



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

FILOGENIA MOLECULAR DE LAS ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *Dracula*  
(*Orchidaceae*) USANDO EL MARCADOR MOLECULAR *ycf1*

AUTORAS

Cynthia Daniela Calderón Parreño

Jennifer Carolina Prexl Zurita

AÑO  
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

FILOGENIA MOLECULAR DE LAS ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *Dracula*  
(*Orchidaceae*) USANDO EL MARCADOR MOLECULAR *ycf1*

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología.

Profesor Guía

PhD Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Autoras

Cynthia Daniela Calderón Parreño

Jennifer Carolina Prexl Zurita

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Filogenia molecular de orquídeas del género *Dracula* (*Orchidaceae*) usando el marcador molecular *ycf1*, a través de reuniones periódicas con las estudiantes Cynthia Daniela Calderón Parreño y Jennifer Carolina Prexl Zurita, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Doctor en Agrotecnología

C.I. 1716829666

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Filogenia molecular de orquídeas del género *Dracula* (*Orchidaceae*) usando el marcador molecular *ycf1*, a través de reuniones periódicas con las estudiantes Cynthia Daniela Calderón Parreño y Jennifer Carolina Prexl Zurita, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Ing. María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Biología Molecular. Bioquímica y Biomedicina.

Especialidad en patología Molecular

C.I. 1712995149

## DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

"Declaro haber dirigido el trabajo, Filogenia molecular de orquídeas del género *Dracula* (*Orchidaceae*) usando el marcador molecular *ycf1*, de las estudiantes Cynthia Daniela Calderón Parreño y Jennifer Carolina Prexl Zurita, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Luis Enrique Baquero Rivadeneira

Licenciado en Ciencias Biológicas

C.I. 1707146187

## DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

---

Cynthia Daniela Calderón Parreño

C.I. 0550053946

---

Jennifer Carolina Prexl Zurita

C.I. 1722345251

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos en primer lugar a Dios por guiarnos a lo largo de la carrera, a nuestras familias por el apoyo incondicional que nos han brindado. A la Universidad de las Américas y de una manera especial al Lic. Luis Enrique Baquero y al Dr. Vinicio Armijos, quienes nos dieron la oportunidad de desarrollar el trabajo de investigación, que con sus aportes valiosos nos supieron orientar de una manera profesional y desinteresada para culminar con éxito este proyecto.

*Daniela y Jennifer*

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo a mis papas Mayra y Walter, quienes con su amor, esfuerzo y apoyo incondicional logré culminar mis estudios. A mi hermana Alejandra, quien brinda su apoyo y fortaleza. Para mis abuelitos Rosa y Alberto, a quienes les considero mis segundos padres, gracias por sus consejos, enseñanzas y por brindarme su amor y apoyo que me alienta a seguir adelante en cada meta trazada. A mis tías Anita y Verónica, quienes me brindaron su apoyo moral y por ser parte de esta etapa de mi vida. A Juan Diego, quien con su amor y motivación me ayuda a seguir adelante.

*Daniela Calderón Parreño*

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a Dios. A mi abuela Clori, quién con su ejemplo, amor y fuerza me impulsó desde el principio y ahora lo sigue haciendo como mi ángel y amor eterno.

A mi mamá Silvia a quién admiro por su amor, esfuerzo y dedicación. A mi padre Paúl, quién fue de gran apoyo para finalizar mis estudios. A mi abuelo Manu, quién alegra mis días con su amor. A mi tía Mishelle quién me apoya, escucha y cuida como una hermana. Para Andrés, quién con su amor, alegría y apoyo incondicional, me ayuda a cumplir mis sueños.

*Jennifer Prexl Zurita*

## RESUMEN

La familia *Orchidaceae* es una de las dos familias más grandes de plantas con flores. Está distribuida por todo el mundo, con una mayor concentración en trópicos y áreas montañosas. Dentro de esta familia se encuentra el género *Dracula*, donde se reconocen 106 especies que se distribuyen desde México hasta Perú. Este género presenta variaciones morfológicas dentro de la misma especie, generando controversias tanto en la sistemática clásica, como en la sistemática molecular. En este estudio se determinó la filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula*, a partir del marcador molecular *ycf1*. Además, los resultados obtenidos se compararon con la sistemática tradicional y las filogenias obtenidas a partir del marcador *matK*. Para la investigación, se recolectaron 106 especies del género *Dracula* provenientes de la colección del Jardín Botánico de Quito. A continuación, se realizó el análisis molecular de cada una de las muestras colectadas. Después, los productos obtenidos fueron secuenciados. Las secuencias fueron analizadas mediante programas bioinformáticos y se generó el árbol filogenético con el marcador *ycf1*. Por último, los resultados filogenéticos obtenidos indicaron que la región *ycf1* es más variable que otros marcadores moleculares como *matK*, siendo así el único marcador molecular que agrupó a las especies de Centro América. Además, se observó que la resolución de *ycf1* disminuyó y no esclareció las relaciones entre especies de Andes occidentales y centrales de Colombia. Por lo demás, el árbol filogenético obtenido con *ycf1* presentó una alta coherencia con la sistemática tradicional propuesta por Luer en 1993.

**Palabras clave:** *Orchidaceae*, *Dracula*, *ycf1*, *matK*.

## ABSTRACT

The *Orchidaceae* family is one of the two largest flowering plant families. It is distributed all over the world, with a higher concentration in tropics and mountainous areas. Within this family is the genus *Dracula*, which recognizes 106 species that are distributed from Mexico to Peru. This genus presents morphological variations inside the same species, generating controversies both in classical systematics and in molecular systematics. In this study, the molecular phylogeny of *Dracula* orchids was determined through the molecular marker *ycf1*. Furthermore, the results obtained were compared with the traditional systematics and the phylogeny obtained with the *matK* marker. For the investigation, 106 species of the genus *Dracula* were collected from the collection of the botanical garden of Quito. Therefore, the molecular analysis of each of the collected samples was carried out. Afterwards, the obtained products were sequenced. The sequences were analyzed using bioinformatics programs and the phylogenetic tree was generated with the *ycf1* marker. Finally, the phylogenetic results indicate that the *ycf1* region is more variable than other molecular markers such as *matK*, being thus the only molecular marker that grouped the Central America species. In addition, it was observed that the resolution of *ycf1* decreased and did not clarified the relations between Western and central Andean species of Colombia. Otherwise, the phylogenetic tree obtained with *ycf1* presented a high coherence with the traditional systematics proposed by Luer in 1993.

**Keywords:** *Orchidaceae*, *Dracula*, *ycf1*, *matK*.

## ÍNDICE

<b>1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	3
1.3. Objetivo General .....	4
1.4. Objetivos Específicos .....	4
1.5. Justificación de la investigación .....	4
<b>2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
2.1. Descripción e Importancia de Familia <i>Orchidaceae</i> .....	5
2.1.1. Definición y Generalidades .....	5
2.1.2. Importancia de la Familia <i>Orchidaceae</i> .....	6
2.2. Descripción taxonómica de la Familia <i>Orchidaceae</i> .....	7
2.2.1. Género <i>Dracula</i> .....	7
2.3. Marcadores Moleculares .....	13
2.3.1. Definición y Aplicaciones .....	13
2.3.2. Marcadores moleculares basados en PCR y secuenciación .....	14
2.3.3. Marcadores moleculares en orquídeas .....	15
2.4. Filogenia Molecular en <i>Orchidaceae</i> .....	18
<b>3. CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS</b> .....	19
3.1. Población y muestra .....	19
3.2. Análisis Molecular .....	19
3.2.1. Estandarización del protocolo de extracción .....	19
3.2.2. Estandarización de la PCR con cebadores <i>ycf1</i> .....	20
3.2.3. Amplificación de ADN .....	21
3.2.4. Visualización de ADN .....	22
3.2.5. Secuenciación .....	23
3.3. Edición de secuencias y reconstrucción filogenética .....	23
<b>4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25

4.1. Análisis molecular.....	25
4.1.1. Amplificación de ADN .....	25
4.1.2. Secuenciación.....	27
4.1.3. Alineamiento.....	28
4.2. Reconstrucción Filogenética.....	29
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>39</b>
5.1. Conclusiones .....	39
5.2. Recomendaciones.....	39
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>

## 1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La familia *Orchidaceae* es una de los linajes de angiospermas más diversos, se diferencian del resto de plantas por las complejas interacciones con diferentes agentes polinizadores y la complejidad que poseen sus flores (Policha, 2014).

Se encuentran distribuidas por todo el mundo, teniendo una mayor diversidad en las regiones tropicales, con aproximadamente 25000 especies repartidas en 5 subfamilias: *Apostasioideae*, *Vanilloideae*, *Cypripedioideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae* (Dressler et al.,1993; Herber, 2014). Dentro de la subfamilia *Epidendroideae* se encuentra un grupo de orquídeas de aproximadamente 140 especies epífitas, denominadas *Dracula* (Luer, 1993).

El género *Dracula* (en latín: *pequeño dragón*), fue nombrado por Luer en 1978. Anteriormente, las especies de *Dracula* se incluían en el género *Masdevallia* pero con el tiempo se convirtió en un género separado, debido a las peculiares características que poseían sus flores (Luer, 1993). Actualmente, se reconocen como parte del género alrededor de 140 especies, distribuidas desde el sur de México al norte de Perú, con una mayor concentración en Ecuador y Colombia, con 60 y 70 especies respectivamente (Chase et al., 2015).

*Dracula*, presenta una estructura compleja en sus flores, con tres caudas – prolongaciones del ápice de los sépalos- y sépalos anchos que aluden a pequeños dragones en suspensión. Las flores de *Dracula* se componen de tres grandes sépalos fusionados hacia la base, dos pétalos pequeños en la columna y el labelo – tercer pétalo modificado- que recuerda al cuerpo fructífero de un hongo (Sinchire, 2010).

La taxonomía y sistemática clásica del género *Dracula* se basa principalmente en la morfología, es decir, en las características fenotípicas, lo que dificulta la identificación de diversas especies, en cuanto a su posición taxonómica dentro del género (Cuéllar, 2011). Por esta razón, se han desarrollado metodologías de identificación molecular, en las cuales se utilizan marcadores moleculares para diferenciar y caracterizar el material genético presente en los organismos con mayor claridad (Azofeifa-Delgado, 2016).

En este contexto, los marcadores moleculares ideales presentan alta variabilidad, son fáciles de secuenciar y poseen información filogenética (Dong et al., 2012). En el caso del género *Dracula*, los marcadores moleculares han permitido identificar especies y aclarar las relaciones de parentesco para contribuir a la resolución de grupos taxonómicos y clados que no han sido resueltas con estudios morfológicos (Oses, 2017).

Tal es el caso del gen cloroplástico *ycf1* (factor 1 de Cadmio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), consta de 5500 pb con sitios ricos en adenina y timina. Presenta además, regiones de repetición invertida (IR) y de copia única (SSC), y ha sido utilizado como marcador molecular para la identificación de distintas especies vegetales (Dong et al., 2018; Li et al., 1996). Además, estudios de Eguiarte *et al.* (2003), mencionan que los genes cloroplásticos presentan una tasa de evolución mayor que los de tipo mitocondrial. Esta característica pudiera favorecer la determinación de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Dracula*.

En Ecuador, el estudio de filogenias moleculares en orquídeas es casi nulo, siendo abundantes en la bibliografía los estudios de tipo morfológico (Zambrano & Solano-Gómez, 2011). Por tal razón, es necesario generar estudios moleculares que proporcionen nueva información que logre resolver las inconsistencias existentes en el género *Dracula*. En esta línea, en el 2009, se realizó un estudio filogenético sobre la "Identificación de Orquídeas Epífitas del Ecuador mediante DNA

Barcoding”. Se analizaron veintidós especies empleando distintos marcadores moleculares como: *matK*, trnL-F e ITS y; se concluyó que *matK* es el mejor marcador para barcoding, ya que presentó una mayor variabilidad con respecto a las otras secuencias (Carrión, 2009). Para el mismo año se publica la investigación: “Utilidad filogenética de *ycf1* en orquídeas: un gen plastídico más variable que *matK*”. En el artículo se demuestra que todas las regiones del gen fueron variables, se alineaban con *Orchidaceae* y resultó informativo para discriminar especies (Neubig et al., 2009).

## 1.2. Planteamiento del problema

En la actualidad existe controversia en cuanto a la sistemática clásica del género *Dracula* propuesta por Luer en 1993, lo cual se basa únicamente en el estudio morfológico de las especies. Por esta razón, se considera que la información que brindan los marcadores morfológicos no es suficiente para esclarecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Dracula*, aún más cuando este presenta variación morfológica dentro de la misma especie. Adicionalmente, las orquídeas tienden a hibridar entre géneros y especies distintas, lo cual dificulta la clasificación de las especies del género *Dracula* (Zambrano & Solano-Gómez, 2011; Zelenko, 2011).

Por otra parte, el uso de marcadores moleculares como ITS y *matK* no han logrado resolver por completo la clasificación del género *Dracula* y sus relaciones filogenéticas por lo que es necesario el estudio de nuevos marcadores moleculares que aporten con mayor información o corroboren la información obtenida con estos marcadores, para así esclarecer las relaciones filogenéticas del género *Dracula* (Neubig et al., 2009).

### 1.3. Objetivo General

- Determinar la filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* (*Orchidaceae*) usando el marcador *ycf1*.

### 1.4. Objetivos Específicos

- Comparar la filogenia obtenida a partir de *ycf1* con la sistemática tradicional en *Dracula*.
- Comparar la filogenia obtenida a partir de *ycf1* con las filogenias obtenidas a partir de *matK* en *Dracula*.

### 1.5. Justificación de la investigación

La implementación de un análisis molecular permitirá aportar con mayor información para solucionar la clasificación de las especies del género *Dracula*, las cuales aparentemente son de continua y rápida evolución. Es importante mencionar que ya se ha demostrado que el uso de marcadores cloroplásticos como *matK* han aportado con información relevante para resolver parte de las relaciones filogenéticas de las especies del género *Dracula* (Dong et al., 2018).

Adicionalmente, el uso de un nuevo marcador cloroplástico (*ycf1*) permitirá contribuir con los otros estudios moleculares, con el fin de aclarar las relaciones entre las especies, sus clados y por ende la historia evolutiva del género *Dracula*. Al mismo tiempo, el marcador molecular *ycf1* aportará con mayor información, debido a que es un gen esencial para muchas plantas y está presente en casi todos los linajes de la familia *Orchidaceae*, siendo un potencial marcador molecular que permitirá identificar, clasificar y esclarecer las relaciones filogenéticas de las especies del género *Dracula* en Ecuador (Drescher et al., 2000).

## 2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Descripción e Importancia de Familia *Orchidaceae*

#### 2.1.1. Definición y Generalidades

Las especies de la familia *Orchidaceae*, son plantas vasculares que se han adaptado a ecosistemas diversos como: páramos, bosques andinos, bosques tropicales y bosques nublados (Freuler, 2013; Villaseñor & Gual, 2014), es decir, se adaptan a los factores abióticos del ambiente, además, presentan simbiosis con micorrizas y tienen mecanismos definidos de polinización (Akhalkatsi et al., 2014). El peculiar nombre de esta familia de plantas se deriva del griego *orkis*, que denota testículos, por la semejanza estructural de las raíces con dobles tubérculos de ciertas orquídeas del viejo mundo con las gónadas masculinas (Herber, 2014; Molineros, 2012).

Se piensa que el origen de las orquídeas ocurrió en Australia, desde donde se extendieron hacia las regiones neotropicales de los continentes más cercanos. La subfamilia *Apostasiodeae* es la más primitiva, la cual después de millones de años se separó del resto de las subfamilias *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Epidendroideae* y *Orchidoideae* (Givnish et al., 2016). Actualmente, la familia *Orchidaceae* presenta 4.032 especies de orquídeas clasificadas y distribuidas por el mundo, con mayor concentración en trópicos, específicamente áreas montañosas. Entre los países con mayor diversidad de orquídeas se encuentra Colombia y Ecuador, las especies colombianas se distribuyen en la región Andina y una pequeña parte en la región Caribe, mientras que las especies ecuatorianas tienen una extensa diversidad de las mismas debido a la variedad de climas que presentan sus regiones naturales. Además, el territorio ecuatoriano alberga cuatro de las cinco subfamilias que se encuentran a nivel mundial, con aproximadamente 1.714 especies únicas, donde la mayoría se desarrollan en zonas templadas y tropicales (Aquirre et al., 2011; Palma & Eliud, 2003; Sarmiento, 2007).

Los europeos en el siglo XVIII fueron los primeros en apreciar estas especies exóticas, las cuales fueron colectadas desde países tropicales y cultivadas en invernaderos de la realeza. Por esta razón, aumentó el número de personas que saqueaban bosques, atentando a la diversidad de las especies. Una de las consecuencias más alarmantes de esta práctica se observa con el género *Cattleya*, el cual se encuentra en peligro de extinción debido a la fragmentación y reducción de su hábitat natural causado por la deforestación de bosques, lo cual provoca la degradación del ecosistema. Además, otra de las causas es la excesiva colecta de las especies ya sea con fin comercial u hortícola. También, el uso de pesticidas que son letales para los agentes polinizadores, son factores que determinan la reducción y extinción de ciertas especies silvestres de orquídeas (Calderon-Saenz, 2007; Givnish et al., 2016).

Debido a esto, la familia *Orchidaceae* fue incluida en el Comercio internacional de especies en peligro de extinción (CITES) del apéndice II, con el fin de controlar la comercialización y utilización de estas especies. De igual forma, Ecuador en el 2008 formó parte de un proyecto llamado "Conservación de semillas de orquídeas con uso sustentable", el cual nace con la necesidad de conservar en bancos de germoplasma especies de orquídeas, especialmente aquellas en amenaza de extinción (Gutiérrez et al., 2017).

### **2.1.2. Importancia de la Familia *Orchidaceae***

La gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes de las especies de la familia *Orchidaceae*, lo cual sumado a la diversidad que poseen sus flores, los mecanismos de polinización y las diferentes maneras de atraer a los agentes polinizadores, ha generado un gran interés a nivel científico y comercial. De hecho su biodiversidad ha desarrollado el biocomercio de las mismas, en este contexto las orquídeas han sido el eje central a tratar en la conferencia de las Naciones Unidas sobre el Comercio y Desarrollo (UNCTAD), la cual se basa principalmente en la

producción y comercialización de orquídeas, respetando la sostenibilidad ambiental, económica y social (UNCTAD, 2007).

Por otra parte, estas especies han sido utilizadas como bioindicadores debido a la alta sensibilidad que poseen a los cambios de los componentes en donde habitan. Además, por la compleja dependencia que tienen las orquídeas a los agentes polinizadores para su reproducción, han sido de utilidad para proporcionar datos sobre los insectos o colibrís que habitan en un área determinada (Carrión, 2009; Morales-Hernández et al., 2016).

## **2.2. Descripción taxonómica de la Familia *Orchidaceae***

Actualmente, a nivel mundial se reconocen 736 géneros y 5 subfamilias: *Apostasioideae*, *Vanilloideae*, *Cypripedioideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae* en la familia *Orchidaceae*. En la subfamilia *Apostasioideae* se han descrito 2 géneros y 16 especies que crecen principalmente en el sudeste asiático, mientras que en *Vanilloideae* se han descrito 15 géneros y 180 especies en regiones tropicales húmedas, subtropicales y al Este de América del Norte (Chase et al., 2015; Georgius, 2003). En *Cypripedioideae* se han descrito 5 géneros y 130 especies en regiones templadas, en los trópicos de América y Asia. La subfamilia *Orchidoideae* cuenta con 208 géneros y 3630 especies descritas, las cuales crecen en todos los continentes a excepción de la Antártida. La subfamilia *Epidendroideae* cuenta con más de 500 géneros y alrededor de 20000 especies descritas actualmente, pues es la subfamilia en la que la mayoría de cambios a nivel morfológicos se ha dado a lo largo de la historia de *Orchidaceae* (Figueroa et al., 2008; Meyer & Cameron, 2009).

### **2.2.1. Género *Dracula***

*Dracula* que en latín significa “pequeño dragón”, fue separado del género *Masdevallia* en 1978 por Carlyle Luer, e incluyó en *Dracula* a las especies con

sépalos internamente pubescentes, pétalos ensanchados y hojas carinadas. Actualmente, se reconocen 140 especies y se distribuyen por el neotrópico occidental americano, es decir, desde el sur de México, hasta Perú (Luer, 1993). Su mayor concentración ocurre en el noroeste de Ecuador y en la cordillera occidental y central de Colombia, con aproximadamente 60 y 70 especies respectivamente (Calderón & Farfán, 2003; Chase et al., 2015).

La mayoría de especies pertenecientes al género son epífitas y muy pocas son terrestres. Se encuentran entre 1500 y 2500m de altitud sobre el nivel del mar (Luer, 1993). Sus plantas son pequeñas y se caracterizan por tener tres sépalos fusionados en su base, dos pétalos pequeños junto a la columna y unos alargamientos llamados caudas en su parte terminal (Meyer & Cameron, 2009; Zambrano, B, Solano-Gómez, 2011).

Además de reconocer el género, Luer clasifico de forma subgenérica las especies de *Dracula*, como se observa en la Figura 1 a continuación:

Subgénero	Sección	Subsección	Series	Especies
<i>Xenosia</i>				<i>D. xenos</i>
<i>Sodiroa</i>				<i>D. sodiroi</i>
<i>Dracula</i>	<i>Andreettaea</i>			<i>D. andreettae</i>
	<i>Chestertonia</i>			<i>D. chestertonii</i>
	<i>Cochliopsia</i>			<i>D. cochliops</i>
	<i>Dodsonia</i>			<i>D. dodsonii</i>
	<i>Dracula</i>	<i>Costatae</i>		<i>D. vespertillo</i>
		<i>Dracula</i>	<i>Parviflorae</i>	<i>D. velutina</i>
			<i>Grandiflorae-parvilabiatae</i>	<i>D. gigas</i>
			<i>Dracula</i>	<i>D. wallisii</i>

Figura 1. Clasificación subgenérica de *Dracula*.

Tomado de: (Meyer & Cameron, 2009).

A) Basada en la sistemática tradicional descrita por Luer que clasifica en tres subgéneros y 5 secciones.

#### 2.2.1.1. Descripción morfológica de *Dracula*

Son plantas con hojas ligeramente coriáceas que pueden ser de forma linear, oblonga o elíptica como se observa en la Figura 2. En la superficie adaxial, las hojas están surcadas longitudinalmente por encima de una nervadura central. Su rizoma suele ser corto, lo que crea plantas densamente caespitosa y en ocasiones pueden ser reptantes. El ápice de las hojas posee una muesca y es apiculado (proveniente de la extensión de la nervadura central). La base se contrae gradualmente en un pecíolo conduplicado. Los sépalos suaves, se encuentran generalmente tapizados por pelos y poseen diversos colores, a su vez son lo más prominente de la flor y en todas las especies conocidas existen extensiones del ápice de los sépalos también llamadas caudas. Estos son normalmente frágiles, delgados, largos o cortos y generalmente, los sépalos de las especies de flores grandes, son muy sensibles a la humedad. Como se observa en la Figura 3, *Dracula* posee dos pétalos

ensanchados y bilaminados (D) y un labelo sacciforme (C), dividido en epiquilo e hipoquilo (C1 y C2) (Johan, 2003; Luer, 1993).



*Figura 2. Dracula pinasensis.*

Tomado de: (Zambrano & Solano-Gómez, 2011).

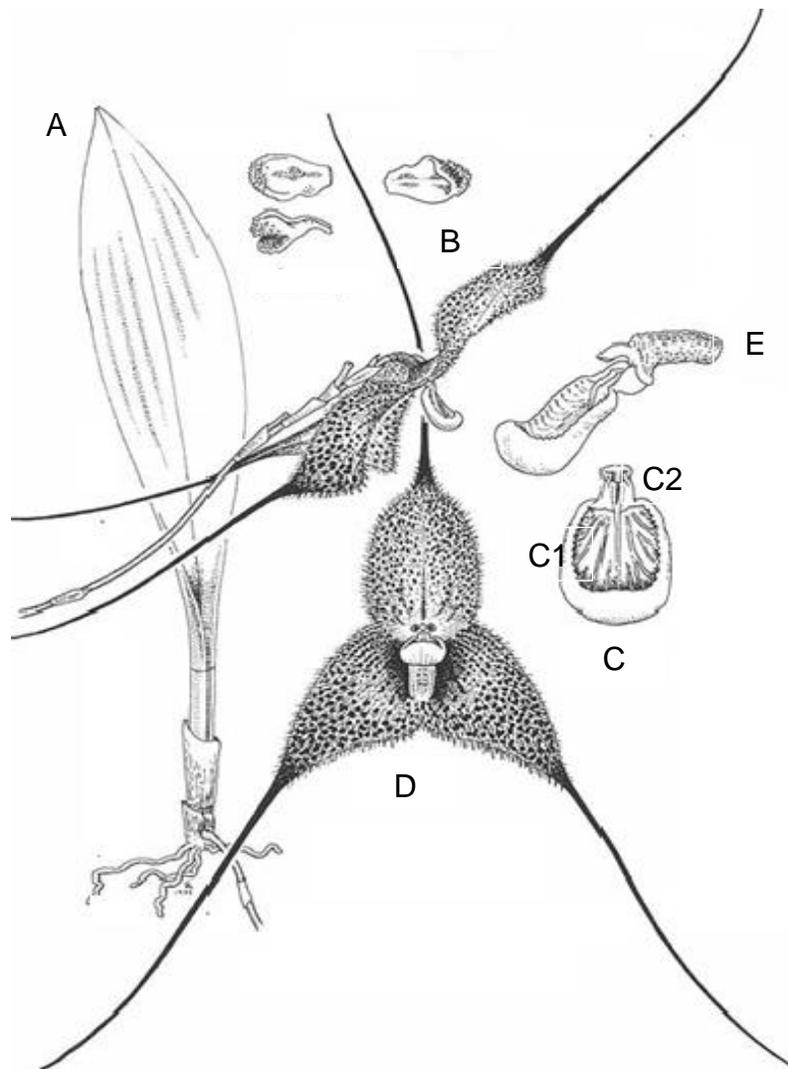


Figura 3. Esquema de las secciones de *Dracula chimaera*.  
Adaptado de: (Luer, 1993).

- A) Planta
- B) Sépalos
- C) Labelo (C1. Epichilo, C2. Hipochilo)
- D) Pétalos bilaminados
- E) Ovario

### 2.2.1.2. Especies relevantes del género *Dracula*

La mayoría de especies del género *Dracula* son localmente endémicos, mientras que algunas especies tienen amplios rangos de expansión. Por ejemplo, *Dracula fulgífera*, es aparentemente endémica de una pequeña área en las laderas

orientales de los Andes en el centro de Ecuador, esta especie en particular no es distintiva a simple vista, pero se caracteriza por poseer diminutas verrugas de color gris en las superficies internas de los sépalos (Figura 4a), otra de las especies localmente endémicas es *Dracula cordobae* (Figura 4b), se encuentra a una altura relativamente baja en los bosques del Suroeste de Ecuador, las flores de esta especie se caracteriza el color blanco cremoso de los sépalos con un borde rojo marrón (Tropicos, 2018).

Entre las especies con amplios rangos de expansión se encuentra *Dracula chiroptera*, se expande desde el sur de Colombia al norte de Ecuador, sus flores son grandes y de colores variables, ampliamente extendidas y con manchas que se asemejan a otras especies del género (Figura 4c). *Dracula felix* (Figura 4d), se encuentra con frecuencia en las laderas occidentales de los Andes del noroeste de Ecuador y Colombia. Esta especie es una de las pocas que se puede identificar fácilmente en la naturaleza debido a que tiene numerosos pedúnculos cortos, simples, con flores (Valencia, 2000).



Figura 4. Especies del género *Dracula*. Tomado de: (Zelenko, 2011).

- A) *Dracula fulgifera*.
- B) *Dracula cordobae*.
- C) *Dracula chiroptera*.
- D) *Dracula felix*

### 2.3. Marcadores Moleculares

#### 2.3.1. Definición y Aplicaciones

Los marcadores moleculares se los conoce como segmentos de ADN que se encuentran en sitios específicos en el genoma. Estos pueden ser unos genes, partes de un gen o simplemente regiones del genoma (Pérez-Almeida et al., 2011).

Por lo tanto, los marcadores moleculares se utilizan para rastrear el comportamiento y herencia del gen de interés. Además, se consideran como herramientas útiles para detección de genotipos, mapeo genético y construcción de filogenias moleculares (Bruford et al., 2003; Pérez-Almeida et al., 2011).

Por otra parte, en las plantas con flores coexisten tres genomas: cloroplástico, mitocondrial y nuclear, que tienen una tasa de evolución distinta. Dentro de los tres genomas se han escogido secuencias que sirven como marcadores moleculares y su uso permite entender la complejidad genética y evolutiva de las plantas (Eguiarte et al., 2003). Por ejemplo, los marcadores de tipo nuclear contienen la mayor cantidad de información genética, además presentan regiones de copia única, repetidas y evolucionan más rápido que la de tipo mitocondrial y cloroplástico. La información evolutiva que brindan los marcadores nucleares es diferente a la de los orgánulos porque presenta mayor cantidad de polimorfismos (Pérez-Almeida et al., 2011).

El ADN mitocondrial tiene regiones que han presentado variaciones en sus genes, los cuales ha sido útiles para estudios de genética, genética poblacional y relaciones evolutivas entre taxa (Rosero et al., 2016; Eguiarte et al., 2003; Méndez Felpeto, 2001). Además, los marcadores basados en ADN de cloroplasto, presentan secuencias conservadas, alta variabilidad, constituyendo una herramienta potencial en análisis filogenéticos y biogeográficos. Por ende, los marcadores moleculares de tipo mitocondrial y cloroplásticos, en su mayoría son empleados en estudios filogeográficos y en genética poblacional debido a su herencia uniparental (García et al., 2013; Méndez Felpeto, 2001; Ming-He et al., 2016).

### **2.3.2. Marcadores moleculares basados en PCR y secuenciación**

Las secuencias de tipo microsatélite o secuencias simples repetidas (SSR), están constituidas por unidades cortas de 1 a 6 pb. Cada secuencia se define por el sitio

que ocupan en el genoma, la frecuencia y repetición de los SSR varía entre cada especie. Además, son secuencias variables, cuya variación se manifiestan como la diferencia en las longitudes de alelos en el mismo *locus*. Estas secuencias microsatélites han sido utilizados como marcadores genéticos desde el desarrollo de la PCR, su detección se realiza mediante la PCR, que se fundamenta en la amplificación de la región, mediante el uso de cebadores complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN, los fragmentos amplificados se separan con base a su peso molecular mediante la técnica electroforética, la cual arroja un patrón de bandas que permite diferenciar a los individuos. Adicionalmente, los productos de la PCR se secuencian mediante la técnica de secuenciación de Sanger con el fin de determinar el orden de nucleótidos que compone la región de interés (Gernandt et al., 2011; Kurt et al., 2016; Zalapa et al., 2012).

Las secuencias obtenidas son editadas mediante softwares bioinformáticos, que determinan el número de bases compartidas y tasas de mutación. Para la edición de las mismas se utiliza una secuencia base, con el fin de verificar la calidad de las mismas. Para la reconstrucción filogenética se usan principios de máxima parsimonia y máxima probabilidad. El árbol consenso se obtiene después de 100 iteraciones de *bootstrap*, parámetro que utiliza sitios filogenéticamente informativos, mediante la reestimación del árbol, en base a la variación de la posición y la repetición de caracteres de la secuencia, lo cual da mayor soporte y robustez al árbol filogenético (Guitiérrez et al., 2015).

### **2.3.3. Marcadores moleculares en orquídeas**

Las secuencias de ADN de tipo nuclear y mitocondrial han sido utilizadas para reconstruir filogenias de orquídeas, pero actualmente se ha potenciado el estudio de marcadores cloroplásticos, dado que son de fácil amplificación, sus genes poseen intervalos bajos de evolución y tienen regiones altamente variables, siendo

importantes cuando se buscan *loci* que resuelvan relaciones entre especies o géneros en análisis filogenéticos (Azofeifa-Delgado, 2016).

Se han utilizado como marcadores moleculares a regiones del genoma plastidio como: *matK*, *rpoCl*, *rbcl*, *ycf1*, *ndhF*, *psaB*, genes nucleares como: *Xdh*, y genes mitocondriales como: *matR*. De estos, solo cinco (*matK*, *psaB*, *ycf1*, *Xdh*, *rbcl*) son ampliamente utilizados en la familia *Orchidaceae* (Ming-He et al., 2016; Morton, 2011).

Estudios realizados han demostrado que el gen *rpoCl* es uno de los mejores marcadores moleculares para identificar familias más no especies de distintos grupos de orquídeas. A su vez, se ha determinado que *matK* a menudo proporciona pocos sitios informativos entre especies estrechamente relacionadas dentro de los géneros de orquídeas. (Dong et al., 2018; Meyer & Cameron, 2009).

#### **2.3.3.1. Región del gen *ycf1***

Es el segundo gen más grande del genoma cloroplástico, con 5500 pb (1800 aminoácidos), presente en casi todos los genomas de cloroplastos de plantas secuenciados hasta la actualidad. El gen *ycf1* tiene una región pequeña de copia única (SSC), la cual presenta alta variabilidad en las secuencias de las angiospermas y otra región de repetición invertida (IR), la cual es conservada y de un tamaño menor a un kilobase de longitud (Figura 5). Este gen ha demostrado ser mucho más variable que otros genes comúnmente utilizados en estudios filogenéticos, por lo cual se considera como un potencial marcador molecular para esclarecer relaciones entre especies (Dong et al., 2015; Neubig et al., 2009).

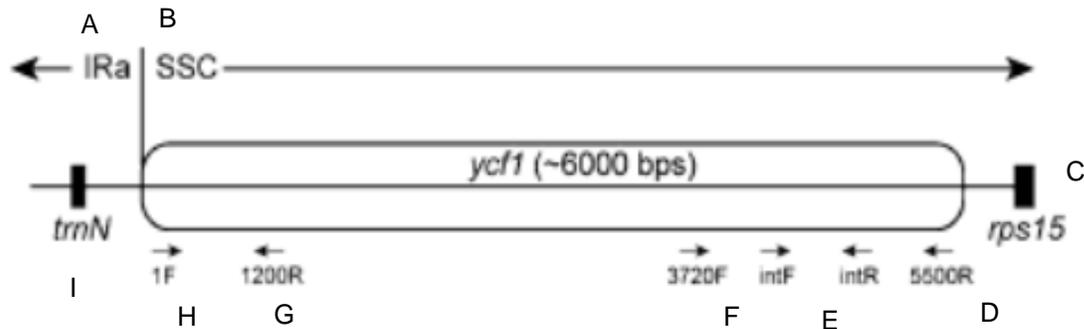


Figura 5. Región 3' del marcador molecular *ycf1*.  
Adaptado de: (Neubig et al., 2009).

- A) Regiones de repetición invertida
- B) Regiones de copia única pequeña
- C) Gen *rps15*
- D) Cebador 5500R del gen *ycf1*
- E) Cebadores internos (intR- intF)
- F) Cebador 3720F
- G) Cebadores en la porción 5' *ycf1*
- H) Cebadores en la porción 5' *ycf1*
- I) Gen *trnN*

### 2.3.3.2. Región del gen *matK*

El gen *matK* tiene una gran variabilidad, su tamaño es de 1500 pb de longitud y está ubicado en el intrón del gen *trnK* como se observa en la Figura 6 (Selvaraj et al., 2008). El gen contiene altas tasas de sustitución dentro de la especie y su región 3' es más conservada que la región 5', proporcionando información muy útil para resolver problemas filogenéticos entre especies (Barthet et al., 2007).



Figura 6. Marcador molecular *matK*. Región 5' y 3' flanqueados por el gen *trnK*.  
Tomado de: (Barthet et al., 2007).

#### 2.4. Filogenia Molecular en *Orchidaceae*

*Orchidaceae* es una familia compleja que representa un desafío para la filogenética y sistemática. La clasificación propuesta en la era pre-ADN de *Orchidaceae* se basó en caracteres morfológicos, que al ser reevaluada con marcadores moleculares mostró varias diferencias dado que la información morfológica presenta una resolución limitada (Freudenstein & Rasmussen, 1999; Koehler et al., 2002).

Investigaciones de filogenias moleculares en la familia *Orchidaceae* han empleado ADN de plástidos, para definir y clasificar las especies altamente variables en su morfología. Actualmente, los marcadores moleculares son la base para la reconstrucción filogenética, pero se considera que la taxonomía y la clasificación sistemática no solo deben basarse en la similitud de los nucleótidos sino también en los caracteres de tipo morfológico, anatómico, ecológico y biogeográfico (Jenner, 2004).

Estudios que se han realizado combinando las pruebas moleculares con la morfológica potencian la resolución de cladogramas a distinto nivel: subfamilias, tribus, subtribus, géneros y especies (Figuerola et al., 2008; Sosa, 2007). Por lo tanto, se generan árboles con mayor soporte y resolución, que cualquier dato procesado individualmente (Gravendeel et al., 2004).

### 3. CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS

#### 3.1. Población y muestra

El permiso de colección e investigación se lo realizó mediante el Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos N. MAE-DNB-VM-2018-0083 (Revisión molecular de las especies del género *Dracula* Orchidaceae, cultivo en invernadero e *in vitro*). El proyecto denominado Filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* (Orchidaceae) usando el marcador molecular *ycf1*, se ejecutó en las instalaciones de los laboratorios de investigación de la Universidad de las Américas en el área de Biología Molecular. Bajo la dirección científica del Licenciado Luis Enrique Baquero Rivadeneira.

Se recolectaron 106 especies del género *Dracula*, provenientes de la colección del Jardín Botánico de Quito (Ver Anexo 1). De cada planta se extrajo una hoja, libre de daños mecánicos aparentes y enfermedades. Se almacenaron en bolsas de papel kraft y estas a su vez en bolsas de plástico, las cuales se llevaron a un recipiente frío para evitar que las muestras sufran procesos degradativos u oxidativos tempranos (Dong et al., 2012). Por último, en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas a -20°C, según la técnica de Pérez-Almeida et al. (2011).

#### 3.2. Análisis Molecular

##### 3.2.1. Estandarización del protocolo de extracción

Se utilizó del kit *Phire Plant Direct PCR Mater* de Thermo Fisher Scientific. El procedimiento inició colocando a la hoja en una caja de vidrio previamente desinfectada con alcohol y cloro. Con un bisturí se realizó un corte de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup>.

Se evaluaron dos protocolos de extracción según las especificaciones del fabricante, que incluye: *Buffer* de dilución, el marcador de peso molecular *O'GeneRuler*<sup>™</sup>, cebadores que amplifican una región altamente conservada del ADN de cloroplasto y son universales en varias especies de plantas, agua libre de nucleasa y la master mix.

- **Protocolo directo:** En un tubo de PCR se agregaron 2 mm<sup>2</sup> del tejido vegetal en 20 µL de *Buffer* de dilución, seguidamente se agregó la master mix de la PCR.
- **Protocolo de maceración:** En un tubo de PCR se agregaron 2 mm<sup>2</sup> de tejido vegetal en 20 µL de *Buffer* de dilución, se maceró el tejido con una punta de micropipeta hasta que el *buffer* tomó un color verdoso y se centrifugó. En otro tubo de PCR se preparó la master mix y se agregaron 0.5 µL del sobrenadante de la maceración.

### 3.2.2. Estandarización de la PCR con cebadores *ycf1*

Se utilizaron los cebadores para *ycf1-1* (Fw y Rv) diseñados por Neubig, quien utiliza la región 3' de 1,500 pares de bases del gen (Neubig et al., 2009). Los cebadores fueron adaptados para el género *Dracula*, basándose en la secuencia de *Masdevallia* (NC\_026777.1). Adicionalmente, se diseñaron otros cebadores para *ycf1-2* utilizando el software *Geneious*, con una versión modificada de Cebador 3.2.3.7 (Remm et al., 2007), siguiendo el algoritmo SantaLucia 1998, basándose en la accesión NC\_026777.1 (Ver Tabla 1) (Geneious, 2018). Estos cebadores fueron evaluados en las especies *Dracula bella* y *Dracula vampira*, usando como temperatura de hibridación inicial 60°C. Además, se realizó un gradiente de temperatura de hibridación para estandarizar las reacciones de PCR (Ver Tablas 2 y 3).

Tabla 1.

*Cebadores empleados para amplificar la región cloroplástica ycf1.*

Referencia	Secuencia
<i>ycf1-1-Fw</i> (Neubig)	TACATATATAATGAACGAATGG
<i>ycf1-1-Rv</i> (Neubig)	GCTGTTATTGGTATCAAACCAATAGCG
<i>ycf1-1-int-fw</i> (Neubig)	AATCTGGACCAATGCACRTATK
<i>ycf1-1-int-Rv</i> (Neubig)	TTTGATTGGTATKATCCAAGG
<i>ycf1-2-Fw</i> (Geneious)	TGAACGAATGGAAAACTGGTT
<i>ycf1-2-Rv</i> (Geneious)	GCTGTGTCGTGCAATGGWTT

Tabla 2.

*Concentraciones de reactivos usados en la mezcla de PCR.*

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Vol x 1
Agua MQ			7,5 µL
Master Mix	2 X	1 X	10 µL
Cebador Forward	10 µM	0,5 µM	1 µL
Cebador Reverse	10 µM	0,5 µM	1 µL
ADN			0,5
Volumen final de reacción			20

Tabla 3.

*Duración, temperatura y ciclos de la PCR utilizando gradiente de temperatura*

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización inicial	98.0°C	5 min	1
Desnaturalización	98°C	10 seg	39
Alineamiento	60°C-62.5°C	10 seg	
Extensión	72°C	40 seg	
Extensión final	72°C	1 min	1

### 3.2.3. Amplificación de ADN

Se amplificaron las regiones de ADN cloroplástico de un tamaño aproximado para *ycf1-1* de 1696 pb y *ycf1-2* de 1376 pb. Las amplificaciones iniciales se realizaron

con el cebador diseñado por Neubig (FWD y RV) y aquellas que no fueron exitosas se las realizó con los cebadores diseñados en el programa *Geneious* (FWD y RV). El proceso se llevó a cabo en un termociclador *Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR System* (Eppendorf, Alemania). Las amplificaciones realizadas del ADN cloroplástico ocurrieron a una temperatura de hibridación seleccionada de 61°C de acuerdo al programa de ciclamiento mostrado en la Tabla 4. Se utilizaron las mismas condiciones para los cebadores diseñados en *Geneious* y por Neubig (Ver Tabla 2 y 4).

Tabla 4.

*Programa utilizado en la amplificación del gen ycf1.*

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duración</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	98.0°C	5 min	1
Desnaturalización	98°C	10 seg	43
Alineamiento	61°C	10 seg	
Extensión	72°C	40 seg	
Extensión final	72°C	1 min	1

#### **3.2.4. Visualización de ADN**

Se verificó la presencia de ADN mediante la técnica de electroforesis horizontal, para lo cual se utilizó un gel de agarosa al 1%. Se dispuso en una cámara de electroforesis (Labnet International, EEUU) y en cada pocillo se agregaron 4 µL del producto de PCR, 3 µL del marcador de peso molecular *Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ Express DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, 2017); y se empleó TBE 1X como amortiguador en la migración de ADN.

Se corrió la electroforesis a 90 voltios durante 45 minutos, después se reveló el gel en el fotodocumentador *BIOrad ChemiDoc MP* (Biorad, EEUU).

Para estimar el tamaño de la banda de ADN se determinó visualmente al comparar con las bandas del marcador molecular *O'GeneRuler*<sup>TM</sup> de 100 a 5000 pb, la cual se observa en la Figura 7.

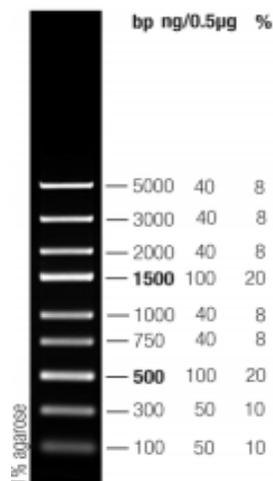


Figura 7. Patrón de bandas del marcador de peso molecular *O'GeneRuler*<sup>TM</sup> Express DNA.

Tomado de: (Thermo Fisher Scientific, 2014).

### 3.2.5. Secuenciación

Se enviaron a secuenciar 40 muestras de productos amplificados del gen *ycf1* (concentración final de 20 ng/ µL) a la empresa Macrogen Inc., y 66 muestras fueron secuenciadas en los Laboratorios de Investigación de la Universidad de las Américas, usando el método de Sanger.

### 3.3. Edición de secuencias y reconstrucción filogenética

Se evaluó la calidad de las secuencias obtenidas con el *software Geneious*. Se determinó mediante el programa la calidad (HQ%) de cada una de las secuencias realizadas de acuerdo al protocolo (Kearse et al., 2012). Las secuencias fueron editadas manualmente dentro del *software Geneious*, mediante los siguientes

pasos: el alineamiento se realizó mediante el programa MAFFT (opciones por defecto) (MAFFT, 2012). Después, se determinó la calidad de cada base respecto a la altura de los picos de las cladogramas y al comparar con la secuencia de *Masdevallia picturata*. Las ambigüedades presentadas en los alineamientos fueron solventadas basándose en las secuencias de mejor calidad. Una vez editadas las secuencias, se obtuvo la secuencia consenso de cada una.

Para la reconstrucción filogenética se utilizó el programa PHYML (Guindon et al., 2005), dentro del cual se utilizó el modelo de sustitución GTR y como medida de soporte se utilizaron 100 repeticiones de *bootstrap* no paramétrico.

## 4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis molecular

#### 4.1.1. Amplificación de ADN

De las 106 especies recolectadas en el estudio 40 muestras fueron amplificadas exitosamente con el cebador *ycf1-1*, con un tamaño de 1696 pb (Figura 8). Las otras 66 muestras fueron amplificadas con el cebador *ycf1-2*, con un tamaño de 1376 pb (Figura 9), debido a que al realizar la amplificación con *ycf1-1* no fue exitosa como se observa en la Figura 8, carril 6. La no amplificación de estas muestras con el cebador *ycf1-1* pudo deberse a la alta variabilidad que presenta este marcador, aún más cuando existen caracteres muy conservados en ciertas especies del género *Dracula*, los cuales podrían evolucionar de forma independiente causando una alteración en la secuencia nucleotídica y por ende no permitiría la hibridación entre las secuencias de interés (Chen et al., 2010; Dong et al., 2015; Górnaiak et al., 2010).

Además, este resultado pudo deberse a que algunos taxones presentan mutaciones críticas en el extremo 3', lo cual genera una falla al momento de amplificar. Por esta razón, se considera factible el uso de múltiples combinaciones de cebadores *ycf1* con el fin de que estos puedan amplificar para un número variable de nucleótidos de la porción 3' (Eguiarte et al., 2003; Neubig et al., 2011).

Sin embargo, las diferencias entre las intensidades de las bandas que se observan en la Figura 8 pudieron deberse a que la cantidad de ADN cloroplástico obtenido de cada muestra fue distinta, aquellos casos que reportaron bandas con baja intensidad pudieron estar relacionados con la pérdida directa de cloroplastos durante el proceso de homogenización del tejido vegetal (Sánchez et al., 2000). Además, algunas muestras provenientes de otras provincias, pudieron haber sufrido algún tipo de oxidación y degradación del material genético durante el transporte

desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, debido a los cambios de temperatura (Bell et al., 2018; Rose et al., 2018; Watanabe, 2012).

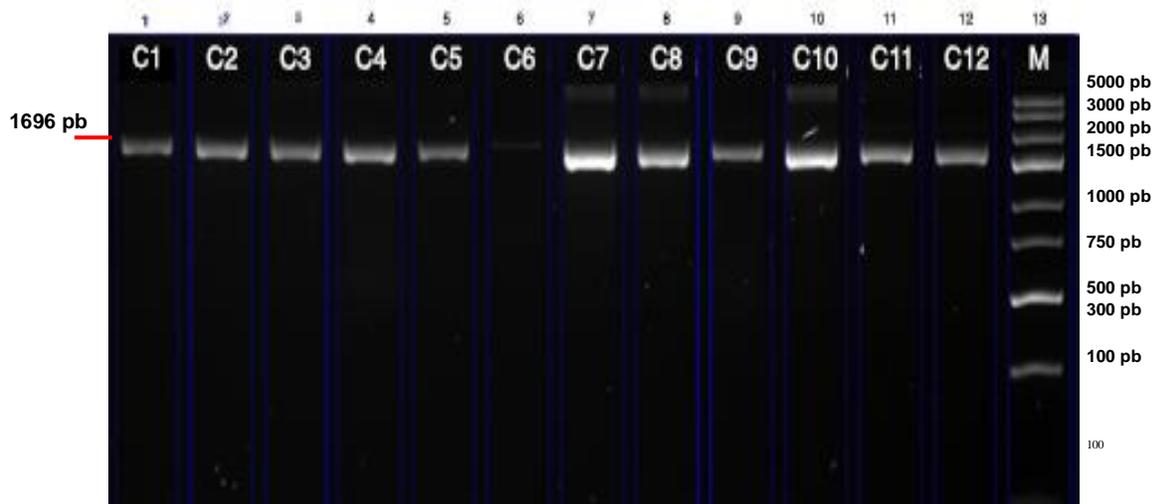


Figura 8. Gel de electroforesis de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe, de los productos de PCR amplificados con el cebador *ycf1-1*.

- A) C1: *Dracula fulgifera*.
- B) C2: *Dracula fulgifera*.
- C) C3: *Dracula dalessandroi*.
- D) C4: *Dracula smaug*.
- E) C5: *Dracula vampira*.
- F) C6: *Dracula andreettae*.
- G) C7: *Dracula venosa*.
- H) C8: *Dracula alcithoe*.
- I) C9: *Dracula adrianae*.
- J) C10: *Dracula anthracina*.
- K) C11: *Dracula woolwardie*
- L) C12: *Dracula bella*.
- M) C13: Marcador de peso molecular de 100-5000 pb *Thermo Fisher*.

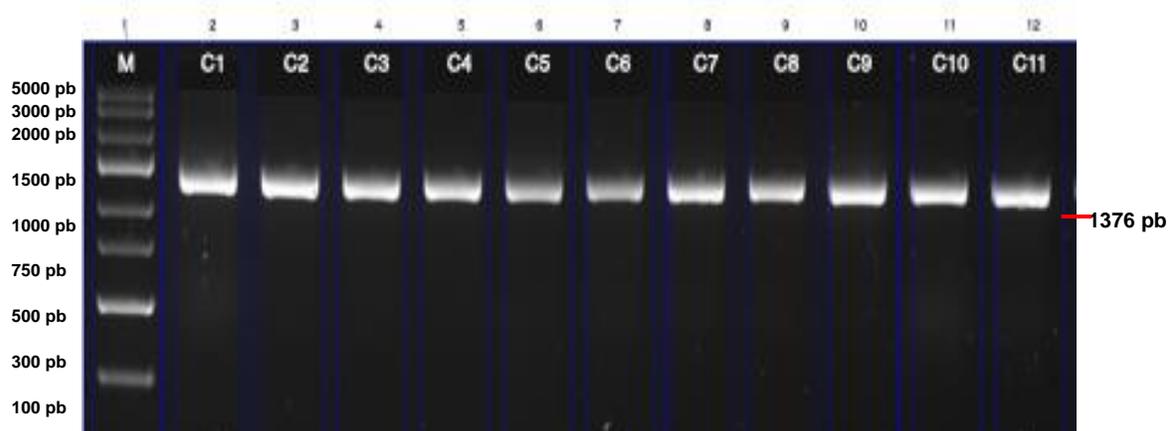


Figura 9. Gel de electroforesis de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe, de los productos de PCR amplificados con el cebador *ycf1-2*.

- A) C1 Marcador de peso molecular de 100-5000 pb *Thermo Fisher*
- B) C2: *Dracula trigonopetala*.
- C) C3 *Dracula erythrochaete*.
- D) C4: *Dracula gigas*.
- E) C5: *Dracula hirtzii Carchi*.
- F) C6: *Dracula ophioceps*.
- G) C7: *Dracula marsupialis*.
- H) C8: *Dracula antonii*.
- I) C9: *Dracula chimaera*.
- J) C10: *Dracula simia*.
- K) C11: *Dracula sibundoyensis*
- L) C12: *Dracula marianii*.

#### 4.1.2. Secuenciación

De las 40 muestras secuencias con el cebador *ycf1-1*, 30 presentaron buena calidad (HQ%) después de la electroforesis capilar, con un valor mayor al 50%. Es así, que 10 muestras presentaron una calidad inferior al 50%, por lo tanto, su lectura decaía poco después de empezar. Esto pudo deberse a que no todas las concentraciones de los amplicones fueron iguales, ocasionando que la reacción fuera más eficientemente en unas muestras que en otras (Castro et al., 2013).

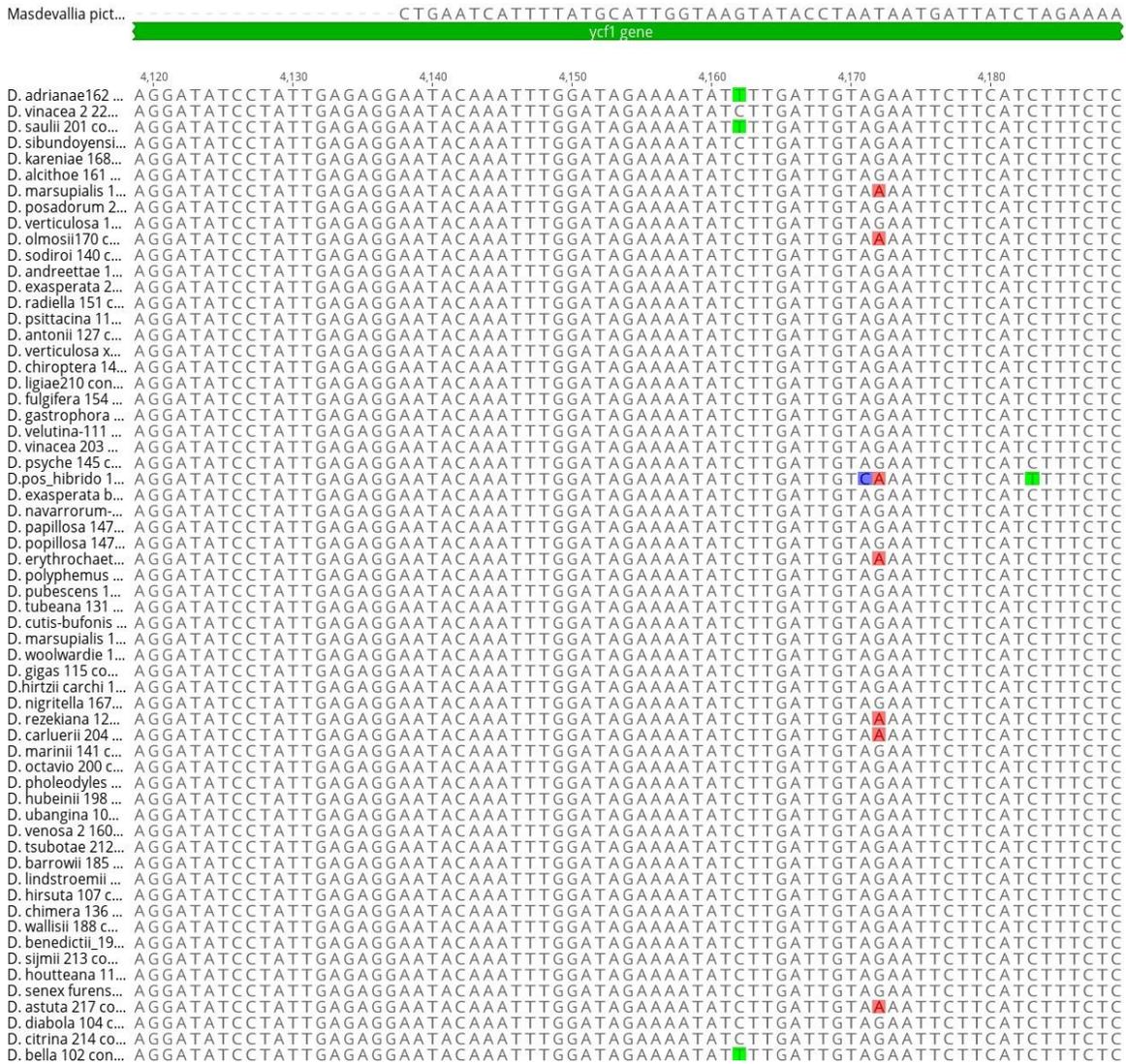
Por otra parte, las 66 muestras secuenciadas con la región *ycf1-2* presentaron una calidad mayor a 60% para continuar con los estudios filogenéticos. Cabe recalcar

que las 10 muestras pérdidas fueron reamplificadas con el cebador *ycf1-2* para aumentar el HQ%, para poder proceder a los estudios de filogenia.

#### **4.1.3. Alineamiento**

Como se observa en la Figura 10, el alineamiento múltiple de las secuencias mostró un porcentaje de similitud del 84.5%. Es posible que este resultado sugiera que las secuencias fueron homólogas, por lo tanto, comparten un ancestro en común. Además, un alto porcentaje de similitud demuestra la eficacia del marcador cloroplástico, para agrupar individuos de la misma especie, pero que provienen de poblaciones Biogeográficamente distantes, de esta manera se puede inferir que el marcador molecular discriminó adecuadamente a las especies pertenecientes al género (Dotor et al., 2016; Rosero et al., 2016; Simo-Droissart et al., 2018).

Sin embargo, no existe un rango específico para determinar qué porcentaje de similitud es adecuado, pues este va a depender del tipo de secuencia y de la longitud que presenta, tal como lo menciona Meneses et al., (2011).



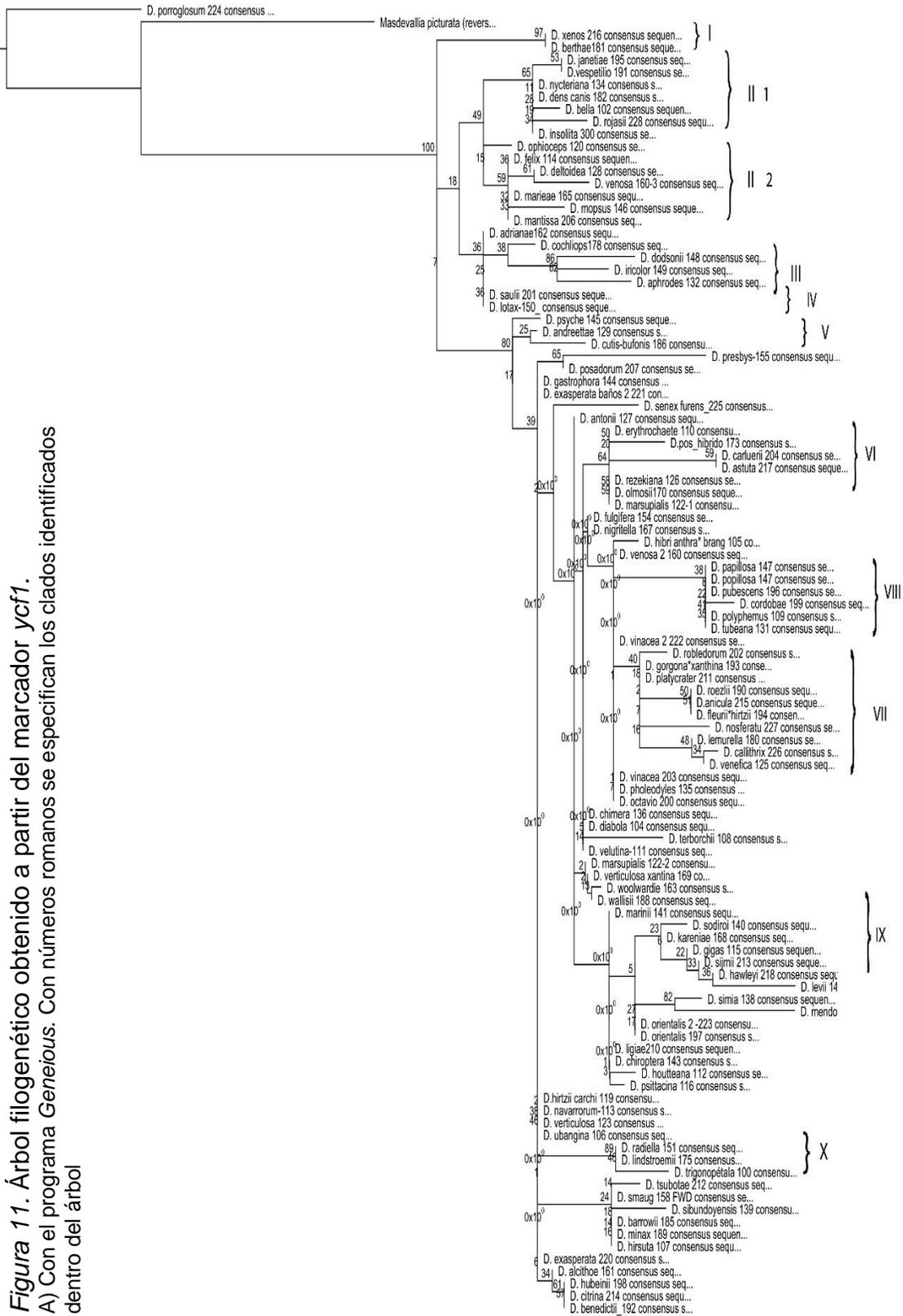


Figura 11. Árbol filogenético obtenido a partir del marcador *ycf1*.  
 A) Con el programa *Geneious*. Con números romanos se especifican los clados identificados dentro del árbol

El árbol filogenético obtenido con *ycf1* permitió identificar los principales grupos de especies de orquídeas pertenecientes al género *Dracula* (Figura 11). Sin embargo, presentó una gran cantidad de politomías, lo que se contempla como clados no resueltos dentro de la topología del árbol filogenético, es decir, se originan más de dos linajes (Peña et al, 2012).

Es así, que dentro del árbol filogenético se pueden observar especies (*D.hirtzii carchi*, *D. navarrorum*, *D. ubangina*, *D. houtteana*, *D. verticulosa*, *D. psittacina*, *D. exasperata*, *D. fulgifera*, *D. chimera*, *D. antonii*, *D. marinii*, *D. sijmii*, *D. kareniae*, *D. mendosae*, *D. ligiae*, *D. senex furens*, *D. orientalis*) sin asociación a un clado específico. Lo que sugiere que estas especies presentan poca variabilidad genética entre ellas en la región del gen *ycf1*, lo cual se corrobora con el alto porcentaje de similitud (84.5%) encontrado entre las especies como se aprecia en la Figura 10. Además, la alta similitud entre especies de orquídeas, es producto de la rápida especiación que estas presentan. Sin embargo no está claro si la similitud presentada entre especies es resultado de una evolución convergente o del parentesco inmediato de las mismas (Bayman, 2012; Peláez et al., 2015).

Por otro lado, en la base del árbol filogenético se observan (Figura 11) dos especies ancestrales del género *Masdevallia*. Por lo cual, la filogenia obtenida es coherente en su mayor parte con la clasificación propuesta por Luer (1993). Tal es el caso del grupo *dodsonii* en el que se confirman 2 de las 3 especies (*D. iricolor*, *D. dodsoni*) descritas en ese trabajo. El grupo *xenos-berthae* coincide completamente con la sistemática descrita por Luer (1993).

Las especies analizadas en este estudio se diferenciaron en 10 clados bien definidos. A pesar de que el porcentaje de bootstrap obtenido en el árbol de *ycf1* fue bajo en ciertos clados, se logró determinar relaciones taxonómicas claras, las cuales pudieron ser contrastadas con otros estudios moleculares y morfológicos, como se describe a continuación.

**Grupo I. xenos - berthae:** Dentro de este grupo se encuentran especies como: *D. xenos* y *D. berthae*, con un soporte de bootstrap del 97%, la filogenia muestra especies basales relacionadas con *Masdevallia* conocidas como Dracuvalias. Esto concuerda con el estudio de Priedgeon et al. (2001), el cual menciona que *D. xenos* es un posible híbrido entre *Dracula* y *Masdevallia*.

Este grupo, coincide con la sistemática tradicional propuesta por (Luer, 1993), el cual lo clasifica en su propio subgénero (*xenosia*). Además, las especies de este clado, presentan similitudes morfológicas como: la posición ascendente de su flor, hojas estrechas y un labio mínimamente desarrollado (Zelenko, 2011).

**Grupo II. Costatae:** En este grupo se encuentran las especies más antiguas del género *Dracula*, logrando diferenciar dos subgrupos:

- **II. 1.** Conformado por: *D. marieae*, *D. mopsus*, *D. mantissa*, *D. felix*, *D. deltoidea*, *D. venosa* y *D. ophioceps*.
- **II.2.** Conformado por: *D. janetiae*, *D. vespertillo*, *D. nycteriana*, *D. bella*, *D. rojasii* y *D. dens-canis*.

A pesar de que el soporte de bootstrap para este grupo fue bajo, los grupos que se forman son coherentes con estudios moleculares y morfológicos. Estas agrupaciones concuerdan con el estudio de Meyer & Cameron (2009), quienes confirman que las especies morfológicamente similares se derivan de un ancestro común. De igual forma, el grupo Costatae concuerda con la sistemática de Luer, quien describe al subgrupo II.1 como variantes de *Dracula felix*, y al subgrupo II.2 como variantes de *Dracula bella*. Además, *Dracula vespertillo* es considerada como la única especie que cruza los Andes y continentes centro y sur americano; por lo que se afirma que es una especie del grupo basal ancestral (Luer, 1993).

**Grupo III. Dodsonii:** Este grupo está conformado por: *D. iricolor*, *D. aphrodes*, *D. dodsonii*. Como se observa en la Figura 11, el clado dentro de la filogenia obtenida presenta un soporte del 86%. Este resultado es coherente con lo reportado por Meyer & Cameron (2009), en donde *Dracula aphrodes* forma parte del clado *D. dodsonii* y *D. iricolor*. Además, dentro de la filogenia obtenida por *ycf1*, se agrupan las especies *D. dodsonii* y *D. iricolor*, las cuales pertenecen a la sección Luer dodsonia, por presentar características similares como, labios grandes y planos, con crecimiento ascendente (Luer, 1993).

**Grupo IV. Lotax:** Este grupo está conformado por: *D. lotax*, *D. saulii* y *D. adrianae*. Filogenéticamente, esta agrupación coincide con los resultados obtenidos a partir de *matK*, en donde se asume que estas especies comparten un ancestro común (Meyer & Cameron, 2009).

Según la sistemática tradicional de Luer, las especies *D. lotax*, *D. saulii* y *D. adrianae* se agrupan en base a su distribución geográfica y se consideran especies reptantes de hojas estrechas con ovarios subcrestados que se distribuyen en los Andes orientales desde el sur de Ecuador hasta el norte de Perú (Baquero, 2019; Luer, 1993).

**Grupo V. Ancestrales:** Este grupo está conformado por: *D. cochliops*, *D. psyche*, *D. andreetae* y *D. cutis bufonis* como se observa en la Figura 11.

La filogenia molecular obtenida a partir de *ycf1*, forma un clado definido entre las especies *D. cochliops*, *D. andreetae*, *D. psyche* y *D. cutis bufonis*, mientras que la obtenida por Meyer & Cameron (2009) agrupó a las especies *D. cochliops* y *D. andreetae* como especies que no se han podido relacionar filogenéticamente.

La filogenia molecular de *ycf1* concuerda con la sistemática de Luer, ya que se consideran especies basales-primitivas, tal es el caso de *Dracula cutis-bufonis* la cual es descrita como una especie única dentro del género *Dracula*. Posee hojas anchas, fácil de reconocer por sus epiquilos bien desarrollados que se asemeja a hongos. Por su parte, *D. andreettae* es una especie rara e inconfundible, sus flores se distinguen por los sépalos abiertos, verrugosos, y son de color verde grisáceo; además de un labio único convexo y pétalos largos (Luer, 1993).

En la Figura 11, se puede observar que a partir del grupo VI la resolución del marcador *ycf1* disminuye, es decir, su filogenia no esclarece relaciones entre las especies de Andes occidentales y centrales de Colombia. Pese a esto, se pueden observar clados que el marcador *matK* no logró diferenciar en estudios anteriores, tal como se describe a continuación:

**Grupo VI. Centroamericanas:** En este grupo se encuentra las especies *D. erythrochaete*, *D. astuta*, *D. carluerii*, *D. rezekiana* y *D. olmosii*. Este grupo concuerda con la sistemática tradicional de Luer (1993), quién las agrupó en base a su morfología (hojas estrechas, un labelo pequeño y floración sucesiva) y distribución, que va desde México hasta Panamá. En contraste, el estudio de Meyer & Cameron (2009), no esclareció la relación filogenética de estas especies. Es la vez que un marcador molecular (*ycf1*) forma un clado que incorpora a especies Biogeográficamente congruentes.

**Grupo VII Inserción de 24 pb:** En este grupo se encuentran las especies atípicas por su variación fenotípica como: *D. gorgono*, *D. platycrater*, *D. roezlii*, *D. robledorum*, *D. lemurella* y *D. nosferatu*. Además de híbridos como: *D. anicula*, *D. calithrix*, *D. venefica* y *D. fleurii\*hirtzii*. Estas especies presentan una inserción de 24 pb, como se observa en la Figura 12, las cuales no se encuentran en ninguna otra especie analizada en este estudio. Según Liu et al. (2013), las regiones cloroplásticas son susceptibles a repeticiones mononucleótidas y a pequeñas

repeticiones en TANDEM. La presencia de esta inserción exclusivamente en estas especies supone la descendencia desde un ancestro común, dado que la aparición de la misma inserción de manera independiente implicaría un evento altamente improbable.

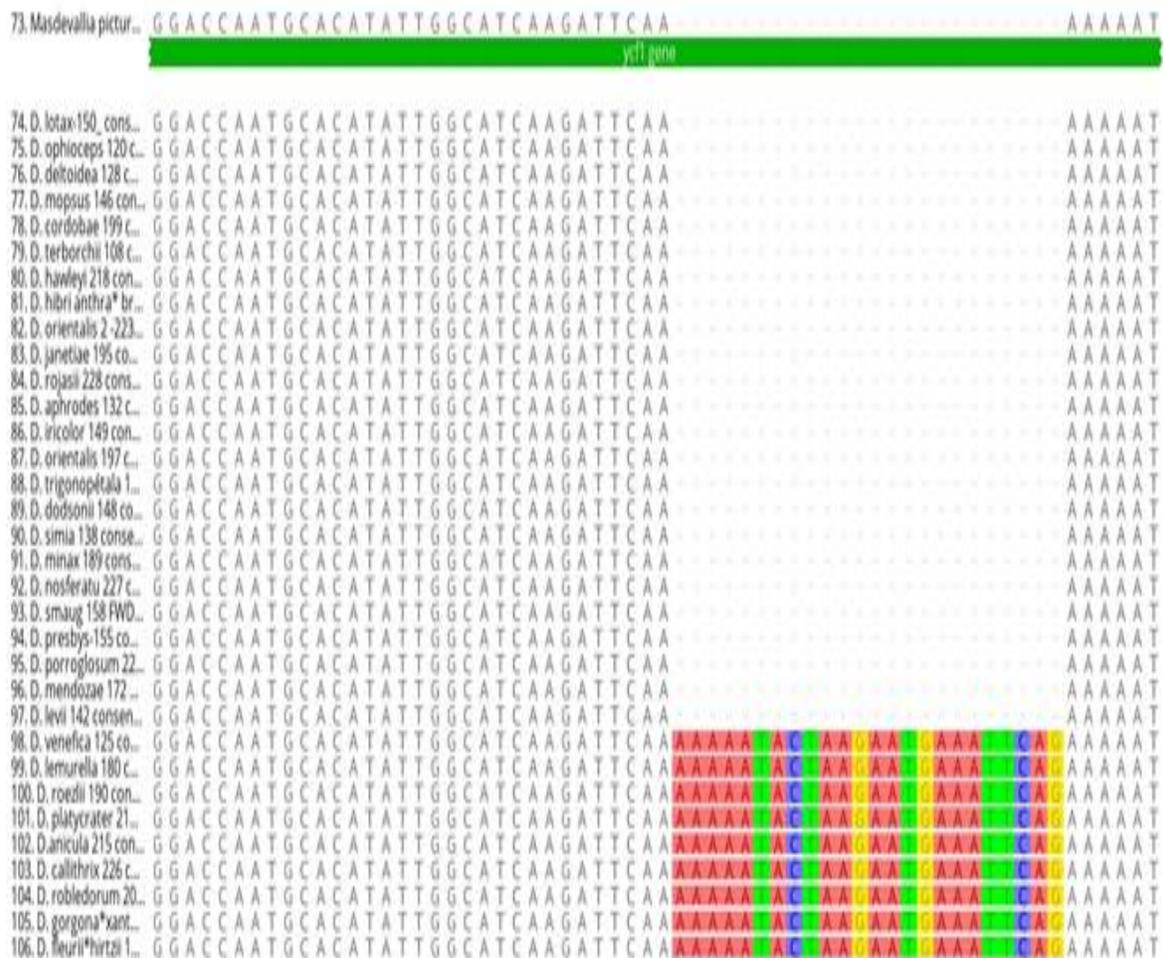


Figura 12. Alineamiento múltiple de especies del género *Dracula*.

A) Se observa la inserción de 24 pares de bases en las especies: *D. gogono*, *D. platycrater*, *D. roezlii*, *D. robledorum*, *D. lemurella*, *D. nosferatu*, *D. ancilla*, *D. callithrix*, *D. venefica* y *D. fleurii*\*hirtzii.

**Grupo VIII. Cordobae- Decussata:** Dentro del árbol filogenético obtenido en este estudio, *ycf1* forma un clado que incluye a las especies del grupo cordobae (*D.*

*tubearia*, *D. pholyphemus*, *D. cordobae*, *D. terborchii*, *D. woolwardie*, *D. pubescens*) y *D. papillosa* del grupo decussata.

La sistemática tradicional de Luer describe a estas especies como plantas que poseen hojas anchas, flores pequeñas con floración sucesiva y simultánea, que se distribuyen en los Andes occidentales del Ecuador (Luer, 1993).

**Grupo IX. Gigas- sodiroi:** En este grupo se encuentran las especies *D. gigas*, *D. hawleyi*, *D. levii*, *D. sijmii* y *D. kareniae*. La filogenia obtenida con el marcador molecular *ycf1* y *matK*, no logra esclarecer la relación filogenética entre estas especies. Meyer & Cameron (2009), sugieren que se debe analizar las secuencias de loci de rápida evolución, para poder aclarar las relaciones filogenéticas no resultas. Sin embargo, el agrupamiento de *D. gigas*, *D. hawleyi*, *D. levii*, *D. sijmii* y *D. kareniae* concuerda con la sistemática tradicional de Luer, quién los agrupa en base a las características morfológicas que presentan como hojas delgadas, inflorescencias largas, floración ascendente (Luer, 1993).

**Grupo X. Radiosa:** Dentro de este grupo se encuentran especies como: *D. radiella*, *D. lindstroemi* y *D. trigonopétala*.

Estas especies no lograron formar un clado que pueda esclarecer las relaciones filogenéticas que existe entre ellas. Sin embargo, Luer las relaciona en base a su morfología: hojas anchas, ramicaulo delgado, ápice de hoja acuminado, epiquilo lleno de lamelas en forma de radio de bicicletas. Además, estas especies se las diferencia biogeográficamente ya que se distribuyen en los Andes occidentales, a excepción de *Dracula radiosa* que crece en Antioquia (Luer, 1993).

Con base a los resultados anteriores, las politomías presentes en el árbol filogenético de la Figura 11 podrían deberse a la alta variabilidad que presenta el gen *ycf1* y a que su posición varía entre ciertas especies, por lo tanto, en este estudio no se pudo esclarecer todas las relaciones existentes entre las especies

del género *Dracula* (Dong et al., 2012; Muller et al., 2006). A pesar de esto, *ycf1* en comparación con otros marcadores moleculares empleados, ha logrado discriminar a nivel de especie en estudios de filogenias en orquídeas. Es importante mencionar que los únicos estudios realizados con el gen *ycf1* sugieren utilizar otras regiones del gen que presenten mayor diversidad de nucleótidos a nivel de especie e incluso proponen el diseño de múltiples combinaciones de cebadores de dichas regiones para obtener la suficiente información filogenética que aclare todas las relaciones de las especies (Dong et al., 2015;. Neubig et al., 2009; Neubig & Abbott, 2010).

De igual manera, en este estudio el marcador molecular *ycf1* no esclareció por completo las relaciones filogenéticas del género *Dracula*, pero se pudo determinar que es un potencial marcador filogenético ya que logró separar la mayoría de los taxones investigados a diferencia de los estudios realizados con el marcador molecular *matK*, lo cual concuerda con el estudio realizado por Dong et al., (2018), quienes confirman que *ycf1* es más variable que el gen *matK*, por lo que puede ser utilizado como un código de barras central para plantas terrestres.

Cabe resaltar, que en este estudio *ycf1* logró dilucidar nuevos clados con respecto a los marcadores tradicionalmente utilizados (ITS y *matK*), esto podría deberse a que el número de caracteres de parsimonia- informativo en la porción de *ycf1* utilizado en este estudio es de aproximadamente dos veces más de lo que aporta *matK*, es así, que *ycf1* logra discriminar a nivel de género, especie e incluso en términos de topologías altamente compatibles (Barthet et al., 2007; Dong et al., 2012; Neubig et al., 2009). Es importante mencionar que *ycf1* no es más variable que ITS, sin embargo, *ycf1* presenta mayor facilidad de alineación y un mayor número de caracteres, lo cual hace que se considere como un marcador molecular ideal para estudios filogenéticos, como lo menciona Whitten et al., 2000.

Es así, que nuestro estudio demuestra que *ycf1* tiene una gran utilidad filogenética, debido a que las dos regiones dentro del gen tienen mayor diversidad de nucleótidos

a nivel de especie dentro de los genomas de plástidos. Sin embargo, para mejorar la resolución del árbol filogenético se debe realizar un análisis más extenso de las regiones plastídicas y nucleares, las cuales puedan ser marcadores moleculares valiosos y brindar más información filogenética para resolver las inconsistencias que se presentan dentro del género (Dong et al., 2015; Neubig et al., 2011; Witten et al., 2014).

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se determinó la filogenia molecular del género *Dracula*, a partir del árbol filogenético obtenido con *ycf1*. Se diferenciaron 10 clados, de los cuales el grupo xenos-berthae coincidió completamente con la sistemática descrita por Luer en 1993. Además, en base a los datos moleculares obtenidos, se encuentran dos nuevas agrupaciones dentro del género *Dracula* (grupo centroamericano y grupo inserción 24 pb), los cuales no se encuentran en ninguna otra filogenia obtenida a partir de marcadores moleculares como *matK*.

El marcador molecular *ycf1*, a pesar de ser poco polimórfico mostró ser Biogeográficamente congruente, debido a que agrupó a las especies ubicadas en Centro América.

Las orquídeas al tener una rápida especiación, no permiten esclarecer las relaciones filogenéticas más recientes, lo cual explica que *ycf1* no haya esclarecido las relaciones entre las especies de Andes occidentales y centrales de Colombia. Además, esto indica que son especies genéticamente más cercanas.

El marcador molecular *ycf1* presentó una mayor capacidad discriminativa con relación al marcador molecular *matK*, tomando como referencia a la sistemática de Luer.

### 5.2. Recomendaciones

Se recomienda trabajar en combinación con otros marcadores moleculares, con mayor nivel de polimorfismo, que aporten mayor información entre especies. Esto podría resolver las inconsistencias presentadas en el género *Dracula*.

Realizar estudios filogenéticos con todas las regiones del marcador molecular *ycf1*, con el fin de obtener una mayor variabilidad entre especies.

Se recomienda realizar estudios combinados moleculares y morfológicos, para obtener una mejor resolución.

Se recomienda realizar la extracción del tejido vegetal un día previo a la realización de la PCR.

## REFERENCIAS

- Akhalkatsi, M., Arabuli, G., Lorenz, R., & Lorenz, R. (2014). *Orchids as indicator species of forest disturbances on limestone quarry in Georgia (South Caucasus)*. *Europäischer Orchideen*, 46(1),123-160. Recuperado el 23 de diciembre de 2018 de [https://www.researchgate.net/profile/Maia\\_Akhalkatsi/publication/262047557\\_Orchids\\_as\\_indicator\\_species\\_of\\_forest\\_disturbances\\_on\\_limestone\\_quarry\\_in\\_Georgia\\_South\\_Caucasus/links/004635367c5565a821000000/Orchids-as-indicator-species-of-forest-disturbances-on-limestone-quarry-in-Georgia-South-Caucasus.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Maia_Akhalkatsi/publication/262047557_Orchids_as_indicator_species_of_forest_disturbances_on_limestone_quarry_in_Georgia_South_Caucasus/links/004635367c5565a821000000/Orchids-as-indicator-species-of-forest-disturbances-on-limestone-quarry-in-Georgia-South-Caucasus.pdf) .
- Aquirre, N., Palomeque, X., Weber, M., & Stimm, B. (2011). *Reforestation and Natural Succession as Tools for Restoration on Abandoned Pastures in the Andes of South Ecuador*. In: Günter S, Weber M, Stimm B, Mosandl R (eds) *Silviculture in the Tropics*. Springer, 513–524. Recuperado el 16 de enero de 2019 de: [https://www.academia.edu/20809221/Reforestation\\_and\\_Natural\\_Succession\\_as\\_Tools\\_for\\_Restoration\\_on\\_Abandoned\\_Pastures\\_in\\_the\\_Andes\\_of\\_South\\_Ecuador](https://www.academia.edu/20809221/Reforestation_and_Natural_Succession_as_Tools_for_Restoration_on_Abandoned_Pastures_in_the_Andes_of_South_Ecuador).
- Azofeifa-Delgado, A. (2016). Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en Frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242. Recuperado el 23 de diciembre de 2018 de: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v17n02\\_221.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221.pdf).
- Baquero, L. (2019). Orquídeas del género *Dracula*. *Phytotaxa*, 1(343), 75–85. Recuperado el 15 de junio de 2019 de: <http://revista.sco.org.co/index.php/orquideologia/article/view/11>.
- Barthet, M, Hilu, K. (2007). *Expression of matK: functional and evolutionary implications*. *NCBI*, 94(8), 57–60. Recuperado el 23 de diciembre de 2018 de: <https://doi.org/10.3732/ajb.94.8.1402>.
- Bayman, P. (2012). Diversidad y filogenia de *Lepanthes* en Puerto Rico:

¿especiación o inmigración? *Lankesiteriana*, 3(12), 131–132. Recuperado el 23 de diciembre de 2018 de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/11553/10898>.

- Bell, C., & Gonzales, L. (2018). *Exploring the utility of “Next-Generation” sequence data ofn inferring the phylogeny of the South American Valeriana (Valerianaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution. Recuperado el 7 de mayo de 2019. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.014*
- Bruford, M., Bradley, D., & Luikart, G. (2003). *DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews*, 4, 900–910. Recuperado el 6 de enero de 2019 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634637>.
- Calderon-Saenz, E. (2007). Serie libros rojos especies amenazadas de Colombia. Libro rojo de plantas de Colombia (IAVH). Bogotá. Recuperado el 6 de enero de 2019.
- Calderón Eduardo, & Farfán Julián. (2003). Especies de los géneros *Dracula* y *Masdevallia* (Orchidaceae) en Colombia. *Biota Colombiana*, 4(2), 187–201. Recuperado el 22 de noviembre de 2018 del: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49140205>
- Carrión, M. (2009). Identificación de orquídeas epifitas del Ecuador mediante *DNA Barcoding*. Quito.
- Castro, J., Navarro, G., Cerdeira, L., & Cobos, M. (2013). Purificación de ADN genómico a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *Mauritia flexuosa* "aguaje. *Scielo*, 79(3), 112–115. Recuperado el 22 de noviembre de 2018 del: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2013000300003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000300003).
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151–174. Recuperado el 3 de marzo de 2019 del: <https://doi.org/10.1111/boj.12234>

- Chen, S., Yao, H., Llu. C, & Shi, L. (2010). *Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. Plos One*, 5(1). Recuperado el 15 de diciembre de 2018 del <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Cuéllar, M. (2011). Código de barras genético de algunas orquídeas veracruzanas bajo riesgo de extinción (Xalapa). Veracruz. Recuperado el 23 de diciembre de 2018.
- Dong, Wenpan, Liu, Jing, Yu, J. (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *Plos One*. Recuperado el 6 de enero de 2019 de: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>
- Dong, W.-L., Wang, R.-N., Zhang, N.-Y., Fan, W.-B., Fang, M.-F., & Li, Z.-H. (2018). *Molecular Evolution of Chloroplast Genomes of Orchid Species: Insights into Phylogenetic Relationship and Adaptive Evolution. International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1–20. Recuperado el 7 de enero de 2019 del: <http://10.0.13.62/ijms19030716>.
- Dong, W, Xu, C., Li, C., Sun, J., & Zuo, Y. (2015). *ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants. Europe PMC*, 5, 114–120. Recuperado el 7 de enero de 2019 del: <https://doi.org/10.1038/srep08348>
- Dotor, M., Gonzáles, L., & Castro, M. (2016). Análisis de la diversidad genética de la mora (*Rubus* spp.) en el departamento de boyacá. *Scielo*, 14(2), 10–17. Recuperado el 8 de mayo de: 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a02.pdf>.
- Drescher, A., Ruf, S., & Calsa, T. (2000). *The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. The Plant Journal*, 22(2), 97–104. Recuperado el 7 de enero de 2019 del: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00722.x>
- Dressler, Robert, L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family* (pp. 141–156). Barcelona: Cambridge University Press.
- Eguiarte, Luis, Castillo, Amanda, Souza, V. (2003). Evolución molecular y genómica

- en Angiospermas. *Scielo*, 25–29. Recuperado el 7 de marzo de 2019 del: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442003000300005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000300005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
- Figueroa, C., Salazar, G. A., Zavaleta, H. A., & Engleman, E. M. (2008). *Root Character Evolution and Systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae)*. *Annals of Botany*, 101(4), 509–520. Recuperado el 6 de enero de 2019 del: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm328>
- Freudenstein, J. V., & Rasmussen, F. N. (1999). *What does morphology tell us about orchid relationships?--a cladistic*. *American Journal of Botany*, 86(2), 225–248. Recuperado el 6 de enero de 2019 del: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680361>
- Freuler, M. J. (2013). Orquídeas (pp. 7–10). Buenos Aires: Albatros SACI.
- García, N., Guitiérrez, P., & Marín, M. (2013). Desarrollo de marcadores microsatélites y mitocondriales para estudios de variación genética de *Spongospora subterranea f. sp. subterranea*. *Scielo*, 25(2). Recuperado el 22 de diciembre de 2018 del: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612013000200002](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000200002)
- Geneious. (2018). Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis. Recuperado el 14 de marzo de 2019 del: <https://www.geneious.com/>
- Georgius, R. (2003). *Rumphius' orchids: orchid texts from the Ambonese herbal* (pp. 14–16). New Haven: Yale University Press. Recuperado el 14 de marzo de 2019.
- Gernandt, D., Zerón, O., & Goyenechea, I. (2011). Inferencia filogenética mediante secuencias de ADN: un ejemplo con los pinos piñoneros (Universida, pp. 9–11). México. Recuperado el 14 de marzo de 2019.
- Givnish, T. J., Spalink, D E., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., ... Cameron, K. M. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography*,

- 43(10), 1905–1916. Recuperado el 6 de enero de 2019 de: <https://doi.org/10.1111/jbi.12854>
- Górniak, M., Pain, O., & Chase, M. (2010). *Phylogenetic relationships within Orchidaceae based on a low-copy nuclear coding gene, Xdh: Congruence with organellar and nuclear ribosomal DNA results*. *Elsevier*, 56(10), 784–795. Recuperado el 22 de mayo de 2019 del: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211743>
- Gravendeel, B., Eurlings, M. C. M., van den Berg, C., & Cribb, P. J. (2004). Phylogeny of *Pleione* (Orchidaceae) and Parentage Analysis of its Wild Hybrids Based on Plastid and Nuclear Ribosomal ITS Sequences and Morphological Data. *Systematic Botany*, 29(1), 50–63. Recuperado el 14 de marzo de 2019 de: <https://doi.org/10.1600/036364404772973988>
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., & Gascuel, O. (2005). PHYML Online - A web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 557–559. Recuperado el 5 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1093/nar/gki352>
- Gutiérrez, A., Barrientos, A., & Campos, E. (2015). Caracterización molecular y análisis filogenético de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Lauraceae). *Actas-proceedings*, 15–16.
- Gutiérrez, D., Asanza, M., & Jalca, I. (2017). III Jornada Iberoamericana en saludo al día mundial del medio ambiente – Ecuador 2017, 89–90. Recuperado el 14 de abril de 2019.
- Herber, P. (2014). Inventario taxonómico de especies de la familia *orchidaceae* en un área de bosque andino del predio la sierra, santuario de fauna y flora guanentá alto rio fonce (pp. 51–60). Recuperado el 22 de diciembre del 2019.
- Jenner, R. A. (2004). Accepting Partnership by Submission? Morphological Phylogenetics in a Molecular Millennium. *Systematic Biology*, 53(2), 333–359. Recuperado el 14 de 2019 marzo de: <https://doi.org/10.1080/10635150490423962>

- Johan, H. (2003). *Dracula vampira*. In *Orchidaceae* (pp. 121–123).
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. Recuperado el 5 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Koehler, S., Williams, N. H., Whitten, W. M., & Amaral, M. do C. E. do. (2002). *Phylogeny of the Bifrenaria (Orchidaceae) Complex Based on Morphology and Sequence Data from Nuclear rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS) and Chloroplast trnL-trnF Region*. *International Journal of Plant Sciences*, 163(6), 1055–1066. Recuperado el 15 de marzo de 2019 de: <https://doi.org/10.1086/342035>
- Kurt, S., Hakan, M., & Kaya, H. (2016). *Feature based quality assessment of DNA sequencing chromatograms*. *Elsevier*, 41, 420–427. Recuperado el 22 de 2019 de: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.asoc.2016.01.025>
- Li, Z., Szczypka, M., Lu, Y., Thiele, D. J., & Rea, P. a. (1996). *Membranes and Bioenergetics: The Yeast Cadmium Factor Protein ( ycf1) Is a Vacuolar Glutathione S -Conjugate Pump The Yeast Cadmium Factor Protein ( ycf1) Is a Vacuolar Glutathione S -Conjugate Pump*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6509–6517. Recuperado el 22 de diciembre de 2018 de: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6509>
- Liu, Y., Huo, N., Dong, L., Wang, Y., & Zhang, S. (2013). *Complete Chloroplast Genome Sequences of Mongolia Medicine Artemisia frigida and Phylogenetic Relationships with Other Plants*. *PloS One*. Recuperado el 14 de marzo de 2019 de: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057533>
- Luer, C. (1993). *Icones Pleurothallidinarum X. Systematics of Dracula* (46th ed.). Sarasota: Missouri Botanical Garden. Recueprado el 22 de diciembre de 2018.

- MAFFT. (2012). Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences. Recuperado el 16 de enero de 2019 de: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>
- Méndez Felpeto, J. (Ed.). (2001). *III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular: organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares*. Coruña: Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións. Recuperado el 22 de diciembre de 2018 de: <https://www.worldcat.org/title/iii-simposio-cientifico-en-biologia-celular-y-molecular-organizacion-y-evolucion-del-genoma-eucariota-marcadores-moleculares/oclc/41245137>.
- Meneses, C., Rozo, L., & Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*. Recuperado el 27 de mayo de 2019 de: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/1491>
- Meyer, G., & Cameron, K. (2009). A *Preliminary Phylogenetic Study of Dracula (Pleurothallidinae , Epidendroideae , Orchidaceae)*. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*, 100–114. Recuperado el 14 de marzo de 2019 de: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.295.2.1>
- Ming-He, Zhang, Guo-Qiang, Lan, Si-Ren, Liu, Z. (2016). A *molecular phylogeny of Chinese orchids*. *Ebesco*, 54-55. Recuperado el 22 de abril de 2019 de: <https://doi.org/10.1111/jse.12187>
- Molineros, F. (2012). *Caracterización morfológica y filogenética del género Vanilla en el distrito de Buenaventura-Valle del Cauca*. Buenaventura.
- Morales-Hernández, J. L., González-Razo, F. J., & Pérez-Chávez, M. A. (2016). Caracterización de las orquídeas epífitas y sus forofitos en el parque ecológico universitario “José Mariano Mociño” de la universidad autónoma del estado de México. *Polibotánica*, 10(42), 103–119. Recuperado el 15 de enero de 2019 de: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.5>
- Morton, C. (2011). *Newly Sequenced Nuclear Gene (xdh) for inferring angiosperm*

- phylogeny*. *BioOne*, 98(1), 63–89. Recuperado el 22 de julio de 2019 de: <https://doi.org/https://doi.org/10.3417/2008107>
- Muller, K., Borsch, T., & Hilu, K. (2006). *Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: contrasting matK, trnT-F, and rbcL in basal angiosperms*. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 41, 99–117. Recuperado el 15 de mayo de 2019 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904914>
- Neubig, K. M., Whitten, W. M., Carlsward, B. S., Blanco, M. A., Endara, L., Williams, N. H., & Moore, M. (2009). *Phylogenetic utility of ycf1 in orchids: A plastid gene more variable than matK*. *Plant Systematics and Evolution*, 277(1–2), 75–84. Recuperado el 6 de enero de 2019 de: <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0105-0>
- Neubig, K, & Abbott, J. (2010). *Primer development for the plastid region ycf1 in Annonaceae and other magnolids*. *American Journal of Botany*, 97(6), 52–55. Recuperado el 15 de abril de 2019 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622459>.
- Neubig, Kurt, Witten, W., Blanco, M., & Endara, L. (2011). *Preliminary molecular phylogenetics of sobralia and relatives (Orchidaceae: sobralieae)*. *Lankesiteriana*, 11(3), 307–317. Recuperado el 6 de enero de 2019 de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/18286>
- Oses, L. (2017). *Filogenia molecular de las especies de Masdevallia Ruiz & Pav. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) de Costa Rica (pp. 112–115)*. Costa Rica.
- Palma, A., & Eliud, S. (2003). *Utilizacion de marcadores moleculares para definir la posicion taxonomica en orquideas*, 46, 35-40. Recuperado el 15 de junio de 2019 de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1960/1/IAD-2003-T001.pdf>.
- Peláez, N., Buitrago, E., & Meyer, G. (2015). *Nuevas especies colombianas de Dracula y Masdevallia: Pleurothallidinae (Orchidaceae)*. *Sociedad Colombiana de Orquideología*, 27–29. Recuperado el 10 de abril de 2019

- de: <http://revista.sco.org.co/index.php/orquideologia/article/view/45>
- Peña, K Alanis, G Lara, Favela Barajas, L. (2012). Los encinos (*Quercus spp.*) del Parque Ecológico Chipinque: nuevos reportes de especies y aportaciones a su conocimiento. *Ciencia XVUANL*. Recuperado el 22 de enero de 2019 de: <http://eprints.uanl.mx/3125/1/12Articulodelosencinos.pdf>
- Pérez-Almeida, I, Graterol, L, Osorio, G, Ramis, C. (2011). Método modificado de obtención de adn genómico en orquídeas (*Cattleya spp.*) para amplificación con marcadores moleculares. *Scielo*, 23(1), 110-115. Recuperado el 3 de marzo de 2019 de: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612011000100004](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612011000100004).
- Policha, T. (2014). *Pollination biology of the mushroom-mimicking orchid genus Dracula*. *University of Oregon*, 22, 212-216. Recuperado el 22 de diciembre de 2018 de: <http://hdl.handle.net/1794/18404>
- Priedgeon, A., Solano, R., & Chase, M. (2001). *Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences*. *American Journal of Botany*, 88, 2286–2308. Recuperado de <https://doi.org/10.2307/3558390>
- Remm, M Koressaar, T. (2007). *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Rose, J., Kleist, T., Lofstrand, S., & Drew, B. (2018). *Phylogeny, historical biogeography, and diversification of angiosperm order Ericales suggest ancient Neotropical and East Asian connections*. *Elsevier*, 122, 59–79. Recuperado el 5 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.ympcv.2018.01.014>
- Rosero, Carol Montenegro, Franco García, J. (2016). *Molecular markers as tools in the identification and genetic analysis of vector species of interest in public health, type Lutzomyia (Verrucarum Theodor group, 1965)*. *Rev*

*Univ. Salud*, 138–155.

- Sanchez, N., Mayer, J., Andrade, E., & Raiño, N. (2000). Aislamiento y caracterización del genoma cloroplástico (cpADN) del café *Coffea arabica* L. cv. Caturra. *Cenicafé*, 51(3), 177-184. Recuperado el 16 de junio de 2019 de: <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc051%2803%29177-184.pdf>
- Sarmiento, T. (2007). La familia *Orchidaceae* en Colombia. *Actualidades Biológicas*, 29(1). Recuperado el 22 de diciembre de 2018 de: <http://www.scielo.org.co/pdf/cide/v7n2/v7n2a05.pdf>.
- Selvaraj, D., Sarma, R. K., & Ramalingam, S. (2008). *Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding*. *Bioinformation*, 3(1), 24–27. Recuperado de: <https://doi.org/10.6026/97320630003024>
- Simo-Droissart, M., Plunkett, G., & Droissart, V. (2018). *New phylogenetic insights toward developing a natural generic classification of African angraecoid orchids (Vandaeae, Orchidaceae)*. *Elsevier*, 126, 241–249. Recueprado de: <https://doi.org/10.1016/j.ympbev.2018.04.021>.
- Sinchire, R. (2010). Identificación de hongos parásitos en 14 especies del género *Dracula* sembradas bajo invernadero (pp. 212–215). Loja.
- Sosa, V. (2007). *A Molecular and Morphological Phylogenetic Study of Subtribe Bletiinae (Epidendreae, Orchidaceae)*. *Systematic Botany*, 32(1), 34–42. Recuperado de: <https://doi.org/10.1600/036364407780360175>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *Thermo Scientific Phire Tissue Direct PCR Master Mix*, 4–6. Recuperado de: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012959\\_Phire\\_Plant\\_Direct\\_PCR\\_MasterMixes\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012959_Phire_Plant_Direct_PCR_MasterMixes_UG.pdf)
- Thermo Fisher Scientific. (2017). *hire Plant Direct PCR Master Mix - Thermo Fisher Scientific*. Recuperado el 22 de diciembre de 2018 de:

- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F160S>
- Tropicos. (2018). *Dracula*. Recuperado el 16 de junio de 2019 de: <http://www.tropicos.org>
- UNCTAD. (2007). Principios y Criterios de Biocomercio. Nueva York.
- Valencia, R. (2000). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. In *Herbario QCA* (Pontifica, pp. 102–104). Quito.
- Villaseñor, J., & Gual, M. (2014). El bosque mesófilo de montaña y sus plantas con flores (pp. 221–236). Recuperado el 22 de marzo de 2019 de: [https://www.researchgate.net/profile/Jose\\_Villasenor/publication/261250640\\_El\\_bosque\\_mesofilo\\_de\\_montana\\_y\\_sus\\_plantas\\_con\\_flores/links/00b49533aecf1f4163000000/El-bosque-mesofilo-de-montana-y-sus-plantas-con-flores.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jose_Villasenor/publication/261250640_El_bosque_mesofilo_de_montana_y_sus_plantas_con_flores/links/00b49533aecf1f4163000000/El-bosque-mesofilo-de-montana-y-sus-plantas-con-flores.pdf)
- Watanabe, R. (2012). Generación de árboles filogenéticos por medio de algoritmos genéticos de función objetivo híbrido, pp. 72–73.
- Whitten, M., Williams, N., & Chase, M. (2000). *Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. Amer J Bot, 87, 1842–1856.* Recuperado el 14 de marzo de 2019.
- Witten, W., Neubig, K., & Williams, N. (2014). *Generic and subtribal relationships in neotropical Cymbidieae (Orchidaceae) based on matK/ycf1 plastid data. Lankesiteriana, 13(3), 375–392.* Recuperado el 14 de marzo de 2019 de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/14425/13720>.
- Zalapa, J., Cuevas, H., Zgu, H., Steffan, S., & Senalik, D. (2012). *Using next generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) in the plant sciences. American Journal of Botany, 99(2).* Recuperado de: <https://doi.org/10.3732/ajb.1100394>.
- Zambrano, B. J., & Solano-Gómez, R. (2011). Un nuevo híbrido natural de *Dracula* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) del suroccidente de Ecuador. *A New Natural Hybrid of Dracula (Orchidaceae: Pleurothallidinae) from*

*Southwestern Ecuador.*, 82(3), 758–761. Recuperado de:  
<http://www.ibiologia.unam.mx>.

Zelenko, H. (2011). *Orchids Masdevallia with its segregates including Dracula* (pp. 10–40). Quito: ZAI publications.

**ANEXOS**

Anexo 1. Listado de especies del género *Dracula*, recolectadas del Jardín  
Botánico de Quito

Familia	Género	Especie
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>alcithoe</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>amaliae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>andreettae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>aphrodes</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>barrowii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>verthae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>circe</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>cochliops</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>cutis bufonis</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>dens-canis</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>diana</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>exasperata</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>fuligifera</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>gigas</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>iricolor</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>lemurella</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>minax</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>mopsus</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>ophioceps</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>pholeodytes</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>severa</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>sibundoyensis</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>smaug</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>syndactyla</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>veleziana</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>velutina</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>venosa</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>vespertilio</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>wallisii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>wolwardiae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>presbys</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>mendozae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>houtteana</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>cordabae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>citrina</i>

<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>gorgonella</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>janetiae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>nycterina</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>platycrater</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>portillae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Masdevallia</i>	<i>porroglosum</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>psittacina</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>robledorum</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>roezlii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>venefica</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>brangeri</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>anthony</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>polyphemus</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>dodsonii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>tubeana</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>anthracina</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>bella</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>chimaera</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>chiroptera</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>diabola</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>erythrochaete</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>felix</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>gorgona</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>hirtzii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>houtteana</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>olmosii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>radiosa</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>verticulosa</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>astuta</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>levii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>tsubotae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>marsupialis</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>vespertillo</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>benedictii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>gorgona</i> * <i>xantina</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>fleuiri</i> * <i>hirtzii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>janetiae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>pubescens</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>orientalis</i>

<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>hubeinii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>cordobae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>octavioi</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>sauli</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>robledorum</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>vinacea</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>carluerii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>sergioi</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>mantissa</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>posadorum</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>cristinia</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>gorgonella</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>ligiae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>platicrater</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>tsubotae</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>sijmii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>citrina</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>anicula</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>xenos</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>astuta</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>hawleyii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>morleii</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>nycteriana</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Dracula</i>	<i>diana</i>

