

## FILOGENIA MOLECULAR PRELIMINAR DE *SCAPHOSEPALUM* (ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE)

LORENA ENDARA A.<sup>1,2,3</sup>, NORRIS H. WILLIAMS<sup>1,2</sup>, Y W. MARK WHITTEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Museo de Historia Natural de Florida (FLMNH), Dickinson Hall, P. O. Box 117800, Gainesville, Florida 32611-7800, U.S.A.

<sup>2</sup> Departamento de Botánica, Universidad de Florida, 220 Bartram Hall, Gainesville, Florida 32611 U.S.A.

<sup>3</sup> Corresponding author: lendara@flmnh.ufl.edu

RESUMEN. El género *Scaphosepalum* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) agrupa a 49 especies de distribución tanto amplia como restringida las que muchas veces crecen en simpatria biótica en los bosques montanos neotropicales. *Scaphosepalum* alcanza su pico de diversidad en el norte de los Andes y constituye un sistema interesante para investigar el efecto que tuvo el levantamiento de los Andes en los procesos de especiación. El objetivo de este proyecto es crear un marco filogenético que sea la base para evaluar si la distribución actual de las especies es la consecuencia de especiación simpátrica o especiación alopatrica seguida por contacto secundario. A continuación se presenta la filogenia preliminar del género *Scaphosepalum* reconstruida utilizando caracteres moleculares obtenidos de la amplificación y secuenciación de las regiones ITS, *trnL-F*, *matK*, y *ycf1*. Los datos de las cuatro regiones combinadas fueron analizados bajo los criterios de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (Maximum Likelihood: ML) y bayesiano y obtuvieron reconstrucciones filogenéticas similares. A pesar de que esta reconstrucción filogenética está aún en una etapa preliminar, los resultados sugieren una fuerte estructura geográfica.

ABSTRACT. The orchid genus *Scaphosepalum* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) encompasses 49 species widely or narrowly distributed in biotic sympatry in the montane Neotropical forests, where it reaches its peak of diversity. *Scaphosepalum* represents an interesting system to investigate speciation patterns. The main goal of this project is to reconstruct the evolutionary history of *Scaphosepalum* and use the resulting phylogenetic hypothesis to determine if the current sympatric distribution of the species is the result of sympatric or allopatric speciation followed by secondary contact. The preliminary phylogeny presented here is based on novel molecular data obtained from the amplification and sequencing of the combined gene regions ITS, *trnL-F*, *matK*, and *ycf1*. Analyses were performed using Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML), and Bayesian optimization criteria. All the resulting analyses resulted in similar tree topologies and indicate a strong geographical structure in the dataset.

PALABRAS CLAVE / KEY WORDS: Orchidaceae, *Scaphosepalum*, filogenia molecular, molecular phylogeny

*Scaphosepalum* agrupa a 49 especies y es un clado relativamente pequeño que pertenece a la diversa subtribu Neotropical Pleurothallidinae la que cuenta con aproximadamente 4000 especies (Pridgeon *et al.*, 2005). *Scaphosepalum* puede ser fácilmente reconocido por sus flores no resupinadas y sinsépalos coronados por osmóforos (Fig. 1), los que en la mayoría de las especies, están bien desarrollados (Vogel, 1965; Pridgeon & Stern, 1985; Luer, 1986, 1988; Pridgeon *et al.*, 2005). Los sinsépalos y el sépalo dorsal poseen caudas (colas sepalinas), las cuales han sido motivo de confusión taxonómica y la razón por la que

inicialmente se incluyó a este género en *Masdevallia* (Luer, 1986).

El pico de diversidad del género *Scaphosepalum* y de la subtribu Pleurothallidinae se encuentra en los bosques montanos del norte de los Andes, un paisaje que ha ofrecido múltiples oportunidades para eventos de radiación y diversificación (Gentry, 1982; Burnham & Graham, 1999; Young *et al.*, 2002; Hughes & Eastwood, 2006; Rull, 2008; Antonelli *et al.*, 2009; Graham, 2009; Struwe *et al.*, 2009). El objetivo principal de este estudio es reconstruir la filogenia de *Scaphosepalum* para examinar los patrones de especiación del género con el



FIGURA 1. Diversidad floral de *Scaphosepalum*. A. *S. decorum*; B. Flor tubular de *S. odontochilum*; C. *S. medinae*. *osm*: osmóforos, *ds*: sépalo.

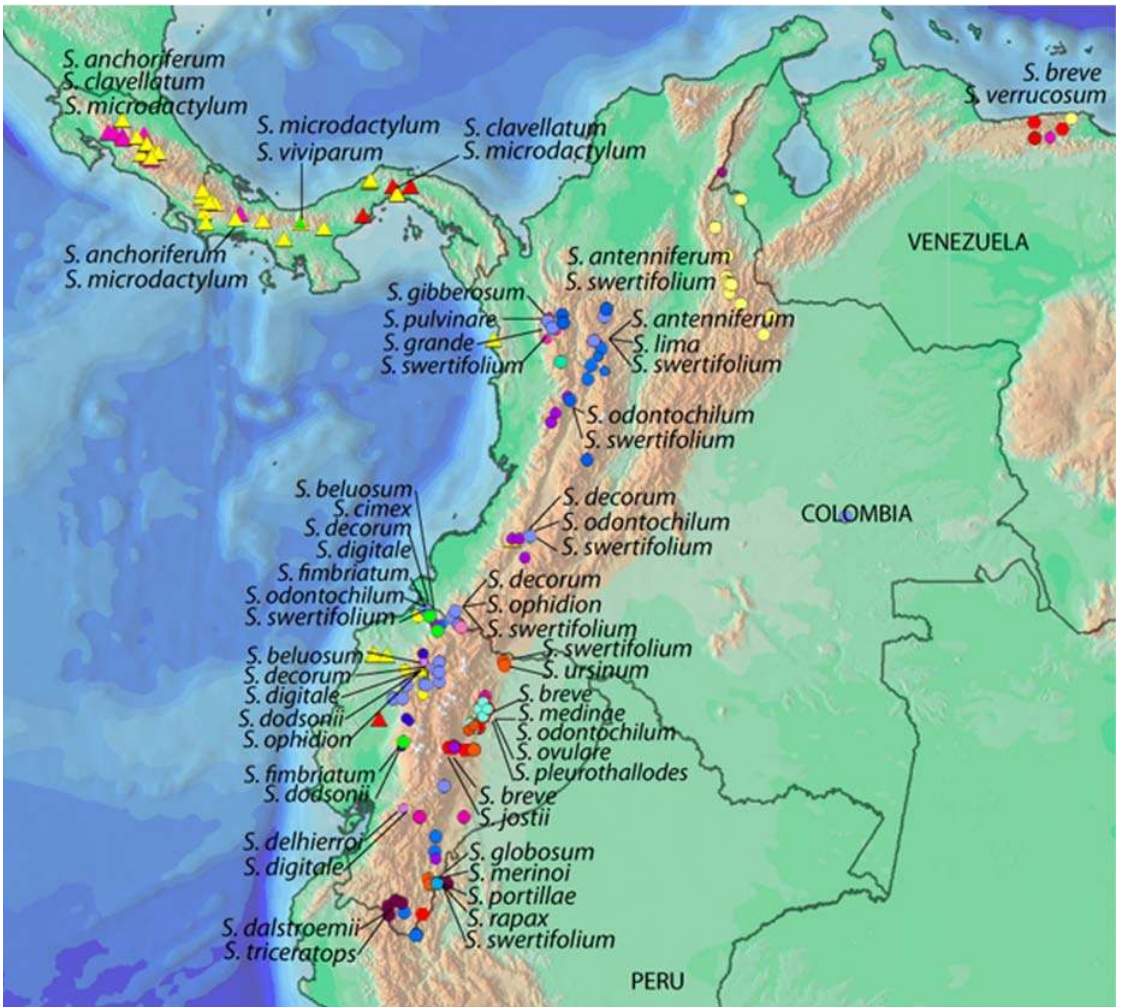


FIGURA 2. Distribución de *Scaphosepalum* y las localidades en donde varias especies crecen en simpatría biótica. Las localidades conocidas en el escudo Guyanés, Bolivia, y Perú fueron excluidas de esta figura.

TABLA 1. Cebadores (primers) utilizados en la amplificación y secuenciación de regiones nuclear y plástidos del género *Scaphosepalum*.

Cebadores	Gen nuclear	Genes plástidos		
	ITS	<i>matK</i>	<i>trnL-F</i>	<i>ycf1</i>
Amplimero	ACGATTTTCATGG	<u>-19F</u>	<u>C</u>	<u>3720F</u>
	TCCGGTGAAGT	CGTTCTGACCATATT	CGAAATCGGTAGA	TACGTATGTAATGAAC
	GTTTCG	GCACTATG	CGCTACG	GAATGG
Amplimero inverso	TAGAATTCCCCG	<u>trk2r</u>	<u>F</u>	<u>5500R</u>
	GTTGCCTCGCCG	ACCTAGTCGGATGG	ATTTGAAGTGGTGA	GCTGTTATTGGCATCA
	TTAC	AGTAG	CACGAG	AACCAATAGCG
Interno		<u>int F</u>	<u>D</u>	<u>560F</u>
		TGAGCGAACACATT	GGGGATAGAGGGA	GATCTGGACCAA
		TCTATGG	CTTGAAC	TGCACATATT
Interno inverso		<u>int R</u>	<u>E</u>	<u>850R</u>
		ATAAGGTTGAAACC	GGTTCAAGTCCCTC	TTTGATTGGGAT
		AAAAGTG	TATCCC	GATCCAAGG

fin de comprender mejor los procesos evolucionarios que han convertido a la región Andina en uno de los puntos calientes (hot-spots) del planeta (Myers *et al.*, 2000). *Scaphosepalum* representa un sistema ideal para detectar escenarios de especiación alopátrica, parapátrica y simpátrica pues una gran cantidad de sus especies viven en simpatria (Fig. 2).

### Materiales y métodos

**Muestreo** — Se extrajo exitosamente el ADN de 37 especímenes que representan a 28 especies con los protocolos citados en Whitten *et al.* (2007). Todos los especímenes utilizados en el análisis preliminar fueron obtenidos de ejemplares cultivados *ex situ* en el Jardín Botánico de Atlanta (ABJ) y cuentan con especímenes depositados en el herbario de la Universidad de Florida (FLAS).

**Secuenciación de genes** — La baja divergencia molecular constituye el mayor reto de este proyecto sin embargo, varios genes plástidos (*trnL-F*, *matK*, y *ycf1*) y un gen nuclear (ITS) han demostrado ser informativos y útiles para nuestro estudio. Todas las amplificaciones se realizaron con el kit de reactivos y polimerasa Sigma Jumpstart *Taq* y Sigma Jumpstart

*redTaq* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) en reacciones de 25 µL conformadas por 2.5 µl de buffer, 0.5 µl de dNTPs y cebadores, 1.0 µl de ADN total, cantidades variables de MgCl<sub>2</sub> (1.5 hasta 3.0 µl), y agua destilada.

Inicialmente se amplificaron las cuatro regiones en un segmento sin embargo, para varios taxones problemáticos las amplificaciones de *matK* y *ycf1* se realizaron en dos segmentos. Los cebadores (primers) y programas utilizados en la amplificación de los diferentes genes se detallan en las tablas 1 y 2, respectivamente. Los productos amplificados fueron colocados en placas de 96 celdas y fueron secuenciados en el Centro Interdisciplinario de Investigación de Biotecnología (ICBR) de la Universidad de Florida en Gainesville. Los electroferogramas resultantes fueron editados en el programa Sequencher 4.6 (Genecodes Inc., Ann Arbor, Michigan, USA) y alineados manualmente en el programa Se-Al (Rambaut, 2000).

**Análisis filogenético** — Previo a combinar las cuatro regiones moleculares y realizar los respectivos análisis filogenéticos se verificó si los sets de datos son congruentes. Para el efecto se realizaron pruebas compartimentalizadas de ILD en el programa PAUP

TABLA 2. Programas de termociclado utilizados en la amplificación de regiones nucleares y plástidas del género *Scaphosepalum*. \* Programas touchdown.

	Denaturalización inicial	Denaturalización	Hibridización (Annealing)	Extensión	Extensión final	Mantenimiento
ITS*	94°C x 2 min	94°C x 1 min	76°C x 1 min	72°C x 1 min	n/a	4°C
	1 ciclo	15 ciclos				
		94°C x 1 min	59°C x 1 min	72°C x 1 min	72°C x 3 min	
		21 ciclos				
mat-K	94°C x 3 min	94°C x 30 min	50°C x 0.30 min	72°C x 2 min	72°C x 3 min	4°C
	1 ciclo	34 ciclos				
trnL-F	94°C x 3 min	94°C x 1 min	58°C x 1 min	72°C x 1:20 min	72°C x 6 min	4°C
	1 ciclo	33 ciclos				
ycfI*	94°C x 3 min	94°C x 30 min	60°C x 1 min	72°C x 2:30 min	n/a	4°C
	1 ciclo	8 ciclos				
		94°C x 3 min	50°C x 0.45 min	72°C x 2:30 min	72°C x 3 min	
		30 ciclos				

(Farris *et al.*, 1995) y pruebas de congruencia topológica para cada set de datos (Soltis *et al.*, 1998). El set de datos combinado fue analizado bajo los criterios de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML: Maximum Likelihood), y Bayesiano. Para los dos criterios iniciales se utilizó el programa PAUP versión 4.0 (Swofford, 1997) y para los análisis Bayesianos se utilizó MrBayes versión 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003; Altekar *et al.*, 2004). Los modelos evolucionarios que mejor explican el modo de evolución de los diferentes sets de datos fueron obtenidos a través del programa Modeltest 3.7 (Posada, 1988).

Se utilizó parsimonia Fitch no ponderada y no ordenada en el análisis parsimónico. En las búsquedas heurísticas de MP y ML se definió un número máximo de 100 árboles, adición de secuencias al azar, con 10,000 réplicas, utilizando el algoritmo de estrategia de búsqueda múltiple (TBR, siglas en inglés). Se enraizó el cladograma con secuencias de *Dryadella*, *Platystele*, *Teagueia*, y *Pleurothallis* (*Specklinia* o *Sarcinula*) *acanthodes* sugeridos como grupos hermanos de *Scaphosepalum* (Pridgeon *et al.*, 1999,

2005). El soporte para los nodos recuperados se calculó con la medida de apoyo “bootstrap” realizando 100 reiteraciones. Para el análisis Bayesiano se definió a nst=6 y rates=invgamma, se retuvo un árbol cada 100 generaciones y se corrió el análisis por seis millones de generaciones. Los análisis fueron ejecutados en el cluster de computadores de filoinformática del Departamento de Botánica de la Universidad de Florida.

## Resultados

Las pruebas compartimentalizadas de ILD indicaron congruencia entre las regiones plástidas pero incongruencia significativa entre las regiones plástidas combinadas y la región nuclear. La naturaleza de la incongruencia entre los sets de datos plástidos y el set de datos nuclear fue posteriormente analizada mediante la comparación de los valores de soporte bootstrap y las topologías de los árboles consenso estricto generados mediante MP y la topología resultante de ML. La topología del árbol correspondiente a las regiones plástidas difirió de la topología de la región nuclear

TABLA 3. Estadísticas de las diferentes regiones utilizadas en el análisis de la filogenia preliminar de *Scaphosepalum*. Valores obtenidos vía Máxima Parsimonia, los modelos de sustitución de nucleótidos fueron obtenidos utilizando Modeltest. MP: Máxima Parsimonia.

	Nuclear	Pláستidas			Combinada
	ITS	3' <i>ycf1</i>	<i>trnL-F</i>	<i>matK</i>	
# taxa utilizada	57	54	58	54	54
# caracteres	800	1635	1253	1464	152
# caracteres constantes	571	1307	1071	1259	4247
# caracteres informativos (MP)	115	149	74	87	405
# caracteres no informativos (MP)	114	179	108	118	500
Mejor árbol	407	534	234	274	1450
Número de árboles	26	24	168	232	22
CI	0.73	0.69	0.82	0.81	0.72
RI	0.81	0.77	0.85	0.83	0.77
# de nodos con medida de apoyo	22/41	14/39	14/25	16/32	32/36
bootstrap $\geq 70\%$					
Modelo de sustitución nucleótida	TrN+G	TrN+G	F81+G	F81+G	TVM+I+G

(ITS) en varios nodos cerca de la espina no resuelta del árbol nuclear. Estas diferencias fueron consideradas como incongruencia suave por lo que se procedió a combinar los datos de las tres regiones pláستidas y la región nuclear.

La Tabla 3 detalla las estadísticas de los árboles obtenidos en base a los análisis parsimónicos realizados para cada región y para las cuatro regiones combinadas (ITS, *trnLF*, *matK*, y *ycf1*) así también como los modelos utilizados en los análisis de ML. Las topologías de las filogenias obtenidas mediante MP, ML, y análisis Bayesianos son similares y difieren únicamente en las longitudes de las ramas. Por razones de espacio se presenta únicamente la hipótesis evolutiva resultante del análisis de ML (Fig. 3).

### Discusión

Aunque en una etapa preliminar (28 especies muestreadas de 49), la filogenia generada (Fig. 3) presenta una estructura geográfica fuerte y los patrones

filogeográficos observados reafirman la importancia de los Andes como una barrera de dispersión. Dos clados están confinados a las estribaciones orientales de los Andes. Es posible observar en la Figura 3 que un clado con alto soporte bootstrap contiene prácticamente a todas las especies muestreadas de las estribaciones noroccidentales de los Andes y América Central con potenciales casos de dispersión hacia las estribaciones orientales de los Andes centrales en Ecuador. Los dos clados restantes contienen a la mayoría de las especies encontradas en las estribaciones orientales de los Andes (color amarillo en la Figura 3). Es posible inferir en base a la filogenia preliminar (Fig. 3) y la distribución de las especies que viven en simpatria (Fig. 2), que las especies que habitan en los mismos hábitats no están cercanamente relacionadas, en otras palabras, no son los grupos hermanos inmediatos, por ejemplo, *Scaphosepalum beluosum*, *S. decorum*, *S. dodsonii*, *S. digitale*, y *S. ophiodon* están presentes en los mismos hábitats (Fig. 2) sin embargo no son

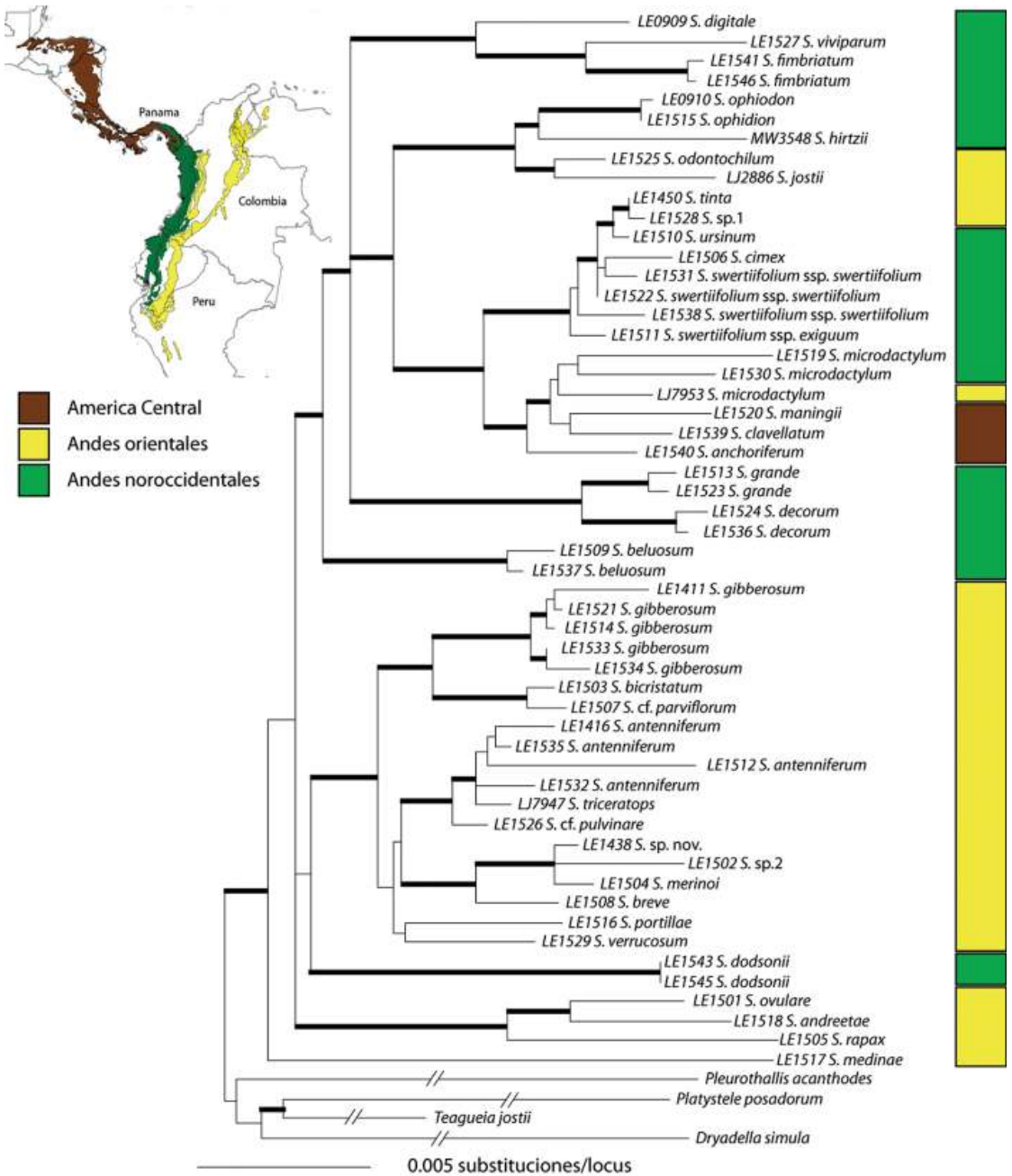


FIGURA 3. Filogenia preliminar de *Scaphosepalum*. Análisis combinado utilizando las regiones moleculares ITS, *matK*, *trnL-F*, y *ycf1* bajo el criterio de máxima verosimilitud (modelo TVM+I+G, 10,000 reiteraciones, algoritmo TBR). Las líneas engrosadas representan valores de apoyo bootstrap mayores a 75%. Las barras inclinadas representan sectores en donde las ramas han sido artificialmente reducidas para una mejor representación de la longitud de las ramas del grupo interno.

especies hermanas por lo tanto no son el resultado de especiación simpátrica.

La parafilia observada a nivel específico en *Scaphosepalum swertiifolium* (Fig. 3), una especie ampliamente distribuida es un evento común y provee evidencia sobre la divergencia de las especies por medio de un evento fundador o divergencia local (Reiseberg & Brouillet, 1994; Howard & Berlocher, 1998). A futuro se espera aumentar más especímenes y variaciones geográficas de las especies ampliamente distribuidas y también especies que exhiben una amplia variabilidad morfológica en su rango de distribución (*Scaphosepalum antenniferum*, *S. breve*, *S. microdactylum*, y *S. verrucosum*) para explorar escenarios de parafilia a nivel específico.

Llama la atención la posición de *Scaphosepalum medinae* como especie hermana al resto de *Scaphosepalum*. *Scaphosepalum medinae* (Fig. 1c) y *S. pleurothallodes*, la última, una especie no muestreada en la filogenia preliminar, son las únicas especies subresupinadas en el género con inflorescencias subcimosas. Probablemente *S. pleurothallodes* también sea hermana al resto de *Scaphosepalum*. La semejanza morfológica de *S. pleurothallodes* y *S. medinae* a *Pleurothallis* (*Specklinia* o *Sarcinula*) *acanthodes*, resulta interesante pues *P. acanthodes* crece en simpatria con las dos especies de *Scaphosepalum* antes mencionadas y podría ser el taxón hermano del clado de *Scaphosepalum*. Para comprobar la monofilia de *Scaphosepalum*, es nuestro objetivo incluir a otras especies de *Pleurothallis* (*Specklinia* o *Sarcinula*). Es también una prioridad de nuestro proyecto un muestreo completo y denso de taxones ya que las reconstrucciones filogenéticas son sensibles a las estrategias de muestreo de taxones y caracteres (Graybeal, 1998; Zwickl & Hillis 2002).

A pesar de que varias especies no están representadas en la filogenia generada, los resultados preliminares favorecen a escenarios de especiación alopátrica y parapátrica seguidos por contacto secundario de las especies.

#### LITERATURA CITADA

Altekar, G., S. Dworkadas, J. P. Huelsenbeck & F. Ronquist, 2004. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407–415.

- Antonelli, A., J. A. A. Nylander, C. Persson & I. Sanmartin. 2009. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proc. Nat. Ac. Sc.* 106: 9749–9754.
- Burnham, R. J. & A. Graham. 1999. The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 86: 546–589.
- Farris, J. S., M. Kallersjo, A. G. Kluge & C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315–319.
- Gentry, A. H. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Ann. Missouri Bot. Gard.* 69: 557–593.
- Graham, A. 2009. The Andes: a geological overview from a biological perspective. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 96: 371–385.
- Graybeal, A. 1998. Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem. *Syst. Biol.* 47: 9–17.
- Howard, D. J. & S. H. Berlocher (ed.). 1998. *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, UK.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hughes, C. & R. Eastwood. 2006. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proc. Nat. Ac. Sc.* 103: 10334–10339.
- Luer, C. 1986. *Icones Pleurothallinidarum I – Systematics of the Pleurothallidinae*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 15.
- Luer, C. 1988. *Icones Pleurothallinidarum V – Systematics of Dresslerella and Scaphosepalum*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 26.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca & J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Pridgeon, A. M. & W. L. Stern. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Bot. Gaz.* 146: 115–123.
- Pridgeon, A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase & F. N. Rasmussen (eds.). 1999. *Genera orchidacearum. Volume 1. General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford University Press, UK.
- Pridgeon, A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase & F. N. Rasmussen (eds.). 2005. *Genera orchidacearum. Volume 4. Epidendroideae (Part one)*. Oxford University Press, UK.
- Rambaut, A. 2002. Se-AL: Sequence Alignment Editor, ver. 2.0a11. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal>.

- Reiseberg, L. H. & L. Brouillet. 1994. Are many plant species paraphyletic? *Taxon* 43: 21-30.
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molec. Ecol.* 17: 2722-2729.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis & J. J. Doyle. 1998. *Molecular systematics of plants II- DNA sequencing*. Kluger Academic, Norwell, Massachusetts, USA.
- Struwe, L., S. Haag, E. Heiberg & J. R. Grant. 2009. Andean speciation and vicariance in Neotropical *Macrocarpa* (Gentianaceae-Helieae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 96: 450-469.
- Swofford, D. L. 1997. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Vogel, S. 1965. *The role of scent glands in pollination*. Smithsonian Institutional Libraries and National Science Foundation, Washington, D.C., USA.
- Whitten, W. M., M. Blanco, N. Williams, S. Koehler, G. Carnevali, R. Singer, L. Endara & K. Neubig. 2007. Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) based upon combined molecular datasets. *Amer. J. Bot.* 94: 1860-1889.
- Young, K. R., C. Ulloa-Ulloa, J. L. Luteyn & S. Knapp, S. 2002. Plant evolution and endemism in Andean South America: an introduction. *Bot. Rev.* 68: 4-21.
- Zwickl, D. J. & D. M. Hillis. 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Syst. Biol.* 51: 588-598.