



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS MOLECULAR Y MORFOMÉTRICO DE DISTINTAS
ESPECIES DEL GÉNERO *Dracula* (ORCHIDACEAE) APLICADO A LA
DETERMINACIÓN DEL ORIGEN HÍBRIDO DE *Dracula x pinasensis*.

AUTORES

Steffi Daniela Arcos Suárez
Bryan David González Cordero

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS MOLECULAR Y MORFOMÉTRICO DE DISTINTAS ESPECIES
DEL GÉNERO *Dracula* (ORCHIDACEAE) APLICADO A LA DETERMINACIÓN
DEL ORIGEN HÍBRIDO DE *Dracula x pinasensis*.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingenieros en Biotecnología

Profesor Guía

Ph.D. Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Autores

Steffi Daniela Arcos Suárez

Bryan David González Cordero

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Análisis molecular y morfométrico de distintas especies del género *Dracula* (ORCHIDACEAE) aplicado a la determinación del origen híbrido de *Dracula* \times *pinasensis*, a través de reuniones periódicas con los estudiantes Steffi Daniela Arcos Suárez y Bryan David González Cordero, 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

Ph.D. en Agrotecnología

C.C. 1716829666

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Análisis molecular y morfométrico de distintas especies del género *Dracula* (ORCHIDACEAE) aplicado a la determinación del origen híbrido de *Dracula x pinasensis*, de los estudiantes Steffi Daniela Arcos Suárez y Bryan David González Cordero, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

María Isabel Ballesteros Redondo

Ph.D. En Ciencias Biológicas

C.C. 1757168610

DECLARACIÓN 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.”

Steffi Daniela Arcos Suárez

C.C. 1003013165

Bryan David González Cordero

C.C. 0923566939

RESUMEN

Dracula × *pinasensis* se considera, dentro del género *Dracula*, un híbrido natural que se ha encontrado y recolectado en el cantón Piñas de la provincia del El Oro. Además, se ha observado que este híbrido se comporta como especie, forma poblaciones naturales e, inclusive, puede llegar a ser más abundante en cantidad de individuos que cualquiera de las especies consideradas como parentales. Existen alrededor de 131 especies aceptadas de *Dracula*. En la selección de las posibles especies parentales de la especie híbrida se realizó una clasificación de aquellas especies que se encuentran en la misma zona geográfica a *D.* × *pinasensis* y con las que, a su vez, comparten características morfológicas. El objetivo de este estudio fue sustentar el origen del híbrido *Dracula* × *pinasensis*, mediante el uso de herramientas moleculares y morfométricas y proponer las posibles especies parentales que dieron origen a este híbrido. Para esto, se inició con la selección de posibles especies parentales, seguido de la recolección de las muestras. Para el componente molecular del estudio se extrajo el ADN de las especies seleccionadas, se realizó PCR, secuenciación, para finalizar con la reconstrucción de árboles filogenéticos. En el componente morfométrico se dio inicio con la captura de fotografías, determinación de *landmarks* en estructuras sexuales y finalmente la comparación de proporciones entre los distintos *landmarks*. Ambas técnicas aplicadas en este estudio dieron como resultado que *D. venosa* es el parental materno más probable de *Dracula* × *pinasensis*. Los resultados morfométricos apuntan a *D. mopsus* como el parental paterno más probable, por su similitud morfológica y su distribución biogeográfica.

ABSTRACT

Dracula x pinasensis is considered, within the genus *Dracula*, a natural hybrid that has been found and collected in the Piñas canton of the province of El Oro. In addition, it has been observed that this hybrid behaves as a species, forms natural populations can be more abundant in number of individuals than any of the species considered as parental. There are about 131 accepted species of *Dracula*. In the selection of the possible parental species of the hybrid species, a classification was made of those species that are in the same geographical area to *D. x pinasensis* and with which, in turn, they share morphological characteristics. The objective of this study was to support the origin of the hybrid *Dracula x pinasensis*, by using molecular and morphometric tools and to propose the possible parental species that gave rise to this hybrid. For this, it began with the selection of possible parental species, followed by the collection of the samples. For the molecular component of the study, the DNA of the selected species was extracted, PCR was carried out, sequencing, and finally the reconstruction of phylogenetic trees. The morphometric component began with the capture of photographs, determination of *landmarks* in sexual structures and finally the comparison of proportions between the different *landmarks*. Both techniques applied in this study showed that *D. venosa* is the most likely maternal parent of *Dracula x pinasensis*. The morphometric results point to *D. mopsus* as the most probable parental parent, due to its morphological similarity and its biogeographical distribution.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación de la investigación.....	2
1.4. Objetivos.....	3
1.4.1. Objetivo general.....	3
1.4.2. Objetivos Específicos.....	3
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Familia Orchidaceae.....	4
2.2. Historia, ecología y sistemática del género <i>Dracula</i>	7
2.3. La polinización en <i>Dracula</i>	8
2.4. Hibridación natural: ejemplos en la naturaleza, híbridos espontáneos y casos en <i>Dracula</i>	9
2.5. <i>Dracula x pinasensis</i>	12
2.6. Estudios moleculares	14
2.7. Morfometría	16
3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS	17
3.1 Elección de posibles especies parentales para el híbrido natural <i>Dracula x pinasensis</i>	17
3.2 Recolección.....	19
3.3 Análisis molecular.....	19
3.3.1 Extracción de ADN.....	20
3.3.2 PCR	20
3.3.3 Secuenciación.....	22
3.3.4 Filogenia	22
3.4 Análisis morfométrico	23
3.4.1 Captura de fotografías.	23

3.4.2 Determinación de <i>landmarks</i> en estructuras sexuales.....	24
3.4.3 Comparación de proporciones entre los distintos <i>landmarks</i>	25
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Análisis Molecular.....	26
4.2. Análisis morfométrico	32
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
5.1. Conclusiones.....	37
5.2. Recomendaciones.....	38
REFERENCIAS	39
ANEXOS	45

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La familia *Orchidaceae* es una de las familias de plantas más diversas del planeta con alrededor de 25000 especies principalmente distribuidas en los trópicos. De las 5 subfamilias que componen la familia *Orchidaceae* una de las más diversas y que contiene gran parte de las orquídeas epífitas es la subfamilia Epidendroideae. Dentro de Epidendroideae se encuentra una de las subtribus más diversas, llamada Pleurothallidinae. *Dracula*, es un género de la subtribu Pleurothallidinae que posee algunas de las flores más grandes de la subtribu, taxonomía confusa, alto endemismo, y poca especificidad en cuanto a polinizadores (Policha, 2014, Luer, 1993).

Inicialmente las especies de *Dracula* se encontraban dentro del género *Masdevallia* hasta que en 1978 Carlyle Luer describe el género *Dracula* y se basa en las diferencias morfológicas encontradas en las primeras especies del género, que son sustancialmente distintas a lo que se espera de *Masdevallia* (Luer, 1993).

De las 131 especies reconocidas para el género, se conocen además varios casos de hibridación espontánea de *Dracula*, que se originan en invernaderos de cultivo o en la naturaleza, tales son los casos de *Dracula x pinasensis*, *Dracula x radiosyndactyla* y *Dracula x anicula* (Koopowitz, Thornhill, & Anderson, 1993). Se conocen también casos como *D. hawleyi*, *D. aphrodes* y *D. incógnita* que se cree que pudieran tener origen híbrido (Luer & Escobar, 1989).

De los casos mencionados anteriormente, *Dracula x pinasensis* fue descrita como híbrida desde su publicación. La propuesta del origen híbrido de *Dracula x pinasensis* surge de las observaciones superficiales de la similitud de esta con otras especies del mismo género como *D. mopsus*, *D. mantissa* y *D. ophioceps* mismas que han sido encontradas cercanas a la zona de crecimiento del posible híbrido. Tomando en cuenta, que *D. x pinasensis* es altamente similar y simpátrica con *D. mopsus*, se sospecha que es un híbrido natural con *D. mopsus* como uno de sus posibles progenitores, y es quizás uno de los casos de hibridación natural más interesantes puesto que convive con uno de sus posibles especies parentales y en ocasiones llega a ser más abundante y sin diluirse en alguna de las especies parentales (Zambrano, 2011).

1.2 Planteamiento del problema

Dracula x pinasensis es quizás uno de los pocos híbridos naturales en este género de orquídeas que se comporta como especie. Es decir, forma poblaciones naturales y todos los individuos de las poblaciones conocidas tienen el mismo fenotipo y parecen tener un polinizador específico. Al mismo tiempo, una de las especies que se sospecha parental, es simpátrica con *D. x pinasensis* y no se encuentran intermedios fenotípicos entre ambas entidades. En este trabajo se buscará sustentar el origen híbrido y las posibles especies parentales del mismo.

1.3 Justificación de la investigación

Desde el descubrimiento de *Dracula x pinasensis* se consideró que su origen era posiblemente híbrido. La información biogeográfica sumada a la

morfológica, no obstante, no basta para sustentar la hipótesis híbrida, así como para designar posibles especies parentales de dicho híbrido. En este estudio se propone el uso de técnicas moleculares y morfométricas que, combinadas con la información biogeográfica y morfológica, aporten más argumentos a la hipótesis híbrida y proponga posibles especies parentales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Sustentar el origen del híbrido *Dracula x pinasensis*, mediante el uso de herramientas moleculares y morfométricas y proponer las posibles especies parentales que formaron este híbrido

1.4.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar los posibles parentales del híbrido *D. x pinasensis* utilizando argumentos biogeográficos y morfológicos.
- Usar el marcador molecular *ycf1* para determinar el origen híbrido de *D. x pinasensis*, a través de la comparación de sus posibles parentales.
- Cuantificar las similitudes entre el híbrido *D. x pinasensis* y sus posibles parentales utilizando herramientas morfométricas.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Familia Orchidaceae

La familia de plantas vasculares *Orchidaceae* junto con las familias *Compositae*, *Cyperaceae*, *Leguminosae*, *Graminae* y *Rubiaceae* contienen uno de los grupos más diversos del planeta en cuanto a cantidad de especies (Dodson, 1993). A la familia *Orchidaceae* pertenecen alrededor de 25000 a 30000 especies, repartidas en aproximadamente, 800 géneros (Dodson, 2004).

Debido a la enorme cantidad de especies, la familia *Orchidaceae* se ha dividido en varias categorías y subcategorías. A diferencia de familias con menor cantidad de especies en donde su sistemática es definida por género y especie, las orquídeas se subdividen en: subfamilia, tribu, subtribu, género y especie (Tabla 1).

Tabla 1.

Categorías existentes en la sistemática de la familia *Orchidaceae*

Taxonomía	
Familia	Orchidaceae
Sub-familia	Orchidoideae
Tribu	Orchideae
Sub-tribu	Orchidinae
Alianza	Orchis
Género	<i>Plantanthera</i>
Especie	<i>P. bifolia</i>

Nota: Especie de referencia *Plantanthera bifolia*.

La identidad de la familia *Orchidaceae* se basa, principalmente, en la fusión parcial o total de los órganos sexuales masculinos (estambres) y femenino (pistilo) en una misma estructura llamada gynostemium o columna (Dodson, 2014). Además, las flores de las orquídeas cuentan con 6 partes florales divididas en dos juegos de tépalos: tres sépalos justo por encima del ovario ínfero y tres pétalos con uno de ellos modificado y llamado labelo (ver *Figura 1.*).

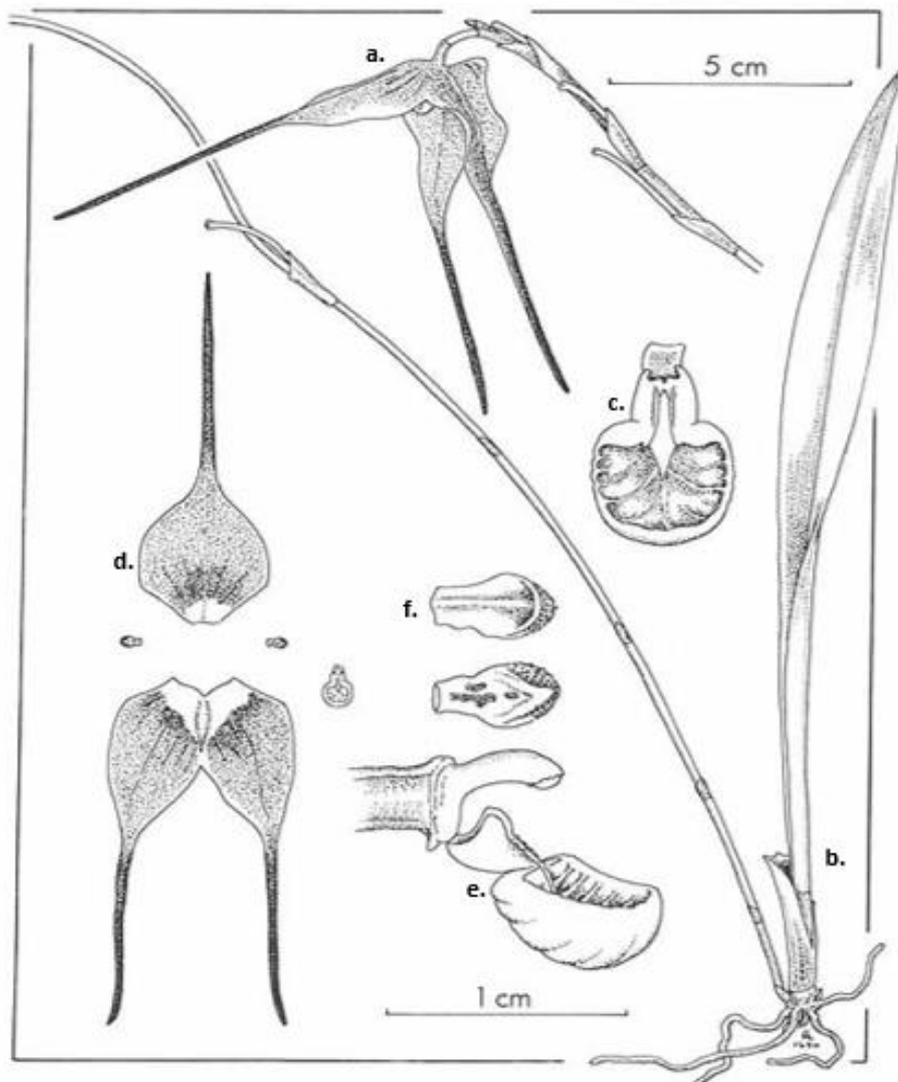


Figura 1. Morfología de *Dracula gigas*.

Tomado de: Native Orchids (Dodson, 2014)

a. Flor, b. Hábito, c. Labelo, d. Periantio seccionado, pedicelo y columna, f. Pétalos.

Las especies de la familia *Orchidaceae* pertenecen a 5 subfamilias:

I. Apostasioideae:

Son plantas terrestres, poseen de dos a tres estambres fértiles, polen en mónadas, ausencia de polinios y filamentos de estambres casi libres; compuestas por 2 géneros, entre los que se encuentran repartidas 20 especies.

II. Cyripedioideae:

Plantas terrestres y raramente epífitas, de dos estambres fértiles y un estaminodio terminal, labelo en forma de bolsa, polen formando masas semi-sólidas, compuestas por 4 géneros, entre los que se encuentran repartidas 115 especies.

III. Vanilloideae:

Terrestres y trepadoras, un estambre fértil, polen en tétradas o en mónadas. Conformada por 90 géneros, entre los que se encuentran repartidas 1600 especies.

IV. Orchidoideae:

Mayormente terrestres, en pocas ocasiones epífitas. Poseen un estambre fértil, presentan una fusión completa de los filamentos, el polen se encuentra en tétradas. Subfamilia compuesta por 70 géneros, entre los que se encuentran repartidas 1900 especies.

V. Epidendroideae:

En su mayoría son plantas epifitas, poseen un estambre fértil, el polen se encuentra en sacos o polinios duros, córneos o cerosos. Presentan una fusión completa de los filamentos y se compone de 500-600 géneros entre los que se encuentran repartidas de 16000 a 21000 especies (Givnish et al., 2016).

Dentro de la subfamilia Epidendroideae se encuentra la subtribu Pleurothallidinae compuesta por 5114 especies, repartidas en 45 distintos géneros, entre los cuales se encuentra el género *Dracula* (Karremans, 2016).

2.2. Historia, ecología y sistemática del género *Dracula*

Dracula es un género de orquídeas de la subtribu Pleurothallidinae que se distribuye desde el Sur de México, hasta el norte de Perú; sin embargo, la mayor concentración de especies del género se localiza en los Andes occidentales, correspondiente al nor-occidente de Ecuador y occidente de Colombia, con alrededor de 50 y 70 especies respectivamente (Pupulin et al., 2009).

La particular denominación de *Dracula* proviene del latín y significa “pequeño dragón” en base a las prolongaciones de los sépalos llamadas caudas, las flores de aspecto macabro que miran hacia el suelo y recuerdan a dragones en miniatura suspendidos en vuelo (Sinchire, 2010, Luer 1993). Carlyle Luer acuña este nombre como un juego de palabras que se puede ver en especies *Dracula vampira*, *Dracula nosfertaui*, *Dracula vlad-tepes*, aludiendo a vampiros y al famoso conde rumano (Luer 1993, Sinchire, 2010).

El género *Dracula* está conformado en su mayoría por plantas epífitas (Pupulin et al., 2009). Los nutrientes y agua requeridos para su crecimiento y desarrollo

lo obtienen de la materia orgánica acumulada en las ramas de las plantas y de la humedad del ambiente . Su hábitat son los bosques de neblina del neo-tropical. La elevación a la que se encuentra el mayor número de especies de *Dracula* está entre los 1500 a 2800 m sobre el nivel del mar, mientras que un porcentaje mínimo de especies crecen en tierras bajas de 200 a 500 m de altura o sobre los 2800 m de elevación (Zambrano, 2011).

Se reconocen 131 especies que pertenecen al género *Dracula*; sin embargo, los cebaderos individuos de este género fueron descritos como especies atípicas para el género *Masdevallia*, hasta el año de 1978 cuando Carlyle Luer propone el género *Dracula* en base a características morfológicas únicas para un grupo de 51 especies (Luer, 1993; Calderón y Farfán, 2003). Las especies de este género poseen hojas ligeramente coriáceas, sépalos revestidos por pubescencia y con prolongaciones apicales llamadas caudas, pétalos bilaminados, un labelo (comúnmente sacciforme) con nervaduras primarias y secundarias, paralelas, perpendiculares y en algunos casos radiales, el labelo se divide en dos estructuras; hipoquilo y epiquilo (Luer, 1993; Pupulin et al., 2009). Las inflorescencias pueden crecer de forma ascendente, horizontal o descendente, pueden aparecer individualmente, secuencialmente o simultáneamente, con más de una flor al mismo tiempo. Sus pétalos son disimulados y pequeños que contrastan con los enormes sépalos (Policha et al, 2016).

2.3. La polinización en *Dracula*.

Los mecanismos de atracción de las orquídeas hacia sus polinizadores se tornan difíciles de entender en algunos casos. Sus sistemas de polinización son diversos entre los que llegan a imitar a otras flores, interpretan formas de varios organismos u ofertan néctar que no existe a insectos que caen en el arte del engaño de estas plantas (León , 2018).

Las estrategias que las orquídeas emplean para su polinización son variadas y en la mayoría de los casos multimodales, siendo el engaño uno de los mecanismos más utilizados para atraer insectos polinizadores (Herber, 2014). Las orquídeas del género *Dracula* no se excluyen de esta última estrategia de tal manera, que emplean aromas para aumentar aún más la probabilidad de conseguir o atraer insectos además de la forma y color parecidos a hongos (Policha, 2014).

En el caso de *Dracula*, aparte de estructuras y morfologías intrincadas, emanan olores propios de los hongos, lo que despierta el instinto en moscas, principalmente de la familia *Drosophilidae* a entrar en contacto con las flores de estas orquídeas. Las moscas pertenecientes al género *Zygothrica* terminan una fracción de su ciclo vital en las paredes superficiales de los organismos fúngicos, razón por la cual, al confundir el labelo de las orquídeas con hongos efectúan la polinización (Policha, 2014). Dichos insectos cargan los paquetes de polen (polinios) recogidos de una planta de *Dracula* y los dirigen hacia el estigma de la flor de otra, para que la polinización se lleve a cabo en este género (León, 2018, Endara et al., Policha y Roy).

Una vez dada la fecundación, se da origen a las semillas, las mismas que carecen de endospermo y cotiledones, las semillas de las orquídeas necesitan de un aporte externo de nutrientes para su germinación. Para lo cual debe existir presencia de hongos micorrízicos, para la germinación de orquídeas en la naturaleza (León y Molina, 2015).

2.4. Hibridación natural: ejemplos en la naturaleza, híbridos espontáneos y casos en *Dracula*.

La hibridación natural es un acontecimiento que ocurre en múltiples organismos vivos, el cual se caracteriza por el cruce entre diferentes genotipos,

generalmente entre especies pertenecientes a un mismo género desplazadas por aislamiento ecológico o reproductivo. Al efectuarse este exótico fenómeno, se dan lugar a nuevas mezclas genéticas favorables o desfavorables para el nuevo ejemplar que las posee (Castillo & Álvarez, 2010).

La hibridación natural esclarece que las barreras biológicas ideadas para salvaguardar la integridad de las especies pueden ser evadidas, siendo el caso de las decenas de miles de híbridos del género *Orchidaceae* que se han originado artificialmente por los humanos, denotando que la incompatibilidad genética no desempeña un rol fundamental en la prevención del intercambio genético entre especies pertenecientes al mismo género o peor aún entre géneros vinculados filogenéticamente. En adición a esto, la efectividad de las barreras biológicas depende de mecanismos geográficos, mecánicos y temporales y prepolinización que impiden que el polen correcto llegue a un estigma incorrecto. Con el origen de uno o varios híbridos naturales, claramente se evidencia que la mayoría de dichas barreras se han debilitado a tal punto que este "paso en falso" podría conducir a una vía alterna de especiación ligada a la evolución (Pupulin, 2015).

Para ejemplificar, existen registros de hibridación natural en especies arbóreas del género *Quercus*, *Pináceas*, o del género *Nothofagus* de Nueva Zelanda y de Sudamérica, a tal punto que en el caso del género *Nothofagus* se ha extendido en gran proporción, siendo descrita ya como especie híbrida, tal como sucede en *Nothofagus leoni* ; cuyo origen se produce entre *N. obliqua* y *N. glauca* (Castillo & Álvarez, 2010).

En el año 1975, el Dr. Oscar y la Sra. Martha de Robledo de Medellín, Colombia compraron a un recolector aficionado local una amplia colección combinada de *Dracula bella* y *Dracula chimaera*, las mismas que fueron cultivadas de manera conjunta en el mismo y único invernadero. Tres años después, se percataron de

que había nuevos individuos con características únicas que las diferenciaban de *Dracula bella* y *Dracula chimaera* por lo que hasta en 1979 se dió nombre a este taxón desconocido el cual fue *Dracula pileus*, ya que tenía la apariencia de un hongo invertido. A partir de este raro acontecimiento por falta de palabras para describir tal fenómeno, se empleó por vez primera el término "espontáneo" determinado como "producido sin trabajo humano". A diferencia de *Dracula pileus*, se daba con más frecuencia el apareamiento de plántulas espontáneas en invernaderos, las mismas que se distinguían por su rara apariencia en sus flores y la rapidez con la que crecían, luciendo de esta manera hoy en día como plántulas vigorosas que conquistan su hábitat de la canasta o maceta en la que se encuentren sin ninguna dificultad (Luer & Escobar, 1989).

Orlando Monsalve un horticultor apasionado al tema, realizó varias polinizaciones cruzadas o cruces no aleatorios entre especies de *Masdevallia* (incluyendo *Dracula*) en invernaderos; no obstante, a esto, no existieron intentos de registrar los resultados obtenidos de dichos cruces dado que ni la plántula híbrida *Masdevallia* ni ningún otro híbrido intergenérico volvieron a aparecer a futuro (Luer & Escobar, 1989)..

Existen individuos que aparentan tener mezclas de genes de especies distintas como *D. hella*, *D. chestertonii*, *D. lotax*, y *D. chimaera*, esto producto de la falta de especificidad de algunos insectos polinizadores de la familia *Drosophilidae* (Luer & Escobar, 1989).

Tomando en cuenta que la hibridación espontánea es común a nivel de invernaderos, no lo es en la naturaleza ya que el aislamiento regional o estacional lo impiden, sin embargo, la hibridación natural puede suceder como en el caso de: *Dracula hawleyi*, *Dracula x pinasensis* y *Dracula radio-syndactyla* (Luer & Escobar, 1989).

Un fenómeno que acontece muy frecuentemente en las plantas es la hibridación interespecífica, sin embargo, el origen de híbridos interespecíficos depende en gran medida de la compatibilidad genética entre ambas especies, superposición de sus rangos de distribución, fenología de floración y las condiciones geográficas para el exitoso asentamiento de la progenie híbrida (Bariloche, Nacional, & Bariloche, 2005). De acuerdo a Anderson, para que un híbrido pueda mantener su linaje, este debe desarrollarse en un ambiente híbrido, es decir, donde las especies puras tengan vulnerable su adaptabilidad, asimismo, su escasa competitividad por polinizadores o por ocupar un espacio son factores que ensancharía la probabilidad de asentamiento de los ejemplares híbridos (Anderson, 1948).

Desde una perspectiva ecológica y evolutiva, el fenómeno de la hibridación juega un rol muy importante en la naturaleza, ya que por medio de esta se supera en la mayoría de los casos en todos los aspectos a los parentales, en otras palabras, se favorece significativamente a la modificación y al crecimiento de la diversidad genética y biológica (Stebbins, 1970). Estos escenarios evolutivos, se presume que se han efectuado en un sin número de ejemplares que se encuentran dentro del género *Dracula*, una de las más curiosas es *Dracula x pinasensis*, ya que esta se la ha visto formando poblaciones y comportándose, ecológica y evolutivamente, como una especie.

2.5. *Dracula x pinasensis*

Morfología:

Hierba de pequeño tamaño aproximadamente de 15 cm de alto, la cual posee tallos monófilos acortados en forma de cilindro. Inflorescencia pronunciada hacia abajo, además, tiene un ovario ensanchado o robusto de color rojo-púrpura oscuro, el mismo que es liso unido a un pedicelo terete. Pétalos de color amarillo-marfil moteado de colores rojo-púrpura, situados de manera erecta y paralelos a

la columna, ligeramente oblicuos con proporciones ovado–espatulados. Adicionalmente, posee un labelo acoplado al pie de la columna de color amarillo claro manchado de rosado, seccionado por un hipoquilo más estrecho en comparación al epiquilo que es más ancho. Columna acortada incurvada en el ápice coloreada de amarillo al igual que la antera en donde se encuentran dos polonios ovoides (ver *Figura 2*) (Zambrano, 2011).

Distribución y hábitat:

Endémica de Ecuador, registrada en las cordilleras del suroccidente, específicamente en la provincia El Oro, en aproximadamente 1200 y 1500 m de altura. Se desarrolla como epífita donde las neblinas son muy habituales, específicamente en el bosque siempreverde piemontano y bosque semideciduo montano.

Estado de conservación:

Su estado no se encuentra evaluado, sus poblaciones que se conocen hasta el momento se sitúan en sobrantes de bosque, las mismas que han sido atacadas por la actividad ganadera, agrícola y deforestación; no se localizan dentro de áreas naturales resguardadas.

Etimología:

El nombre proviene en alusión a Piñas, localidad donde fue hallada.

Comentarios taxonómicos:

Dracula x pinasensis, es muy análoga a *D. mopsus*, especie nativa del Ecuador (simpátrica); por lo que esta especie podría ser un antecesor putativo. A pesar de esto, ésta difiere por varias diferencias en sus destacadas estructuras (Zambrano,2011).

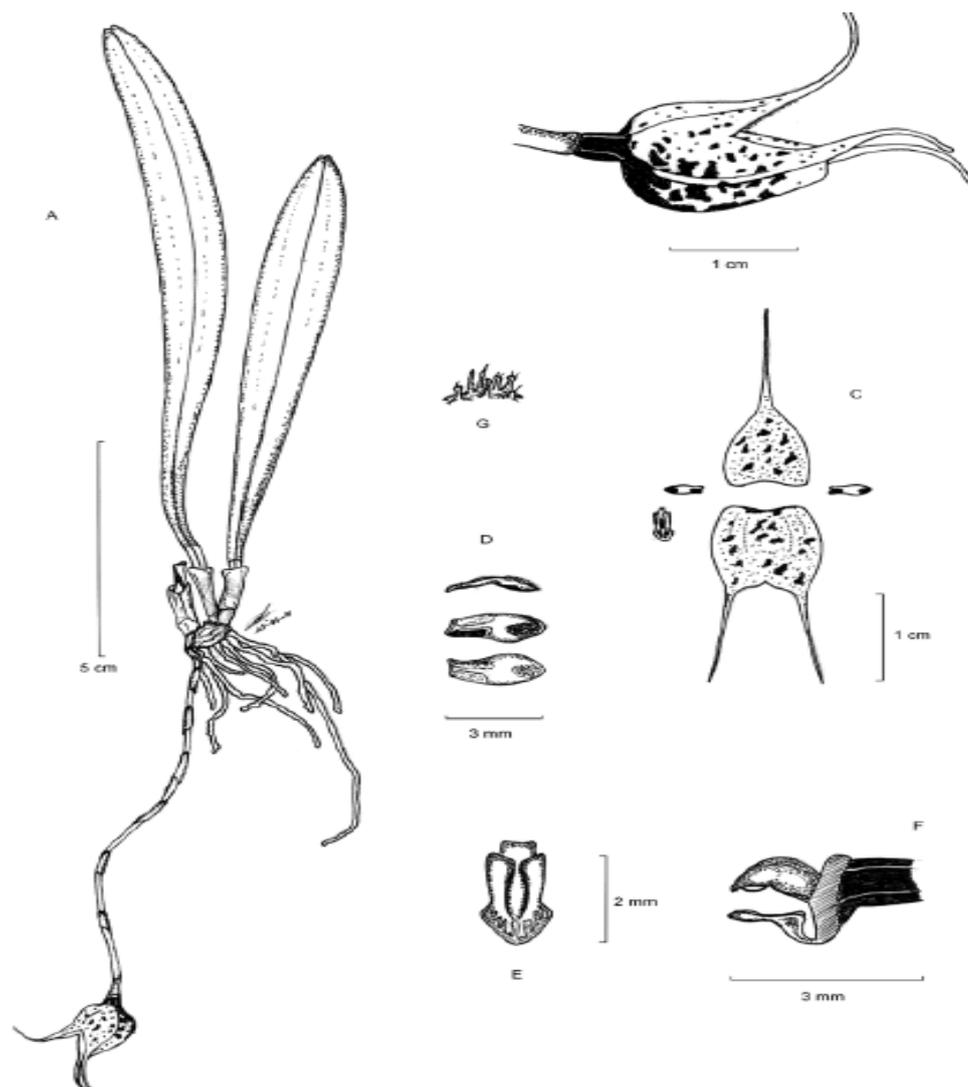


Figura 2. Morfología de *Dracula x pinasensis*.

Tomado de Zambrano, 2011.

A, hábito; B, perspectiva lateral de la flor; C, disección floral; D, pétalos en diferentes ángulos; E, labelo en perspectiva frontal; F, labelo y columna en vista lateral; G, detalle de los pelos en el sépalo.

2.6. Estudios moleculares

Existen segmentos de ADN, cuya ubicación en el genoma es específica de forma que pueden ser rastreados sean estos segmentos codificantes o no, y reciben el nombre de marcadores moleculares (Azofeifa-Delgado, 2006).

Las células vegetales poseen tres tipos de genomas: genoma cloroplástico, nuclear y mitocondrial; siendo el genoma nuclear de herencia biparental, mientras que los dos restantes provienen de una línea materna de las angiospermas (Singh et al, 2012).

Las secuencias de ADN cloroplástico son ampliamente utilizadas para la reconstrucción de filogenias de plantas. Una de las regiones del genoma plastídico más empleadas y más variables es *matk*. El gen cloroplástico *matK* está conformado por 1500bp, se encuentra localizado en el intrón del gen *trnK* y codifica para la proteína Maturasa (Selvaraj et al, 2008) enzima que cataliza la remoción de intrones no autocatalíticos de RNAs permaturos (Barthet y Hilu, 2007). Sin embargo, existen estudios genómicos comparativos realizados con plantas del género *Heliantus* y *Lactuca* que sugieren que existe otro gen plastídico que es aún más variable que *matk* y se trata del gen *ycf1* (Timme et al, 2007) el cual tiene una longitud de 5,500bp. La función del gen aún es desconocida, pero se ha demostrado que es esencial en la supervivencia de las plantas (Neubig et al, 2008). El gen *ycf1* es sumamente variable de forma que se facilita el diseño de cebadores para plantas briofitas, monilofitas, gimnospermas y angiospermas.

La familia Orchidaceae ha sido estudiada filogenéticamente mediante análisis de ADN. Dressler y Higgins (2003) basándose en la comparación de secuencias de ADN definieron un nuevo nombre genérico para el complejo "Cattleya". Por otro lado, en el año 2003 Pridgeon y su equipo reconstruyeron la filogenia de la subtribu Pleurothallidinae empleando análisis nucleares con el marcador *ITS* y los marcadores plastídicos *trnL*, *atpβ-rbcL* y *matk* en tres géneros de orquídeas (Norris y Whitten, 2003). Por tanto, mediante estudios moleculares se pudo definir cercanías genéticas entre subfamilias, tribus, subtribus, géneros y especies.

2.7. Morfometría

La morfometría tradicional, se distingue por el empleo de metodologías estadísticas a agrupaciones de variantes morfológicas, para determinar la covariación que existen en las medidas y analizar patrones de variación que existen dentro o entre muestras, por otro lado, dichas variables por lo general, provienen de medidas lineales en relación a dos puntos homólogos. En ocasiones se utilizan proporciones y ángulos, los mismos que se traducen en cantidades o cifras (Otalvaro,2011).

Por medio de esta herramienta, se logra detallar de manera cuantitativa, indagar y aclarar su variación biológica, la cual se adquiere por presiones medioambientales que ocasionan modificaciones que se heredan ya sean estas físicas o conductuales (Otalvaro,2011).

Por medio de comparaciones morfológicas y anatómicas, se ha logrado categorizar taxonómicamente organismos y entender la variedad de la vida biológica (Adams et al. 2004), por ende, el empleo de herramientas morfométricas, ayuda a comprender las posibles variaciones morfológicas y el reconocimiento de múltiples diferencias que existen entre organismos, poblaciones o especies (Cantera & Gil-agudelo, 2016). Aquellas variaciones que se presenten, pueden ser medidas e identificadas siguiendo modelos matemáticos en base a sus parámetros asimétricos y alométricos de cada individuo. De tal manera, esta herramienta morfométrica no solamente permite contrastar los tamaños entre individuos, sino también pretende cuantificar sus perfiles, aspectos, geometrías, formas y conformaciones de modo estable, es decir, exento de variaciones fisiológicas del tamaño. Tal herramienta, basa su principio en mediciones de puntos con alto nivel de correspondencia, denominados puntos homólogos o *landmarks*, esto no por existir cierta homología entre ellos, sino que permiten establecer o identificar estructuras

específicas de los organismos, los cuales son reproducibles de un individuo a otro (Otalvaro, 2011).

La morfometría como tal, ha sido muy empleada en diferentes estudios tales como: diferenciación de especies (Medel et al. 2003, Langerhans et al. 2003), investigaciones evolutivas (Vaux et al., 2018), caracterización de géneros, especies y poblaciones en plantas como en orquídeas (Cantera & Gil-agudelo, 2016, Cope, Corney, Clark, Remagnino, & Wilkin, 2012), animales y moluscos (Ibáñez et al. 2007, Borda, 2014) e insectos como Anopheles y plecópteros (Gamboa, 2010, Calle et al. 2008), estudios taxonómicos, filogenéticos y paleontológicos (Aguirre et al. 2006, Vidal et al. 2017) y finalmente selección del híbrido tilapia roja y comparación morfométrica en especies híbridas frente a sus parentales (Villegas et al., 2013, Salamanca, 2018).

3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Elección de posibles especies parentales para el híbrido natural *Dracula x pinasensis*.

Debido a que *Dracula x pinasensis* se describe originalmente como híbrido, el primer trabajo fue la comparación morfológica y la distribución geográfica de las especies propuestas como posibles parentales en base a la descripción original y el resto de las especies del género *Dracula* con *D. x pinasensis*.

Comparando morfológicamente las 131 especies de la base de datos botánica *The Plant List* y en base a los registros geográficos descritos por Luer (1993), se eligieron varias especies que coincidían en ambos aspectos (distribución geográfica y morfologías) como posibles especies parentales de *D. x pinasensis* incluyendo especies simpátricas que no pertenecieran a la subsección *Costatae* (*D. cordobae* y *D. hirsuta*) como controles negativos (ver Tabla 2).

Tabla 2.
Especies candidatas de estudio con parecido morfológico y biogeográfico a
Dracula x pinasensis

Especie	Distribución Geográfica	Color de los sépalos	Sépalos moteados	Forma del epiquilo del labelo	Dimensiones del sépalo dorsal (mm)	Pubescencia en los sépalos
<i>D. x pinasensis</i>	Ecuador suroccidente	amarillos, moteados de rojo-púrpura	si	plano	9 x 6	si
<i>D. cordobae</i>	Ecuador suroccidente	blancos-crema bañados y manchados por café-rojizo	no	cóncavo	18 x 15	si
<i>D. deltoidea</i>	Ecuador sur-orientado y suroccidente	blancos-verdoso ligeramente bañados con café-anaranjado	no	cóncavo	11 x 8	si
<i>D. felix</i>	Ecuador nor-occidente	blancos-pálido bañados con café externamente y bañados con rosa y puntos rojos	no	cóncavo	8 x 9	si
<i>D. hirsuta</i>	Ecuador surorientado	rojos-púrpura en el lado externo, crema casi completamente cubiertos por café-rojizo oscuro	no	cóncavo	14 x 16	si
<i>D. mantissa</i>	Ecuador noroccidente	amarillos claro, bañados con manchas rojas	no	cóncavo	5 x 6	si
<i>D. mopsus</i>	Ecuador centro y suroccidente	crema, bañados y moteados con rojo-púrpura o café-púrpura	si	cóncavo	9 x 10	si
<i>D. ophioceps</i>	Colombia suroccidente	amarillos-claro bañados con café hacia el ápice	no	cóncavo	11 x 10	si
<i>D. venosa</i>	Ecuador norte, centro-occidente	crema, moteados de rojo-púrpura	si	convexo	15 x 10	si

Nota: Las celdas resaltadas representan las características que las especies candidatas comparten con *Dracula x pinasensis*.

Para la siguiente parte del estudio (morfométrico y molecular) se descartan dos especies más: *Dracula mantissa* y *D. ophioceps*. La primera, debido al diminuto tamaño de sus flores combinado con otras características no compartidas con *D. x pinasensis*. La segunda, sobre todo, por encontrarse geográficamente muy distante, además de compartir escasos rasgos morfológicos.

Dracula x pinasensis se compara, inicialmente, con todas las especies dentro del género *Dracula* y se descartan, en base a la elección de características; morfológicas, ecológicas y bio-geográficas la mayoría de las especies del género. Luego de esta elección se eligen las siguientes especies como controles negativos (grupo externo para el estudio molecular): *Dracula hirsuta*, *Dracula cordobae*, *Dracula deltoidea*, *Dracula felix*, *Dracula mopsus* y *Dracula venosa*.

3.2 Recolección

Se recolectó el material vegetal compuesto por un segmento de tejido foliar carente de enfermedades de un ejemplar de *D. felix*, *D. venosa*, *D. mopsus*, *D. cordobae*, *D. deltoidea*, *D. hirsuta* y 4 de *D. x pinasensis*. Las muestras fueron almacenadas en papel kraft y transportadas en un cooler para conservarlas, evitado así su degradación, estas muestras fueron almacenadas en el laboratorio a -20 °C, de acuerdo al procedimiento descrito en Dong (2012).

3.3 Análisis molecular

Todos los procedimientos moleculares se llevaron a cabo en el laboratorio de investigación de la Universidad de las Américas, en los meses de octubre 2018 a marzo 2019.

3.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Phire Plant Direct PCR Master de Thermo Fisher Scientific (2017b), para lo cual se tomaron de 2 a 3 pequeños fragmentos de 1mm² de las muestras previamente recolectadas, tras colocarlos en microtubos de 0,5 mL se añadieron 10µL del buffer de extracción del kit Phire Plant Direct PCR Master de Thermo Fisher Scientific y se dejó macerar durante 10 minutos a temperatura ambiente, para finalmente realizar una centrifugación corta a cada muestra por 10 segundos.

3.3.2 PCR

La amplificación de la región del ADN cloroplastídico *ycf1* se realizó utilizando el kit Phire Plant Direct PCR Master de Thermo Fisher Scientific con las concentraciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3.

Concentraciones de la PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix

Reactivo	1x	10x
Agua grado PCR	7,5 µL	75 µL
PCR Master mix	10 µL	100 µL
<i>Primer forward</i>	1 µL	10 µL
<i>Primer reverse</i>	1 µL	10 µL
ADN	0,5 µL	0,5 µL/ cada muestra
Total	20 µL	200 µL

Las amplificaciones del ADN se llevaron a cabo en el termociclador Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR system, con los gradientes de temperatura de la Tabla 4.

Tabla 4.

Temperaturas utilizadas en cada fase de la PCR.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	5 min	1
Desnaturalización	98°C	10 seg	
Hibridación	60°C	10 seg	40
Extensión	72°C	40 seg	
Extensión final	72°C	1 min	1

Tabla 5.

Primers utilizados para la amplificación del gen *ycf1*.

	CEBADORES
Primer Forward (FW)	TAC GTA TGT AAT GAA CGA ATG G
Primer Reverse (REV)	GCT GTT ATT GGC ATC AAA CCA ATA GCG

La verificación de los productos de la PCR se realizó mediante una electroforesis horizontal, para lo cual se preparó un gel de agarosa al 1%, mismo que fue teñido con SYBR safe (Invitrogen). Se tomaron 4µL de las amplificaciones resultantes de la PCR, y se añadieron a los pocillos intermedios del gel, y 4 µL del ladder O'GeneRuler™ Express DNA Ladder (Fischer Scientific), colocado en los pocillos de los extremos, los cuales se corrieron en la cámara de electroforesis a 90V, 300mA, durante 40 minutos. La visualización del gel se realizó en el fotodocumentador Gel Doc™ XR.

3.3.3 Secuenciación

La secuenciación de las muestras amplificadas se realizó bajo el servicio de la Universidad de las Américas, utilizando los *primers* descritos en la tabla 5, más un *primer reverse* interno cuya secuencia fue 5´-TTT GAT TGG GAT GAT CCA AGG-3´

3.3.4 Filogenia

Las secuencias resultantes fueron analizadas utilizando el software Geneious Prime v.2019.1.1.

Utilizando este software se realizó la edición de las secuencias correspondientes a los *primers forward*, *reverse* y *reverse* interno proporcionados por el servicio de secuenciación de la Universidad de Las Américas, seguido por el alineamiento de las mismas para obtener la secuencia consenso del gen *ycf1* en cada una de las especies.

Usando el algoritmo de alineamiento MAFFT Alignment (Kato & Standey, 2013) se realizó el alineamiento múltiple del gen *ycf1* entre todas las secuencias consenso, mediante los parámetros predeterminados por el software; posteriormente se realizó la construcción del árbol filogenético, manejando el complemento PHYML (Guindon et al, 2010) dentro de Geneious Prime para lo cual se utilizó el método máxima similitud, por *bootstrap* no paramétrico con 100 réplicas, mediante siete modelos distintos: Kimura, Jukes- Cantor, General-Time-Reversible, Tamura-Nei, Hasewaga-Kishino-Yano, Felsenstein 84, Felsenstein 81.

3.4 Análisis morfométrico

En el estudio morfométrico se establece el siguiente protocolo:

3.4.1 Captura de fotografías.

Se capturaron fotografías para todas las especies que se obtuvieron de la primera elección (ver Tabla 2). Para esto, se tomó como criterio las estructuras que no presentan alto nivel de variabilidad en el tiempo, dentro del género y en especial en las orquídeas, tales como: labelo, columna y pétalos. Para esto, con ayuda de una cámara fotográfica profesional Nikon 5100 con lente macro de 60 mm, se realizaron tomas a las estructuras de las especies candidatas. Las flores de dichas especies estuvieron en posición frontal y con las mismas condiciones de enfoque, distancia e iluminación.



Figura 3. Representación de condiciones fotográficas aplicadas a todas las especies candidatas.

Dracula venosa, vista frontal, 20 cm de distancia y zoom x1

3.4.2 Determinación de *landmarks* en estructuras sexuales

Se utilizó un software morfométrico MorphoMath 1.1 para establecer distancias y proporciones en base a puntos de referencia o *landmarks*. Este software requiere que se ubiquen dichos *landmarks* de forma equivalente u homóloga para cada estructura sexual de estudio, con el propósito de generar múltiples proporciones a partir de la combinación de distancias generadas por los *landmarks*. Para ello, se cargaron al software las fotografías capturadas de: *Dracula hirsuta*, *Dracula cordobae*, *Dracula deltoidea*, *Dracula felix*, *Dracula mopsus* y *Dracula venosa*, *Dracula x pinasensis*.

A continuación, para todas las especies ya seleccionadas, se estableció de manera equivalente los *landmarks* para labelo, pétalo y columna, tomando en cuenta que con la ubicación de cada landmark se abarcó en su gran mayoría todas las variantes posibles de largo y ancho de cada estructura respectivamente, es decir, largo por ancho del de hipoquilo y epiquilo en el caso del labelo ver Figura 4, separación de "cuernos" en columna, ver Figura 5 o finalmente las diferentes variaciones de ensanchamiento en pétalo, ver Figura 6.

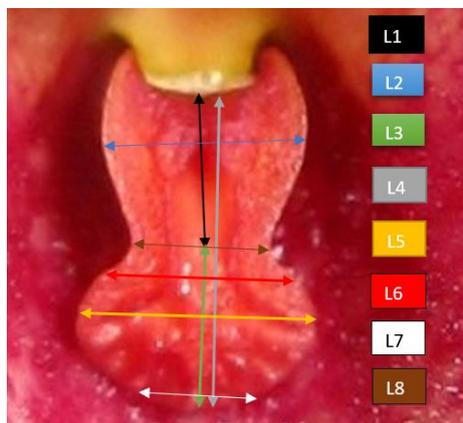


Figura 4. Landmarks establecidos para labelo (L)

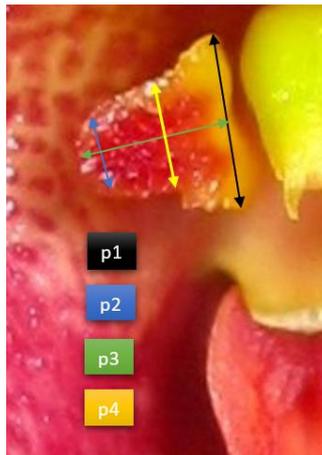


Figura 5. Landmarks establecidos para pétalo (p).

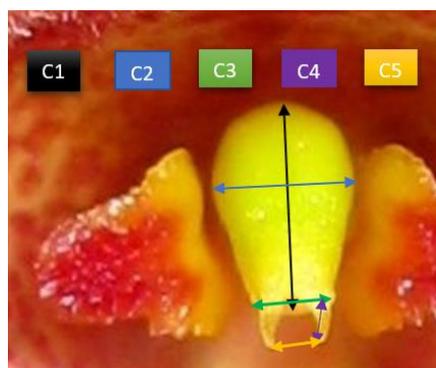


Figura 6. Landmarks establecidos para columna (c).

3.4.3 Comparación de proporciones entre los distintos *landmarks*.

A continuación, se efectuaron comparaciones homólogas entre las proporciones o ratios obtenidos del posible híbrido frente a todas las especies de estudio preseleccionadas. Luego, se efectuó la diferencia entre dichas comparaciones, para luego establecer el valor absoluto de las mismas, ver Anexos 2-19. Se compiló toda la información en donde, se determinó de cada conjunto de proporciones un valor mínimo y el cuartil 1, ver Anexos 21 , 23 y 25. Posteriormente, se resaltaron en negrita los valores mínimos de cada análisis efectuado, así como también de color rosado las celdas que contenían números inferiores al cuartil 1, ver Anexos 21, 23 y 25 .Se contó el número de valores

mínimos y celdas que contenían números inferiores al cuartil 1 en cada especie por separado (Tabla 6).

Finalmente, para cada especie por separado se hizo un conteo global de valores mínimos y celdas que contenían cifras inferiores al cuartil 1.

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis Molecular

En este estudio se descartaron *D. mantissa*, *D. ophioceps* como posibles parentales partícipes de la hibridación de *D. x pinasensis*, debido a características muy lejanas con respecto al mismo. *D. pusilla* fue descartada igualmente debido a su distribución biogeográfica, que va desde México hasta Panamá, lejos del Suroccidente de Ecuador, de donde es endémica *D. x pinasensis* y estudios moleculares han demostrado que pertenece a un linaje de Centro América que nada tiene que ver con las especies Sudamericanas. Este descarte de especies se lo realizó en base al estudio de Zambrano (2011).

El componente molecular en este estudio inició con la recolección de las diez muestras (un ejemplar de *D. felix*, *D. venosa*, *D. mopsus*, *D. cordobae*, *D. deltoidea*, *D. hirsuta* y 4 de *D. xpinasensis*), seguido por la extracción de ADN, la amplificación del gen *ycf1* se realizó mediante PCR, cuyos resultados se revelaron mediante una electroforesis horizontal, finalmente, se realizó la secuenciación del producto de PCR, secuencias con las que se realizaron las reconstrucciones de los árboles filogenéticos.

Después de realizar la PCR para las 10 muestras, la corrida del gel de electroforesis reveló bandas entre 1500 a 2000 pb, lo cual es coherente con el

estudio de Huan Ha Van, et al (2017) en el que se encontraron bandas de 1500pb para el gen *ycf1* en muestras de orquídeas (Fig. 7).

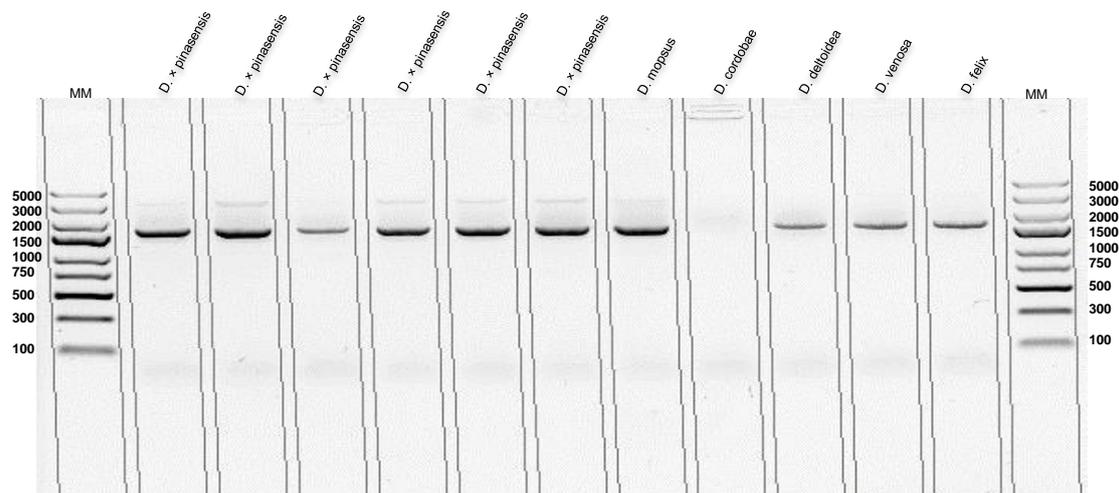


Figura 7. Gel de electroforesis del producto de PCR del gen *ycf1* de algunas de las muestras estudiadas.

Las columnas MM corresponden al marcador molecular de 100 a 5000pb y concentración de 40 ng/ μ L.

La región codificante del gen *ycf1* tiene una longitud de 5,451 pb, razón por la que el gen no puede ser secuenciado en una sola lectura y es necesario dividirlo en fracciones. Neubig, et al (2008) en su estudio divide a *ycf1* en dos fracciones de aproximadamente 1,500 (*ycf1a*) y 1,200 pb (*ycf1b*). En este estudio se empleó la fracción *b* del gel *ycf1*. Sin embargo, y con el fin de reducir la pérdida de información genética fue necesario emplear tres *primers* para completar la secuenciación de la región amplificada.

El alineamiento de las secuencias obtenidas con los tres *primers* FW, REV, INTREV (Fig 8) se realizó para elaborar un consenso por cada muestra (Fig 9), se obtuvo finalmente un promedio de las secuencias consenso de aproximadamente 1,137 pb. Siendo *D. felix* la muestra con el consenso de mayor longitud 1,314pb.

En el caso de *D. cordobae* fue necesario realizar la secuenciación con un *primer* más (INTFW), el cual no fue empleado para el resto de muestras, debido a que particularmente en esta especie no solapaban las secuencias de los cebadores FW e INTREV. Sin embargo, al incluir en el alineamiento a la secuencia resultante del cebador INTFW se pudo obtener un consenso de 1,180pb.

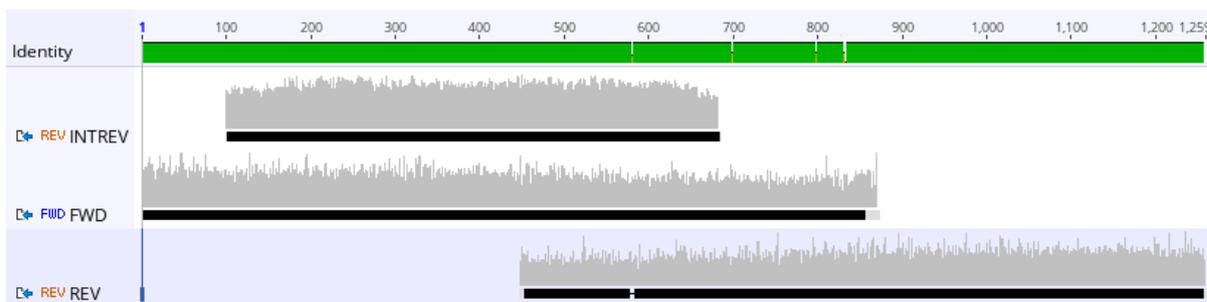


Figura 8. Alineamiento de las tres secuencias de *ycf1* en *D. deltoidea*

Obtenida con los cebadores FW, INTREV, REV.



Figura 9. Secuencia consenso de *D. deltoidea*.

Resultante del alineamiento de los cebadores FWD, REV, INTREV.

Alineamiento múltiple realizado con las diez secuencias consenso de las muestras analizadas (Fig 10), el porcentaje de identidad del alineamiento de las secuencias fue 98.8%.

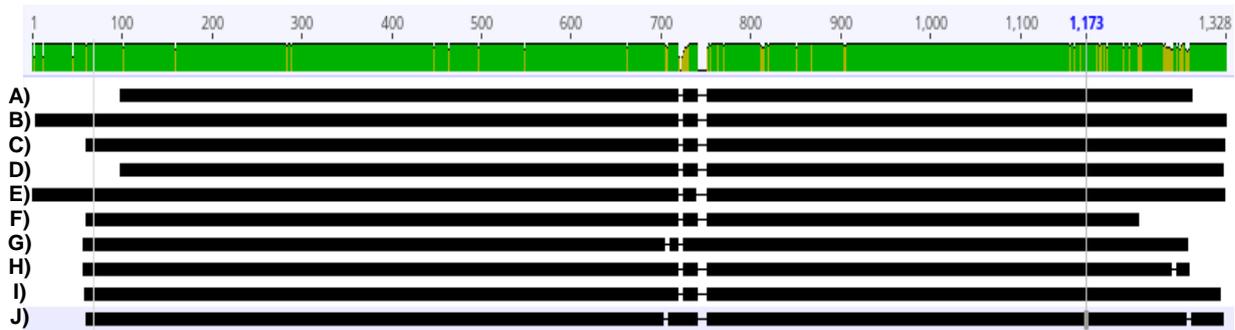


Figura 10. Alineamiento de las 10 secuencias consenso.

A) *D. cordobae*, B) *D. hirsuta*, C) *D. deltoidea*, D) *D. venosa*, E) *D. felix*, F) *D. mopsus*, G) *D. x pinasensis 2*, H) *D. x pinasensis*.

Con el alineamiento múltiple se realizaron reconstrucciones filogenéticas con diferentes modelos evolutivos, esto se hizo para ver la estabilidad de los datos en la reconstrucción filogenética. Los modelos que se utilizaron fueron Kimura, Jukes- Cantor, General-Time-Reversible (GTR), Tamura-Nei, Hasewaga-Kishino-Yano, Felsenstein 84, Felsenstein 81 como se ve en la Fig 11, en la cual, se puede comparar sus topologías.

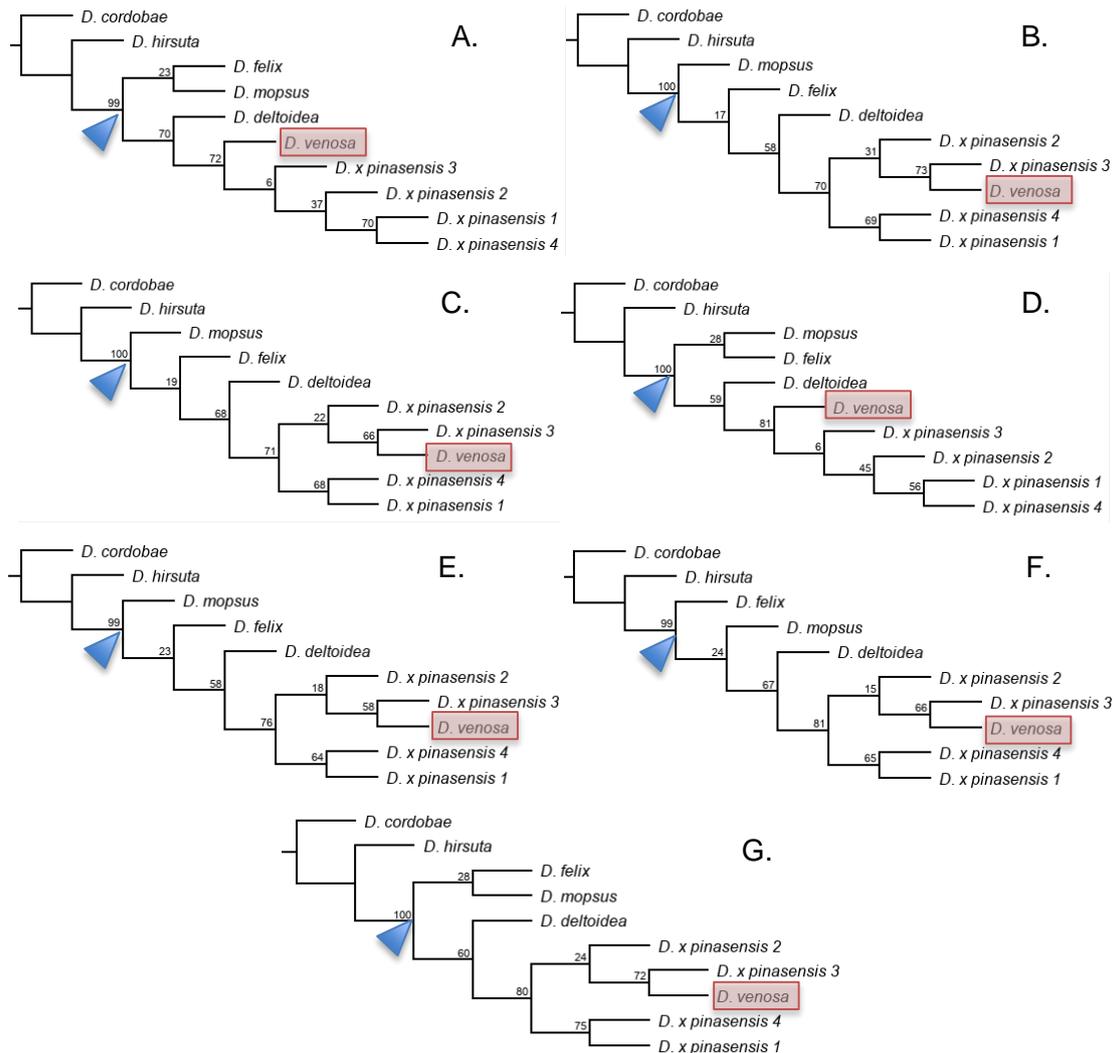


Figura 11. Árboles filogenéticos de la región *ycf1*, realizados con ocho modelos evolutivos distintos

A. Kimura, B. Jukes- Cantor, C. General-Time-Reversible, D. Tamura-Nei, E. Hasewaga-Kishino-Yano, F. Felsenstein 84, G. Felsenstein 81.

Los árboles filogenéticos de la Fig. 11 fueron anclados con la especie *Dracula cordobae*.

El modelo GTR (Fig. 11 C) fue empleado como base, debido a que este modelo considera seis parámetros asociados a los tipos de cambios según Erixon, et al (2003), asumiendo una tasa de mutación más alta que el resto de los modelos evolutivos con los que se analizaron los resultados. Por esto resulta el modelo

más realista de los ocho modelos bajo los cuales se realizaron las reconstrucciones filogenéticas.

Pese a que existen varias similitudes entre los árboles obtenidos a partir de los ocho modelos, también existen algunas diferencias entre ellos. Tomando en cuenta que, el modelo base es *General-Time-Reversible* (Fig. 11 C) existe una variación en el resultado del modelo Kimura (Fig. 11 A) y Tamura-Nei (Fig. 11 D) en los que *D. Venosa* (resaltada en color rosa en Fig, 11), se encuentra fuera del clado conformado por todas las especies de *D. x pinasensis*, mientras que en el modelo GTR se puede encontrar a *D. venosa* como parte de las especies que forman el clado. Otra de las diferencias que se puede observar es que tanto *D. mopsus* como *D. felix* se encuentran agrupadas en el modelo GTR, mientras que en los otros cinco modelos se forma una rama distinta lo cual sugiere que estas dos especies tienen menor grado de parentesco con respecto a lo que se suponía.

En cada uno de los árboles construidos se pudo observar la formación del clado que de acuerdo a la descripción de Luer (1993) corresponde al grupo *Costatae* con un soporte de rama de 99 a 100 para todos los modelos (seleccionada con una flecha azul en Fig. 11), lo cual demuestra la estabilidad de la formación de este clado. En su trabajo, Luer realiza una clasificación subgenérica y agrupa a varias especies dentro de la subsección *Costatae*, entre esas especies se encuentran *D. mopsus*, *D. felix*, *D. deltoidea*, *D. venosa*, resultados que van acorde a lo obtenido en los árboles construidos de la región *ycf1*. Sin embargo, Luer en su trabajo no incluye a *D. x pinasensis* debido a que aún no había sido descubierta, tomando en cuenta, que la primera descripción de *D. x pinasensis* fue realizada por Bosco Zambrano y Rodolfo Solano en el año 2011, pero los resultados en este estudio sugieren que este posible híbrido pertenece al grupo *Costatae*.

En todas las reconstrucciones filogenéticas realizadas se agrupan a *D. venosa* y *D. x pinasensis* en un solo clado y con un soporte de bootstrap entre 70 a 81, lo cual nos indica que esta es una agrupación filogenéticamente estable dentro de nuestro análisis de sensibilidad. Considerando que, el gen *ycf1* está localizado en el genoma cloroplástico, por lo que la información obtenida sobre el origen del posible híbrido por medio de este gen revelará únicamente a quien supone ser el parental materno y en este caso se trata de *D. venosa*.

4.2. Análisis morfométrico

En base al protocolo propuesto anteriormente, se obtuvieron datos de: diferencia entre ratios de cada especie frente al posible híbrido, seguido de su valor absoluto, cálculo y conteo de valores mínimos, cálculo del cuartil 1 y finalmente el conteo de celdas resaltadas de color rosa para valores inferiores al cuartil 1 respectivo de cada estructura (l=labelo, p=pétalo y c=columna). Conteo de valores mínimos y valores inferiores al cuartil 1 en cada combinación de *landmarks*, para columna, labelo y pétalo (Tabla 6 y 7).

Tabla 6.

Conteo de valores mínimos y valores inferiores al cuartil 1 en cada combinación de *landmarks*, para columna, labelo y pétalo.

	Conteo de valores Columna (c)					
	<i>D.cordobae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.deltoidea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>
N° de celdas resaltadas	2	6	4	6	8	14
N° v.mínimos	0	2	4	2	6	6

Conteo de valores Labelo (l)						
	<i>D.cordobae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.deltoidea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>
N° de celdas resaltadas	3	4	4	6	33	46
N° v.mínimos	0	2	0	10	10	33
Conteo de valores Pétalo (p)						
	<i>D.cordobae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.deltoidea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>
N° de celdas resaltadas	2	2	3	5	4	8
N° v.mínimos	2	2	0	0	2	6

Tabla 7.

Sumatoria global del número de valores mínimos y valores inferiores al cuartil 1 obtenidos del conteo de columna, labelo y pétalo.

Conteo de valores Totales						
	<i>D.cordobae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.deltoidea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>
N° de celdas resaltadas	7	12	11	17	45	68
N° v.mínimos	2	6	4	12	18	45

De acuerdo a la Tabla 6, (conteo de valores de columna) *Dracula venosa*, en promedio, tuvo 9 conteos más de celdas coloreadas ante el resto de las

especies, mientras que en valores mínimos tuvo 3 veces más conteos, lo cual refleja un gran parecido con *D. x pinasensis* en esta estructura (ver Anexo 1). En el conteo de valores de labelo, el mayor parecido frente al posible híbrido lo mantuvo *D. venosa* seguida de *D. mopsus* y *D. deltoidea*. El escenario se torna diferente en el conteo de valores pétalo, en donde la más parecida sigue siendo *D. venosa*, pero a esta no le sigue ya *D. mopsus* sino *D. deltoidea* entre las más parecidas con respecto al posible híbrido.

D. venosa fue la especie que presentó la mayor cantidad de valores inferiores al cuartil 1 (celdas color rosado) calculado para cada estructura, con un conteo global de 68, siendo 23 conteos superior a *Dracula mopsus*, 51 a *D. deltoidea*, 57 a *D. hirsuta*, 56 a *D. felix* y finalmente 61 superior a *D. cordobae*. En el apartado de valores mínimos el escenario fue similar, de manera que *Dracula venosa* fue la especie que mayor cantidad de conteos presentó con respecto a las otras, acumulando un total de 45, con 27,33,41,39,43 más que las otras especies, respectivamente. Considerando los valores totales en comparaciones morfométricas se concluye que *D. venosa*, *D. mopsus* y *D. deltoidea* son las especies más parecidas morfológicamente a *D. x pinasensis* en la comparación de tres estructuras de la flor.

D. venosa demostró ser la más parecida versus las otras dos especies. Es importante considerar que las tres especies que se asemejan a *D. x pinasensis* pertenecen a la sección *Costatae* dentro del género *Dracula*. Las dos especies más parecidas (*D. venosa* y *D. mopsus*) a *Dracula x pinasensis*, tienen un área de distribución común en la provincia de Cotopaxi donde *D. mopsus* crece en zonas más bajas (entre los 800-1200m) y *D. venosa* en zonas más altas (1800-2300m) lo cual no restringe a la posibilidad de individuos de cualquiera de las especies que pudiera germinar más bajo o más alto en elevación. En el caso de que *D. x pinasensis* se pudo haber originado de la hibridación de estas dos especies, plantas en flor de ambos individuos tuvieron que encontrarse en algún sitio de los rangos de distribución altitudinal. Es interesante considerar que el

rango altitudinal conocido para *D. x pinasensis* se comparte con *D. mopsus* y no con *D. venosa* o *D. deltoidea*.

Zambrano menciona que uno de los parentales de este posible híbrido natural es *D. mopsus*, una especie simpátrica para *D. x pinasensis*. Morfométrica y molecularmente esta especie presenta gran parecido con respecto al posible híbrido en las tres estructuras del estudio (labelo, columna y pétalo), tal como lo señala Zambrano.

Debido a la región utilizada para el estudio molecular, *ycf1* corresponde a un fragmento *localizado* en el genoma cloroplástico, en donde el posible parental masculino únicamente pudo ser estimado por medio del componente morfométrico en este estudio. En el análisis morfométrico, *D. mopsus* siempre se mantuvo junto a *D. venosa*, como una de las especies más parecidas a *D. x pinasensis*. Otra de las características que aportan a esta afirmación, es la pubescencia que posiblemente heredó de su parental. En *D. mopsus*, la pubescencia se forma a partir de tricomas con forma de diminutas anémonas, es decir, con un pequeño tronco que en la punta se divide en muchos apéndices. En *D. x pinasensis* la pubescencia posee tricomas similares a los de *mopsus* lo cual pudiera indicar herencia de dicha especie. Esta característica es muy rara para el resto de las especies del género, lo cual corrobora a que *D. mopsus* podría ser el parental masculino, tal como lo describe Zambrano (2011).

De acuerdo a Luer (1993) algunas especies del género *Dracula* se encuentran dentro de un grupo denominado *Costatae* debido al parecido de las crestas de los ovarios a costillas. En la monografía de *Dracula*, Luer clasifica a *D. venosa* y *D. mopsus* como especies pertenecientes a este grupo, puesto que presentan crestas en su ovario. En base a los resultados moleculares y morfométricos de este estudio, *D. x pinasensis* aparece dentro del clado de las especies de la sección *Costatae*, no obstante, es la única especie que no tiene el ovario

crestado. Esta ausencia posiblemente esté ligada de forma directa a la introgresión interespecífica. De acuerdo a Pineiro (2010), dicho fenómeno incrementa la variabilidad genética por medio de genotipos recombinantes, lo que brinda a las poblaciones un mecanismo para expresar o silenciar rasgos fenotípicos conforme a la necesidad de adaptación, es decir, desarrollar rasgos o adaptaciones novedosas que los parentales no poseen.

La posible razón del origen de una especie híbrida, es la distribución simpátrica de las especies, tal como se evidenció en la investigación de Dafni y Ivri (1979) y Narváez (2010). Lo cual sugiere que por medio de este fenómeno, *D x pinasensis* pudiera haberse originado como híbrido entre *D. venosa* y *D. mopsus*.

El uso de herramientas morfométricas, son sumamente útiles para comprender las posibles variaciones morfológicas y el reconocimiento de múltiples diferencias que existen entre organismos, poblaciones o especies (Cantera & Gil-agudelo, 2016). En este estudio, por morfometría se logró distinguir el grado de similitud morfológica de *D x pinasensis* frente a los posibles parentales. Sin embargo, Bateman, Smith, & Fay (2008), especulan que esta técnica debe estar ligada con otras para fortalecer su efectividad para la diferenciación de especies híbridas. El uso de morfometría en este estudio permitió proponer los principales parentales de *D x pinasensis* (*Dracula mopsus x Dracula venosa*), resultado muy similar en el estudio de Bateman y colaboradores en donde, por medio de morfometría, se pudo comprobar el origen de una nueva especie híbrida en Gran Bretaña.

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En este estudio se consideraron las 131 especies aceptadas del género *Dracula*, de las cuales, mediante descarte en base a características morfológicas y biogeográficas se seleccionaron para el apartado molecular y morfométrico especies de la sección *Costatae*: *D. deltoidea*, *D. felix*, *D. mantissa*, *D. mopus*, *D. ophioceps*, *D. venosa* y especies ajenas a la sección *D. cordobae* y *D. hirsuta* como controles negativos.

Al utilizar el marcador cloroplastídico *ycf1* se pudo conocer al probable progenitor materno de *D. x pinasensis*. El análisis molecular de este estudio sugiere que *D. venosa* podría ser el parental materno partícipe en la hibridación que da origen a *D. x pinasensis*. Conjuntamente, con el análisis morfométrico se sugiere que, en efecto *D. venosa* puede ser el parental materno que intervino en la formación del posible híbrido natural. Por otro lado, en relación al componente morfométrico de este estudio, se propone que *D. mopsus* podría ser el parental paterno de *D. x pinasensis*, ya que fue la segunda especie con mayor número de conteo de valores mínimos (18) y valores inferiores al cuartil 1 (45) en las estructuras ligadas a la polinización (columna, pétalo y labelo). No hay que olvidar, además, que *D. mopsus* es la única especie de la subsección *Costatae*, que convive con *D. x pinasensis*, lo cual sustenta nuestra hipótesis.

5.2. Recomendaciones

En el caso de determinar el origen de una nueva especie híbrida mediante morfometría, se recomienda hacerlo conjuntamente con técnicas moleculares con el fin de fortalecer su veracidad y eficacia. Además, abarcar la mayor cantidad de individuos de estudio, con el fin de obtener información representativa de una población. Morfométricamente, es recomendable utilizar la mayor cantidad de *landmarks* como sea posible, con el propósito de englobar todas las variabilidades posibles de la estructura a analizar. Las fotografías tomadas a individuos de estudio deben estar bajo las mismas condiciones como la posición de la flor y de la cámara como el enfoque, luz, etc, de tal manera, que se obtengan datos uniformes y reales de cada estructura. Morfometría en estructuras micro: pubescencia, glándulas, estomas, otras estructuras del integumento de los pétalos y sépalos en *Dracula*.

Para el análisis molecular, se recomienda buscar un marcador molecular nuclear que permita obtener información sobre el posible parental masculino, así como también un marcador molecular mitocondrial para contrastar y fortalecer los resultados obtenidos con el marcador cloroplástico *ycf1*.

Por último, estudios que puedan obtener información sobre los polinizadores -colectándolos y realizando observaciones- de las tres especies pudieran resolver, de manera definitiva, la hipótesis de la hibridación de *D. x pinasensis* originada por el cruce de *D. mopsus* con *D. venosa*.

REFERENCIAS

- Anderson, E. (1948). Evolution : *An International Journal of Organic Evolution*. *Nature*, 161(4083), 162–163. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1038/161162d0>
- Bariloche, R., Nacional, U., y Bariloche, C. P. (2005). Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N . pumilio* en el noroeste patagónico, 26(2), 25–32.
- Borda, V. (2014). Análisis morfométrico para la discriminación de especies: el caso del complejo *Megalobulimus leucostoma* *Morphometric analysis to discriminate between species: The case of the Megalobulimus leucostoma*, 117–124.
- Calderón, E., y Farfán, J. (2003). Especies de los géneros *Dracula* y *Masdevalia* (Orchidaceae) en Colombia. *Biota Colombiana*, 4(2), 187–201. following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71: 5–16.
- Cantera, J. R., y Gil-agudelo, D. L. (2016). Diferenciación morfológica de las especies de *Piangua anadara tuberculosa* y *Anadara similis* (*arcidae*) en diferentes bosques de manglar a lo largo de la costa pacífica Colombiana. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2012.41.1.72>.
- Castillo, S., y Álvarez, J. (2010). Morfología y comportamiento meiótico en el híbrido natural *Quercus glabrescens* x *Q. rugosa* (FAGACEAE), 16(2), 171–177. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2009.10.036>.

- Carreño, S., y Molano, B. (2017). Variación morfométrica de la Tilapia roja (*Oreochromis sp*) cultivada en estanques con aguas subterráneas en Arauca, Colombia (Morphometric variation of red Tilapia (*Oreochromis sp*) cultivated in ponds with groundwater in Arauca, Colombia).
- Dafni, A. y Ivri, Y. (1979), *Pollination ecology and hybridization between, orchis coriophora l. and o. collina sol. ex russ. (orchidaceae) in Israel. New Phytologist*, 83: 181-187. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de doi:10.1111/j.1469-8137.1979.tb00740.x
- Di Pardo, A., Chiocchio, V., Barrera, V., Colombo, R. P., Martinez, A. E., Gasoni, L., y Godeas, A. M. (2015). *Mycorrhizal fungi isolated from native terrestrial orchids of pristine regions in Córdoba (Argentina)*. *Revista de Biología 54 Tropical*, 63(1), 275–283.
- Gamboa, M. (2010). Análisis morfométrico de cuatro especies simpátricas del género *Anacroneuria* (*Plecoptera : Perlidae*), 29(2), 247–256.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., Cameron, K. M. (2016). *Orchid historical biogeography, diversification, Antartica and the paradox of orchid dispersal. Journal of Biogeography*, 43(10), 1905–1916. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1111/jbi.12854>
- Guidon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., y Gascuel, O. (2010). *New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies : Assessing the Performance of PhyML 3 . 0*, 59(3), 307–321. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- 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. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Duitama.
- Huan, H. Van, Trang, H. M., y Toan, N. Van. (2017). *Asian Journal of Plant Sciences Research Article Identification of DNA Barcode Sequence and Genetic Relationship among Some Species of Magnolia Family Ha Van Huan , Hoang Minh Trang and Nguyen Van Toan*. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.3923/ajps.2018.56.64>
- Karremans, A. (2016). *Genera pleurothallidinarum: An updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae*, 219–241.
- Katoh K, Standley DM. *MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability*. Mol Biol Evol. 2013;30:772–780. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <http://doi:10.1093/molbev/mst010>
- Koopowitz, H., Thornhill, A. y Anderson, M. *Biodivers Conserv* (1993) 2: 681. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1007/BF00051967>
- Luer, C., y Escobar, R. R. (1989). *Spontaneous hybrids in Dracula*. *American Orchid Society Bulletin*, 58(10), 981-986 EP.
- Luer, C. A. (1993). *Icones Pleurothallidinarum X. Systematics of Dracula*. *Monographs in Systematic Botanic from Missouri Botanical Garden*, 46, 1–244
- León Arteaga, M. (2018). Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula*, mediante el sistema *Barcode*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.

- Narváez, R. (2010). Hibridación natural en orquídeas, 6, 5–6. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de https://www.academia.edu/3646519/Hibridaci%C3%B3n_natural_en_orqu%C3%ADdeas_Precocidad_manifiesta?auto=download
- Neubig, Kurt M.; Whitten, W. Mark; Carlswald, Barbara S.; Blanco, Mario A.; Endara, Lorena; Williams, Norris H.; and Moore, Michael, "*Phylogenetic utility of ycf1 in orchids: a plastid gene more variable than matK*" (2008). *Faculty Research y Creative Activity*. 257.
- Norris, W.; Whitten, M. 2003. *Molecular phylogenetics and generic concepts in the Maxillarieae (Orchidaceae)*. *Lankesteriana*, 7: pp. 61 – 62.
- Otalvaro, J. L. C. (2011). Caracterización morfométrica de *Anadara tuberculosa* y *A. similis* en la costa pacífica colombiana.
- Pinheiro, B. I. O. (2010). *Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids Epidendrum fulgens and E . puniceoluteum (Orchidaceae)*, 3981–3994. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04780.x>
- Policha, T. (2014). *Pollination biology of the mushroom-mimicking orchid genus Dracula*. Eugene: University of Oregon.
- Policha, T., Davis, A., Barnadas, M., Dentinger, B. T. M., Raguso, R. A., y Roy, B. A. (2016). *Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking Dracula orchids using realistic three-dimensional printed flowers*. *New Phytologist*, 210(3), 1058–1071. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1111/nph.13855>
- Pridgeon, A.; Chase, M. 2003. *Phylogenetics of the Subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae : Orchidaceae) based on combined evidences from DNA*

sequences. Lankesteriana, 7: pp. 49 – 50.

Pupulin, F. (2015). *× Cochlezella costaricensis, a Name for a Rare Natural Hybrid in the Zygopetalinae (Orchidaceae)*. *Harvard Papers in Botany*, 20(2), 199–208. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.3100/hpib.v20iss2.2015.n8>

Pupulin, F., Merino, G., y Medina, H. (2009). *Draculas del Ecuador*. (J. Páez, Ed.). Quito: Universidad Alfredo Pérez Guerrero.

Richard M. Bateman, Rhian J. Smith, Michael F. Fay, Los análisis genéticos morfológicos y poblacionales dilucidan el origen, la importancia evolutiva y las implicaciones de conservación de *Orchis × angusticuris* (*O. purpurea × O. simia*), una orquídea híbrida nueva en Gran Bretaña. *Revista botánica de la Linnean Society*, Volumen 157, Número 4, páginas 687–711. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00856.x>

Selvaraj, D., Sarma, R. K., y Sathishkumar, R. (2008). *Bioinformatics Phylogenetic analysis of chloroplast mat K gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding Bioinformatics*. *Bioinformatics*. Recuperado el 8 de agosto de 2019 de <https://doi.org/0973-2063>

Sinchire, R. (2010). *Identificación de hongos parásitos en 14 especies del género Dracula sembradas bajo invernadero*. Loja: Universidad Particular de Loja.

Singh, H. K., Parveen, I., Raghuvanshi, S., y Babbar, S. B. (2012). *The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of Dendrobium species*, 1–11.

- Stebbins, G. L. (1970). *Variation and Evolution in Plants: Progress During the Past Twenty Years BT - Essays in Evolution and Genetics in Honor of Theodosius Dobzhansky: A Supplement to Evolutionary Biology*. In M. K. Hecht y W. C. Steere (Eds.) (pp. 173–208). Boston, MA: Springer US.
- Timme, R., Kuehl, J., Jeffrey, B., y Robert, J. (2007). *Plastid Genomes: Identification of Divergent Regions And Categorization of Shared Repeats*. *American Journal of Botany*, 94(3), 302–312.
- Vaux, F., Trewick, S. A., Crampton, J. S., Marshall, B. A., Beu, A. G., Hills, S. F. K., y Morgan-richards, M. (2018). *Molecular Phylogenetics and Evolution Evolutionary lineages of marine snails identified using molecular phylogenetics and geometric morphometric analysis of shells*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 626–637.
- Vidal, Marcela; Ortiz, Juan C; Escobar, Gustavo; Torres-Pérez, F. (2017). y *Microlophus yanezi*: Dos buenas especies del desierto interior de Chile y Perú, 81(2), 100–110.
- Villegas, D., Milla, M., González, O. C., y Durant, K. (2013). Análisis multivariado en la comparación morfométrica del híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) y sus parentales Multivariate morphometric analysis in the comparison of the hybrid *Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) and their progenitors, 1(1), 29–36.
- Zambrano, J. (2011). Un nuevo híbrido natural de *Dracula* (*Orchidaceae*: *Pleurothallidinae*) del suroccidente de Ecuador, 758–761.

ANEXOS

Anexo 1

Fotografías capturadas a todos los individuos de estudio.

<p><i>D. cordobae</i></p> 	<p><i>D. hirsuta</i></p> 	<p><i>D. felix</i></p> 	
<p><i>D. deltoidea</i></p> 	<p><i>D. venosa</i></p> 	<p><i>D. mopsus</i></p> 	<p><i>D. x pinasensis</i></p> 

Anexo 2

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D.cordobae*.

Nombre de la muestra	<i>D. x pinasensis</i> columna	<i>D.cordobae</i> columna		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
c1/c2	1.7082	1.0886	0.6196	0.6196
c2/c1	0.5854	0.9186	-0.3332	0.3332
c1/c3	2.562	1.6217	0.9403	0.9403
c3/c1	0.3903	0.6166	-0.2263	0.2263
c1/c4	3.7274	6.9021	-3.1747	3.1747
c4/c1	0.2683	0.1449	0.1234	0.1234
c1/c5	3.7121	3.5662	0.1459	0.1459
c5/c1	0.2694	0.2804	-0.011	0.011
c2/c3	1.4998	1.4896	0.0102	0.0102
c3/c2	0.6667	0.6713	-0.0046	0.0046
c2/c4	2.182	6.3401	-4.1581	4.1581
c4/c2	0.4583	0.1577	0.3006	0.3006
c2/c5	2.1731	3.2758	-1.1027	1.1027

c5/c2	0.4602	0.3053	0.1549	0.1549
c3/c4	1.4549	4.2561	-2.8012	2.8012
c4/c3	0.6874	0.235	0.4524	0.4524
c3/c5	1.4489	2.1991	-0.7502	0.7502
c5/c3	0.6902	0.4547	0.2355	0.2355
c4/c5	0.9959	0.5167	0.4792	0.4792
c5/c4	1.0041	1.9354	-0.9313	0.9313

Anexo 3

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en labelo, entre *D. x pinasensis* y *D. cordobae*.

Nombre de la muestra	<i>D. x pinasensis</i> labelo	<i>D.cordobae</i> labelo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
I1/I2	0.9253	0.5795	0.3458	0.3458
I2/I1	1.0807	1.7256	-0.6449	0.6449
I1/I3	1.3493	0.2286	1.1207	1.1207
I3/I1	0.7411	4.3736	-3.6325	3.6325
I1/I4	0.5744	0.1861	0.3883	0.3883
I4/I1	1.7411	5.3734	-3.6323	3.6323

11/5	0.7271	0.216	0.5111	0.5111
15/11	1.3753	4.6289	-3.2536	3.2536
11/16	0.903	0.3397	0.5633	0.5633
16/11	1.1075	2.9435	-1.836	1.836
11/17	1.4933	0.5795	0.9138	0.9138
17/11	0.6696	1.7256	-1.056	1.056
11/18	1.2577	0.5996	0.6581	0.6581
18/11	0.7951	1.6677	-0.8726	0.8726
12/13	1.4582	0.3945	1.0637	1.0637
13/12	0.6858	2.5346	-1.8488	1.8488
12/14	0.6207	0.3211	0.2996	0.2996
14/12	1.6111	3.114	-1.5029	1.5029
12/15	0.7858	0.3728	0.413	0.413
15/12	1.2726	2.6825	-1.4099	1.4099
12/16	0.9758	0.5862	0.3896	0.3896
16/12	1.0248	1.7058	-0.681	0.681
12/17	1.6138	1	0.6138	0.6138
17/12	0.6196	1	-0.3804	0.3804
12/18	1.3592	1.0347	0.3245	0.3245

18/12	0.7357	0.9664	-0.2307	0.2307
13/14	0.4257	0.8139	-0.3882	0.3882
14/13	2.3493	1.2286	1.1207	1.1207
13/15	0.5389	0.9448	-0.4059	0.4059
15/13	1.8556	1.0584	0.7972	0.7972
13/16	0.6692	1.4859	-0.8167	0.8167
16/13	1.4943	0.673	0.8213	0.8213
13/17	1.1067	2.5346	-1.4279	1.4279
17/13	0.9035	0.3945	0.509	0.509
13/18	0.9321	2.6226	-1.6905	1.6905
18/13	1.0728	0.3813	0.6915	0.6915
14/15	1.266	1.1608	0.1052	0.1052
15/14	0.7899	0.8614	-0.0715	0.0715
14/16	1.5721	1.8255	-0.2534	0.2534
16/14	0.6361	0.5478	0.0883	0.0883
14/17	2.6	3.114	-0.514	0.514
17/14	0.3846	0.3211	0.0635	0.0635
14/18	2.1898	3.2221	-1.0323	1.0323
18/14	0.4567	0.3104	0.1463	0.1463

15/16	1.2418	1.5726	-0.3308	0.3308
16/15	0.8053	0.6359	0.1694	0.1694
15/17	2.0537	2.6825	-0.6288	0.6288
17/15	0.4869	0.3728	0.1141	0.1141
15/18	1.7297	2.7756	-1.0459	1.0459
18/15	0.5781	0.3603	0.2178	0.2178
16/17	1.6538	1.7058	-0.052	0.052
17/16	0.6047	0.5862	0.0185	0.0185
16/18	1.3929	1.765	-0.3721	0.3721
18/16	0.7179	0.5666	0.1513	0.1513
17/18	0.8422	1.0347	-0.1925	0.1925
18/17	1.1873	0.9664	0.2209	0.2209

Anexo 4

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en pétalo, entre *D. x pinasensis* y *D.cordobae*

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> pétalo	<i>D.cordobae</i> pétalo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
p1/p2	2.6295	1.389	1.2405	1.2405
p2/p1	0.3803	0.7199	-0.3396	0.3396

p1/p3	1.1063	0.6011	0.5052	0.5052
p3/p1	0.9039	1.6635	-0.7596	0.7596
p1/p4	1.6977	0.6861	1.0116	1.0116
p4/p1	0.589	1.4575	-0.8685	0.8685
p2/p3	0.4207	0.4328	-0.0121	0.0121
p3/p2	2.3769	2.3107	0.0662	0.0662
p2/p4	0.6456	0.494	0.1516	0.1516
p4/p2	1.5489	2.0244	-0.4755	0.4755
p3/p4	1.5346	1.1414	0.3932	0.3932
p4/p3	0.6516	0.8761	-0.2245	0.2245

Anexo 5

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D.deltoidea*

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> columna	<i>D.deltoidea</i> columna		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
c1/c2	1.7082	1.3387	0.3695	0.3695
c2/c1	0.5854	0.747	-0.1616	0.1616
c1/c3	2.562	1.8637	0.6983	0.6983
c3/c1	0.3903	0.5366	-0.1463	0.1463

c1/c4	3.7274	3.6449	0.0825	0.0825
c4/c1	0.2683	0.2744	-0.0061	0.0061
c1/c5	3.7121	4.7288	-1.0167	1.0167
c5/c1	0.2694	0.2115	0.0579	0.0579
c2/c3	1.4998	1.3922	0.1076	0.1076
c3/c2	0.6667	0.7183	-0.0516	0.0516
c2/c4	2.182	2.7227	-0.5407	0.5407
c4/c2	0.4583	0.3673	0.091	0.091
c2/c5	2.1731	3.5324	-1.3593	1.3593
c5/c2	0.4602	0.2831	0.1771	0.1771
c3/c4	1.4549	1.9558	-0.5009	0.5009
c4/c3	0.6874	0.5113	0.1761	0.1761
c3/c5	1.4489	2.5373	-1.0884	1.0884
c5/c3	0.6902	0.3941	0.2961	0.2961
c4/c5	0.9959	1.2974	-0.3015	0.3015
c5/c4	1.0041	0.7708	0.2333	0.2333

Anexo 6

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D. deltoidea*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> labelo	<i>D.deltoidea</i> labelo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
11/2	0.9253	0.5406	0.3847	0.3847
12/1	1.0807	1.8498	-0.7691	0.7691
11/3	1.3493	0.4445	0.9048	0.9048
13/1	0.7411	2.2499	-1.5088	1.5088
11/4	0.5744	0.3046	0.2698	0.2698
14/1	1.7411	3.2833	-1.5422	1.5422
11/5	0.7271	0.4138	0.3133	0.3133
15/1	1.3753	2.4164	-1.0411	1.0411
11/6	0.903	0.5661	0.3369	0.3369
16/1	1.1075	1.7664	-0.6589	0.6589
11/7	1.4933	0.9375	0.5558	0.5558
17/1	0.6696	1.0666	-0.397	0.397
11/8	1.2577	0.7228	0.5349	0.5349
18/1	0.7951	1.3835	-0.5884	0.5884
12/3	1.4582	0.8222	0.636	0.636
13/2	0.6858	1.2163	-0.5305	0.5305

12/14	0.6207	0.5634	0.0573	0.0573
14/12	1.6111	1.7749	-0.1638	0.1638
12/15	0.7858	0.7655	0.0203	0.0203
15/12	1.2726	1.3063	-0.0337	0.0337
12/16	0.9758	1.0472	-0.0714	0.0714
16/12	1.0248	0.9549	0.0699	0.0699
12/17	1.6138	1.7342	-0.1204	0.1204
17/12	0.6196	0.5766	0.043	0.043
12/18	1.3592	1.337	0.0222	0.0222
18/12	0.7357	0.7479	-0.0122	0.0122
13/14	0.4257	0.6853	-0.2596	0.2596
14/13	2.3493	1.4593	0.89	0.89
13/15	0.5389	0.9311	-0.3922	0.3922
15/13	1.8556	1.074	0.7816	0.7816
13/16	0.6692	1.2737	-0.6045	0.6045
16/13	1.4943	0.7851	0.7092	0.7092
13/17	1.1067	2.1093	-1.0026	1.0026
17/13	0.9035	0.4741	0.4294	0.4294
13/18	0.9321	1.6262	-0.6941	0.6941

18/13	1.0728	0.6149	0.4579	0.4579
14/15	1.266	1.3587	-0.0927	0.0927
15/14	0.7899	0.736	0.0539	0.0539
14/16	1.5721	1.8587	-0.2866	0.2866
16/14	0.6361	0.538	0.0981	0.0981
14/17	2.6	3.0781	-0.4781	0.4781
17/14	0.3846	0.3249	0.0597	0.0597
14/18	2.1898	2.3731	-0.1833	0.1833
18/14	0.4567	0.4214	0.0353	0.0353
15/16	1.2418	1.368	-0.1262	0.1262
16/15	0.8053	0.731	0.0743	0.0743
15/17	2.0537	2.2654	-0.2117	0.2117
17/15	0.4869	0.4414	0.0455	0.0455
15/18	1.7297	1.7465	-0.0168	0.0168
18/15	0.5781	0.5726	0.0055	0.0055
16/17	1.6538	1.656	-0.0022	0.0022
17/16	0.6047	0.6038	0.0009	0.0009
16/18	1.3929	1.2767	0.1162	0.1162
18/16	0.7179	0.7832	-0.0653	0.0653

17/18	0.8422	0.771	0.0712	0.0712
18/17	1.1873	1.2971	-0.1098	0.1098

Anexo 7

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en pétalo, entre *D. x pinasensis* y *D.deltoidea*.

Nombre de la muestra	<i>D. x pinasensis</i> pétalo	<i>D.deltoidea</i> pétalo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
p1/p2	2.6295	1.9987	0.6308	0.6308
p2/p1	0.3803	0.5003	-0.12	0.12
p1/p3	1.1063	1.237	-0.1307	0.1307
p3/p1	0.9039	0.8084	0.0955	0.0955
p1/p4	1.6977	1.4186	0.2791	0.2791
p4/p1	0.589	0.7049	-0.1159	0.1159
p2/p3	0.4207	0.6189	-0.1982	0.1982
p3/p2	2.3769	1.6158	0.7611	0.7611
p2/p4	0.6456	0.7098	-0.0642	0.0642
p4/p2	1.5489	1.4089	0.14	0.14
p3/p4	1.5346	1.1468	0.3878	0.3878
p4/p3	0.6516	0.872	-0.2204	0.2204

Anexo 8

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D.felix*.

Nombre de la muestra	<i>D. x pinasensis</i> columna	<i>D. felix</i> columna		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
c1/c2	1.7082	1.2046	-0.2518	0.2518
c2/c1	0.5854	0.8302	0.1224	0.1224
c1/c3	2.562	2.9498	0.1939	0.1939
c3/c1	0.3903	0.339	-0.0257	0.0257
c1/c4	3.7274	17.6484	6.9605	6.9605
c4/c1	0.2683	0.0567	-0.1058	0.1058
c1/c5	3.7121	4.2605	0.2742	0.2742
c5/c1	0.2694	0.2347	-0.0173	0.0173
c2/c3	1.4998	2.4488	0.4745	0.4745
c3/c2	0.6667	0.4084	-0.1291	0.1291
c2/c4	2.182	14.6508	6.2344	6.2344
c4/c2	0.4583	0.0683	-0.195	0.195
c2/c5	2.1731	3.5369	0.6819	0.6819

c5/c2	0.4602	0.2827	-0.0888	0.0888
c3/c4	1.4549	5.9828	2.2639	2.2639
c4/c3	0.6874	0.1671	-0.2602	0.2602
c3/c5	1.4489	1.4443	-0.0023	0.0023
c5/c3	0.6902	0.6924	0.0011	0.0011
c4/c5	0.9959	0.2414	-0.3773	0.3773
c5/c4	1.0041	4.1423	1.5691	1.5691

Anexo 9

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en labelo, entre *D. x pinasensis* y *D.felix*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> labelo	<i>D.felix</i> labelo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
I1/I2	0.9253	0.1371	0.7882	0.7882
I2/I1	1.0807	7.2944	-6.2137	6.2137
I1/I3	1.3493	0.118	1.2313	1.2313
I3/I1	0.7411	8.4739	-7.7328	7.7328
I1/I4	0.5744	0.1062	0.4682	0.4682
I4/I1	1.7411	9.4147	-7.6736	7.6736
I1/I5	0.7271	0.1259	0.6012	0.6012

15/11	1.3753	7.9412	-6.5659	6.5659
11/16	0.903	0.1789	0.7241	0.7241
16/11	1.1075	5.5895	-4.482	4.482
11/17	1.4933	0.3397	1.1536	1.1536
17/11	0.6696	2.9435	-2.2739	2.2739
11/18	1.2577	0.1848	1.0729	1.0729
18/11	0.7951	5.4118	-4.6167	4.6167
12/13	1.4582	0.8608	0.5974	0.5974
13/12	0.6858	1.1617	-0.4759	0.4759
12/14	0.6207	0.7748	-0.1541	0.1541
14/12	1.6111	1.2907	0.3204	0.3204
12/15	0.7858	0.9185	-0.1327	0.1327
15/12	1.2726	1.0887	0.1839	0.1839
12/16	0.9758	1.305	-0.3292	0.3292
16/12	1.0248	0.7663	0.2585	0.2585
12/17	1.6138	2.4781	-0.8643	0.8643
17/12	0.6196	0.4035	0.2161	0.2161
12/18	1.3592	1.3479	0.0113	0.0113
18/12	0.7357	0.7419	-0.0062	0.0062

13/14	0.4257	0.9001	-0.4744	0.4744
14/13	2.3493	1.111	1.2383	1.2383
13/15	0.5389	1.0671	-0.5282	0.5282
15/13	1.8556	0.9371	0.9185	0.9185
13/16	0.6692	1.516	-0.8468	0.8468
16/13	1.4943	0.6596	0.8347	0.8347
13/17	1.1067	2.8788	-1.7721	1.7721
17/13	0.9035	0.3474	0.5561	0.5561
13/18	0.9321	1.5658	-0.6337	0.6337
18/13	1.0728	0.6386	0.4342	0.4342
14/15	1.266	1.1856	0.0804	0.0804
15/14	0.7899	0.8435	-0.0536	0.0536
14/16	1.5721	1.6844	-0.1123	0.1123
16/14	0.6361	0.5937	0.0424	0.0424
14/17	2.6	3.1984	-0.5984	0.5984
17/14	0.3846	0.3127	0.0719	0.0719
14/18	2.1898	1.7397	0.4501	0.4501
18/14	0.4567	0.5748	-0.1181	0.1181
15/16	1.2418	1.4207	-0.1789	0.1789

16/15	0.8053	0.7039	0.1014	0.1014
15/17	2.0537	2.6978	-0.6441	0.6441
17/15	0.4869	0.3707	0.1162	0.1162
15/18	1.7297	1.4674	0.2623	0.2623
18/15	0.5781	0.6815	-0.1034	0.1034
16/17	1.6538	1.8989	-0.2451	0.2451
17/16	0.6047	0.5266	0.0781	0.0781
16/18	1.3929	1.0328	0.3601	0.3601
18/16	0.7179	0.9682	-0.2503	0.2503
17/18	0.8422	0.5439	0.2983	0.2983
18/17	1.1873	1.8385	-0.6512	0.6512

Anexo 10

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en pétalo, entre *D. x pinasensis* y *D.felix*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> pétalo	<i>D.felix</i> pétalo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
p1/p2	2.6295	1.7191	0.9104	0.9104
p2/p1	0.3803	0.5817	-0.2014	0.2014
p1/p3	1.1063	0.8595	0.2468	0.2468

p3/p1	0.9039	1.1634	-0.2595	0.2595
p1/p4	1.6977	1.248	0.4497	0.4497
p4/p1	0.589	0.8013	-0.2123	0.2123
p2/p3	0.4207	0.5	-0.0793	0.0793
p3/p2	2.3769	2	0.3769	0.3769
p2/p4	0.6456	0.726	-0.0804	0.0804
p4/p2	1.5489	1.3774	0.1715	0.1715
p3/p4	1.5346	1.452	0.0826	0.0826
p4/p3	0.6516	0.6887	-0.0371	0.0371

Anexo 11

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D.hirsuta*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> columna	<i>D.hirsuta</i> columna		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	RESTA	V.ABS
c1/c2	1.7082	1.2252	0.483	0.483
c2/c1	0.5854	0.8162	-0.2308	0.2308
c1/c3	2.562	2.5111	0.0509	0.0509
c3/c1	0.3903	0.3982	-0.0079	0.0079

c1/c4	3.7274	12.6667	-8.9393	8.9393
c4/c1	0.2683	0.0789	0.1894	0.1894
c1/c5	3.7121	3.8	-0.0879	0.0879
c5/c1	0.2694	0.2632	0.0062	0.0062
c2/c3	1.4998	2.0496	-0.5498	0.5498
c3/c2	0.6667	0.4879	0.1788	0.1788
c2/c4	2.182	10.3387	-8.1567	8.1567
c4/c2	0.4583	0.0967	0.3616	0.3616
c2/c5	2.1731	3.1016	-0.9285	0.9285
c5/c2	0.4602	0.3224	0.1378	0.1378
c3/c4	1.4549	5.0442	-3.5893	3.5893
c4/c3	0.6874	0.1982	0.4892	0.4892
c3/c5	1.4489	1.5133	-0.0644	0.0644
c5/c3	0.6902	0.6608	0.0294	0.0294
c4/c5	0.9959	0.3	0.6959	0.6959
c5/c4	1.0041	3.3333	-2.3292	2.3292

Anexo 12.

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en labelo, entre *D. × pinasensis* y *D.hirsuta*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> labelo	<i>D.hirsuta</i> labelo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	RESTA	V.ABS
11/12	0.9253	0.4048	0.5205	0.5205
12/11	1.0807	2.4706	-1.3899	1.3899
11/13	1.3493	0.2629	1.0864	1.0864
13/11	0.7411	3.8041	-3.063	3.063
11/14	0.5744	0.2082	0.3662	0.3662
14/11	1.7411	4.804	-3.0629	3.0629
11/15	0.7271	0.2982	0.4289	0.4289
15/11	1.3753	3.353	-1.9777	1.9777
11/16	0.903	0.2865	0.6165	0.6165
16/11	1.1075	3.4907	-2.3832	2.3832
11/17	1.4933	0.6891	0.8042	0.8042
17/11	0.6696	1.4511	-0.7815	0.7815
11/18	1.2577	0.4047	0.853	0.853
18/11	0.7951	2.4709	-1.6758	1.6758
12/13	1.4582	0.6495	0.8087	0.8087
13/12	0.6858	1.5398	-0.854	0.854

12/14	0.6207	0.5143	0.1064	0.1064
14/12	1.6111	1.9445	-0.3334	0.3334
12/15	0.7858	0.7368	0.049	0.049
15/12	1.2726	1.3572	-0.0846	0.0846
12/16	0.9758	0.7078	0.268	0.268
16/12	1.0248	1.4129	-0.3881	0.3881
12/17	1.6138	1.7025	-0.0887	0.0887
17/12	0.6196	0.5874	0.0322	0.0322
12/18	1.3592	0.9999	0.3593	0.3593
18/12	0.7357	1.0001	-0.2644	0.2644
13/14	0.4257	0.7919	-0.3662	0.3662
14/13	2.3493	1.2628	1.0865	1.0865
13/15	0.5389	1.1345	-0.5956	0.5956
15/13	1.8556	0.8814	0.9742	0.9742
13/16	0.6692	1.0898	-0.4206	0.4206
16/13	1.4943	0.9176	0.5767	0.5767
13/17	1.1067	2.6215	-1.5148	1.5148
17/13	0.9035	0.3815	0.522	0.522
13/18	0.9321	1.5396	-0.6075	0.6075

18/13	1.0728	0.6495	0.4233	0.4233
14/15	1.266	1.4327	-0.1667	0.1667
15/14	0.7899	0.698	0.0919	0.0919
14/16	1.5721	1.3762	0.1959	0.1959
16/14	0.6361	0.7266	-0.0905	0.0905
14/17	2.6	3.3105	-0.7105	0.7105
17/14	0.3846	0.3021	0.0825	0.0825
14/18	2.1898	1.9442	0.2456	0.2456
18/14	0.4567	0.5143	-0.0576	0.0576
15/16	1.2418	0.9606	0.2812	0.2812
16/15	0.8053	1.0411	-0.2358	0.2358
15/17	2.0537	2.3106	-0.2569	0.2569
17/15	0.4869	0.4328	0.0541	0.0541
15/18	1.7297	1.357	0.3727	0.3727
18/15	0.5781	0.7369	-0.1588	0.1588
16/17	1.6538	2.4055	-0.7517	0.7517
17/16	0.6047	0.4157	0.189	0.189
16/18	1.3929	1.4127	-0.0198	0.0198
18/16	0.7179	0.7079	0.01	0.01

l7/l8	0.8422	0.5873	0.2549	0.2549
l8/l7	1.1873	1.7028	-0.5155	0.5155

Anexo 13.

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en pétalo, entre *D. x pinasensis* y *D.hirsuta*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> pétalo	<i>D.hirsuta</i> pétalo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
p1/p2	2.6001	1.5837	1.0164	1.0164
p2/p1	0.3846	0.6314	-0.2468	0.2468
p1/p3	1.6554	0.9619	0.6935	0.6935
p3/p1	0.6041	1.0397	-0.4356	0.4356
p1/p4	1.2041	0.9903	0.2138	0.2138
p4/p1	0.8305	1.0098	-0.1793	0.1793
p2/p3	0.6366	0.6074	0.0292	0.0292
p3/p2	1.5707	1.6465	-0.0758	0.0758
p2/p4	0.4631	0.6253	-0.1622	0.1622
p4/p2	2.1594	1.5992	0.5602	0.5602
p3/p4	0.7274	1.0295	-0.3021	0.3021
p4/p3	1.3748	0.9713	0.4035	0.4035

Anexo 14

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D.mopsus*.

Nombre de la muestra	<i>D. x pinasensis</i> columna	<i>D.mopsus</i> columna		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
c1/c2	1.7082	1.4121	0.2961	0.2961
c2/c1	0.5854	0.7082	-0.1228	0.1228
c1/c3	2.562	2.1318	0.4302	0.4302
c3/c1	0.3903	0.4691	-0.0788	0.0788
c1/c4	3.7274	3.4244	0.303	0.303
c4/c1	0.2683	0.292	-0.0237	0.0237
c1/c5	3.7121	4.5679	-0.8558	0.8558
c5/c1	0.2694	0.2189	0.0505	0.0505
c2/c3	1.4998	1.5096	-0.0098	0.0098
c3/c2	0.6667	0.6624	0.0043	0.0043
c2/c4	2.182	2.425	-0.243	0.243
c4/c2	0.4583	0.4124	0.0459	0.0459
c2/c5	2.1731	3.2348	-1.0617	1.0617

c5/c2	0.4602	0.3091	0.1511	0.1511
c3/c4	1.4549	1.6063	-0.1514	0.1514
c4/c3	0.6874	0.6225	0.0649	0.0649
c3/c5	1.4489	2.1428	-0.6939	0.6939
c5/c3	0.6902	0.4667	0.2235	0.2235
c4/c5	0.9959	1.3339	-0.338	0.338
c5/c4	1.0041	0.7497	0.2544	0.2544

Anexo 15

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en labelo, entre *D. x pinasensis* y *D.mopsus*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> labelo	<i>D.mopsus</i> labelo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
l1/l2	0.9253	0.5357	0.3896	0.3896
l2/l1	1.0807	1.8667	-0.786	0.786
l1/l3	1.3493	0.6164	0.7329	0.7329
l3/l1	0.7411	1.6224	-0.8813	0.8813
l1/l4	0.5744	0.3813	0.1931	0.1931
l4/l1	1.7411	2.6224	-0.8813	0.8813
l1/l5	0.7271	0.5056	0.2215	0.2215

15/11	1.3753	1.9778	-0.6025	0.6025
11/16	0.903	0.5732	0.3298	0.3298
16/11	1.1075	1.7446	-0.6371	0.6371
11/17	1.4933	1.111	0.3823	0.3823
17/11	0.6696	0.9001	-0.2305	0.2305
11/18	1.2577	0.6081	0.6496	0.6496
18/11	0.7951	1.6446	-0.8495	0.8495
12/13	1.4582	1.1506	0.3076	0.3076
13/12	0.6858	0.8691	-0.1833	0.1833
12/14	0.6207	0.7118	-0.0911	0.0911
14/12	1.6111	1.4049	0.2062	0.2062
12/15	0.7858	0.9438	-0.158	0.158
15/12	1.2726	1.0595	0.2131	0.2131
12/16	0.9758	1.07	-0.0942	0.0942
16/12	1.0248	0.9346	0.0902	0.0902
12/17	1.6138	2.074	-0.4602	0.4602
17/12	0.6196	0.4822	0.1374	0.1374
12/18	1.3592	1.1351	0.2241	0.2241
18/12	0.7357	0.881	-0.1453	0.1453

13/14	0.4257	0.6187	-0.193	0.193
14/13	2.3493	1.6164	0.7329	0.7329
13/15	0.5389	0.8203	-0.2814	0.2814
15/13	1.8556	1.2191	0.6365	0.6365
13/16	0.6692	0.9299	-0.2607	0.2607
16/13	1.4943	1.0753	0.419	0.419
13/17	1.1067	1.8025	-0.6958	0.6958
17/13	0.9035	0.5548	0.3487	0.3487
13/18	0.9321	0.9865	-0.0544	0.0544
18/13	1.0728	1.0137	0.0591	0.0591
14/15	1.266	1.3259	-0.0599	0.0599
15/14	0.7899	0.7542	0.0357	0.0357
14/16	1.5721	1.5032	0.0689	0.0689
16/14	0.6361	0.6653	-0.0292	0.0292
14/17	2.6	2.9136	-0.3136	0.3136
17/14	0.3846	0.3432	0.0414	0.0414
14/18	2.1898	1.5946	0.5952	0.5952
18/14	0.4567	0.6271	-0.1704	0.1704
15/16	1.2418	1.1337	0.1081	0.1081

16/15	0.8053	0.8821	-0.0768	0.0768
15/17	2.0537	2.1974	-0.1437	0.1437
17/15	0.4869	0.4551	0.0318	0.0318
15/18	1.7297	1.2026	0.5271	0.5271
18/15	0.5781	0.8315	-0.2534	0.2534
16/17	1.6538	1.9383	-0.2845	0.2845
17/16	0.6047	0.5159	0.0888	0.0888
16/18	1.3929	1.0608	0.3321	0.3321
18/16	0.7179	0.9427	-0.2248	0.2248
17/18	0.8422	0.5473	0.2949	0.2949
18/17	1.1873	1.8272	-0.6399	0.6399

Anexo 16

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en pétalo, entre *D. x pinasensis* y *D.mopsus*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> pétalo	<i>D.mopsus</i> pétalo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
p1/p2	2.6295	1.5005	1.129	1.129
p2/p1	0.3803	0.6665	-0.2862	0.2862
p1/p3	1.1063	1.2325	-0.1262	0.1262

p3/p1	0.9039	0.8114	0.0925	0.0925
p1/p4	1.6977	0.9122	0.7855	0.7855
p4/p1	0.589	1.0962	-0.5072	0.5072
p2/p3	0.4207	0.8214	-0.4007	0.4007
p3/p2	2.3769	1.2175	1.1594	1.1594
p2/p4	0.6456	0.608	0.0376	0.0376
p4/p2	1.5489	1.6449	-0.096	0.096
p3/p4	1.5346	0.7402	0.7944	0.7944
p4/p3	0.6516	1.3511	-0.6995	0.6995

Anexo 17

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en columna, entre *D. x pinasensis* y *D.venosa*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> columna	<i>D.venosa</i> columna		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
c1/c2	1.7082	1.4649	0.2433	0.2433
c2/c1	0.5854	0.6827	-0.0973	0.0973

c1/c3	2.562	2.6668	-0.1048	0.1048
c3/c1	0.3903	0.375	0.0153	0.0153
c1/c4	3.7274	4.7275	-1.0001	1.0001
c4/c1	0.2683	0.2115	0.0568	0.0568
c1/c5	3.7121	3.8415	-0.1294	0.1294
c5/c1	0.2694	0.2603	0.0091	0.0091
c2/c3	1.4998	1.8205	-0.3207	0.3207
c3/c2	0.6667	0.5493	0.1174	0.1174
c2/c4	2.182	3.2273	-1.0453	1.0453
c4/c2	0.4583	0.3099	0.1484	0.1484
c2/c5	2.1731	2.6224	-0.4493	0.4493
c5/c2	0.4602	0.3813	0.0789	0.0789
c3/c4	1.4549	1.7727	-0.3178	0.3178
c4/c3	0.6874	0.5641	0.1233	0.1233
c3/c5	1.4489	1.4405	0.0084	0.0084
c5/c3	0.6902	0.6942	-0.004	0.004
c4/c5	0.9959	0.8126	0.1833	0.1833
c5/c4	1.0041	1.2306	-0.2265	0.2265

Anexo 18

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en labelo, entre *D. x pinasensis* y *D.venosa*.

Nombre de la muestra	<i>D.x pinasensis</i> labelo	<i>D.venosa</i> labelo		
1ra DIST/2da DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
11/12	0.9253	0.6931	0.2322	0.2322
12/11	1.0807	1.4428	-0.3621	0.3621
11/13	1.3493	0.7903	0.559	0.559
13/11	0.7411	1.2654	-0.5243	0.5243
11/14	0.5744	0.4366	0.1378	0.1378
14/11	1.7411	2.2904	-0.5493	0.5493
11/15	0.7271	0.5854	0.1417	0.1417
15/11	1.3753	1.7084	-0.3331	0.3331
11/16	0.903	0.7669	0.1361	0.1361
16/11	1.1075	1.3039	-0.1964	0.1964
11/17	1.4933	1.1448	0.3485	0.3485
17/11	0.6696	0.8735	-0.2039	0.2039
11/18	1.2577	1.0537	0.204	0.204
18/11	0.7951	0.9491	-0.154	0.154

12/13	1.4582	1.1402	0.318	0.318
13/12	0.6858	0.8771	-0.1913	0.1913
12/14	0.6207	0.6299	-0.0092	0.0092
14/12	1.6111	1.5875	0.0236	0.0236
12/15	0.7858	0.8446	-0.0588	0.0588
15/12	1.2726	1.1841	0.0885	0.0885
12/16	0.9758	1.1065	-0.1307	0.1307
16/12	1.0248	0.9038	0.121	0.121
12/17	1.6138	1.6517	-0.0379	0.0379
17/12	0.6196	0.6054	0.0142	0.0142
12/18	1.3592	1.5202	-0.161	0.161
18/12	0.7357	0.6578	0.0779	0.0779
13/14	0.4257	0.5525	-0.1268	0.1268
14/13	2.3493	1.81	0.5393	0.5393
13/15	0.5389	0.7407	-0.2018	0.2018
15/13	1.8556	1.35	0.5056	0.5056
13/16	0.6692	0.9705	-0.3013	0.3013
16/13	1.4943	1.0304	0.4639	0.4639
13/17	1.1067	1.4487	-0.342	0.342

17/13	0.9035	0.6903	0.2132	0.2132
13/18	0.9321	1.3333	-0.4012	0.4012
18/13	1.0728	0.75	0.3228	0.3228
14/15	1.266	1.3407	-0.0747	0.0747
15/14	0.7899	0.7459	0.044	0.044
14/16	1.5721	1.7565	-0.1844	0.1844
16/14	0.6361	0.5693	0.0668	0.0668
14/17	2.6	2.6221	-0.0221	0.0221
17/14	0.3846	0.3814	0.0032	0.0032
14/18	2.1898	2.4133	-0.2235	0.2235
18/14	0.4567	0.4144	0.0423	0.0423
15/16	1.2418	1.3102	-0.0684	0.0684
16/15	0.8053	0.7633	0.042	0.042
15/17	2.0537	1.9558	0.0979	0.0979
17/15	0.4869	0.5113	-0.0244	0.0244
15/18	1.7297	1.8	-0.0703	0.0703
18/15	0.5781	0.5555	0.0226	0.0226
16/17	1.6538	1.4928	0.161	0.161
17/16	0.6047	0.6699	-0.0652	0.0652

l6/l8	1.3929	1.3739	0.019	0.019
l8/l6	0.7179	0.7278	-0.0099	0.0099
l7/l8	0.8422	0.9204	-0.0782	0.0782
l8/l7	1.1873	1.0865	0.1008	0.1008

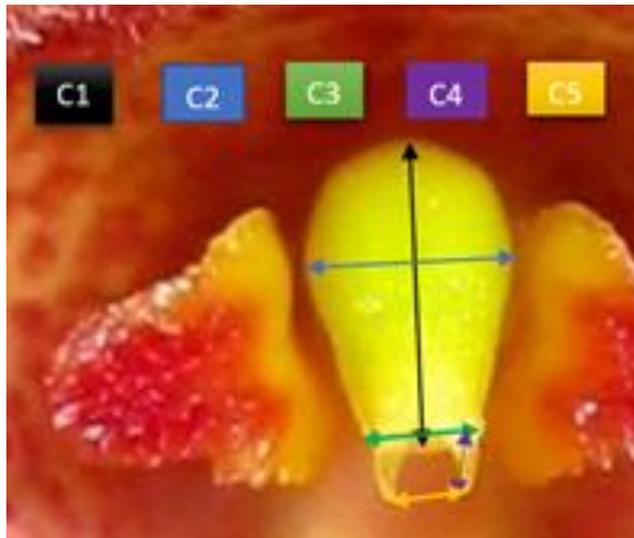
Anexo 19

Comparación del ratio en cada combinación de *landmarks* en pétalo, entre *D. x pinasensis* y *D.venosa*

Nombre de la muestra	<i>D. x pinasensis</i> pétalo	<i>D. Venosa</i> pétalo		
1ra DIST/2nda DIST	RATIO	RATIO	DIFERENCIA	V.ABS
p1/p2	2.6295	2.1152	0.5143	0.5143
p2/p1	0.3803	0.4728	-0.0925	0.0925
p1/p3	1.1063	1.1193	-0.013	0.013
p3/p1	0.9039	0.8934	0.0105	0.0105
p1/p4	1.6977	1.6119	0.0858	0.0858
p4/p1	0.589	0.6204	-0.0314	0.0314
p2/p3	0.4207	0.5292	-0.1085	0.1085
p3/p2	2.3769	1.8898	0.4871	0.4871
p2/p4	0.6456	0.7621	-0.1165	0.1165

p4/p2	1.5489		1.3122	0.2367	0.2367
p3/p4	1.5346		1.4401	0.0945	0.0945
p4/p3	0.6516		0.6944	-0.0428	0.0428

Anexo 20 Cinco Landmarks establecidos para columna (c).



Anexo 21

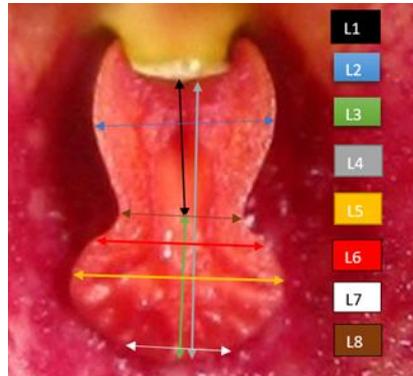
Valores provenientes de la diferencia de cada especie frente a *D. x pinasensis*, en adición al cálculo de valores mínimos, cuartil 1 y realce en **negrita** el valor mínimo situado en cada especie, así como también resaltado de color rosado las celdas que contenían valores inferiores al cuartil 1, para cada combinación de *landmarks* correspondiente a columna.

1ra DIST/2nda DIST COLUMNA (c)	<i>D.cordo bae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.deltoid ea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>	min	Cuarti1
c1/c2	0,620	0,252	0,483	0,370	0,296	0,243	0,243	0,263

c2/c1	0,333	0,122	0,231	0,162	0,123	0,097	0,097	0,123
c1/c3	0,940	0,194	0,051	0,698	0,430	0,105	0,051	0,127
c3/c1	0,226	0,026	0,008	0,146	0,079	0,015	0,008	0,018
c1/c4	3,175	6,961	8,939	0,083	0,303	1,000	0,083	0,477
c4/c1	0,123	0,106	0,189	0,006	0,024	0,057	0,006	0,032
c1/c5	0,146	0,274	0,088	1,017	0,856	0,129	0,088	0,134
c5/c1	0,011	0,017	0,006	0,058	0,051	0,009	0,006	0,010
c2/c3	0,010	0,475	0,550	0,108	0,010	0,321	0,010	0,035
c3/c2	0,005	0,129	0,179	0,052	0,004	0,117	0,004	0,016
c2/c4	4,158	6,234	8,157	0,541	0,243	1,045	0,243	0,667
c4/c2	0,301	0,195	0,362	0,091	0,046	0,148	0,046	0,105
c2/c5	1,103	0,682	0,929	1,359	1,062	0,449	0,449	0,744
c5/c2	0,155	0,089	0,138	0,177	0,151	0,079	0,079	0,101
c3/c4	2,801	2,264	3,589	0,501	0,151	0,318	0,151	0,364
c4/c3	0,452	0,260	0,489	0,176	0,065	0,123	0,065	0,137
c3/c5	0,750	0,002	0,064	1,088	0,694	0,008	0,002	0,022
c5/c3	0,236	0,001	0,029	0,296	0,224	0,004	0,001	0,010
c4/c5	0,479	0,377	0,696	0,302	0,338	0,183	0,183	0,311
c5/c4	0,931	1,569	2,329	0,233	0,254	0,227	0,227	0,239

Anexo 22

Ocho *Landmarks* establecidos para labelo (I)



Anexo 23

Valores provenientes de la diferencia de cada especie frente a *D. x pinasensis*, en adición al cálculo de valores mínimos, cuartil 1 y realce en negrita el valor mínimo situado en cada especie, así como también resaltado de color rosado las celdas que contenían valores inferiores al cuartil 1, para cada combinación de *landmarks* correspondientes a labelo.

1ra DIST/2da DIST LABEL O (I)	<i>D.cordobae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.deltoid ea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>	min	Cuartil 1
I1/I2	0,346	0,788	0,521	0,385	0,390	0,232	0,232	0,356
I2/I1	0,645	6,214	1,390	0,769	0,786	0,362	0,362	0,676
I1/I3	1,121	1,231	1,086	0,905	0,733	0,559	0,559	0,776
I3/I1	3,633	7,733	3,063	1,509	0,881	0,524	0,524	1,038
I1/I4	0,388	0,468	0,366	0,270	0,193	0,138	0,138	0,212
I4/I1	3,632	7,674	3,063	1,542	0,881	0,549	0,549	1,047

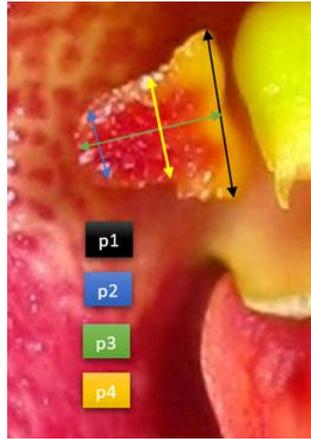
11/5	0,511	0,601	0,429	0,313	0,222	0,142	0,142	0,244
15/11	3,254	6,566	1,978	1,041	0,603	0,333	0,333	0,712
11/6	0,563	0,724	0,617	0,337	0,330	0,136	0,136	0,332
16/11	1,836	4,482	2,383	0,659	0,637	0,196	0,196	0,643
11/7	0,914	1,154	0,804	0,556	0,382	0,349	0,349	0,426
17/11	1,056	2,274	0,782	0,397	0,231	0,204	0,204	0,272
11/8	0,658	1,073	0,853	0,535	0,650	0,204	0,204	0,564
18/11	0,873	4,617	1,676	0,588	0,850	0,154	0,154	0,654
12/13	1,064	0,597	0,809	0,636	0,308	0,318	0,308	0,388
13/2	1,849	0,476	0,854	0,531	0,183	0,191	0,183	0,262
12/4	0,300	0,154	0,106	0,057	0,091	0,009	0,009	0,066
14/2	1,503	0,320	0,333	0,164	0,206	0,024	0,024	0,174
12/5	0,413	0,133	0,049	0,020	0,158	0,059	0,020	0,051
15/2	1,410	0,184	0,085	0,034	0,213	0,089	0,034	0,086
12/6	0,390	0,329	0,268	0,071	0,094	0,131	0,071	0,103
16/2	0,681	0,259	0,388	0,070	0,090	0,121	0,070	0,098
12/7	0,614	0,864	0,089	0,120	0,460	0,038	0,038	0,097
17/2	0,380	0,216	0,032	0,043	0,137	0,014	0,014	0,035
12/8	0,325	0,011	0,359	0,022	0,224	0,161	0,011	0,057

18/12	0,231	0,006	0,264	0,012	0,145	0,078	0,006	0,029
13/14	0,388	0,474	0,366	0,260	0,193	0,127	0,127	0,210
14/13	1,121	1,238	1,087	0,890	0,733	0,539	0,539	0,772
13/15	0,406	0,528	0,596	0,392	0,281	0,202	0,202	0,309
15/13	0,797	0,919	0,974	0,782	0,637	0,506	0,506	0,673
13/16	0,817	0,847	0,421	0,605	0,261	0,301	0,261	0,331
16/13	0,821	0,835	0,577	0,709	0,419	0,464	0,419	0,492
13/17	1,428	1,772	1,515	1,003	0,696	0,342	0,342	0,773
17/13	0,509	0,556	0,522	0,429	0,349	0,213	0,213	0,369
13/18	1,691	0,634	0,608	0,694	0,054	0,401	0,054	0,453
18/13	0,692	0,434	0,423	0,458	0,059	0,323	0,059	0,348
14/15	0,105	0,080	0,167	0,093	0,060	0,075	0,060	0,076
15/14	0,072	0,054	0,092	0,054	0,036	0,044	0,036	0,046
14/16	0,253	0,112	0,196	0,287	0,069	0,184	0,069	0,130
16/14	0,088	0,042	0,091	0,098	0,029	0,067	0,029	0,049
14/17	0,514	0,598	0,711	0,478	0,314	0,022	0,022	0,355
17/14	0,064	0,072	0,083	0,060	0,041	0,003	0,003	0,046
14/18	1,032	0,450	0,246	0,183	0,595	0,224	0,183	0,229
18/14	0,146	0,118	0,058	0,035	0,170	0,042	0,035	0,046

15/16	0,331	0,179	0,281	0,126	0,108	0,068	0,068	0,113
16/15	0,169	0,101	0,236	0,074	0,077	0,042	0,042	0,075
15/17	0,629	0,644	0,257	0,212	0,144	0,098	0,098	0,161
17/15	0,114	0,116	0,054	0,046	0,032	0,024	0,024	0,035
15/18	1,046	0,262	0,373	0,017	0,527	0,070	0,017	0,118
18/15	0,218	0,103	0,159	0,006	0,253	0,023	0,006	0,043
16/17	0,052	0,245	0,752	0,002	0,285	0,161	0,002	0,079
17/16	0,019	0,078	0,189	0,001	0,089	0,065	0,001	0,030
16/18	0,372	0,360	0,020	0,116	0,332	0,019	0,019	0,044
18/16	0,151	0,250	0,010	0,065	0,225	0,010	0,010	0,024
17/18	0,193	0,298	0,255	0,071	0,295	0,078	0,071	0,107
18/17	0,221	0,651	0,516	0,110	0,640	0,101	0,101	0,138

Anexo 24

Cuatro *Landmarks* establecidos para pétalo (p)



Anexo 25

Valores provenientes de la diferencia de cada especie frente a *D. x pinasensis*, en adición al cálculo de valores mínimos, cuartil 1 y realce en negrita el valor mínimo situado en cada especie, así como también resaltado de color rosado las celdas que contenían valores inferiores al cuartil 1, para cada combinación de *landmarks* correspondiente a pétalo.

1RA DIST/2N DA DIST PÉTALO (p)	<i>D.cordo bae</i>	<i>D.felix</i>	<i>D.hirsuta</i>	<i>D.delto idea</i>	<i>D.mopsus</i>	<i>D.venosa</i>	min	Cuartil 1
p1/p2	1,241	0,910	1,016	0,631	1,129	0,514	0,514	0,701
p2/p1	0,340	0,201	0,247	0,120	0,286	0,093	0,093	0,140
p1/p3	0,505	0,247	0,694	0,131	0,126	0,013	0,013	0,127
p3/p1	0,760	0,260	0,436	0,096	0,093	0,011	0,011	0,093
p1/p4	1,012	0,450	0,214	0,279	0,786	0,086	0,086	0,230
p4/p1	0,869	0,212	0,179	0,116	0,507	0,031	0,031	0,132

p2/p3	0,012	0,079	0,029	0,198	0,401	0,109	0,012	0,042
p3/p2	0,066	0,377	0,076	0,761	1,159	0,487	0,066	0,151
p2/p4	0,152	0,080	0,162	0,064	0,038	0,117	0,038	0,068
p4/p2	0,476	0,172	0,560	0,140	0,096	0,237	0,096	0,148
p3/p4	0,393	0,083	0,302	0,388	0,794	0,095	0,083	0,146
p4/p3	0,225	0,037	0,404	0,220	0,700	0,043	0,037	0,087

