Oncidiinae, *Santanderella*, Colombia, *matK-trnK*, *ITS1-5.8S-ITS2*.

Introducción

Se recolectó una planta de orquídeas perteneciente a la subtribu Oncidiinae (sensu R. Dressler, 1981) y que muestran afinidad con los géneros *Notylia* Lindl. y

Macroclinium Barb. Rodr. Ésta planta fue recogida por Jonathan Amado en Floridablanca, Santander, (Colombia) y reportada por Orlando Rincón en 2009.

Una serie de caracteres de este espécimen mostró afinidad con especies de *Notylia*:

- planta epífita, cespitosa, con pseudobulbos unifoliados.
- Hojas conduplicadas (dorso- ventralmente aplanadas).
- Inflorescencia en racimo plurifloro, péndulo.
- Antera dorsal, bastante grande.
- Polinario con estípite estrecho y alargado
- Estigma ventral, como fisura estrecha longitudinal

Muchos de estos caracteres se encuentran también en el género *Macroclinium*, sin embargo, la estructura de la columna y los polinios, en adición a las características de los sépalos y pétalos, y en especial de los labios, presentan marcadas diferencias en comparación con las de los géneros cercanos.

La *Santanderella* tiene algunas características fenotípicas particulares como son tener flores que no se abren completamente (lo que parece ser una condición general de todas las plantas de esta especie visto por los coleccionistas), con los sépalos y pétalos estrechos, y un labio que es diferente de todas las formas de labios "notyliiformes" vistos hasta ahora. Éste es muy estrecho, con un par de pequeños lóbulos redondeados en la base, luego se vuelve estrecho de nuevo, y luego se ensancha un poco, con un ápice subagudo. No hay callo. (característica que es común a las flores de *Macroclinium*). La columna es relativamente corta, con

una parte basal en el terete y se ensancha apicalmente en dos alas obtusas irregulares que se fusionan ventralmente formando un ángulo agudo. Hay un clinandrio con paredes bastante altas y en el interior de la cavidad del rostelo se destaca, que es espesa y alta en la base y se extiende hacia delante en una punta aguda. La columna no se dobla hacia atrás como en la mayoría de las especies de *Notylia*. En la parte ventral del rostelo, el estigma puede ser visto como una estrecha rendija. La antera es similar a las conocidas en *Notylia* y *Macroclinium*. Sin embargo, los polinios son más notables. Hay dos polinios, como en todos los *Oncidiinae*, pero a diferencia de los polinios de *Notylia* y *Macroclinium*, los de “*Santanderella*” son bastante grandes, alargados, aplanados y cóncavos. Este tipo de polinios, por lo que sabemos, no se encuentra en ninguna especie conocida hasta ahora, de *Notylia* o *Macroclinium*. Los géneros de la subtribu *Oncidiinae* cercanos a *Notylia* y *macroclinium* han sido definidos y caracterizados de diferentes maneras a nivel fenotípico, como puede verse en el estudio publicado por Pupulin (1997). Según éste estudio, la principal diferencia entre *Notylia* y *Macroclinium* radica en la forma de las hojas: dorso-ventralmente aplanadas (*Notylia*) vs lateralmente aplanadas (*Macroclinium*). Las hojas de “*Santanderella*” la especie que nos ocupa son dorso-ventralmente aplanadas, pero son en forma de V. Todo el análisis fenotípico puede ser consultado en *Orquideología* (Medellín) 27(2): 167-178, 2011 (sub 2010) (Ortiz, 2011).

Por tanto, llegamos a la conclusión que había que establecer un nuevo género para acomodar ésta nueva especie dentro de éste. Aunque el establecimiento de nuevos géneros monotípicos no es lo ideal, pero las claves taxonómicas

establecidas para clasificar cada género en algunos casos muestran que hay especies que no pueden ser clasificados dentro de ninguno de los géneros conocidos actualmente. por otra parte, no es el único género monotípico dentro de este grupo algunos que se pueden nombrar son: *Notyliopsis*, *Sarmenticola*, *Chelyorchis*, *Hintonella*, *Hofmeisterella* y *Schunkea*.

Con el fin de esclarecer la posición filogenética de ésta nueva especie, se procedió realizar un análisis molecular con códigos de barras de ADN (marcadores plastídicos y nucleares *matK-trnK* e *ITS1-5.8S-ITS2*) para determinar las afinidades filogenéticas de este eventual nuevo género con otras especies de orquídeas de la misma subtribu, reportadas por nosotros y otros en el GenBank.

Materiales y Métodos

Selección de taxones y muestras

Se seleccionaron 25 muestras cada una representativa de una especie endémica de la subtribu Oncidiinae (*Notylia incurva*, *Macroclinium xiphophorum*, *Oncidium cultratum*, *Oncidium pyramidale*, *Oliveriana ortizii*, *Notyliopsis beatricis*, *Odontoglossum luteopurpureum*, *Oncidium globuliferum*, *Oncidium carthagenense*, *Oncidium fuscatum*, *Brassia* sp, *Macradenia brassavolae*, *Oncidium lanceanum*, *Telipogon nervosus*, *Trichocentrum pulchrum*, *Otoglossum* sp, *Psychopsis krameriana*). Las muestras de “*Santanderella*” serán recolectadas por el padre

Pedro Ortiz Valdivieso en Floridablanca (Sant.) y Bucaramanga (Sant.) y las restantes serán aportadas por la colección personal del padre Ortiz o bien del Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana (HPUJ) y éstas especies serán clasificadas con el criterio taxonómico del padre Pedro Ortiz Valdivieso, S.J.

Para el análisis filogenético se utilizaron secuencias tomadas del genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) de taxones cercanos a los géneros problema: *Macroclinium*, *Notylia* y *Santanderella*, para hacer un muestreo mayor y conocer cuál de éstos era más cercano con el nuevo género en cuanto a distancias genéticas. Se utilizaron las secuencias de la especie *Maxilaria aciantha* como grupo externo (outgroup) ya que pertenece a la subtribu Maxillariinae

Extracción de ADN y Amplificación

Las muestras frescas (hojas o flores completas) se colectaron en bolsa ziploc y posteriormente se enviaron al laboratorio para se preservaran a -20°C en presencia de sílica gel. La extracción de ADN y amplificación de los tres genes utilizados (*trnL-F*, *matK* e *ITS1 y 2*) se realizó a partir del método modificado y publicado por el grupo del Instituto de Genética Humana en la caracterización de diferentes géneros de orquídeas a partir de material fresco (Quintanilla et al, 2010; 2011).

Secuenciación de los productos amplificados

Se realizó la purificación de los amplificados con el método de etanol. Las secuencias se analizaron utilizando los software Sequencer 4.8 ®. El alineamiento

de las secuencias se hizo utilizando el programa BioEdit v. 7.0 (Sequence Alignment Editor) (Hall y col, 1999).

Análisis filogenético

Para calcular las distancias genéticas de los datos de secuencias como los modelos propuestos por Jukes and Cantor (1969) y Kimura (1980). Se utilizaró el programa PHYLIP v. 3.68 (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein 1993). Para inferir los filogramas de de máxima probabilidad o verosimilitud y de máxima parsimonia se utilizo el programa PAUP versión 4.0 (Swofford, 2002.), así como el programa TREEVIEW v.1.6.6 (Page R.D:M, 2001) para visualizar los árboles filogenéticos.

Resultados

Se obtuvieron secuencias para los dos marcadores en todas las muestras seleccionadas para realizar el análisis. Se procedio a realizar el análisis filogenético primero con cada marcador por separado, luego combinando los dos marcadores para realizar una búsqueda heuristica más potente y después utilizando los marcadores moleculares y los caracteres morfologicos mas relevantes d elas especies en cuestión (Pridgeon, 2009; Chase 2005)

Análisis con ITS 1 y 2.

La correspondiente búsqueda de maxima parsimonia (MP) para el marcador nuclear ITS1 y 2 dio como resultado 3.414 árboles de 179 pasos (CI (indice de consistencia) = 0,65; RI (indice de retencion) = 0,82). La matriz alineamiento dio

como resultado 558 caracteres de los cuales el 7.9% eran parsimoniosamente informativos. La búsqueda de máxima verosimilitud (ML) llevó a un árbol con $-\ln L = 1807.26573$. Las topologías obtenidas a través de la MP y ML análisis fueron congruentes con respecto a todos los clados con un soporte de las ramas alto. En éste análisis la *Santanderella* se ubico en un clado genético alejado de los géneros *Notylia* y *Santanderella*.

Análisis con matK-trnK

La correspondiente búsqueda de máxima parsimonia (MP) para el marcador plastídico MatK dio como resultado 9543 árboles de 412 pasos (CI = 0,43; RI = 0,75). La matriz alineamiento dio como resultado 1194 caracteres de los cuales el 10% eran parsimoniosamente informativos. La búsqueda de máxima verosimilitud (ML) llevó a un árbol con $-\ln L = 1678.39578$. Las topologías obtenidas a través de la MP y ML análisis fueron congruentes con respecto a todos los clados con un soporte de las ramas alto. En éste análisis la *Santanderella* se ubico en un clado genético alejado de los géneros *Notylia* y *Santanderella*.

Análisis combinado con el marcador nuclear y el marcador plastídico

En la prueba de hipótesis alternativa donde se Compararon los resultados más óptimos de los mejores árboles y también los mejores árboles, dada la hipótesis, se utilizaron la prueba de templeton (topología con *ITS*, $p < 0.0001$; topología con matK, $p = 0.34$) y la prueba de incongruencia de longitud ILD (del inglés *Incongruence Length Difference*) ($P = 0.001$) sugerian que las topologías obtenidas utilizando los marcadores por separado generaban organización de los clados no

congruentes, por lo que era necesario utilizar los marcadores en un análisis combinando las secuencias obtenidas en las diferentes especies con los otros marcadores, con el fin de obtener relaciones filogenéticas consistentes entre especies en los filogramas realizados bajo el algoritmo de MP y bajo ML.

Los datos obtenidos en el análisis combinado (ITS y matK-trnK) contenían muchos “gaps” o vacíos (superiores a 20 pb) y produjo una matriz de alineamiento de 1611 caracteres. El análisis de MP (máxima parsimonia) para los dos marcadores combinados resultó en 6478 árboles con 749 pasos con un CI de 0.52 y un RI de 0.73; en general, el 17.9% de los sitios incluidos en el análisis fueron informativos. En este análisis la *Santanderella* se ubicó en un clado genético alejado de los géneros *Notylia* y *Santanderella* y en un clado más cercano al “outgroup” o grupo control *Maxillaria aciantha*.

Discusión

El espécimen estudiado morfológicamente es una especie inusual, (Ortiz, 2011) además posee características ecológicas que hacen pensar que se trata de un nuevo género. El hábitat y las características florales de esta especie podrían considerarse un puente en la brecha entre *Macroclinium* y *Notylia*, sin embargo, el análisis molecular combinado entre los marcadores nucleares y plastídicos muestra que la *Santanderella* no pertenece al género *Notylia* ni al género *Macroclinium*. Todos los filogramas realizados demostraron que *Santanderella* es un nuevo grupo al ser comparado con otros géneros de la subtribu *Oncidiinae*. Las

claves taxonómicas actuales que clasifican a las orquideas de éstos géneros no pueden ubicar a la *Santanderella* como una especie de ninguno de los géneros que existen dentro de la subtribu Oncidiinae (Pridgeon, 2009), por tanto, se concluye que a nivel molecular y a nivel fenotípico la *Santanderella amadorinconiana* claramente es un nuevo género que no pertenece ni al género *Notylia* ni al género *Macroclinium* y que se ubica dentro de la subtribu Oncidiinae (Quintanilla, 2011).

Se hace necesario realizar los análisis filogenéticos combinando marcadores plastídicos y marcadores nucleares, debido a la historia evolutiva intrínseca de cada uno de ellos en cada individuo y a lo largo del tiempo de evolución de la especie, también es importante tener en cuenta para realizar éste tipo de análisis moleculares la información morfológica del individuo, la cual es una información valiosa para poder definir las claves taxonómicas de una especie.

Bibliografía

Chase, M., Hanson, L., Albert, v. a., Whitten, w. m. and Williams, N. H. 2005. Life history and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95(1):191-199.

Chase, M. and Hills, H. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.

Chase, M. and Whitten, M. 2011. Further taxonomic transfers in Oncidiinae (Orchidaceae). *Phytotaxa* 20: 26-32.

Doyle, J. A. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry* 19: 11-15.

Dressler, R. L. 1981. *The Orchids. Natural history and classification*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press, p. 211-225.

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

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791

GeneBank. In: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank. Consulted on 23-03-2011.

Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. R., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 751-755.

Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969 Evolution of protein molecules. In: Munro H. N. *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.

Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 78, 454-458.

Maddison, D. R. and Maddison, W. P. 2005. *MacClade 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Version 4.08*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Ortiz V., P. 2011 (sub 2010). *Santanderella*, a Colombian new genus in the Oncidiinae (Orchidaceae). *Orquideología XXVII* (2): 167-178.

Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Pridgeon, A. M., Solano, R., and Chase, M. 2001. Phylogenetic relationships of Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 88: 2286-2308

Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase M. W. and Rasmussen F. N. 2009. *Genera Orchidacearum* 5, Part 2. Oxford University Press, Oxford, UK.

Pupulin, F. 1997. Una sinossi del genere *Macroclinium* (Orchidaceae: Oncidiinae) *Caesiana* 9: 1-20.

Quintanilla, S. R., Ortiz, P., Bernal, J. E. and Gómez, A. 2010. Molecular characterization and phylogenetic relationships among genera of the subtribe Oncidiinae (Epidendroideae: Orchidaceae) and a new genus tentatively called "*Santanderella*". Botany Conference 2010. Providence, Rhode Island, USA, July 31-August 4.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Salazar G. A., Cabrera L. I., Madriñán S. and Chase M. 2009. Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 104(3): 403-416.

Senghas, K. 1996. Subtribus: Notyliinae in R. Schlechter, *Die Orchideen*, I/C, 3rded. (Berlin, PareyBuchverlag). pp. 1977-1944; Nachträge: 73. Notyliinae: pp. 2794-2797.

Sun, Y., Skinner, D. Z, Liang G. H. and Hulbert, S. H. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.

Swofford, D. 2002 PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, D., Gibson, J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.

Vanderpoorten, A. and Shaw, J. 2010. The application of molecular data to the phylogenetic delimitation of species in briophytes: A note of caution. *Phytotaxa* 9: 229-237