

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Gongora* ORCHIDACEAE, DE LAS
ESPECIES REGISTRADAS EN EL ECUADOR**

AUTORAS:

Adriana Lucía Mogrovejo Herrera

Yahaira Elena Proaño Laiquez

TUTOR:

MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, Febrero del 2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras, Adriana Lucía Mogrovejo Herrera, con documento de identificación N° 030229872-4 y Yahaira Elena Proaño Laiquez, documento de identificación N° 171586011-8, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Gongora* ORCHIDACEAE, DE LAS ESPECIES REGISTRADAS EN EL ECUADOR”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Nombre: Mogrovejo Herrera Adriana Lucía

Cédula: 0302298724

Fecha: 14-02-2020



.....
Nombre: Proaño Laiquez Yahaira Elena

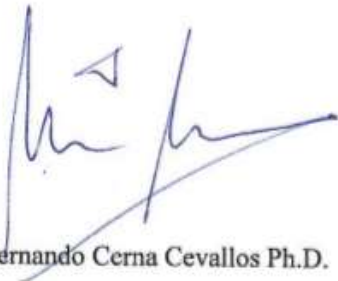
Cédula: 1715860118

Fecha: 14-02-2020

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Gongora* ORCHIDACEAE, DE LAS ESPECIES REGISTRADAS EN EL ECUADOR”, realizado por Adriana Lucía Mogrovejo Herrera y Yahaira Elena Proaño Laiquez, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, Febrero del 2020



Marco Fernando Cerna Cevallos Ph.D.

C.I. 050187207-1

Dedicatoria

A Dios, tal vez nunca entienda lo que verdaderamente eres, pero sé que todo lo que soy es por ti.

A Gerardo, Marcia y Marina, mis viejitos adorados, por ser mi inspiración....por y para ustedes
todo, desde siempre.

A Betty, Ruth, Gustavo, Anita, Paola y Andrés por la paciencia, la compañía, las risas y sobre
todo por el infinito amor.

A todos los biotecnólogos conservacionistas que desde el profundo amor que sentimos por la
biodiversidad de nuestro planeta, luchamos a diario por su cuidado.

Adriana

A Dios, por brindarme la vida, salud y la sabiduría en este grandioso camino de la vida.

A mis padres, Ramiro Proaño y Mónica Laiquez por todo su amor, comprensión y aliento en cada
etapa de mi vida y su acompañamiento en cada paso.

A mi hija, Cammie Victoria, por ser el más grande motivo para salir adelante e inspirarme a ser
mejor cada día.

A David, por su amor, paciencia y apoyo en todo momento y sobre todo, en los difíciles.

Yahaira

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana y al Grupo de Investigación Nunkui Wakan por permitirnos formar parte de su equipo de trabajo y concluir con nuestra formación académica; pero, sobre todo por formarnos como seres humanos críticos, realistas y con una profunda pasión por la investigación.

A nuestro tutor de tesis, PhD. Marco Cerna por la oportunidad de conocer el fantástico mundo de las orquídeas, por su guía y asesoramiento durante la investigación y la inyección de ánimos en momentos de dificultad.

A Luis Baquero por compartir con nosotras su pasión por la investigación, por su asesoramiento y su valioso aporte en la interpretación de resultados.

A la Mgtr. Germania Karolys, Ing. Elizabeth Yugsi, Ing. Byron Fuertes, Ing. Erika Paredes e Ing. Luciana Vargas, por su amistad, guía, consejos y apoyo incondicional durante el desarrollo experimental del presente estudio.

A Esteban Rojas, Johanna Andrade, Belén Montaluisa, Lisbeth Molina, Byron Fuertes, Vanessa Garzón, Diana Paucar, Larissa Jaramillo, Pamela Logroño, Johana Lozano, Gina Jami y Victoria Sánchez, por ser la familia que uno escoge, la que hace que la vida sea más llevadera, los queremos infinitamente.

Índice

Introducción	1
Capítulo I.....	4
1. Marco Conceptual	4
1.1. Familia Orchidaceae	4
1.2. Importancia de las orquídeas.....	5
1.3. Género <i>Gongora</i>	6
1.3.1. Clasificación taxonómica	6
1.3.2. Descripción botánica y morfológica.....	14
1.4. Marcadores moleculares en orquídeas	17
1.4.1. Región <i>matK</i>	17
1.4.2. Región <i>rpoC1</i>	18
1.5. Filogenia	19
Capítulo II	21
2. Materiales y métodos	21
2.1. Recolección y preparación de muestras.....	21
2.2. Estudio molecular	22
2.2.1. Extracción de ADN	22
2.2.2. Evaluación cualitativa de ADN	23
2.2.3. Amplificación de ADN.....	24
2.2.4. Secuenciación	26
2.2.5. Filogenia	26
Capítulo III	28
3. Resultados y discusión.....	28

3.1. Recolección y preparación de muestras	28
3.2. Estudio molecular	32
3.3. Filogenia molecular y Georreferenciación.....	35
Conclusiones	59
Recomendaciones	60
Bibliografía.....	61

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes de la reacción PCR con Phire Plant Direct PCR para región <i>matK</i> y <i>rpoCl</i>	25
Tabla 2. Lista de las especies muestreadas del género <i>Gongora</i> con su respectiva georreferenciación.	28

Índice de figuras

Figura 1. Filogenia molecular de Stanhopeinae según los marcadores moleculares nr DNA ITS/ <i>matK</i> / <i>ycf1</i> .	11
Figura 2: Clasificación filogenética de Stanhopeinae según el tipo de polinizador.	12
Figura 3. Clasificación taxonómica del género <i>Gongora</i> según estudios moleculares...	13
Figura 4. Morfología del género <i>Gongora</i> .	16
Figura 5. Estructura de la región <i>matK</i> (<i>maturase K</i>).	18
Figura 6. Organización estructural del gen <i>rpoC1</i> y sus regiones flanqueantes.	19
Figura 7. Electroforesis del ADN extraído de especies del género <i>Gongora</i> .	33
Figura 8. Amplificación del producto PCR con el marcador <i>matK2.1a</i>	34
Figura 9. Amplificación del producto PCR con el marcador <i>rpoC1</i>	34
Figura 10. Árbol filogenético de la región <i>matK</i> mediante el método de <i>Máxima Verosimilitud</i> y el modelo <i>Tamura- Nei</i> con 1000 Bootstraps. <i>Stanhopea saccata</i> y <i>Coeliopsis hyacinthosma</i> como grupos externos.	36
Figura 11. Distribución geográfica del género <i>Gongora</i> Grupo I. Grupo escobariana (especies basales).	39
Figura 12. Distribución geográfica del género <i>Gongora</i> Grupo II. Grupo cassidea (especies extranjeras basales).	42
Figura 13. Distribución geográfica del género <i>Gongora</i> Grupo III. Grupo scaphephorus (especies ecuatorianas) en América del Sur con excepción de Ecuador.	45
Figura 14. Distribución geográfica del género <i>Gongora</i> Grupo III. Grupo scaphephorus (especies ecuatorianas) en Ecuador.	46
Figura 15. Distribución geográfica del género <i>Gongora</i> Grupo IV. Grupo hirtzii en América del Sur a excepción de Ecuador.	49

Figura 16. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo IV. Grupo *hirtzii* en Ecuador.
.....50

Figura 17. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo V. *Quinquenervis* en América del Sur a excepción del Ecuador.54

Figura 18. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo V. *Quinquenervis* en el Ecuador.
.....55

Índice de anexos

Anexo 1. Morfología del género <i>Gongora</i> y sus diferentes subgéneros.....	73
Anexo 2. Ubicación geográfica de las especies del género <i>Gongora</i>	74
Anexo 3. Fotografías de las especies del género <i>Gongora</i>	87
Anexo 4. Árbol filogenético de la región <i>matK</i> mediante el método de <i>Máxima Verosimilitud</i> y el modelo <i>Jukes-Cantor</i> con 1000 Bootstraps. <i>Stanhopea saccata</i> y <i>Coeliopsis hyacinthosma</i> como grupos externos.	95
Anexo 5. Porción de Stanhopeinae con la combinación de los marcadores moleculares <i>matK/trnK-F/Its</i> nr DNA.	96
Anexo 6. Árbol de <i>Máxima Verosimilitud</i> para Coeliopsidae y Stanhopeinae.	97
Anexo 7. Árbol filogenético para la región <i>matK</i> para la totalidad de las muestras, basado en el modelo <i>Tamura-Nei</i> mediante el método de <i>Máxima Verosimilitud</i> con 1000 Bootstraps. <i>Stanhopea saccata</i> y <i>Coeliopsis hyacinthosma</i> como grupos externos.....	99

Resumen

El género *Gongora* pertenece a la familia Orchidaceae y agrupa a alrededor de 60 a 70 especies descritas que se distribuyen desde México y Centroamérica hasta Bolivia y Brasil en América del Sur. En el Ecuador se encuentran descritas aproximadamente 20 especies distribuidas en los bosques andinos bajos, amazónicos y litorales. Estudios de filogenia molecular realizados respaldan la clasificación de *Gongora* en 3 subgéneros y 7 secciones según lo planteado por Jenny (1993); sin embargo, estos estudios no han permitido resolver las relaciones evolutivas de *Gongora* y su clasificación a nivel de secciones. En el presente estudio se trabajó con 51 muestras vegetales, se amplificaron las regiones cloroplásticas *matK* y *rpoC1* mediante PCR convencional, se construyeron árboles filogenéticos con el método de estimación de *Máxima Verosimilitud* y el modelo evolutivo *Tamura-Nei*. El árbol filogenético obtenido se encuentra conformado por 5 grupos más 1 grupo externo y además, revela a *matK* como una región *ADN Barcoding*, altamente discriminante a nivel subgenérico de *Gongora*; por el contrario, el marcador molecular *rpoC1* no permitió discriminar especies del género. El análisis biogeográfico muestra que en el Ecuador las provincias orientales de Morona Santiago y Zamora Chinchipe presentan la mayor diversidad de especies.

Palabras claves: *Orchidaceae*, *Gongora*, *filogenia molecular*, *matK*, *rpoC1*.

Abstract

The genus *Gongora* is a member of the Orchidaceae family and consists of about 60 to 70 described species, distributed from Mexico throughout Central America to Bolivia and Brazil (South America). Around 20 species of *Gongora* have been described in Ecuador at lowland neotropical rainforests of andes, amazon and litoral regions. Previous studies on molecular phylogenetic, support the division of *Gongora* into 3 subgenus and 7 sections as proposed by Jenny (1993). However, this molecular data do not resolve evolutionary relations of the genus, neither its classification at section level. For the present study, 51 vegetal samples were collected and chloroplastic regions *matK* and *rpoCI* were amplified by conventional PCR technique and phylogenetic trees were obtained by using *Maximum Likelihood estimation* and *Tamura Nei* model. The phylogenetic tree obtained is conform by 5 groups and 1 out-group and also revels *matK* as potential *ADN Barcoding* region to discriminate subgenus in *Gongora*. On the contrary, *rpoCI* can not discriminate species of the genus *Gongora*. According to biogeographical analysis, Ecuador's provinces Morona Santiago and Zamora Chinchipe presents the highest biodiversity area of species from this genus.

Key words: *Orchidaceae, Gongora, molecular phylogenetic, matK, rpoCI*

Introducción

La familia Orchidaceae conforma uno de los grupos de plantas más diverso y abundante del planeta con alrededor de 28000 especies y 880 géneros distribuidos alrededor del mundo, siendo el hábitat de mayor distribución las regiones tropicales (Novoa, Espejo, Cisternas, Rubio, & Dominguez, 2006; Christenhusz & Byng, 2016). El Ecuador ha sido considerado como el “País de las Orquídeas” debido a la gran cantidad de representantes que se distribuyen a lo largo de todo el territorio; es así, que una de cada cinco especies de orquídeas del mundo se encuentran en el país sumando alrededor de 4300 especies conocidas, a esta lista frecuentemente se suman nuevos descubrimientos (Montalvo & Vargas, 2019).

El género *Gongora* agrupa a alrededor de 60 a 70 especies descritas que se distribuyen ampliamente desde México hacia Centroamérica y en América del Sur hasta Bolivia; también, se encuentran algunos ejemplares en Trinidad y Tobago (Jenny, 1993; Pridgeon, Cribb & Chase, 2009); además, en el Ecuador se encuentran descritas aproximadamente 20 especies que se distribuyen en los bosques andinos bajos, amazónicos y litorales.

El Ecuador es un país megadiverso con graves problemas de pérdida de hábitat que influyen en la disminución de la variedad genética de especies tanto de flora como fauna; son varios los factores que amenazan la conservación de las orquídeas, algunos de estos constituyen propiamente factores biológicos intrínsecos, pérdida del hábitat, transformación de ecosistemas, deforestación, entre otros (Endara, León-Yáñez, & Norris, 2008).

Adicionalmente, la falta de inventarios reales de biodiversidad, la carencia de estudios de filogenia molecular, genética de poblaciones, estudios de ecofisiología y dinámica de las poblaciones, sugieren que probablemente algunas especies del género *Gongora* hayan desaparecido sin antes ser descubiertas o a su vez que existen nuevas especies que no han sido descritas. La información concerniente al estado del género *Gongora* en el Ecuador; en cuanto, a

sus relaciones evolutivas, diversificación, endemismo, taxonomía, son determinantes en el establecimiento de programas de conservación que aseguren la permanencia y supervivencia de las especies en su hábitat (Fernández-Fernández et al., 2018).

El Ecuador cuenta con aproximadamente un tercio de la totalidad de las especies del género de las cuales según Jørgensen y León-Yáñez (1999), 6 especies son endémicas y han sido catalogadas en el “Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador” bajo diferentes grados de amenaza: *Gongora gracilis*, *Gongora pardina* y *Gongora superflua* (casi amenazadas), *Gongora grossa*, *Gongora ilense* y *Gongora napoensis* (vulnerables) (Endara et al., 2008).

A pesar de lo anterior, no existe información en cuanto a la filogenia molecular del género; la primera taxonomía oficial del género fue realizada por Jenny (1993), basándose en características sistemáticas y morfológicas, así clasificó a *Gongora* en 3 subgéneros y 7 secciones. Los estudios moleculares al respecto son escasos, algunos de ellos clarifican aunque no es su totalidad las relaciones filogenéticas del género; sin embargo, estos estudios no se han realizado en función del *Gongora* como tal, sino más bien constituyen análisis filogenéticos de la tribu Stanhopeinae; por lo que, se han incluido pocos ejemplares del género que no permiten resolver las relaciones a nivel subgenérico de *Gongora* (Whitten et al., 2000; Pridgeon, Cribb, et al., 2009; Whitten et al., 2014).

Actualmente, las técnicas moleculares que permiten el estudio de la variación de las regiones de ADN, han logrado proporcionar una gran cantidad de información que constituye la base para los estudios de filogenia, evolución, diversificación, identificación de especies, diferenciación de especies crípticas, entre otras (Rivas & Salazar, 2017). El *ADN Barcoding* constituye una herramienta que permite reducir la ambigüedad en cuanto a la información existente acerca del estado de conservación de las especies y los ecosistemas; además, que permite dilucidar problemas de filogenia y filogeografía de las especies, información crucial en la formulación de

planes de manejo y conservación de la biodiversidad (Altamirano-Benavides & Yáñez, 2016); no obstante, estos análisis deben ser complementados con estudios de morfología, sistemática, ecología, entre otros que permitan comprender la compleja dinámica de los ecosistemas.

Es así, que la presente investigación tiene como objetivos determinar la filogenia molecular del género *Gongora* Orchidaceae, de las especies registradas en el Ecuador complementado con un estudio biogeográfico.

Capítulo I

1. Marco Conceptual

1.1. Familia Orchidaceae

La palabra “*orquídea*” proviene del latín “*orchis*” que significa testículos, como referencia a los pseudobulbos que presentan ciertas especies; además, estas estructuras son considerados como tallos fotosintéticos, que permiten el almacenamiento de agua y nutrientes (Castellanos-Castro & Torres-Morales, 2018).

La familia Orchidaceae conforma uno de los grupos de plantas más diverso y abundante del planeta con alrededor de 28000 especies y 880 géneros distribuidos alrededor del mundo, concentrándose la mayoría en regiones tropicales y con excepción en los polos y desiertos (Novoa, Espejo, Cisternas, Rubio, & Dominguez, 2006; Christenhusz & Byng, 2016). Una de cada cinco especies de orquídeas se encuentran en el Ecuador, existiendo más de 4300 especies de orquídeas conocidas aproximadamente y cada día se encuentran nuevos hallazgos en este campo (Morales, 2005; Montalvo & Vargas, 2019). En cuanto a la población de orquídeas nacionales se refiere: el 42 % corresponden a especies endémicas (1710 especies) y el 58 % (1455 especies) presentan algún tipo de amenaza; de las cuales el 87 % son vulnerables (Endara et al., 2008). El Ecuador constituye un hábitat ideal para las orquídeas; es por esto, que aproximadamente un tercio de las plantas ecuatorianas endémicas son orquídeas (León et al., 2011). Además, debido a la presencia de numerosas y variadas especies de esta familia en el territorio ecuatoriano, el Ecuador ha sido declarado como el “País de las Orquídeas” (Ministerio de Turismo, 2013).

1.2. Importancia de las orquídeas

Las orquídeas juegan un papel ecológico importante en la dinámica de los bosques tropicales, regulando el ciclo de los nutrientes y por lo tanto, la productividad primaria de los ecosistemas; así mismo, constituyen micro hábitats de diferentes organismos, promoviendo de esta manera la biodiversidad en distintos grados (Pantaleón, 2011). Considerando que las orquídeas son especies vegetales cuyos hábitats constituyen ambientes específicos, éstas pueden ser utilizadas como bioindicadores de presencia o abundancia de otras especies (Newmark, 2002).

En términos económicos, las orquídeas brindan oportunidades de desarrollo en las comunidades, a través de actividades turísticas con fines recreativos; así también, sus metabolitos secundarios constituyen la materia prima para la elaboración de productos terminados en diferentes tipos de industrias (Grajales-Conesa, Meléndez-Ramírez, & Cruz-López, 2011)

El Ecuador a pesar de ser considerado como un país megadiverso cuenta con graves problemas ambientales que amenazan a su flora y fauna, algunos de los factores más importantes que ponen en riesgo la conservación de las orquídeas son factores biológicos intrínsecos y la pérdida del hábitat; lo anterior, sumado a factores antropogénicos representan un riesgo eminente para la conservación de orquídeas (Marín & Céspedes, 2007). En este sentido, es necesario el diseño de estrategias de conservación tanto *ex situ* como *in situ*; la conservación *in situ* únicamente se verá asegurada si se promueve la permanencia de hábitats en las regiones críticas, mientras que la *ex situ*, debe ser fomentada mediante el aprovechamiento racional de las especies (Fernández-Fernández et al., 2018).

Todo esto, únicamente es posible siempre y cuando se disponga de datos que respalden la necesidad de la conservación de la biodiversidad en el país y su importante rol en la ecofisiología del entorno; por lo tanto, también es indispensable la implementación de políticas públicas que permitan y aseguren la conservación, protección, aprovechamiento racional y permanencia de la

biodiversidad a través de la regulación del manejo de pastizales, la tala indiscriminada de especies maderables, el tráfico de especies y otros factores desencadenantes de la fragmentación de hábitats (Fernández-Fernández et al., 2018).

1.3. Género *Gongora*

Este género fue dedicado por Hipólito Ruiz y José Antonio Pavón al Ilustrísimo Señor Antonio Caballero y Gongora bajo cuyo virreinato se organizó una expedición botánica; misma que, conllevó a un gran descubrimiento y avance en la Botánica (Hermano Daniel, 1959; Fernández-Fernández et al., 2018).

El género *Gongora* contiene alrededor de 60 a 70 especies ampliamente distribuidas en los bosques húmedos neotropicales de tierras bajas de Centroamérica y América del Sur; en ésta última, se distribuyen en las laderas de los Andes desde Colombia hasta Ecuador y en las laderas orientales hasta el sur de Perú y Bolivia, existen también algunos ejemplares en Trinidad y Tobago (Jenny, 1993). En el Ecuador, existen aproximadamente 20 especies descritas, distribuidas en los bosques andinos bajos, bosques amazónicos y litorales (Ecuagenera, n.d.); de las cuales, Según, León y otros, (2011) en el “Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador” se ha catalogado a 6 especies bajo diferentes grados de amenaza: *Gongora gracilis*, *Gongora pardina*; *Gongora superflua* (casi amenazadas), *Gongora grossa*, *Gongora ilense* y *Gongora napoensis* (vulnerables).

1.3.1. Clasificación taxonómica

El término taxonomía proviene de las palabras griegas: “*taxis*” que significa ordenación y “*nomos*” que significa ley; por lo tanto, es la ciencia que permite ordenar por grupos a los seres vivos (Alvarado, 1990). Los principios básicos de la taxonomía, indican que los grupos

constituyen un sistema jerárquico que van desde un grupo básico hasta la unidad del sistema taxonómico; entendiéndose así, como grupo macro a las familias, que a su vez son el conjunto de géneros y este resulta ser el conjunto de especies; además, cuando las necesidades de la clasificación lo requieran, se pueden formar grupos más complejos como: superclase, subclase, subfilo, etc. (Alvarado, 1990).

La taxonomía del género *Gongora* no es del todo clara al igual que los taxones dentro del mismo; esto se debe a la variación intraespecífica y también, a la variación de caracteres morfológicos de las especies, lo que ha llevado a la errónea identificación de varias especies (Hetherington & Ramírez, 2015). La complejidad en la clasificación del género se remonta a lo acontecido en la Real Expedición Botánica llevada a cabo en última parte del siglo XVIII, expedición comandada por los botánicos Ruiz y Pavón que significó el descubrimiento de varios géneros de especies vegetales, durante la expedición por América del Sur, Ruiz y Pavón colectaron lo que sería el espécimen tipo del género *Gongora*; es decir, la especie *G. quinquenervis* Ruiz y Pavón; sin embargo, se presentaron complicaciones en el traslado del herbario de la especie tipo, por lo que la descripción de la especie no fue precisa, esto se tradujo en varios intentos erróneos al describir la morfología floral exacta de *G. quinquenervis* (Hetherington & Ramírez, 2015).

Sin embargo, la primera clasificación del género fue propuesta por Jenny (1993), que realizó un sistema de clasificación y revisión a nivel de género basado en morfológicos y sistemáticos, así reconoció a 3 subgéneros: *Gongora* subg. *Gongora* (Pfitzer) Jenny, *Gongora* subg. *Acropera* (Pfitzer) Jenny y *Gongora* subg. *Portentosa* Jenny; además dividió al subgénero *Gongora* en 4 secciones: sección *Gongora*, sección *Gratulabunda*, sección *Grossa* y sección *Truncata* (Véase ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)

Si bien es cierto, la taxonomía clásica utilizada durante varios años ha logrado agrupar a las especies en varios géneros, ésta solo ha considerado en su mayoría características morfológicas y sistemáticas de los individuos, y el género *Gongora* no es la excepción; por lo que, surge la necesidad de contar con datos exactos en cuanto a la identificación de las especies, así la identificación molecular permite una correcta agrupación de los individuos dentro de sus correspondientes jerarquías taxonómicas (Azofeifa-Delgado, 2006).

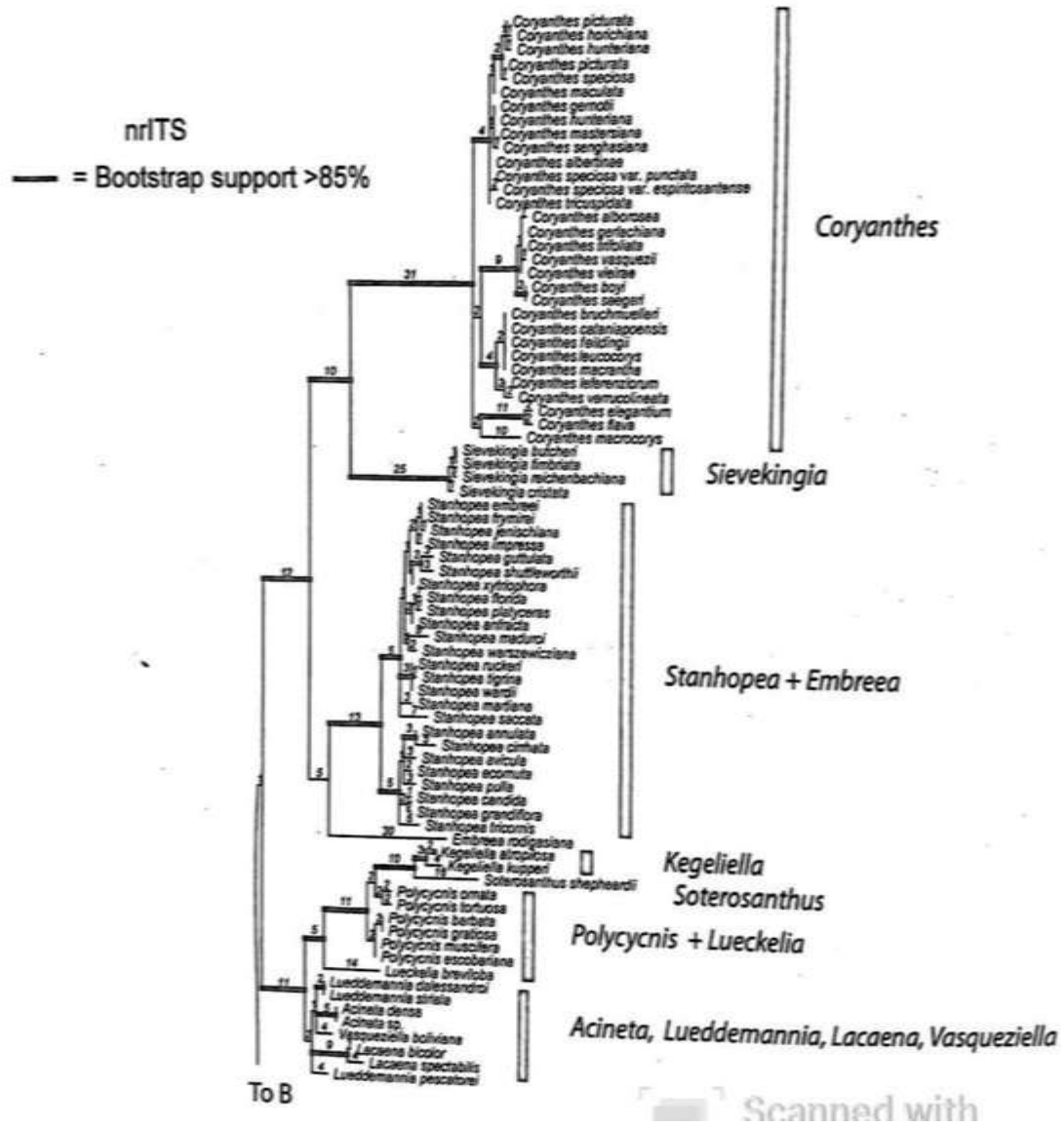
En la actualidad, el desarrollo de técnicas moleculares respecto a la identificación de especies ha constituido una herramienta de gran valor para los investigadores con el objetivo de esclarecer la taxonomía de las especies en estudio; los recientes análisis filogenéticos de la tribu Stanhopeinae empleando datos moleculares del ADN cloroplástico y ribosomal apoyan la división de *Gongora* en los géneros propuestos por Jenny (1993), y revelan al subgénero *Portentosa* como hermano del subgénero *Gongora* y a su vez del subgénero *Acropera*, así mismo dividen al subgénero *Gongora* en cuatro secciones: *Gongora*, *Grossa*, *Gratulabunda* y *Truncata* (Pridgeon, Cribb, & Chase, 2009; Whitten, Neubig, & Williams, 2014; Hetherington-Rauth & Ramírez, 2016).

Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de estos análisis se realizaron enfatizando las relaciones genéricas de Stanhopeinae e incluyeron taxones muestreados de toda la tribu Cymbidieae y únicamente 9 accesiones a nivel de especie de *Gongora*; por lo tanto, estos análisis no tenían la intención de resolver las relaciones a nivel de especie y secciones del género de estudio (Whitten, Williams & Chase, 2000).

Es así, como las relaciones evolutivas y monofiléticas del género *Gongora* no se encuentran del todo claras, esto es debido a que comúnmente las regiones génicas utilizadas para estudiar la inferencia filogenética no han exhibido suficiente polimorfismo como para clarificar problemas taxonómicos (Whitten, Neubig & Williams, 2014).

Finalmente, es importante destacar que los estudios moleculares se deben complementar con información no solo de tipo morfológica sino también ecológica; en el caso del género *Gongora*, éste se caracteriza por sus peculiaridades en cuanto a los aromas florales; mismos que, exhiben asociaciones altamente especializadas con sus polinizadores las abejas macho del género *Euglossa* (Whitten, 1985). La especificidad de los polinizadores juega un papel significativo en la regulación del flujo genético entre las poblaciones, en el mantenimiento de las barreras de aislamiento reproductivo y en la minimización del desperdicio del polen (Hetherington & Ramírez, 2015). Sin embargo, son escasos los estudios en cuanto al síndrome de polinización del género *Gongora*; Gerlach (2019) en su conferencia “De toboganes y subibajas: algo sobre la biología de la polinización en el género *Gongora*” presentada en la VI Conferencia Científica de Orquídeas Andinas llevado a cabo en Medellín-Colombia, resaltó que en otros géneros de orquídeas el mecanismo de polinización suele ser uniforme; sin embargo, en *Gongora* al parecer existen al menos 5 mecanismos diferentes que no necesariamente se restringen a los órdenes taxonómicos del género.

**Filogenia molecular de Stanhopeinae según los marcadores moleculares nr DNA
ITS/matK/ycf1**



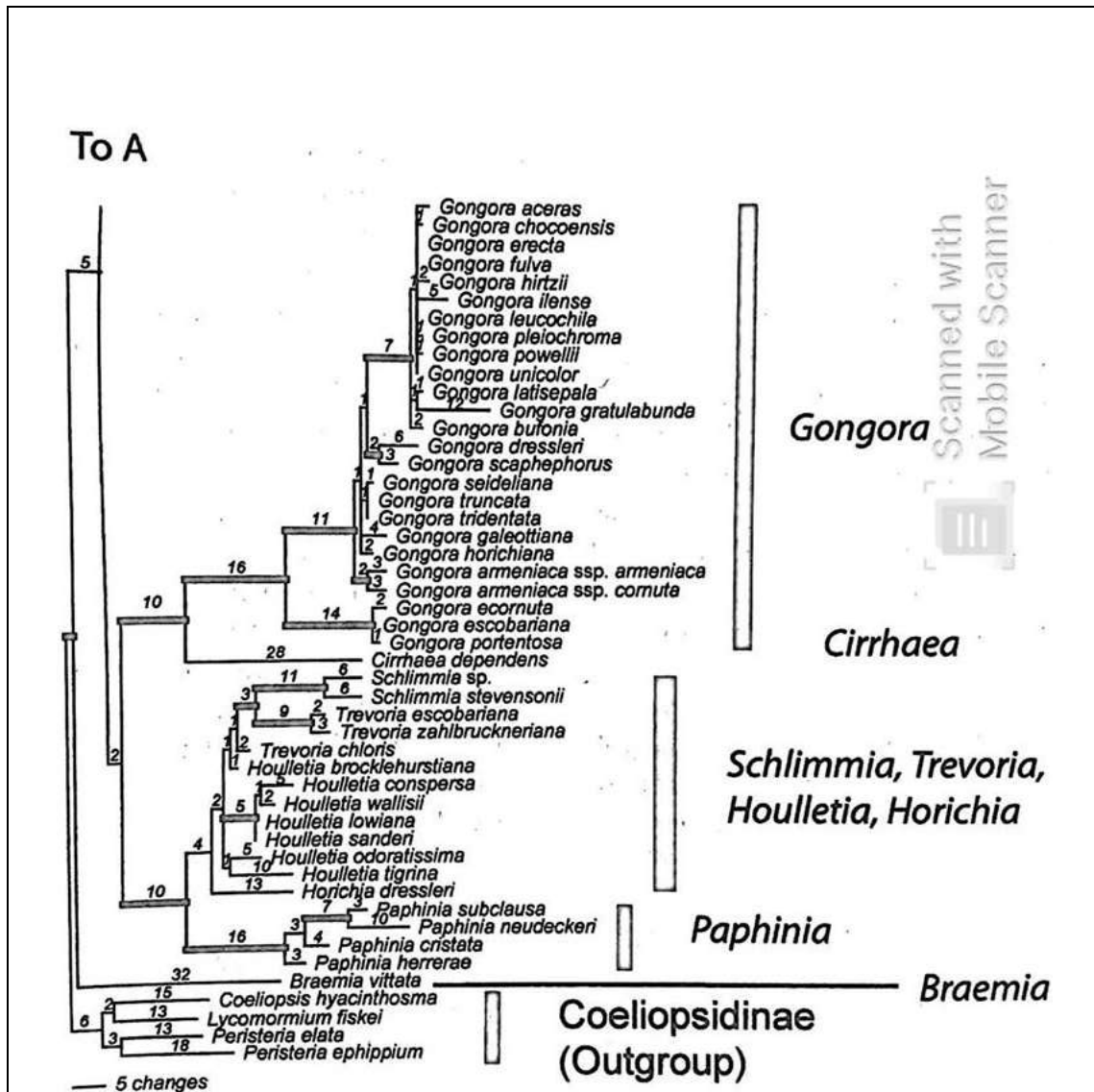


Figura 1. Filogenia molecular de Stanhopeinae según los marcadores moleculares nr DNA ITS/*matK/ycf1*. Se muestra a Coeliopsidinae como grupo externo.

Fuente: (Pridgeon et al., 2009)

Clasificación taxonómica del género *Gongora* según el tipo de polinizador.

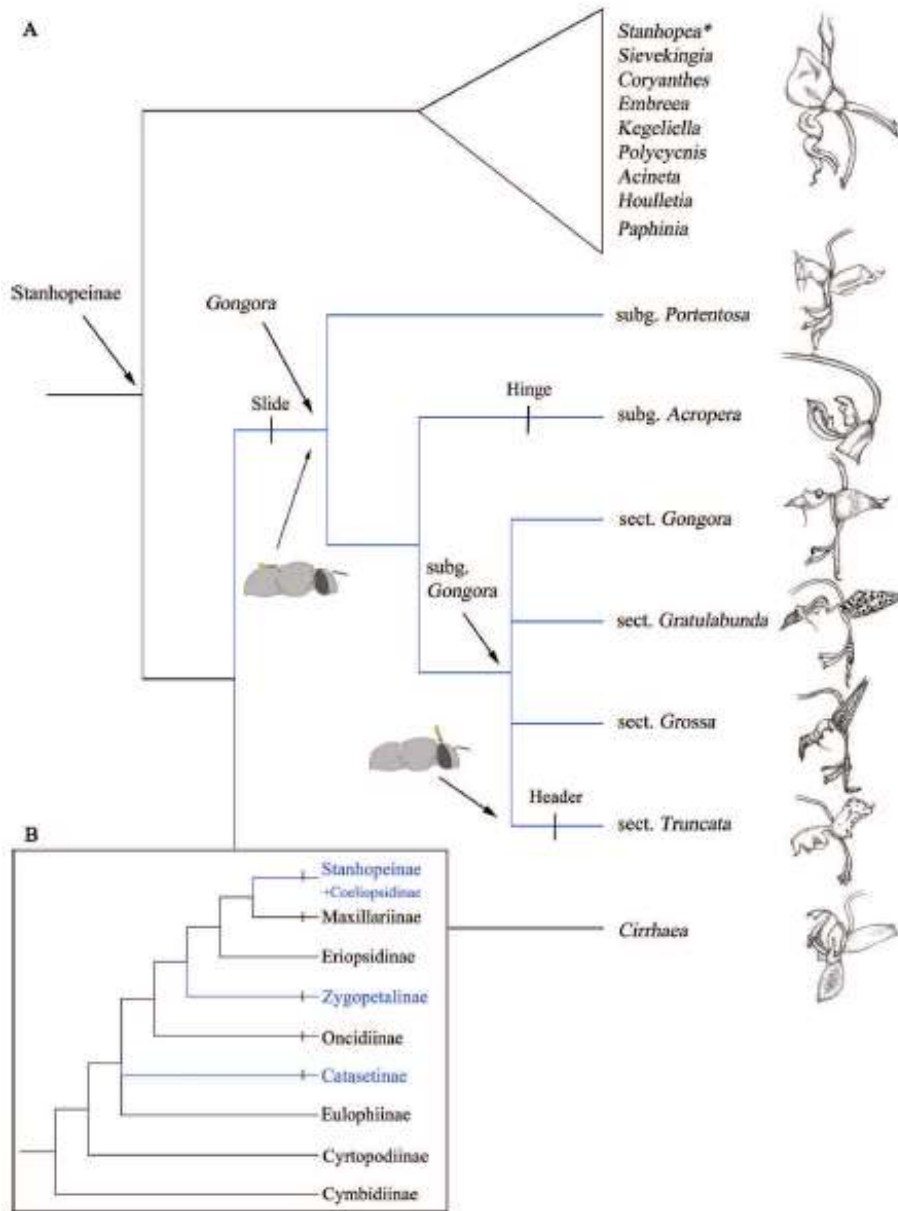


Figura 2: Relación filogenética de orquídeas Stanhopeinae polinizadas por abejas macho *Euglossa*, los datos moleculares respaldan las relaciones evolutivas entre los subgéneros de *Gongora*.

Fuente: (Hetherington & Ramírez, 2015)

Clasificación taxonómica del género *Gongora*

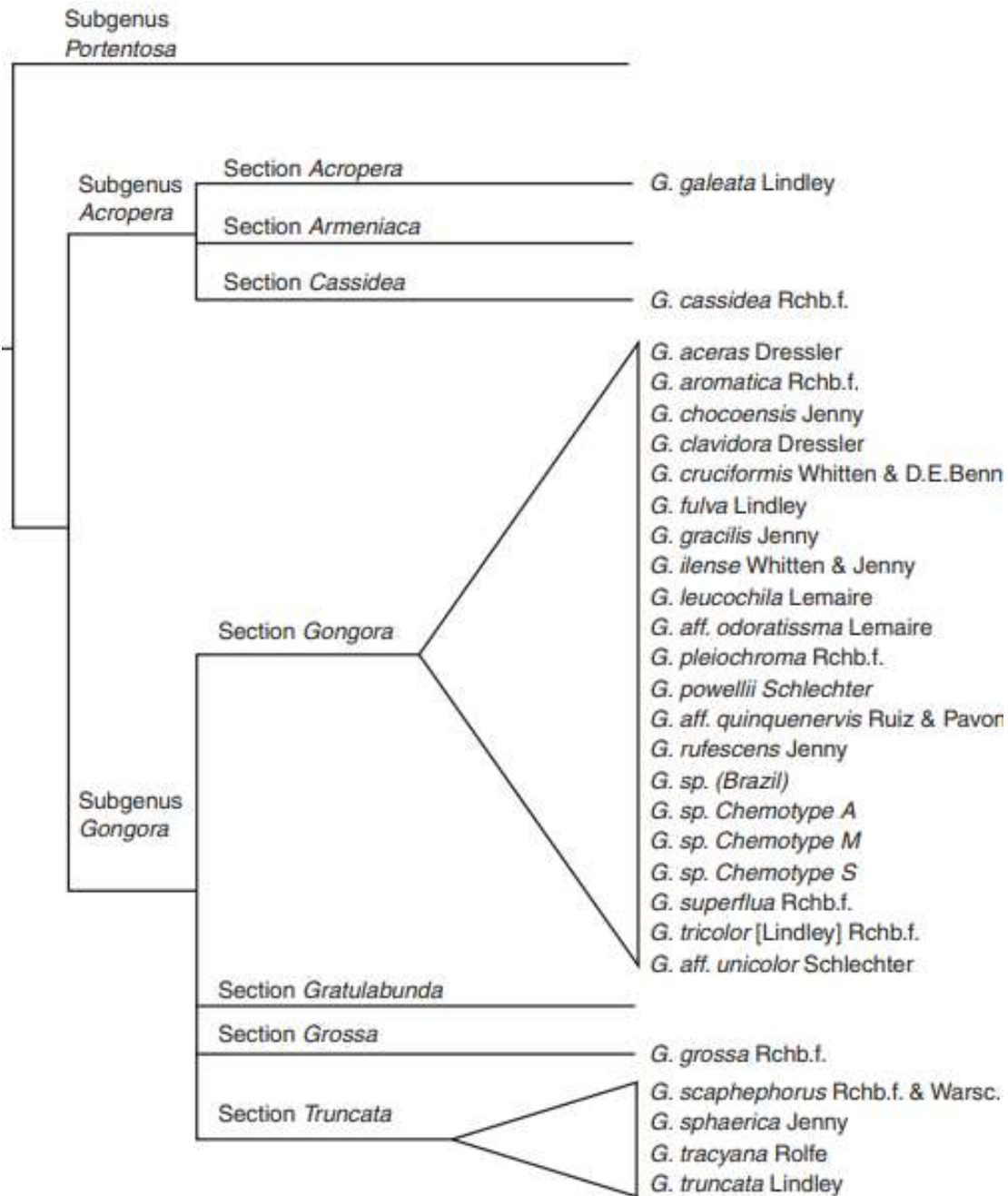


Figura 3. Clasificación taxonómica del género *Gongora* según estudios moleculares.

Fuente: (Hetherington-Rauth & Ramírez, 2016)

1.3.2. Descripción botánica y morfológica

Las orquídeas del género *Gongora* son plantas epífitas perennes con crecimiento simpodial y presentan pseudobulbos ovoides (Hetherington & Ramírez, 2015). Sus 2 únicas hojas alternas nacen del ápice de cada pseudobulbo, éstas son de tipo coriáceas con venas pronunciadas y pueden alcanzar hasta 30 cm de longitud (Jenny, 1993).

Además, estas especies producen inflorescencias colgantes con aproximadamente de 10 a 20 flores e incluso algunas presentan hasta 50 flores que se abren simultáneamente, suelen florecer entre 3 a 7 días antes de marchitarse y durante este tiempo emiten un aroma floral fuerte especialmente en las mañanas; las flores individuales están compuestas por 2 sépalos laterales, 1 sépalo inferior, 2 pétalos pequeños, 1 pétalo altamente modificado llamado labelo y la columna que presenta las estructuras reproductivas de ambos sexos (Hetherington & Ramírez, 2015).

Subgénero *Portentosa*: este subgénero es el único que presenta inflorescencias resupinadas sus pétalos son mucho más amplios que otros subgéneros; además, posee un pedicelo arrodillado, los sépalos casi tan anchos como largos adheridos al pie de columna; los ápices son rectangulares, labelo sin gancho basal y tripartito: hipocótilo se encuentra dividido longitudinalmente, también es grueso y sin cuernos laterales; mesocótilo con lóbulos laterales dolabriformes con un callo rectangular laminado y cerca del ápice; epicótilo con cerdas curvas y carnosas, columna curvada con alas triangulares (Pridgeon et al., 2009).

Subgénero *Acropera*: las inflorescencias presentan ejes fractiflex, pedicelos generalmente arqueados y flores no resupinadas; sus sépalos son casi tan anchos como largos, los sépalos dorsales son cóncavos y cubren la columna, estos suele ser agudos u obtusos y abruptamente apiculados; presenta un labelo bipartito con una garra basal liguada, el hipocótilo es visiblemente

lobulado sin cuernos y cerdas, presenta un epicótilo alargado, lanceolado-acuminado dividido en el ápice y columnas curvadas, comprimidas dorsalmente y alas triangulares (Pridgeon et al., 2009)

Subgénero *Gongora*: las inflorescencias de este subgénero presentan flores no resupinadas con eje recto, pedicelos curvos; además, los sépalos se adhieren a un pie de columna prominente y son casi el doble de largos que la columna; pétalos adnatos a la columna, triangulares o sigmoideos con cerdas en los vértices; labelo tripartito, sin garra y adnato al pie de la columna, hipóquilo con o sin cuernos laterales, carnosos y con una división mediana, mesóquilo con lóbulos laterales dolabriformes con dos cerdas que apuntan hacia abajo, ápices acuminados y un callo interior laminado y rectangular, borde basal apiculado, a menudo con una joroba dorsal; epicótilo triangular y acuminado; columna curvada, aplanada ventralmente, más grueso en el ápice, con alas en forma de diente (Pridgeon et al., 2009).

A continuación, se muestra las diferentes morfologías que presenta el género *Gongora*:

Ilustración morfológica del género *Gongora*

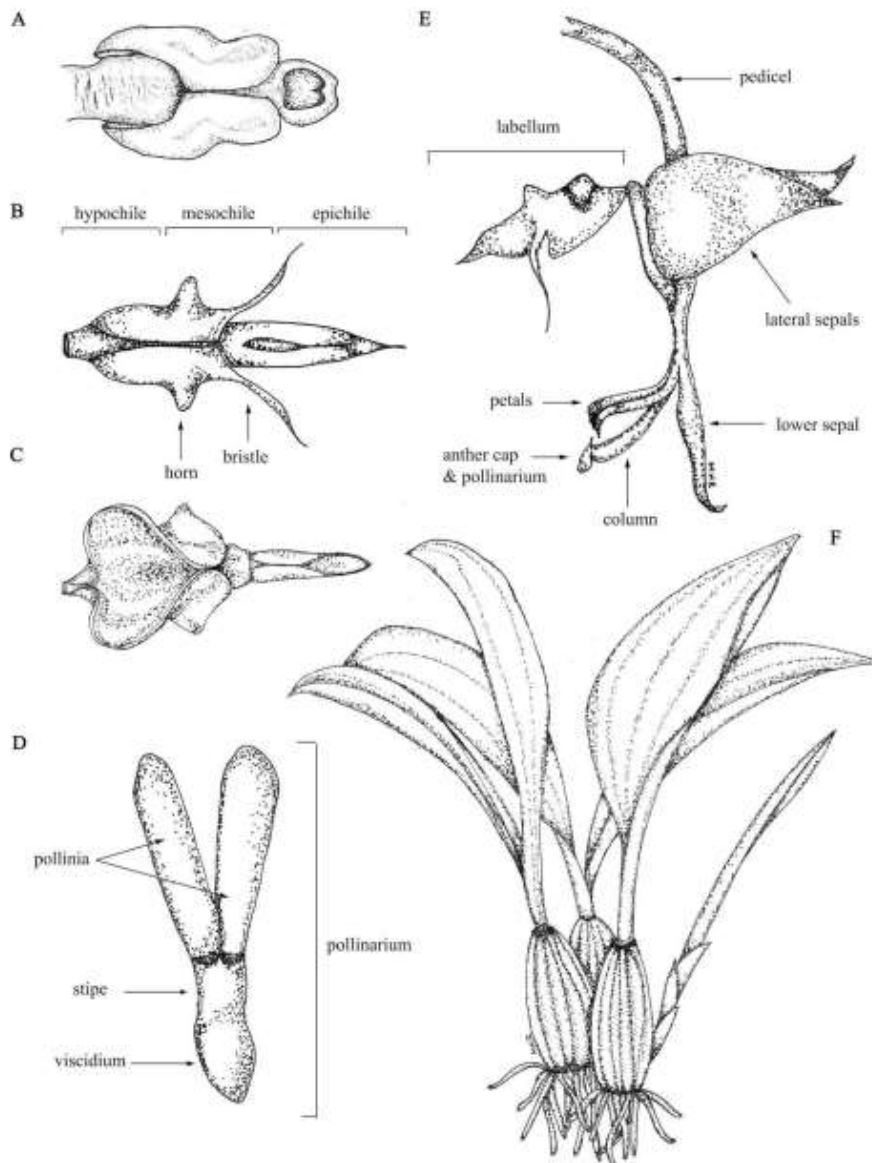


Figura 4. Morfología del género *Gongora*.

A. *Gongora galeata* subgénero *Acropera*. **B.** Sección *Gongora* Subgénero *Gongora*. **C.** *Gongora tracyana* subgénero *Gongora*. **D.** Órganos reproductores. **E.** inflorescencia del género. **F.** Forma vegetativa del género *Gongora*.

Fuente: (Hetherington & Ramírez, 2015)

1.4. Marcadores moleculares en orquídeas

Se denomina marcador molecular a cualquier molécula de proteína, ADN o ARN de tamaño o peso molecular conocido, que permita caracterizar e identificar distintos organismos (Azofeifa-Delgado, 2006). Teniendo en cuenta, que estos marcadores moleculares son considerados como un punto de referencia en el genoma, pueden constituir un fragmento de ADN caracterizado por su alto grado de polimorfismo; de tal manera, que permite distinguir entre diferentes grupos taxonómicos hasta nivel de especie o subespecie, poblaciones, familias o individuos (Ríos, Mejía-Ruiz, & Álvarez-Castañeda, 2009).

Para la identificación molecular de especies vegetales se han propuesto varios marcadores moleculares como los espaciadores *atp-F-atp-H*, *psbK-psbL*, *trnH-psbA* y los genes *matK*, *rbcL*, *rpob*, *rpoC1* (Castellanos-Castro & Torres-Morales, 2018).

Son varios los estudios en los cuales a partir de la combinación de varias regiones cloroplásticas se ha logrado realizar inferencias filogenéticas; Whitten y otros vegetales con flores. (2014) emplearon las regiones cloroplásticas combinadas *matK/ycf1* para el estudio de las relaciones filogenéticas de 289 taxones de la subtribu Cymbidieae (Orchidaceae), obteniendo árboles altamente confiables y congruentes con estudios moleculares previos. Estas regiones cloroplásticas en comparación con otras regiones intergénicas; tales como: *trnL-F*, *atpb-rbcL*, se alinean con un porcentaje de confianza mucho más alto a través de los grupos taxonómicos grandes como lo constituyen las tribus (Parveen, Singh, Malik, Raghuvanshi, & Babbar, 2017).

1.4.1. Región *matK*

El gen cloroplástico *matK* es ampliamente utilizado en especies vegetales gracias a su alta variabilidad, este presenta un tamaño de 1500 pb; además, está ubicado en el intrón *trnK*, los dos exones de este gen que flanquean al gen *matK* (Véase **Figura 5**) (Selvaraj, Sarma, &

Sathishkumar, 2008). La región 3' es relativamente conservada y la región 5' menor a la anterior; lo cual, significa que este es lo suficientemente polimórfico para resolver relaciones filogenéticas a niveles profundos; así también, es relevante mencionar que *matK* posee altas tasas de sustitución (Barthet & Hilu, 2007).

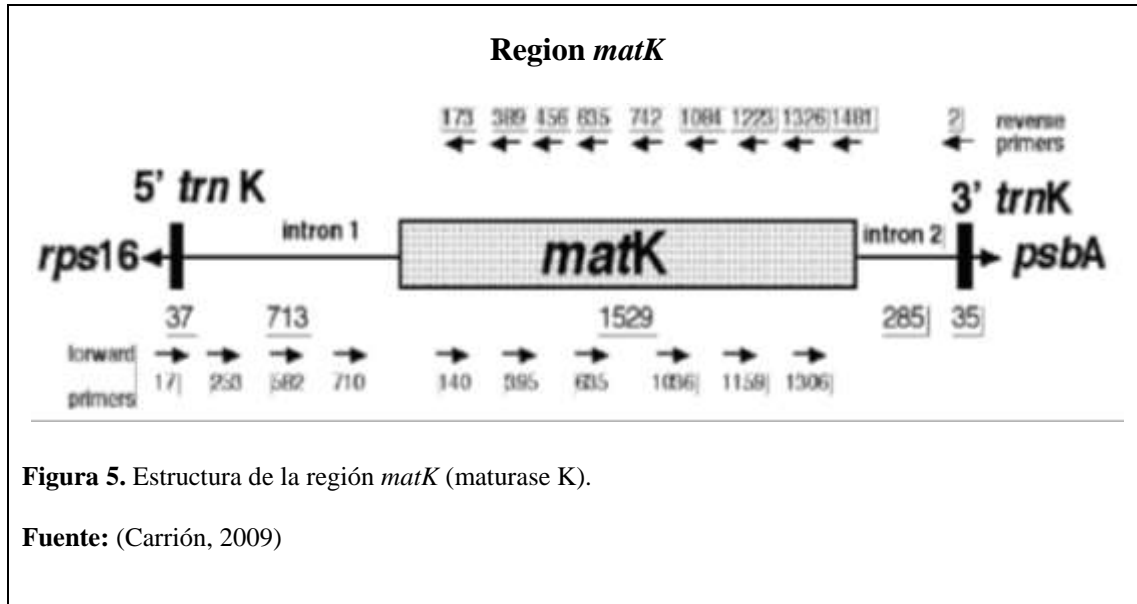
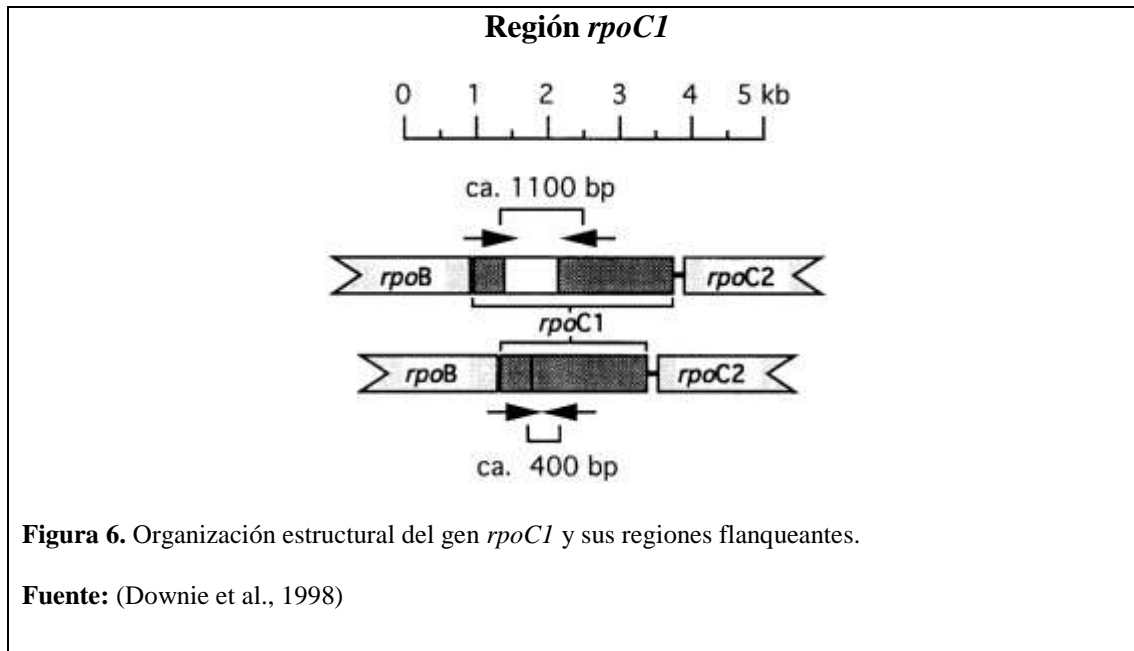


Figura 5. Estructura de la región *matK* (maturase K).

Fuente: (Carrión, 2009)

1.4.2. Región *rpoC1*

El gen *rpoC1* cuenta con un tamaño molecular entre 550 a 750 pb y además, se encuentra rodeado de regiones flanqueantes de porciones de genes *rpoB* y *rpoC2* (Véase **Figura 6**); la utilidad y efectividad de este marcador molecular ha sido corroborada en diferentes investigaciones (Downie, Katz-Downie, Rogers, Zujewski, & Small, 1998; Vindas-Rodríguez, Rojas Jiménez, & Tamayo-Castillo, 2011)



1.5. Filogenia

El término filogenia se define como el origen, formación y desarrollo evolutivo de una especie biológica, y se caracteriza por establecer relaciones evolutivas entre grupos de organismos y sus vínculos durante este proceso (Cerna & Miño, 2018). Los árboles filogenéticos pueden ser realizados bajo diferentes criterios y métodos; además, para su construcción se emplean diferentes programas bioinformáticos, que entre sus múltiples funciones permite estimar tiempos de divergencia, estimar tasas evolutivas, entre otros (Benitez, 2004; Miño, 2018).

En cuanto a los métodos de inferencia filogenética se refiere, entre los más empleados se encuentra el de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*), este constituye un modelo de reconstrucción filogenética a partir de procesos evolutivos explícitos y realistas considerando principalmente las características genéticas de los caracteres; así se considera un verdadero ajuste entre las probabilidades de mutación en la secuencia del ADN (proceso evolutivo), las secuencias de ADN propiamente dichas y cada uno de los posibles árboles filogenéticos; de tal manera que,

el árbol final que posiblemente constituiría el árbol original, es aquel que presenta el valor de *likelihood* más alto (Eguiarte, Souza & Nuñez-Farfán, 1997).

En cuanto a los modelos de evolución, el modelo *Tamura-Nei* considera las diferencias entre las transiciones y transversiones entre los nucleótidos; mientras que, el modelo *Jukes-Cantor* asume igual probabilidad de cambio en la frecuencia de las 4 bases nucleotídicas; por lo tanto, no se corrige la transición o transversión de nucleótidos y se asume una igualdad en la tasa de sustitución entre todos los sitios (Kumar, Stecher & Tamura, 2016).

Capítulo II

2. Materiales y métodos

2.1. Recolección y preparación de muestras

La recolección del material vegetal de las especies del género *Gongora*, se realizó entre los meses de diciembre del 2018 hasta mayo del 2019 en distintas provincias del Ecuador; tal como, se detalla a continuación: en la provincia de Carchi: Chical; en Imbabura: Lita (Invernadero “El Santuario”); en la provincia de Pichincha: Quito (Colección privada de Alexander Hirtz), San Miguel de los Bancos (Colección privada de Dario Guisal) y Mindo (Jardín de Orquídeas de Hugolino Oñate); en Napo: (Orquideario “Ruth’s Garden”); en Pastaza (Orquideario “Iwiakma” y Jardín Botánico “Las Orquídeas” de Omar Tello) y finalmente, en la provincia de Zamora Chinchipe: El Panguí (Invernaderos de Ecuagenera y Colección privada de Marco Jiménez).

Las especies de las cuales se recolectó el tejido foliar fueron previamente identificadas morfológicamente y registradas en el libro de campo de Marco Cerna N° 11 que va desde el individuo 3869 al 4402; durante la recolección se verificó que las muestras no presentaran daños mecánicos y se encuentren libres de enfermedades, de acuerdo a la metodología descrita por Agrocalidad (2015).

A continuación, con un bisturí estéril, se realizó un corte del tejido foliar; mismo que, fue almacenado en bolsas de papel Kraft junto con sílica gel; para su análisis, las muestras fueron transportadas en un recipiente térmico acondicionado a 4 °C con gel frío hacia el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Politécnica Salesiana y fueron almacenadas en un congelador *TEMPLOW Selecta* a -20 °C (Cascante, 2008).

2.2. Estudio molecular

2.2.1. Extracción de ADN

El estudio molecular se llevó a cabo durante el período de enero del 2019 y enero del 2020.

Debido a que las hojas del género *Gongora* poseen una elevada cantidad de polifenoles y polisacáridos (Hetherington & Ramírez, 2015) se probaron dos protocolos de extracción de ADN: Doyle y Doyle modificado y protocolo directo de extracción de ADN.

El protocolo directo de extracción de ADN se realizó con el Kit *Phire Plant Direct PCR Master Mix, Thermo Scientific*, según las recomendaciones del fabricante; para lo cual, se tomó una muestra de tejido vegetal de aproximadamente 2 mm de diámetro y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL *Eppendorf*; a continuación, se agregó 20 μ L de Dilution Buffer y con la punta de una micropipeta se maceró presionando el tejido contra las paredes del tubo hasta que la mezcla se tornó de color verde claro; posteriormente, se llevó a la microcentrífuga por 10 seg y finalmente, se tomó 1 μ L de ADN del sobrenadante para la PCR (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Para las muestras cuyo ADN no logró ser extraído por kit se realizaron lavados previos según el protocolo propuesto por Porebski, Bailey y Baum (1997); para lo cual, se tomó de 20-30 mg de muestra y se pulverizó con nitrógeno líquido; el tejido pulverizado se colocó en tubos de microcentrífuga de 2 mL *Eppendorf* y se añadió 400 μ L de buffer de lavado (100 mM HEPES [1M], 4 % β -Mercaptoetanol y 0,1 % PVP); se llevó a vórtex por 5 min; a continuación, se centrifugó a 13000 rpm por 3 min y se eliminó el sobrenadante, el proceso anterior se repitió cinco veces y al concluir el último lavado se añadió 400 μ L de Buffer de Resuspensión TE (20 mM TrisHCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8); finalmente, se llevó a vórtex por 5 min, se centrifugó a 130000 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante. Después de los lavados descritos con

anterioridad, se procedió a realizar un protocolo simple de extracción de ADN propuesto por Doyle y Doyle (1987), modificado por Iza (2018) y Montalvo y Vargas (2019): a la muestra se añadió 300 μL de Buffer Lisis (100 mM TrisHCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8 y 500 mM NaCl) y se maceró con una vareta hasta obtener una solución homogénea; a continuación, se agregó otros 300 μL del mismo buffer y se agitó en el vórtex; posteriormente, se adicionó 100 μL de SDS al 10 % y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces, la muestra se calentó durante 1 hora a 65 °C en un termobloque agitando cada media hora, luego se colocó 100 μL de acetato de potasio (5 M), se mezcló por inversión suave de 5 a 8 veces y se llevó a hielo por 5 min; a continuación, se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL *Eppendorf* al cual se le añadió 600 μL de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó en el vórtex, se llevó a centrifuga por 5 min a 13000 rpm, se transfirió el sobrenadante en volúmenes de 100 en 100 μL a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL *Eppendorf*, se agregó 360 μL de isopropanol frío y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces, se almacenó a -20 °C durante toda la noche

A continuación, se centrifugó a 13000 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante, el pellet de ADN obtenido se lavó con 400 μL de etanol frío al 70 %, se dio vórtex por 30 seg y se centrifugó a 13000 rpm por 3 min, se repitió los lavados 3 veces más, después del último lavado, se retiró el exceso de etanol y se colocó el tubo de microcentrífuga en un termobloque previamente calentado a 37 °C. Finalmente, una vez evaporado el etanol, se resuspendió el pellet con 30 μL de Buffer TE [1X] (10 mM TrisHCl pH 8 y 0,5 M EDTA pH 8).

2.2.2. Evaluación cualitativa de ADN

Se verificó la presencia o ausencia de ADN mediante una electroforesis horizontal, según el protocolo descrito por Iza (2018) y modificado por Montalvo y Vargas (2019); para lo cual, se

preparó un gel de agarosa al 1 %, para cuya elaboración se pesó 0,5 g de agarosa grado biología molecular *Thermo Scientific* y se aforó a 50 mL de TBE [1X] (se obtiene a partir del TBE [10X], preparado con: 27,5 g de ácido bórico; 2,93 g EDTA y 54 g de tris base, aforado a 500 mL y ajustado a pH 8); posteriormente, se agregó 5 μ L de *SYBR® safe DNA Gel Stain, Invitrogen*; a continuación, se dispensó el gel en la cámara de electroforesis *Labnet*, en cada pocillo se cargó: 3 μ L de ADN y 5 μ L de tampón de carga *BlueJuice™ Gel Loading Buffer [2X], Invitrogen*; se programó la cámara a 80 V por 45 min. Para la estimación del tamaño y concentración de las bandas de ADN, se tomó como referencia el marcador molecular *O' GeneRuler Express DNA Ladder* 100 a 5 000 bp y 40-100 ng/0,5 μ g (Thermo Fisher Scientific, 2018); se cargó 2 μ L de marcador molecular junto con 5 μ L de tampón de carga, se reveló el gel en un fotodocumentador *Bio-imaging systems®* y se digitalizó la imagen en computadora (Rivas & Salazar, 2017; Fuertes-Flores, Mallitasig-Quishpe, Cerna-Cevallos, & Gutierrez, 2018).

2.2.3. Amplificación de ADN

Según lo sugerido por Iza (2018) y Montalvo y Vargas (2019), mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional se amplificaron las regiones cloroplásticas *matK* y *rpoCl* empleando el kit *Phire Direct Plant PCR Master* de *Thermo Fisher Scientific*. La región *matK* se amplificó con los cebadores *matK 2.1a forward* (5'-ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC-3') y *reverse* (5'- GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3'); mientras que la región *rpoCl* con los cebadores *rpoCl forward* (5'-GTGGATACTTCTTGATAATGG-3') y *reverse* (5'-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC-3'), la amplificación se llevó a cabo en un termociclador *ProFlex PCR System, Applied Biosystems-USA* (Chase et al., 2007).

Los componentes de la reacción tanto para *matK* como para *rpoC1*, se muestran a continuación en la **Tabla 1**:

Tabla 1.

Componentes de la reacción PCR con *Phire Plant Direct PCR* para región *matK* y *rpoC1*

Componente	<i>matK</i>	<i>rpoC1</i>
	Vol (μ L) para 1 muestra	Vol (μ L) para 1 muestra
<i>Phire Plant Direct PCR Master mix</i>	10	12,5
<i>Primer forward</i> (10 μ M)	0,5	0,5
<i>Primer reverse</i> (10 μ M)	0,5	0,5
Agua de PCR	8	10
*DMSO	-	0,5
ADN	1	1
Volumen total mix	19,5	24
Volumen final de reacción	20	25

Fuente: (Iza, 2018; Thermo Fisher Scientific, 2018). Modificado por las autoras.

Al agregar *Dimetil-sulfóxido (DMSO) en la reacción en una concentración no mayor al 8 % del total de la mezcla, éste se une a la plantilla de ADN en los residuos de citosina provocando un cambio en su configuración, lo que facilita la desnaturalización del ADN y por lo tanto, una reducción de la Temperatura de Melting; al ser los cebadores ricos en GC, el DMSO facilita la unión de los éstos a la plantilla molde, mejorando sustancialmente la amplificación (Lorenz, 2012).

Según, lo sugerido por Montalvo y Vargas (2019) las condiciones de amplificación para la región cloroplástica *matK* fueron: desnaturalización inicial a 98 °C por 5 min; a continuación, 40 ciclos

de: desnaturalización a 98 °C por 10 seg, alineamiento a 53,5 °C por 10 seg y extensión a 72 °C por 40 seg y para la extensión final 72 °C por 1 min. Mientras que, para la región cloroplástica *rpoCI*, según lo sugerido por Iza (2018), las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 96 °C por 5 min, a continuación 35 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 10 seg, alineamiento a 55,5 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 1 min y para la extensión final 72 °C por 5 min. Es importante, destacar que las condiciones de amplificación tomadas como referencia, fueron modificadas por las autoras, en función del propósito de la investigación. La evaluación del producto de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %, procedimiento descrito anteriormente en la sección 2.2.2; se cargó 0,5 μ L de producto de PCR y 1 μ L del marcador molecular *O' GeneRuler Express DNA Ladder ready-to-use* [0,1 μ g/ μ L] de 100-5000 bp, como referencia para la estimación del tamaño de las bandas (Thermo Fisher Scientific, 2018).

2.2.4. Secuenciación

La secuenciación se realizó en la empresa *Macrogen Inc.* ubicada en Seúl, Corea del Sur, siguiendo el método clásico de Sanger automatizado; para este fin se preparó la muestra con 20 ng/ μ L del producto de PCR diluidos en agua libre de nucleasas y almacenados en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL *Eppendorf* según los requerimientos de la empresa; previo a la secuenciación, las muestras fueron purificadas (Macrogen, 2018).

2.2.5. Filogenia

Se evaluó la calidad de las secuencias de las regiones cloroplásticas *matK* y *rpoCI* mediante el programa FichTV versión 1.4.0, se seleccionaron aquellas secuencias que presentaron un porcentaje de calidad ≥ 80 %; a continuación, para su revisión y edición se importaron las

secuencias seleccionadas al programa MEGA 7 y se procedió a eliminar el ruido de fondo; una vez obtenidas las secuencias limpias y editadas se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE y se procedió a la construcción de los árboles filogenéticos.

Para la construcción de los árboles filogenéticos para cada región, se empleó el método de estimación de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) y se evaluaron dos modelos evolutivos: *Tamura-Nei* y *Jukes-Cantor*, para cada uno se empleó Bootstraps con 1000 réplicas (Peña, 2011; Montalvo y Vargas, 2019; Albán y Toapanta, 2019).

En la construcción del árbol además de ocupar las secuencias de las especies ecuatorianas del género *Gongora*, también se emplearon secuencias obtenidas del GenBank de especies extranjeras del género, con el fin de proporcionar mayor resolución a los árboles finales y visualizar de mejor manera la formación de grupos (Kumar et al., 2016).

Los árboles obtenidos fueron enraizados bajo el criterio del grupo externo, estas secuencias fueron obtenidas del GenBank, se escogió a *Stanhopea saccata* y *Coeliopsis hyacinthosma* como grupos externos tanto para el árbol *matK* como el árbol *rpoCI* debido a que las dos especies pertenecen a la tribu Cymbidieae que constituye un taxón externo al grupo de estudio (Pridgeon, Cribb & Chase, 2009; Batista et al., 2014).

Una vez definidos los árboles filogenéticos, se los evaluó mediante comparación entre la taxonomía tradicional descrita por Jenny (1993) en su obra “Monograph of the Genus *Gongora*”; y así mismo, una comparación entre algunos estudios de filogenia molecular realizados. Las coordenadas geográficas correspondientes a cada especie se encuentran al final del documento

(Véase

Anexo

2).

Capítulo III

3. Resultados y discusión

3.1. Recolección y preparación de muestras

La recolección de muestras de tejido foliar de las especies del género *Gongora* se realizó en distintas provincias del Ecuador; como se muestra a continuación: en la provincia de Carchi: Chical; en Imbabura: Lita (Invernadero “El Santuario”); en la provincia de Pichincha: Quito (Colección privada de Alexander Hirtz), San Miguel de los Bancos (Colección privada de Dario Guisal) y Mindo (Jardín de Orquídeas de Hugolino Oñate); en Napo: (Orquideario “Ruth’s Garden”); en Pastaza (Orquideario “Iwiakma” y Jardín Botánico “Las Orquídeas” de Omar Tello) y finalmente, en la provincia de Zamora Chinchipe: El Pangui (Invernaderos de Ecuagenera y Colección privada de Marco Jiménez), obteniéndose un total de 51 muestras, pertenecientes a alrededor de 20 especies del género de estudio (Véase **Anexo 2** y **Anexo 3**)

Tabla 2.

Lista de las especies muestreadas del género *Gongora* con su respectiva georreferenciación.

N. muestra	Especie	Código	Latitud	Longitud	Lugar de recolección
1	<i>Gongora</i> aff. <i>grossa</i>	4128	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
2	<i>Gongora</i> aff. <i>hirtzii</i>	4130	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
3	<i>Gongora</i> aff. <i>hirtzii</i>	4131	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
4	<i>Gongora</i> aff. <i>bufonia</i>	4134	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha

5	<i>Gongora</i> aff. <i>grossa</i>	4138	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
6	<i>Gongora</i> aff. <i>sphaerica</i>	4139	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
7	<i>Gongora</i> aff. <i>latisepala</i>	4144	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
8	<i>Gongora</i> aff. <i>latisepala</i>	4145	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
9	<i>Gongora</i> aff. <i>atroporpurea</i>	4146	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
10	<i>Gongora</i> aff. <i>hirtzii</i>	4147	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
11	<i>Gongora</i> aff. <i>ionodesme</i>	4148	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
12	<i>Gongora</i> <i>superflua</i> det: Mogrovejo y Proaño	4149	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
13	<i>Gongora</i> <i>bufonia</i> det: Mogrovejo y Proaño	4150	- 0,177036	- 78,492133	Invernadero Alex Hirtz – Quito, Pichincha
14	<i>Gongora</i> aff. <i>hirtzii</i> (nueva)	4165	0,023957	- 78,895075	San Miguel de los Bancos, Pichincha
15	<i>Gongora</i> <i>leucochila</i>	4167	0,023957	- 78,895075	San Miguel de los Bancos, Pichincha
16	<i>Gongora</i> aff. <i>hirtzii</i>	4189	- 0,055073	- 78,77645	Jardín de Orquídeas de Hugolino Oñate – Mindo, Pichincha
17	<i>Gongora</i> <i>flaveola</i>	4209	- 1,082154	- 77,925713	Ruth's Garden – Napo
18	<i>Gongora</i> <i>grossa</i>	4241	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Pangui, Zamora Chinchipe
19	<i>Gongora</i> <i>pardina</i>	4242	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Pangui, Zamora Chinchipe
20	<i>Gongora</i> <i>pleiochroma</i>	4243	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Pangui, Zamora

					Chinchiipe
21	<i>Gongora fulva</i>	4244	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
22	<i>Gongora rufescens</i>	4245	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
23	<i>Gongora atropurpurea</i>	4247	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
24	<i>Gongora latisepala</i>	4248	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
25	<i>Gongora cassidea</i>	4286	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
26	<i>Gongora bufonia</i>	4287	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
27	<i>Gongora sanderiana</i>	4295	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
28	<i>Gongora aff gracilis</i>	4298	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
29	<i>Gongora superflua</i>	4300	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
30	<i>Gongora quinquenervis</i>	4314	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
31	<i>Gongora ilense</i>	4320	- 3,634700	- 78,593596	Ecuagenera – El Panguí, Zamora Chinchiipe
32	<i>Gongora aff atropurpurea</i>	4332	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
33	<i>Gongora aff atropurpurea</i>	4335	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
34	<i>Gongora aff atropurpurea</i>	4336	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
35	<i>Gongora aff atropurpurea</i>	4337	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita,

					Imbabura
36	<i>Gongora ilense</i> det: Mogrovejo y Proaño	4338	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
37	<i>Gongora</i> aff. <i>fulva</i> .	4339	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
38	<i>Gongora</i> aff. <i>grossa</i>	4340	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
39	<i>Gongora</i> aff. <i>atroporpurea</i>	4341	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
40	<i>Gongora</i> aff. <i>atroporpurea</i>	4349	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
41	<i>Gongora grossa</i> det: Mogrovejo y Proaño	4353	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
42	<i>Gongora</i> aff. <i>sphaerica</i>	4355	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
43	<i>Gongora</i> aff. <i>sphaerica</i>	4359	0,771852	- 78,372645	Orquideario “El Santuario” – Lita, Imbabura
44	<i>Gongora</i> aff. <i>bufonia</i>	4369	1,011727	- 78,242612	Chical, Carchi
45	<i>Gongora</i> aff. <i>gracilis</i>	4371	1,011727	- 78,242612	Chical, Carchi
46	<i>Gongora</i> aff. <i>fulva</i>	4375	1,011727	- 78,242612	Chical, Carchi
47	<i>Gongora quinquenervis</i> det: Mogrovejo y Proaño	4376	1,011727	- 78,242612	Chical, Carchi
48	<i>Gongora gracilis</i>	4387	- 4,054939	- 78,933644	Orquideario “La Paphinia” de Marco Jiménez – Zamora, Zamora Chinchipe
49	<i>Gongora scaphephorus</i>	4399	- 4,054939	- 78,933644	Orquideario “La Paphinia” de Marco Jiménez – Zamora,

					Zamora Chinchipe
50	<i>Gongora ecornuta</i>	4400	- 4,054939	- 78,933644	Orquideario “La Paphinia” de Marco Jiménez – Zamora, Zamora Chinchipe
51	<i>Gongora ionodesme</i>	4402	- 4,133333	- 78,966667	Zamora, Zamora Chinchipe

Nota: Se ubican 9 puntos de recolección de especies del género *Gongora* registradas en el Ecuador, código de colección del libro de campo N° 11 de Marco Cerna que va desde el individuo 3869 al 4402.

Elaborado por: (Las autoras, 2020).

Las especies ecuatorianas consideradas para este estudio en base a Dodson, Luer y Romero (2006) fueron: *G. atropurpurea*, *G. ecornuta*, *G. gracilis*, *G.grossa*, *G. hirtzii*, *G. ilense*, *G. pardina*, *G. pleiochroma*, *G. quinquenervis*, *G. rufescens*, *G. scaphephorus*, *G. superflua* y finalmente, se incluyó *G. ionodesme* reportada para el Ecuador por Gerlach (2009).

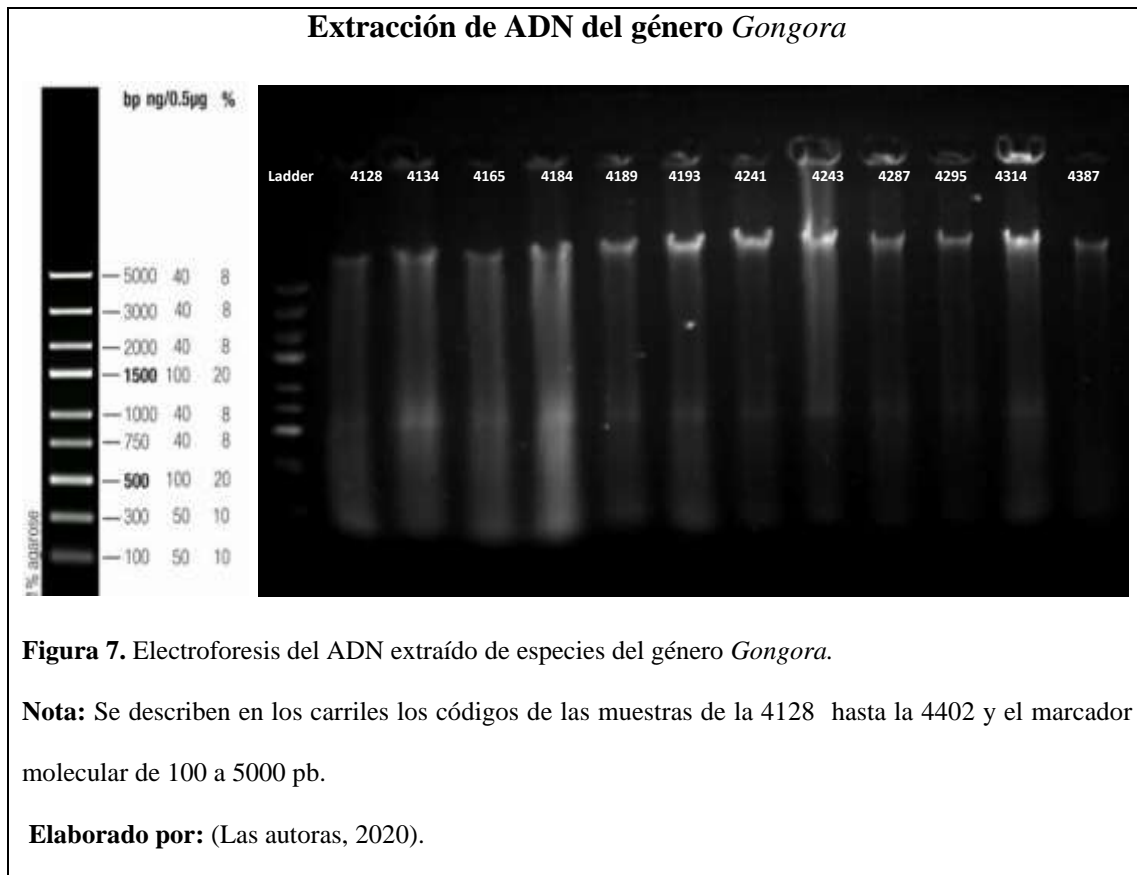
Es importante, recalcar que *G. napoensis* (sinónimo de *G. aceras*) (The Plant List, 2018), no fue incluida; ya que, no fue posible su recolección. Según León et al. (2011) esta especie fue encontrada por una única vez en 1978 en el camino entre Puerto Napo y Misahuallí, actualmente no se reporta en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).

3.2. Estudio molecular

Se logró extraer ADN total de las muestras recolectadas para este estudio, las bandas de ADN obtenidas presentaron alrededor de 5000 pb (Véase **Figura 7**), estos resultados son similares a los obtenidos por Iza (2018); Montalvo y Vargas (2019) y Albán y Toapanta (2019) en estudios de *ADN Barcoding* en diferentes géneros de orquídeas.

La región cloroplástica *matK* se amplificó para la totalidad de las muestras recolectadas, el amplicón obtenido presentó una longitud de aproximadamente de 800 pb (Véase **Figura 8**), estos resultados son similares a los obtenidos por Parveen, Singh, Malik, Raghuvanshi y Babbar (2017); Montalvo y Vargas (2019) y Albán y Toapanta (2019), que evaluaron *matK* como una potencial región Barcode en diferentes géneros de orquídeas.

Además, se trabajó con a región cloroplástica *rpoCI* que se amplificó exitosamente para todas las muestras, exceptuando *G. sandariana* que presentó dificultades para su procesamiento; el amplicón obtenido presentó alrededor de 500 pb (Véase **Figura 9**), resultados similares a los obtenidos por Ginibun et al. (2010); así, como los obtenidos por Parveen, Singh, Malik, Raghuvanshi y Babbar (2017) e Iza (2018) que también evaluaron a *rpoCI* como posible región Barcode en diferentes géneros de orquídeas.



Electroforesis del producto PCR de la región *matK2.1a*

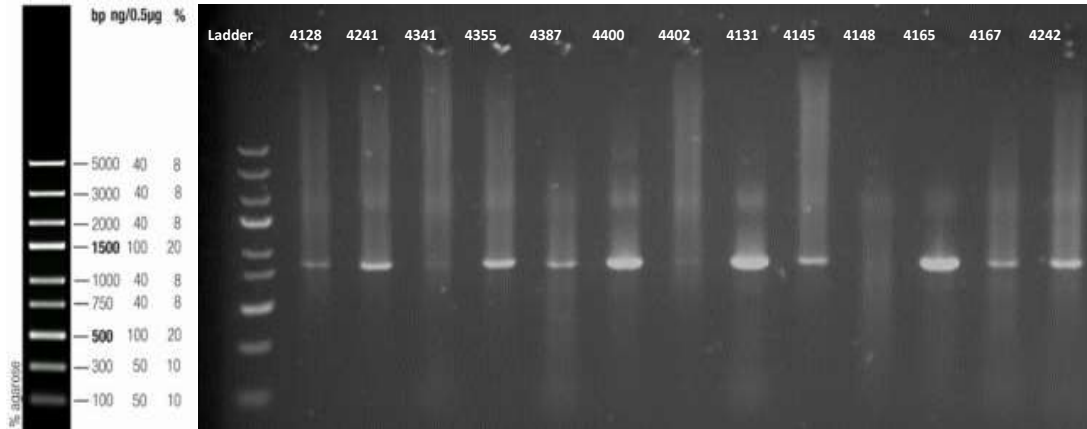


Figura 8. Amplificación del producto PCR con el marcador *matK2.1a*

Nota: se describen los carriles con códigos de las muestras de la 4128 hasta la 4402 y el marcador molecular de 800 pb.

Elaborado por: (Las autoras, 2020).

Electroforesis del producto PCR de la región *rpoC1*

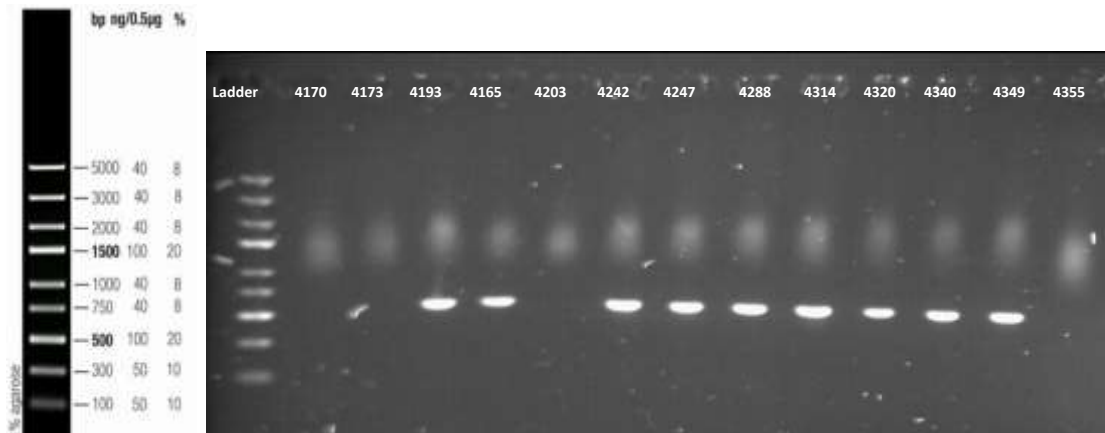


Figura 9. Amplificación del producto PCR con el marcador *rpoC1*

Nota: se describen los carriles con códigos de las muestras de la 4128 hasta la 4402 y el marcador molecular de 500 pb.

Elaborado por: (Las autoras, 2020).

3.3. Filogenia molecular y Georreferenciación

Una vez procesadas las secuencias obtenidas, se realizaron árboles filogenéticos con el método de estimación de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) para los marcadores moleculares: *matK* y *rpoCl* (Kumar, Stecher y Tamura, 2016).

La construcción de los árboles para las dos regiones cloroplásticas se realizó con los modelos evolutivos *Jukes-Cantor* y *Tamura- Nei*; a pesar, de que los árboles obtenidos presentaron topologías similares (*Véase*

Anexo 4), para el árbol final únicamente se consideró el modelo *Tamura-Nei* debido a que éste corrige la tasa transición o transversión de nucleótidos (Kumar, Stecher y Tamura, 2016; Montalvo & Vargas, 2019).

Los grupos externos *Stanhopea saccata* y *Coeliopsis hyacinthosma* permitieron un enraizamiento exitosos de los árboles, debido a que clarificaron grupos basales y grupos de reciente evolución (Pridgeon et al., 2009; Batista et al., 2014).

Según los árboles filogenéticos obtenidos en el presente estudio para el género *Gongora*, construidos a partir de las regiones cloroplásticas *matK* y *rpoCl*, únicamente la región *matK* permitió obtener una clasificación subgenérica para *Gongora*.

A continuación, la **Figura 10** muestra el árbol filogenético para la región cloroplástica *matK* obtenido en el presente estudio.

Árbol filogenético *Maximum Likelihood* región *matK* del género *Gongora*

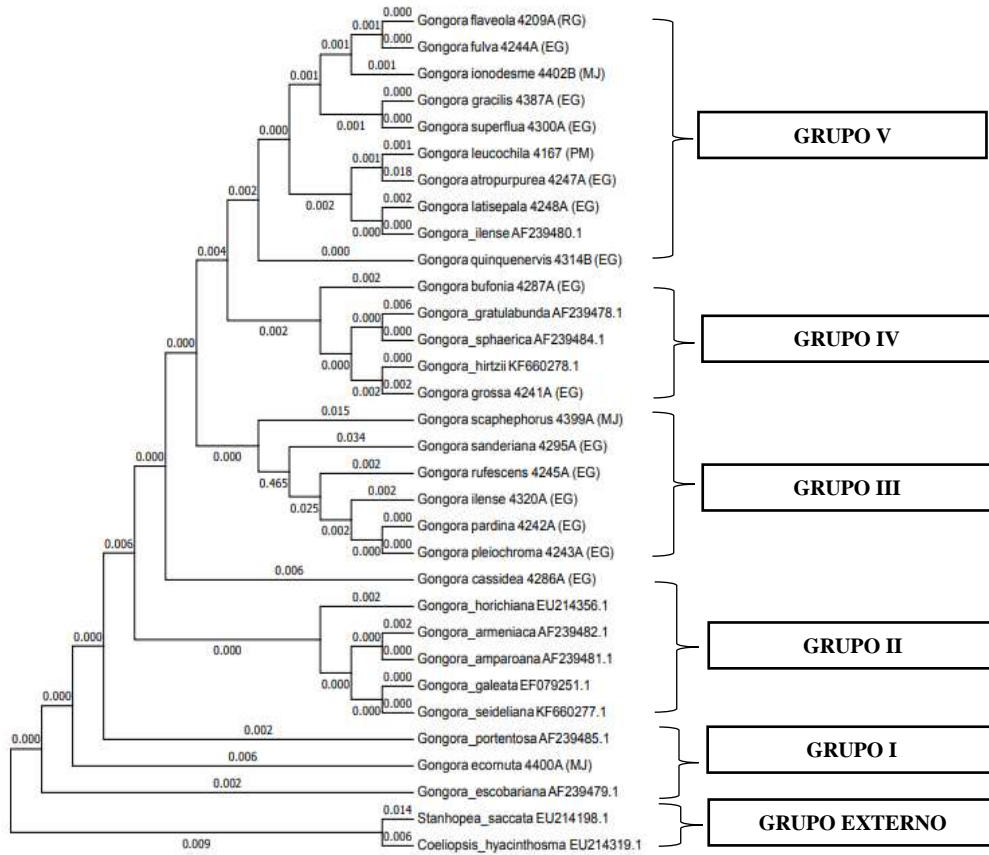


Figura 10. Árbol filogenético de la región *matK* mediante el método de *Máxima Verosimilitud* y el modelo *Tamura-Nei* con 1000 Bootstraps. *Stanhopea saccata* y *Coeliopsis hyacinthosma* como grupos externos.

Elaborado por: (Las autoras, 2020)

Nota: El análisis involucró 32 secuencias de nucleótidos de las cuales 13 corresponden a la base de datos Genbank. En este árbol únicamente se consideraron las especies identificadas. Datos procesados con el software MEGA 7.

En el árbol filogenético para la región cloroplástica *matK*, se evidenciaron 5 grupos más 1 grupo externo. A continuación, se describen los grupos formados con la región cloroplástica *matK*:

GRUPO I. Grupo escobariana (especies basales): está conformado por las especies *Gongora escobariana* Whitten, *Gongora ecornuta* Jenny y *Gongora portentosa* Linden & Rchb.f. que forman un grupo basal. En el presente estudio se lo nombra “escobariana” debido a que esta especie se presenta como la más antigua y a su vez, comparte el ancestro en común con el resto de las especies del género.

La conformación de este grupo coincide con la filogenia realizada por Pridgeon, Cribb, y otros (2009) (Véase

Figura 1); de igual manera, con el estudio realizado por Whitten, Williams y Chase (2000) (Véase **Anexo 5**) y Whitten, Neubig, y Williams (2014) (Véase **Anexo 6**) pero que incluyen a *G. escobariana* y *G. portentosa* formando un grupo basal correspondiente al subgénero *Portentosa*; sin embargo, no incluyen a *G. ecornuta* en la clasificación. En lo que a taxonomía tradicional se refiere, existe correspondencia con el trabajo de Jenny (1993) que forma un grupo similar al del presente estudio, pero incluye a *G. sanderiana*, mientras que *G. escobariana* no se encuentra considerada para este subgénero.

La principal característica morfológica de las especies de este grupo es la presencia de flores resupinadas, lo que las diferencia del resto de subgéneros (Pridgeon et al., 2009). En la clasificación infragenérica este subgénero se destaca porque el frente del labio se encuentra apuntando lejos al eje de la inflorescencia (Rice, 2003).

En cuanto, a la distribución geográfica según Dodson et al. (2006) y Tropicos (2017), la especie *G. escobariana* endémica y nativa de Colombia se distribuye en las estribaciones de los Andes, entre los 1000-1200 m.s.n.m. en los departamentos de Antioquia y Córdoba; mientras que, *G. portentosa* también nativa de Colombia se distribuye en los departamentos de Boyacá, Caquetá, Cundinamarca y Meta entre los 800-1000 m.s.n.m, esta especie también ha sido reportada para

Ecuador y Perú en los bosques húmedos entre los 1000-1100 m.s.n.m. La especie *G. ecornuta* ha sido reportada para Perú y Ecuador, en éste último se distribuye en las provincias de Napo, Morona Santiago y Zamora Chinchipe entre los 700-1200 m.s.n.m. (Jørgensen & León-Yáñez, 1999; Dodson et al., 2006).

A continuación, en la **Figura 11** se muestra la distribución geográfica de las especies del género *Gongora* que conforman el grupo I.

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo I

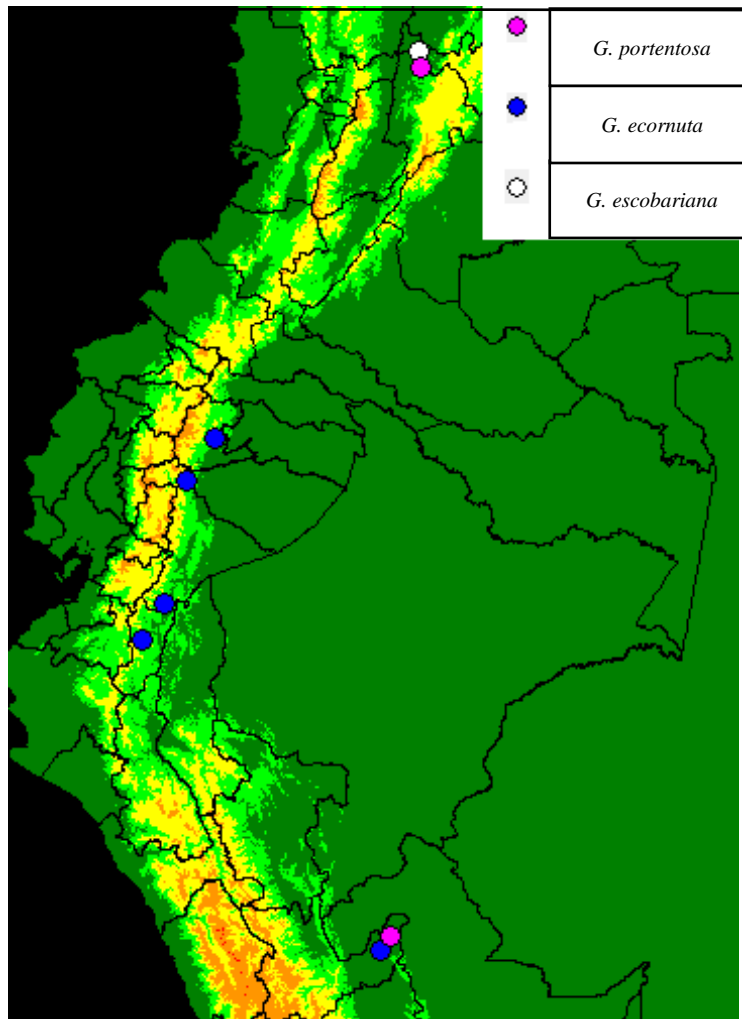


Figura 11. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo I. Grupo escobariana (especies basales).

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. escobariana*, *G. ecornuta* y *G. portentosa*.

Fuente: (Dodson et al., 2006; Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

GRUPO II. Grupo cassidea (especies centro americanas basales): este grupo se encuentra formado por *G. cassidea* Rchb.f., *G. horichiana* Fowlie, *G. amparoana* Schltr, *G. armeniaca* (Lindl.) Rchb.f., *G. galeata* (Lindl.) Rchb.f. y *G. seideliana* Rchb.f..

El nombre de este grupo se debe a que *G. cassidea* es la especie más antigua y a partir de la cual se diversificaron las demás especies. Este grupo conformado únicamente por especies centroamericanas, por su ubicación basal también constituyen especies ancestrales; en cuanto, a los estudios moleculares, la conformación de este grupo coincide con el estudio de Whitten, Williams y Chase (2000), en cuya filogenia también se forma un grupo correspondiente al subgénero *Acroptera* que además de incluir a *G. tridentata*, se ubica inmediatamente después del subgénero ancestral *Portentosa*. De igual manera, en la filogenia de Pridgeon, Cribb, y otros (2009), se evidencia un grupo correspondiente al subgénero *Acroptera* que además de incluir otras especies, también se ubica inmediatamente después del subgénero ancestral *Portentosa*.

Sin embargo, en el estudio de Whitten y otros (2014), este subgénero que incluye a *G. tridentata*, no se ubica inmediatamente junto al subgénero *Portentosa*, sino junto al subgénero *Gongora*, sugiriendo que no necesariamente se trata de un grupo ancestral, sino más bien de evolución reciente.

En este grupo también se evidencia que no existe diferencia genética entre las especies *G. galeta* (EF079251.1) y *G. seideliana* (KF660277.1) registradas en el GenBank, por lo que se sugiere revisar el material de los autores con el fin de ubicar correctamente las especies.

En cuanto, a taxonomía tradicional se refiere existe correspondencia con el trabajo de Jenny (1993) que forma un grupo similar al del presente estudio en el que además incluye a *G. cornuta* y *G. horichiana* pero no a *G. seideliana* que ubica en la sección *Truncata* del subgénero *Gongora*.

El subgénero *Acroptera* constituye un subgénero basal que comparte algunas características respecto a morfología floral junto con el subgénero *Portentosa*, al parecer se trata de 2 grupos constituidos por especies ancestrales cuyas morfologías florales son bastante distintas del resto de subgéneros; se distinguen del subgénero *Portentosa* porque se trata de flores no resupinadas

(Pridgeon et al., 2009). Según su clasificación infragenérica, este subgénero destaca por la presencia de un labelo sin cerdas en el medio; mientras que, para la sección *Acropera* el sépalo dorsal envuelve a la columna y los pedicelos se encuentran fuertemente curvados y para la sección *Armeniaca* el sépalo dorsal presenta márgenes reflexos y los pedicelos son ligeramente arqueados (Rice, 2003).

En cuanto, a la distribución geográfica de este grupo según Tropicós (2017), estas especies se distribuyen en el centro del continente americano: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá; a excepción de *G. seideliana* que se distribuye en Colombia.

La especie *G. cassidea* se distribuye al norte de Centroamérica: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Honduras y Nicaragua entre los 700-1500 m.s.n.m.; mientras que, *G. horichiana* en Costa Rica y Panamá entre los 650-1500 m.s.n.m.; *G. amparoana* se restringe a Costa Rica entre los 1100-1200 m.s.n.m.; mientras *G. armeniaca* presenta una distribución más amplia en Costa Rica, Nicaragua, Panamá entre los 700-1300 m.s.n.m., la especie *G. galeata* se restringe al sur de México y el norte de Guatemala entre los 700-1800 m.s.n.m., finalmente *G. seideliana* se registra únicamente para el norte de Colombia (Tropicós, 2019).

A continuación, en la **Figura 12** se muestra la distribución geográfica de las especies del género *Gongora* que conforman el grupo II.

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo II

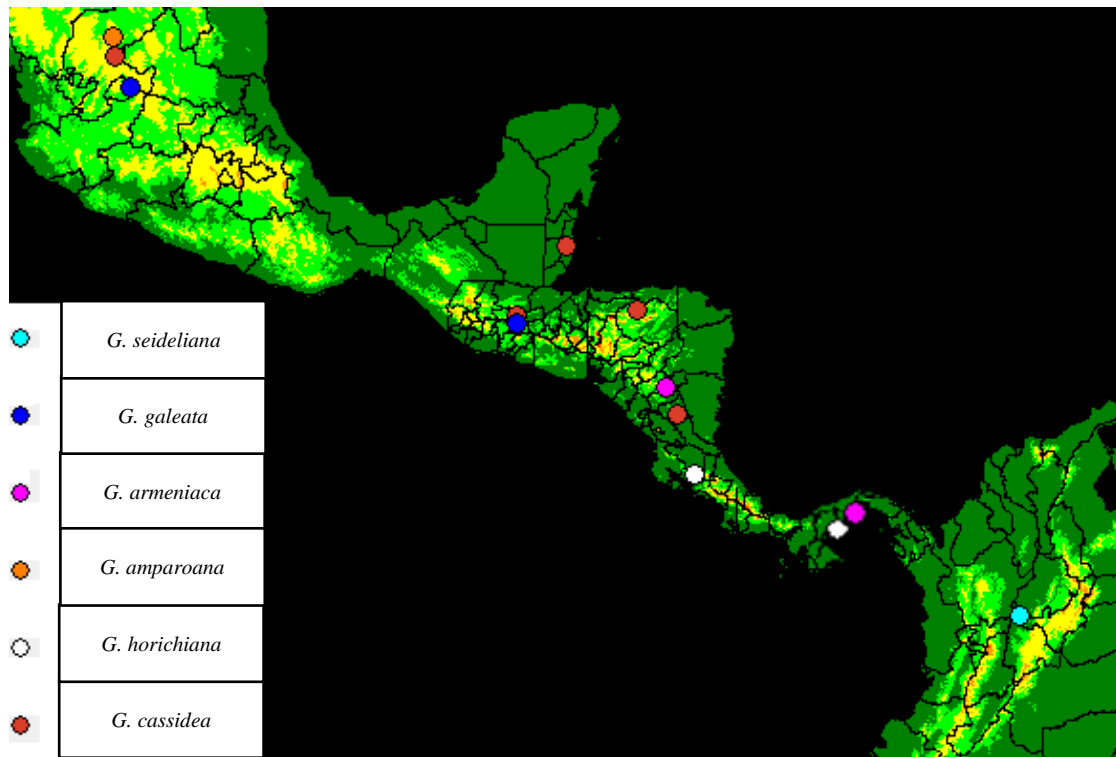


Figura 12. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo II. Grupo *cassidea* (especies extranjeras basales).

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. cassidea*, *G. horichiana*, *G. amparoana*, *G. armeniaca*, *G. galeata* y *G. seideliana*.

Fuente: (Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

GRUPO III. Grupo *scaphephorus* (especies ecuatorianas): en este grupo se encuentran las especies ecuatorianas *Gongora scaphephorus* Rchb.f. & Warsz., *Gongora sanderiana* Kraenzl, *Gongora. rufescens* Jenny, *Gongora ilense* Whitten & Jenny, *Gongora pardina* Jenny y *Gongora pleiochroma* Rchb.f. El nombre de este grupo hace referencia a *G. scaphephorus* que se ubica como la especie basal y a partir de la cual se diversificaron las demás especies.

Existe coincidencia del presente grupo con la filogenia planteada por Pridgeon, Cribb, y otros (2009) que agrupa a *G. ilense*, *G. pleiochroma* y *G. scaphephorus* conformando el subgénero *Gongora*; sin embargo, no se incluye a *G. sanderiana*, *G. rufescens* y *G. pardina*; mientras que, Whitten, Williams y Chase (2000) y Whitten y otros (2014) únicamente consideraron a *G. ilense* y la agruparon junto con otras especies conformando también el subgénero *Gongora*; en los estudios previos no se incluyen a varias especies ecuatorianas descritas recientemente.

En lo que a taxonomía tradicional se refiere, el Grupo III es similar a lo propuesto por Jenny (1993); sin embargo, en esta clasificación no se incluye a *G. sanderiana* en el subgénero *Gongora*; en tanto que, se la ubica en el subgénero *Portentosa*; mientras que, *G. ilense* no es considerada en esta taxonomía.

Según el presente estudio molecular, la especie *G. ilense* recolectada en ECUAGENERA no corresponde con la misma secuencia de la especie obtenida del GenBank accesión AF239480.1 de Whitten, Williams y Chase (2000), que se ubica en el Grupo VI; por lo que, la especie recolectada para este análisis se encuentra erróneamente identificada y se trata de una especie diferente.

Según Jørgensen y León-Yáñez (1999), *G. sanderiana* se encontraba registrada para el Ecuador; sin embargo, Dodson y otros (2006) en su publicación “Orchids of Ecuador” no consideran a *G. sanderiana* para el Ecuador argumentando que su identificación se basó en un material erróneamente identificado de *G. ecornuta*; en el presente estudio *G. sanderiana* se ubica en el Grupo III junto con las especies ecuatorianas y genéticamente distante de *G. ecornuta*; de tal manera, que constituye una especie diferente a *G. ecornuta*.

En este grupo también se evidencia que no existe diferencia genética entre las especies *G. pardina* y *G. pleiochroma* recolectadas en Ecuagenera; por lo que, se sugiere revisar el material con el fin de ubicar correctamente las especies.

A partir de este grupo las morfologías florales con respecto a otros subgéneros son bastante diferentes, lo que Pridgeon y otros (2009), sugiere que se trata de un grupo de evolución reciente. Según la clasificación infragenérica, esta sección se destaca por presentar un labelo con cuernos delgados, nunca superando la base (Rice, 2003).

El grupo V se encuentra distribuido en el centro y sur del continente americano; teniendo todas las especies como registro en común a Ecuador. *G. scaphephorus*, *G. sanderiana*, *G. rufescens*, *G. pardina* y *G. pleiochroma* se distribuyen ampliamente en la región oriental ecuatoriana en las provincias de Morona Santiago, Napo, Zamora Chinchipe y Pastaza entre los 450-1300 m.s.n.m., siendo Napo y Morona Santiago las provincias de mayor diversidad, la descripción geográfica de *G. ilense* se realiza en el Grupo V (Dodson et al., 2006; Tropicós, 2019).

Sin embargo, también existen registros de *G. scaphephorus* y *G. rufescens* en Bolivia, Colombia y Perú; de igual manera, existen registros de *G. sanderiana* para Perú; en el caso, de *G. pleiochroma*, es la única especie del grupo que también ha sido recolectada en Surinam, Guayana Francesa y Guyana; lo anterior, indica que si bien estas especies son endémicas del Ecuador, hay diversificación en América del Sur (Tropicós, 2019).

A continuación, en las **Figura 13** y **Figura 14** se muestra la distribución geográfica de las especies del género *Gongora* que conforman el grupo III.

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo III

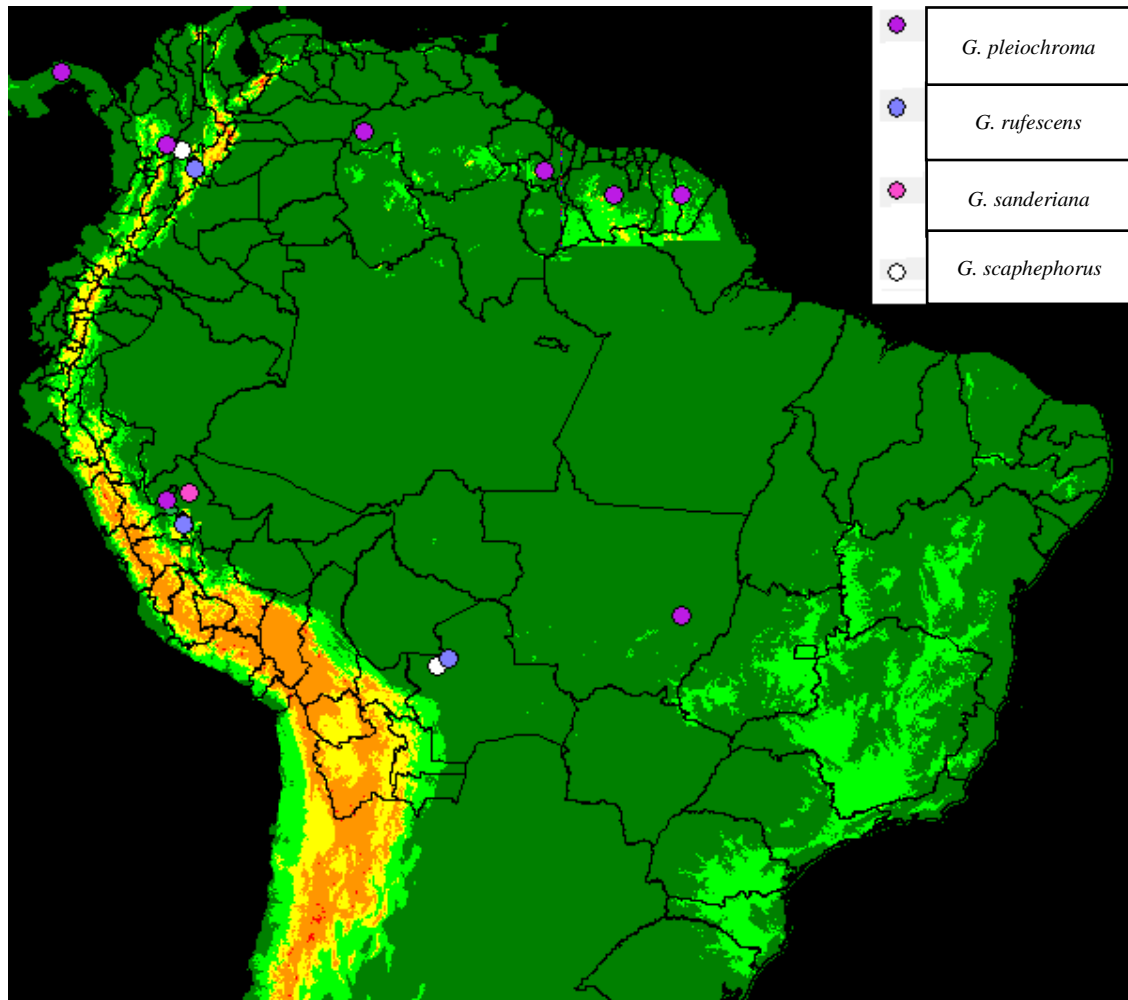


Figura 13. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo III. Grupo scaphephorus (especies ecuatorianas) en América del Sur con excepción de Ecuador.

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. scaphephorus*, *G. sanderiana*, *G. rufescens*, *G. pardina* y *G. pleiochroma*.

Fuente: (Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo III

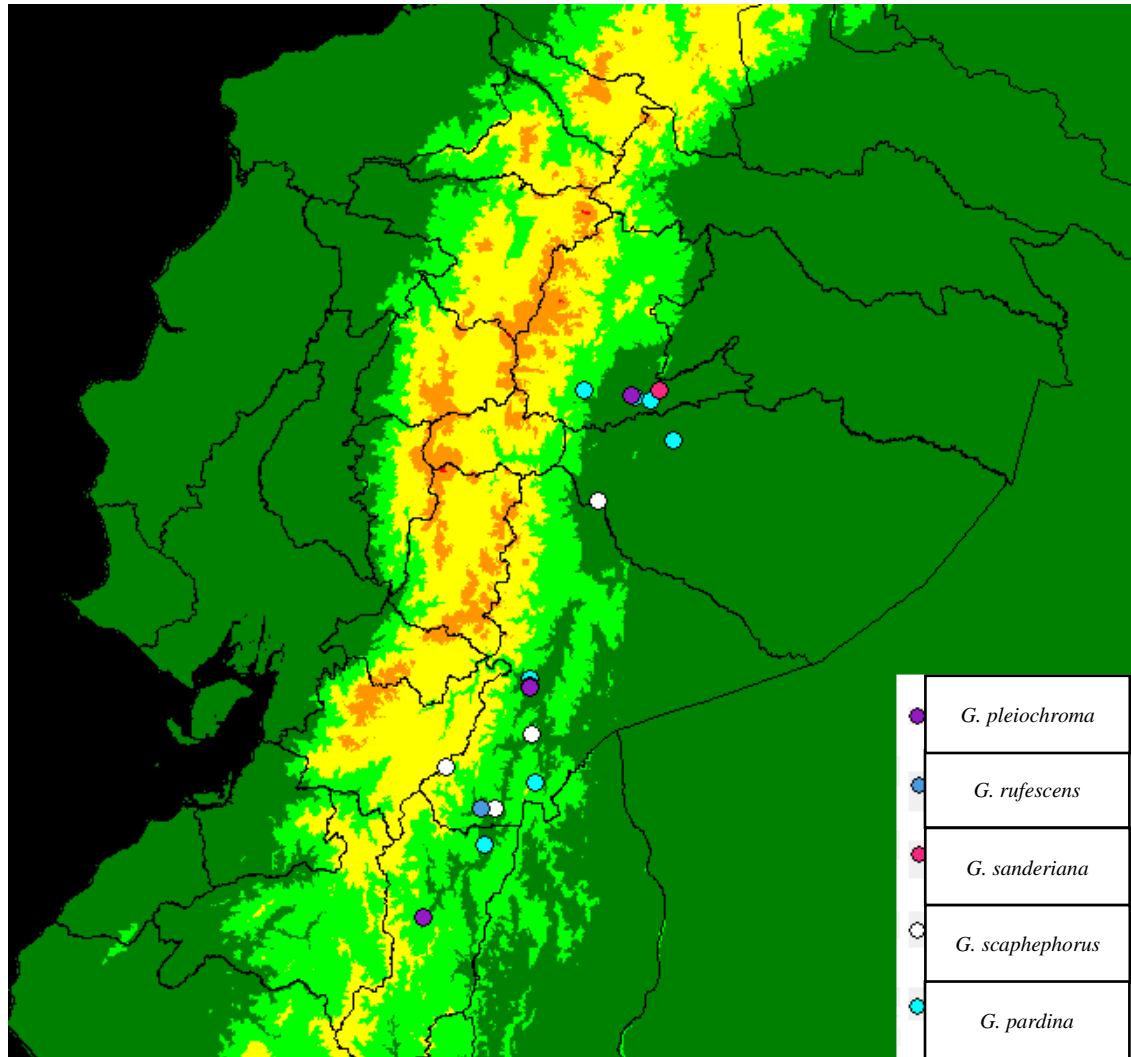


Figura 14. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo III. Grupo scaphephorus (especies ecuatorianas) en Ecuador.

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. scaphephorus*, *G. sanderiana*, *G. rufescens*, *G. pardina* y *G. pleiochroma*. **Fuente:** (Dodson et al., 2006; Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

GRUPO IV. Grupo hirtzii: este grupo está conformado por *Gongora grossa* Rchb.f., *Gongora hirtzii* Dodson & N. H. Williams, *Gongora sphaerica* Jenny, *Gongora gratulabunda* Rchb.f. y *Gongora bufonia* Lindl. Su nombre se debe a *G. hirtzii* que constituye la especie más basal a partir de la cual se diversificaron el resto de las especies.

Molecularmente existe correspondencia del presente grupo con Whitten, Williams y Chase (2000) que también agrupan a *G. gratulabunda* y *G. sphaerica*; pero difiere, al incluir a *G. ilense*. Existe también coincidencia de este grupo con el posterior trabajo de Whitten y otros (2014) que también agrupan a *G. hirtzii*. Por otro lado, Pridgeon, Cribb y otros (2009), también agrupan a *G. hirtzii*, *G. gratulabunda* y *G. bufonia* e incluyen especies de las cuales no se disponía de material vegetal para este estudio.

En cuanto, a la taxonomía tradicional existe similitud de este grupo con lo planteado por Jenny,(1993) que agrupa a todas estas especies en el subgénero *Gongora* en diferentes secciones. La sección *Grossa* se caracteriza por presentar un hipoquilo plano, con cuernos de longitud distinta a las cerdas del mesoquilo, mientras que en la sección *Gratulabunda* el hipoquilo presenta una base alargada, en forma de S, anclado a la base de la columna (Jenny, 1993). Según la clasificación infragenérica, la sección *Grossa* presenta un labelo con cuernos carnosos que supera a la base, mientras que la sección *Gratulabunda* destaca por un labelo unido a una garra de tipo sigmoidea (Rice, 2003).

En este grupo además se incluyen 15 especies que fueron recolectadas en estado vegetativo; por lo que, no fue posible su identificación, una vez realizado el estudio molecular en función del árbol filogenético se determinó a que especie correspondían si era el caso; mientras que, las especies que no fueron identificadas se las nombro afín a la especie genéticamente más cercana; es así que, en este grupo se logró identificar 2 especies correspondientes a *G. bufonia* y *G. grossa*, mientras que 2 especies se nombraron afín a *G. bufonia*, 3 especies afín a *G. sphaerica*, 5

especies afín a *G. hirtzii*, y 3 especies afín a *G. grossa*. Las especies que conforman el Grupo IV presentan registros en 3 países del sur del continente americano: Colombia, Ecuador y Brasil; la especie *G. grossa* endémica del Ecuador, se distribuye ampliamente en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos, El Oro, Pichincha y Bolívar entre los 100-1200 m.s.n.m., siendo El Oro la provincia dónde más registros se presentan; la especie *G. hirtzii* se encuentra registrada Colombia en el departamento de Antioquia en Colombia y para el Ecuador, en éste último su distribución se restringe a Esmeraldas entre los 675-850 m.s.n.m., las especies *G. sphaerica* y *G. gratulabunda* se distribuyen en Colombia; mientras, que para *G. bufonia* únicamente se presentan registros en Brasil (Dodson et al.,2006; Tropicos, 2019).

A continuación, en las **Figura 15** y **Figura 16** se muestra la distribución geográfica de las especies del género *Gongora* que conforman el grupo IV.

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo IV

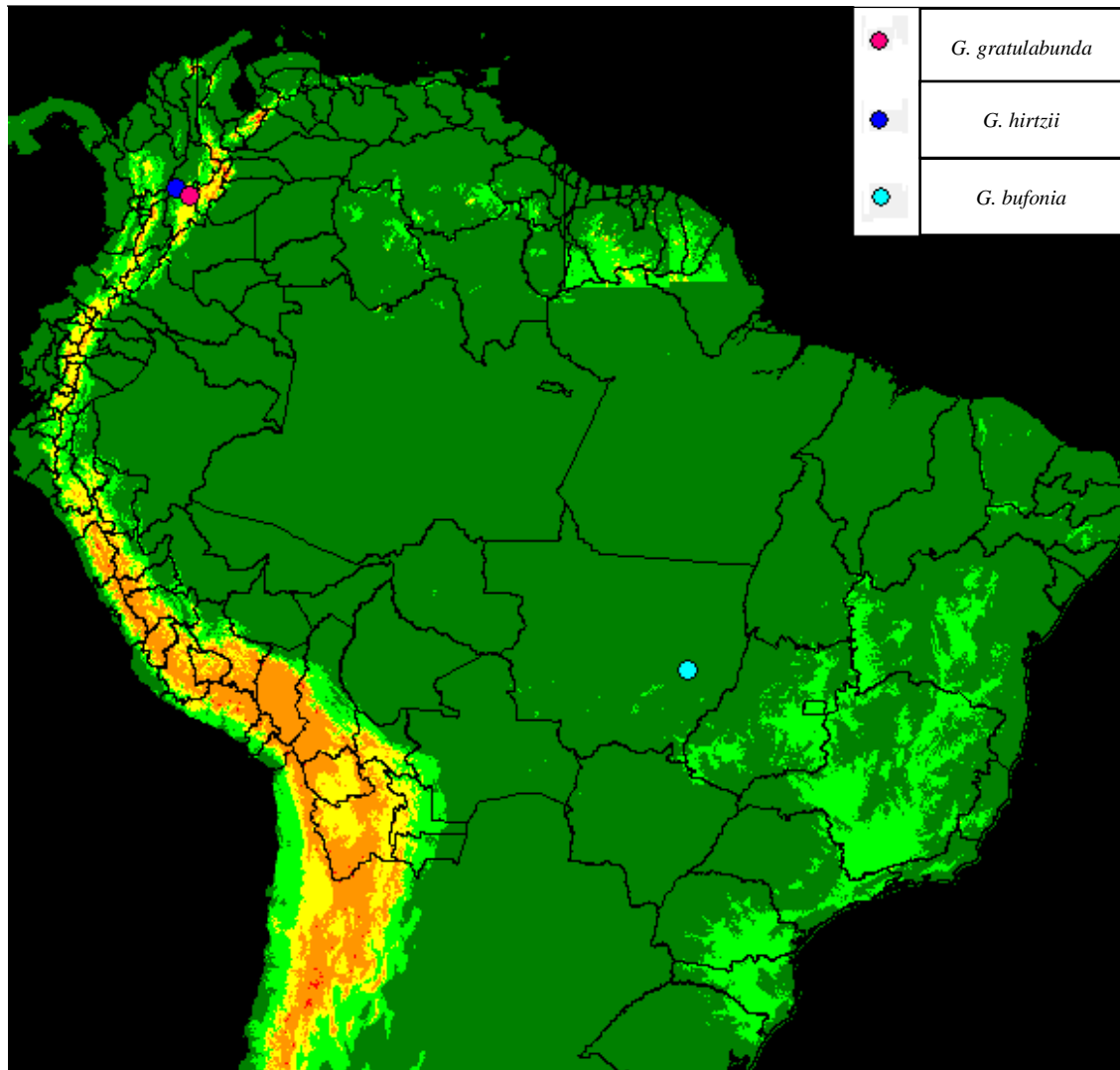


Figura 15. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo IV. Grupo *hirtzii* en América del Sur a excepción de Ecuador.

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. grossa*, *G. hirtzii*, *G. sphaerica*, *G. gratulabunda* y *G. bufonia*.

Fuente: (Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo IV

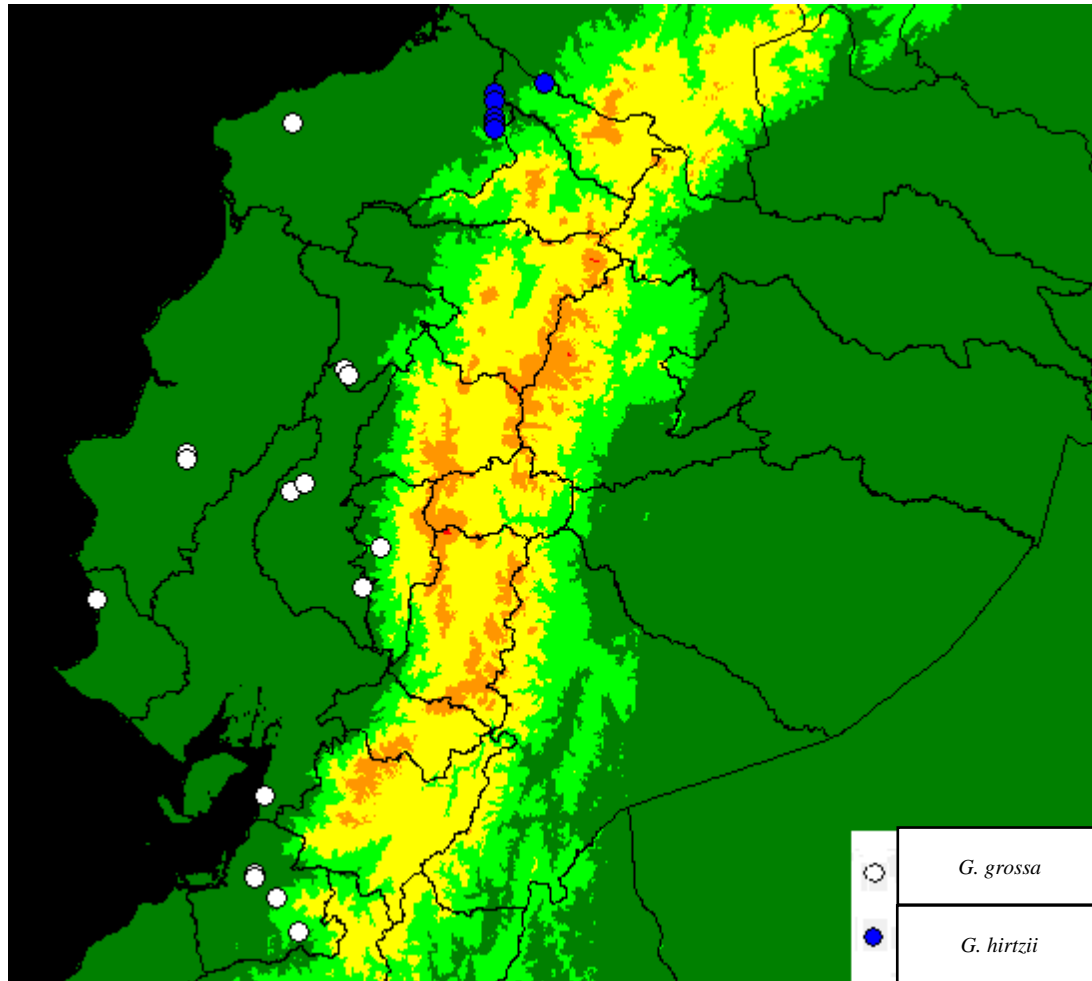


Figura 16. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo IV. Grupo *hirtzii* en Ecuador.

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. grossa*, *G. hirtzii*, *G. sphaerica*, *G. gratulabunda* y *G. bufonia*.

Fuente: (Dodson et al., 2006; Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

GRUPO V. Grupo *Quinquenervis*: se encuentra conformado por *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pav, *Gongora fulva* Lindl., *Gongora flaveola* Rchb.f., *Gongora ionodesme* G. Gerlach, *Gongora gracilis* Jenny, *Gongora superflua* Rchb.f., *Gongora ilense* Whitten & Jenny, *Gongora latisepala* Rolfe, *Gongora atroporpurea* Hook., y *Gongora leucochila* Lem

El nombre de este grupo hace referencia a *G. quinquenervis* que se localiza como la especie más basal y es a partir de la cual se diversificó el resto de las especies.

En cuanto, a *G. quinquenervis*, su clasificación siempre ha sido objeto de controversia (Jenny, 1996; Pupulin, 2012). Esta dificultad se debe a una errónea descripción del espécimen tipo *G. quinquenervis* Ruiz & Pav (Jenny, 1993, 1996; Pupulin, 2012).

Es así, que el nombre *G. quinquenervis* continúa siendo mal aplicado por los botánicos en su intento por describir con exactitud esta especie; Dressler (1982), sugirió que existen al menos una docena de especies erróneamente identificadas dentro del complejo de especies *G. quinquenervis*. Molecularmente existe correspondencia del presente grupo con lo planteado por Pridgeon, Cribb, y otros (2009), cuya filogenia agrupa en la sección *Gongora* del subgénero *Gongora* a *G. quinquenervis*, *G. fulva*, *G. ilense*, *G. latisepala* y *G. leucochila*, incluyendo además a otras especies. En este grupo también se evidencia que no existe diferencia genética entre las especies *G. gracilis* y *G. superflua*, y entre *G. fulva* y *G. flaveola* recolectadas en Ecuagenera; por lo que, se sugiere revisar el material con el fin de ubicar correctamente las especies.

En cuanto, a la taxonomía tradicional se refiere, existe similitud con el trabajo de Jenny (1993), que agrupa a la mayoría de estas especies en la sección *Gongora*; pero no considera dentro de la clasificación taxonómica a *G. flaveola*, *G. ionodesme* y *G. ilense*.

En este grupo además se incluyen 17 especies que fueron recolectadas en estado vegetativo; por lo que, no fue posible su identificación, una vez realizado el estudio molecular en función del árbol filogenético se determinó a que especie correspondían si era el caso; mientras que, las especies que no fueron identificadas se las nombró afín a la especie genéticamente más cercana, es así que en este grupo se logró identificar 3 especies correspondientes a *G. ilense*, *G. superflua* y *G. quinquenervis*; mientras que, 7 especies fueron nombradas afín a *G. atropurpurea*, 2

especies afín a *G. latisepala*, 2 especies afín a *G. gracilis*, 1 especie afín a *G. ionodesme* y 2 especies afín a *G. fulva* (Véase **Anexo 7**).

Si bien, el subgénero *Gongora* se clarifica a partir del Grupo III en el árbol filogenético del presente estudio, es precisamente en el Grupo V en el cual se encuentran especies cuyas morfologías florales presentan rasgos que distinguen a esta sección de otras secciones del subgénero; las inflorescencias presentan eje recto, con pedicelo curvado; flores no resupinadas; sépalos adnatos a una columna prominente, casi del doble de largos que la columna, reflexos; pétalos adnatos a la columna, triangulares o sigmoideos con cerdas en los vértices (Pridgeon et al., 2009).

Evidentemente, la sección *Gongora* constituye el grupo más rico en especies, con al menos 30 reconocidas, pero también resulta el más difícil para delimitar las especies que se encuentran dentro del mismo, incluyendo las del complejo de especies *G. quinquenervis* (Whitten, 1985; Jenny, 1993). La ambigüedad que existe para delimitar las características de esta sección posiblemente se debe a la coexistencia de múltiples poblaciones simpátricas con poca o casi nula variación morfológica que presentan un claro aislamiento reproductivo probablemente debido a su exclusiva polinización por las abejas macho *Euglossa* (Whitten, 1985; Hetherington & Ramírez, 2015).

En cuanto, a la distribución geográfica las especies que conforman el Grupo V presentan una distribución tanto en Centroamérica como en América del Sur; la especie *G. quinquenervis* es la que presenta una distribución más amplia, debido a que se encuentra registrada para México, Belice, Nicaragua, Panamá, Perú y Ecuador, siendo la provincia de Zamora Chinchipe del oriente ecuatoriano la que mayor cantidad de registros presenta, seguido de Napo, Morona Santiago y Los Ríos, con una altura de distribución entre los 220-1200 m.s.n.m (Dodson et al., 2006;

Tropicos, 2019). La especie *G. ionodesme* presenta un solo registro en Zamora Chinchipe-Ecuador, a las orillas del Río Jamboe a los 1500 m.s.n.m (Gerlach, 2009).

La especie *G. gracilis* se distribuye en Cajamarca, Perú a una altura de 1950 m.s.n.m., mientras que en el Ecuador en Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Napo, siendo esta última provincia donde se encuentran la mayoría de registros, su distribución se encuentra entre los 450-1200 m.s.n.m; *G. superflua* se restringe a la región occidental ecuatoriana en El Oro y *G. atropurpurea* presenta un único registro en el Ecuador, en la provincia de Sucumbíos a los 500 m.s.n.m.; sin embargo, también existen registros para Brasil, Colombia, Guyana, Surinam, Panamá, Perú y Venezuela, siendo ésta especie la única del grupo que se diversifica en el parte nororiental de América del Sur (Dodson et al.,2006; Tropicos, 2019).

Por su parte, *G.ilense* se distribuye entre los 220-800 m.s.n.m. de la Región Occidental en las provincias de Manabí, Esmeraldas, Los Ríos y Pichincha, siendo estas tres últimas provincias las que mayor número de especies registradas presentan (Dodson et al., 2006; Tropicos, 2019). Las especies *G. fulva*, *G. latisepala*, *G. leucochila* y *G. flaveola* se distribuyen en Centroamerica, y en el caso, de *G. fulva* hasta el norte de Colombia; mientras que, *G. latisepala* se restringe a América del Sur, en Colombia, Ecuador y Perú en los bosques primarios entre los 700-1400 m.s.n.m (Tropicos, 2019).

A continuación, en las **Figura 17** y **Figura 18** se muestra la distribución geográfica de las especies del género *Gongora* que conforman el grupo V.

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo V

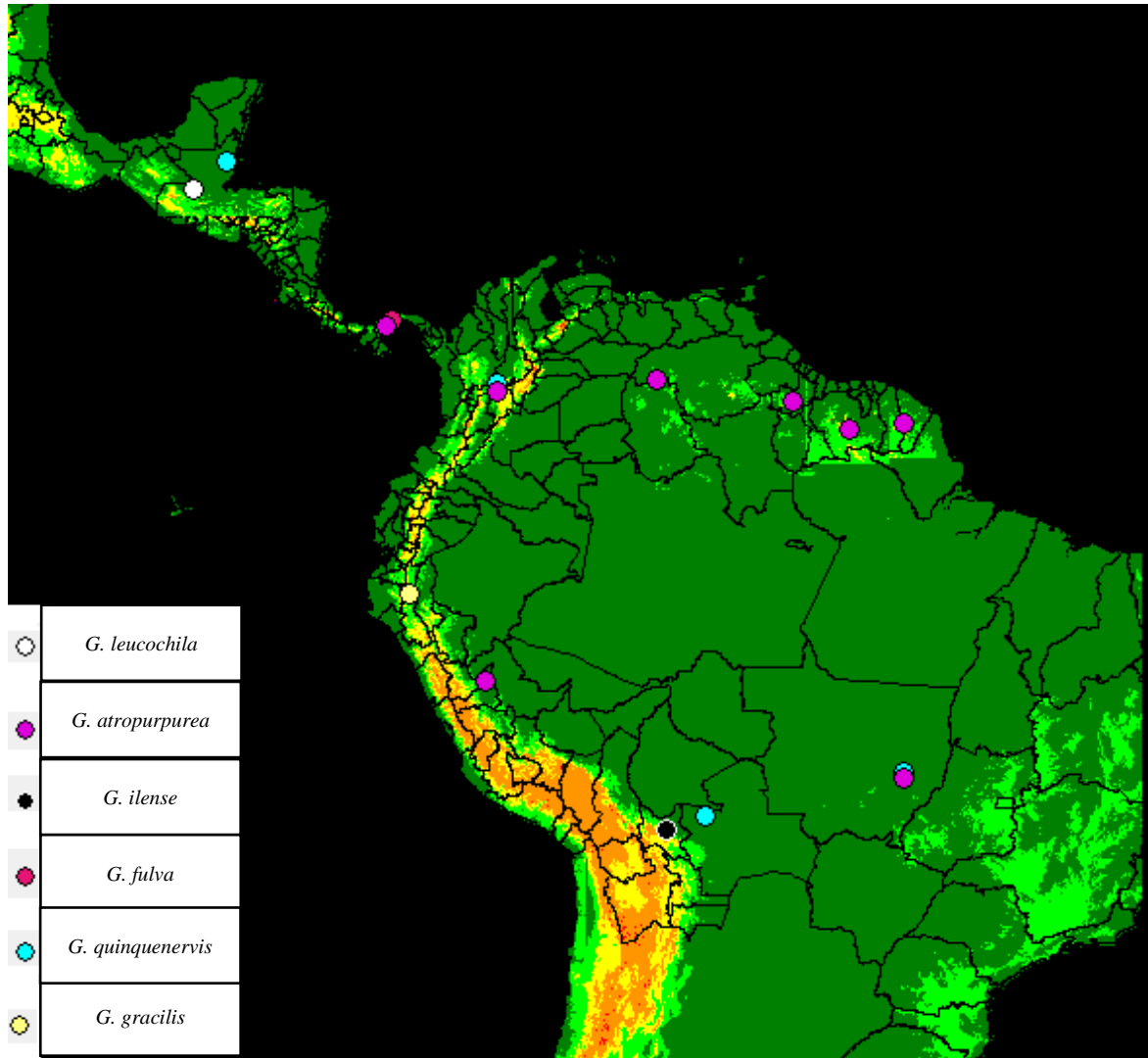


Figura 17. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo V. *Quinquenervis* en América del Sur a excepción del Ecuador.

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. quinquenervis*, *G. fulva*, *G. flaveola*, *G. ionodesme*, *G. gracilis*, *G. superflua*, *G. ilense*, *G. latisepala*, *G. atropurpurea*, y *G. leucochila*.

Fuente: (Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).

Ubicación geográfica del género *Gongora* Grupo V

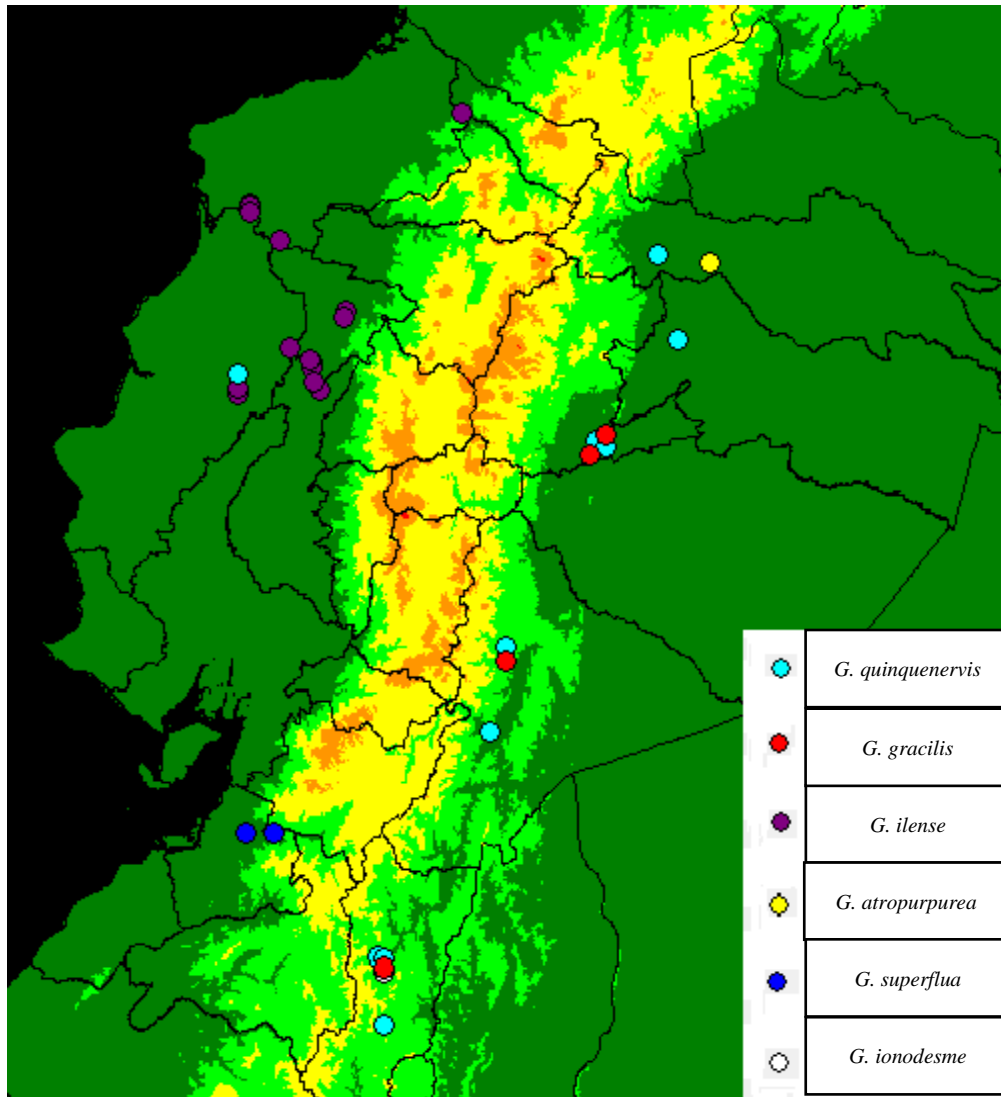
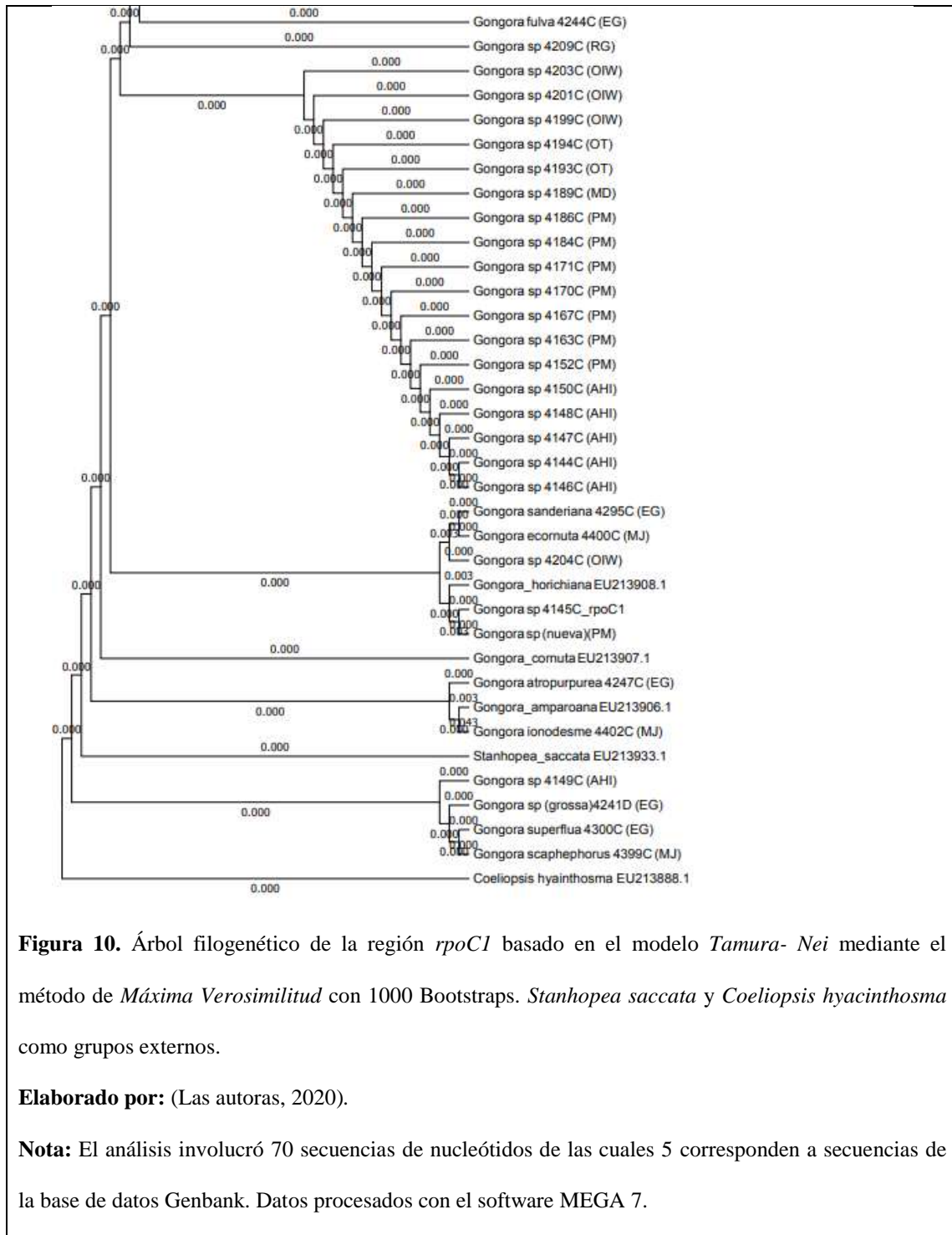


Figura 18. Distribución geográfica del género *Gongora* Grupo V. Quinquenervis en el Ecuador.

Nota: Este grupo incluye a las especies: *G. quinquenervis*, *G. fulva*, *G. flaveola*, *G. ionodesme*, *G. gracilis*, *G. superflua*, *G. ilense*, *G. latisepala*, *G. atropurpurea*, y *G. leucochila*.

Fuente: (Dodson et al., 2006; Tropicos, 2019).

Elaborado por: (Las autoras, 2020). Datos procesados con el software DIVA GIS (2020).



El árbol filogenético del género *Gongora* con la región cloroplástica *rpoC1* se realizó con las mismas muestras para la región *matK* y se incluyeron 5 secuencias el GenBank, 2 de ellas correspondían a los grupos externos *Coeliopsis hyacinthosma* y *Stanhopea saccata*.

Los resultados de la filogenia molecular demostraron que el marcador molecular *rpoCl* no presenta variación suficiente como para una diferenciación entre especies; por lo que, no constituye una herramienta molecular que permita discriminar la clasificación subgenérica de *Gongora*, estos resultados son similares a los obtenidos por Parveen y otros (2017); Rivera y otros (2017) e Iza (2018); en cuyos árboles filogenéticos para diferentes especies de orquídeas, el marcador *rpoCl* no presentó mayor discriminación subgenérica.

Conclusiones

Se colectaron 51 muestras de tejido vegetal pertenecientes a alrededor de 20 especies del género *Gongora*; a partir, de las cuales se obtuvo un banco de ADN que contiene al menos el 70 % del total de las especies aceptadas en la base de datos “The Plant List”.

Se amplificó a través de la técnica de PCR convencional la región cloroplástica *matK* para la totalidad de las muestras, mientras que la región *rpoCl* no fue posible amplificarla para *G. sanderiana*. Según los árboles filogenéticos obtenidos, únicamente la región *matK* permitió obtener una clasificación subgenérica para *Gongora*.

El árbol filogenético obtenido se encuentra conformado por 5 grupos más 1 grupo externo y es congruente con la clasificación subgenérica: *Gongora*, *Acropera* y *Portentosa* para el género, propuesta en estudios moleculares previos y la clasificación taxonómica de Jenny (1993). El árbol filogenético también presenta a *Acropera* y *Portentosa* como subgéneros hermanos y basales a partir de los cuales, se diversificaron el resto de las especies de *Gongora*. Se evidencia también 27 especies no identificadas que fueron nombradas afín a la especie genéticamente más cercana, mismas que, podrían constituir nuevos registros.

El análisis biogeográfico muestra una amplia distribución del género desde México hasta Bolivia y Brasil en América del Sur; mientras que en el Ecuador, las provincias de Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Esmeraldas, El Oro y Los Ríos son las que presentan una mayor densidad poblacional de especies. En el Ecuador además se evidencia una distribución de biodiversidad de *Gongora* bastante definida, con especies que únicamente se restringen a las estribaciones orientales u occidentales, exceptuando *G. quinquenervis* que ha sido registrada en las estribaciones orientales y occidentales.

Recomendaciones

Trabajar con secuencias que presenten una calidad ≥ 80 % para la elaboración de árboles filogenéticos; con el fin de asegurar resultados fidedignos, así mismo, emplear programas bioinformáticos y bases de datos robustas que permitan la administración de grandes cantidades de información, con el fin de facilitar la obtención y evaluación de resultados.

Evaluar a los marcadores moleculares: *matK-ycf1*+espaciador intergénico (*trnL-F*, *atpB-rbcL* o *psbA-trnH*), en futuros estudios como posibles regiones ADN *Barcoding* altamente discriminantes que, permitan resolver las relaciones filogenéticas a nivel de secciones para el género *Gongora*, siempre y cuando se trabaje con la totalidad de especies del género.

Realizar un seguimiento a las especies de los grupos IV y V del presente estudio, que han sido nombradas afín a la especie más cercana y aquellas que no presentan diferencia entre sus secuencias, puesto que pueden tratarse de nuevos registros de *Gongora* para el Ecuador o a su vez encontrarse erróneamente identificadas.

Complementar la información molecular con estudios de taxonomía tradicional y estudios de ecofisiología del entorno de las especies de estudio, de tal manera que, sea posible comprender de mejor manera la dinámica de los hábitats de *Gongora*.

Bibliografía

- Agrocalidad, (2015). Instructivo para toma de muestras para el Laboratorio de Biología Molecular. Retrieved from Instructivo de toma de muestra para le laboratorio de biología molecular- diagnóstico vegetal. website:
http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/INT_BM_27.pdf
- Albán, J., & Toapanta, C. (2019). *Identificación molecular del género Caucaea (Orchidaceae) mediante el sistema Barcode y análisis químico de los aromas florales*. 27–29. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16979/1/UPS-QT13816.pdf>
- Altamirano-Benavides, M., & Yáñez, P. (2016). El código de barras de ADN (Barcoding): Una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en el Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 23(1), 5–13.
<https://doi.org/10.17163/lgr.n23.2016.01>
- Alvarado, R. (1990). Sistemática, Taxonomía, nomenclatura: Nuevos avances en esos campos del saber. *Trazos*, 7, 5–39.
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Revisión bibliográfica: Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico 1. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242.
- Barthet, M., & Hilu, K. (2007). Expression of *matK*: Functional and evolutionary implications. *American Journal of Botany*, 94(8), 1402–1412. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.8.1402>
- Batista, J., Mota, A. C. M., Proite, K., Bianchetti, L. de B., Romero-González, G., Espinoza, H., & Salazar, G. (2014). Molecular phylogenetics of Neotropical *Cyanaeorchis* (Cymbidieae, Epidendroideae, Orchidaceae): Geographical rather than morphological similarities plus a new specie. *Phytotaxa*, 156(5), 251–272. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.156.5.1>
- Benitez, O. (2004). *Contribución al estudio de la filogenia molecular de los peces de la familia gerreidae en México* (Instituto Politécnico Nacional).

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00465.2016>

Carrión, M. (2009). *Identificación de orquídeas epífitas del Ecuador mediante DNA Barcoding*. Quito.

Cascante, A. (2008). Guía para la recolecta y preparación de muestras botánicas. In *Museo Nacional de Costa Rica*. Retrieved from

<http://www.museocostarica.go.cr/herbario/pdf/Guia-para-recolectar.pdf>

Castellanos-Castro, C., & Torres-Morales, G. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible*. Bogotá D.C.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Pontificia Universidad Javeriana, Jardín Botánico de Bogotá “José Celestino Mutis”, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Gobernación de Cundinamarca.

Cerna, M., & Miño, J. (2018). Identificación molecular del género *Passiflora* (*Passifloraceae*), en la región norte del Ecuador mediante el método DNA Barcoding. *Bionatura*, 1(1).

Chase, M., Cowan, R., Hollingsworth, P., Petersen, G., Madriñán, S., Seberg, O., ... Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295–299. <https://doi.org/10.1002/tax.562004> · Source: OAI

Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217.

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>

Dodson, C., Luer, C., & Romero, G. (2006). *Orchids of Ecuador*.

Downie, S. R., Katz-Downie, D. S., Rogers, E. J., Zujewski, H. L., & Small, E. (1998). Multiple independent losses of the plastid *rpoC1* intron in *Medicago* (*Fabaceae*) as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences.

Canadian Journal of Botany, 76(5), 791–803. <https://doi.org/10.1139/cjb-76-5-791>

- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 11–15.
- Dressler, R. (1982). Biology of the orchid bees (*Euglossini*). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 373–394.
- Ecuagenera. (n.d.). *Manual de Cultivo de Orquídeas*.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Nuñez-Farfán, J. (1997). El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. *Botanical Sciences*, 181(60), 169.
<https://doi.org/10.17129/botsci.1528>
- Endara, L., León-Yáñez, S., & Norris, W. (2008). Panorama de conservación de orquídeas en la región andina: El caso de estudio de las orquídeas de Ecuador. Presentado en Plano de Ação para orquídeas amenazadas no Brasil. *Jardín Botánico de Río de Janeiro, Brasil*.
- Fernández-Fernández, D., Tobar-Suárez, F., Garzón-Santomao, C., Yáñez-Muñoz, M., Mena-Jaén, J., & González-Romero, D. (2018). Orquídeas y Bromelias de la provincia de El Oro: Una guía de identificación para los principales géneros y especies del páramo al manglar. In *Prefectura de El Oro* (9th ed., Vol. 67). Quito: GADPE - INABIO.
- Fuertes-Flores, B., Mallitasig-Quishpe, D., Cerna-Cevallos, M., & Gutierrez, S. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (*Orchidaceae*). *Bionatura*, 1(1).
- Gerlach, G. (2009). *Gongora ionodesme*. *Orchideen Journal*, 77–84.
- Gerlach, G. (2019). "De toboganes y subibajas: algo sobre la biología de la polinización en el género *Gongora*" presentada en la VI Conferencia Científica de Orquídeas Andinas. Medellín.
- Ginibun, F., Saad, M., Hong, T., Othman, R., Khalid, N., & Bhassu, S. (2010). Chloroplast DNA barcoding of spathoglottis species for genetic conservation. *Acta Horticulturae*, 878, 453–

460. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.878.58>

- Grajales-Conesa, J., Meléndez-Ramírez, V., & Cruz-López, L. (2011). Floral scents and their interaction with insect pollinators. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), 1356–1367.
- Hermano Daniel. (1959). Anatomía de las orquídeas y su clasificación. *Revista Universidad Pontificia Bolivariana*, 23(84), 312–335.
- Hetherington-Rauth, M., & Ramírez, S. (2016). Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany*, 118(1), 135–148. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw072>
- Hetherington, R., & Ramírez, S. (2015). Evolutionary Trends and Specialization in the *Euglossine* Bee-pollinated Orchid Genus *Gongora*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 100(4), 271–299. <https://doi.org/10.3417/2014035>.
- Iza, M. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula, mediante el sistema BARCODE*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Jenny, R. (1993). *Monograph of the Genus Gongora Ruiz & Pavón* (Koeltz Scientific Books (USA), Ed.). Illinois.
- Jenny, R. (1996). The genus *Gongora*. *Orchids*, 1164–1169.
- Jørgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador* (C. Dodson, Ed.). Retrieved from <http://www.mobot.org/MOBOT/research/ecuador/formatsp.shtml>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. In *Oxford University Press* (Vol. 34). <https://doi.org/10.2166/nh.2003.0008>
- León, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Quito.

- Lorenz, T. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 1–14.
- Macrogen. (2018). Guide for sample preparation. Retrieved from Sample Preparation Guide website: https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_prep.jsp
- Marín, C., & Céspedes, C. (2007). Sistema de Información Científica y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 327–351.
- Ministerio de Turismo. (2013). *Ecuador declarado “País de las Orquídeas.”* Retrieved from <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-declarado-pais-de-las-orquideas/>
- Miño, J. (2018). Identificación molecular del género *Passiflora* (*Passifloraceae*) de la región norte del Ecuador por medio del método DNA Barcoding. *Universidad Politécnica Salesiana*, 1–100. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Montalvo, M., & Vargas, L. (2019). Revisión de las Especies Latinoamericanas de Orquídeas del Género *Dracula* mediante la técnica Barcode (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Morales, C. (2005). Sobre un Opus magnum de la orquideología neotropical. *Lankesteriana*, 5(1), 85.
- Newmark, W. (2002). *Conservation Biodiversity in East African Forest: a study of the Eastern Arc Mountains*. Utah Museum of Natural History. Salt Lake City: University of Utah.
- Novoa, P., Espejo, J., Cisternas, M., Domínguez, E., & Rubio, M. (2006). *Guía de Campo de las Orquídeas Chilenas* (2nd ed.). Santiago de Chile: CORMA.
- Pantaleón, X. (2011). *Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas Prothechea varicosa y Prothechea karwinskii para la identificación de compuestos volátiles*. Instituto Politécnico Nacional.

- Parveen, I., Singh, H., Malik, S., Raghuvanshi, S., & Babbar, S. (2017). Evaluating five different Loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK* and *ITS*) for DNA Barcoding of Indian Orchids. *Genome*, *60*, 1–27. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0215>
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, *18*(2), 265–267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>
- Pfahl, J. (2020). Internet orchid species photo encyclopedia. Retrieved from <http://www.orchidspecies.com/index.htm>
- Porebski, S., Bailey, G., & Baum, B. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Pridgeon, A., Cribb, P., & Chase, M. (2009). *Genera orchidacearum*. New York: Oxford University Press.
- Pupulin, F. (2012). The *Orchidaceae* of Ruiz & Pavon's "Flora Peruviana et Chilensis". A taxonomic study. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, *69*(1), 21–79.
- Rice, R. (2003). *Gongorana: infrageneric review of the genus Gongora (Orchidaceae)*. (O. Journal, Ed.).
- Ríos, E., Mejía-Ruiz, H., & Álvarez-Castañeda, S. (2009). Marcadores moleculares: una Revolución en la Zoología. *Ciencia*, 5–13. Retrieved from https://www.dartmouth.edu/~chemlab/techniques/vol_flasks.html
- Rivas, P., & Salazar, P. (2017). *Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el ishpingo (O. quixos) provenientes de 5 provincias de la amazonía ecuatoriana*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Rivera, H., Rossini, B., Tambarussi, E., Veasey, E., Ibanes, B., & Marino, C. (2017). DNA barcode regions for differentiating *Cattleya walkeriana* and *C. loddigesii*. *Acta Scientiarum*

- *Biological Sciences*, 39(1), 45–52. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v39i1.33024>
- Selvaraj, D., Sarma, R., & Sathishkumar, R. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from *Zingiberaceae* for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3(1), 24–28.
- The Plant List. (2018). Retrieved December 9, 2019, from *Gongora*. The Plant List website: <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/kew-91594>
- Thermo Fisher Scientific. (2012). Phire Plant Direct PCR Master Mix: user guide. Retrieved from Thermo Scientific O'GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use website: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013076_OGeneRuler_Express_DNALadder_RTU_UG.pdf
- Thermo Fisher Scientific. (2018). Phire Plant Direct PCR Master Mix: user guide. Retrieved from Phire Plant Direct PCR Master Mix website: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F160S>
- Tropicos, (2019). Género *Gongora*. Retrieved from <https://www.tropicos.org/Home.aspx>
- Whitten, M., Neubig, K., & Williams, N. (2014). Generic and subtribal relationships in neotropical cymbidieae (orchidaceae) based on *matk/ycf1* plastid data. *Lankesteriana*, 13(3), 375–392. <https://doi.org/10.15517/lank.v13i3.14425>
- Whitten, M., Williams, N., & Chase, M. (2000). Subtribal and Generic Relationships of *Maxillarieae* (*Orchidaceae*) with Emphasis on *Stanhopeinae*: Combined Molecular Evidence. *American Journal of Botany*, 87(12), 1842–1856. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2656837>
- Whitten, W. (1985). *Variation in Floral Fragrances and Pollinators in the Gongora quinquenervis Complex (Orchidaceae) in Central Panama*. University of Florida, Gainesville.

Anexos

Anexo 1. Monografía del género *Gongora*

Taxonomy of the genus *Gongora*:

The existing division by PFITZER (1888) into the section *Gongora* and the section *Acropora* is no longer satisfactory according to today's level of knowledge. The section *Acropora* was created by PFITZER (1888) from the genus *Acropora* originally described by LINDLEY (1833).

The section *Gongora* (then still *Eugongora*) was also created by PFITZER (1888) and contained all species whose petals are united to the column for half their length while those whose petals grow together with the column at the base only belonged to the section *Acropora*. This division does not take into account the species around *Gongora portentosa* Linden & Rehb.f., although these particular species form a well-separated group in their own right.

The following new divisions of the genus are more suited to our current knowledge of the genus:

Genus *Gongora* Ruiz & Pavon

Subgenus *Gongora*

Section *Gongora*

<i>Gongora quinquenervis</i>	Ruiz & Pavon
<i>Gongora aceras</i>	Dressler
<i>Gongora aromatica</i>	Rehb.f.
<i>Gongora bufonia</i>	Lindley
<i>Gongora claviodora</i>	Dressler
<i>Gongora fulva</i>	Lindley
<i>Gongora galeottiana</i>	Rich. & Gal.
<i>Gongora gibba</i>	Dressler
<i>Gongora gracilis</i>	Jenny
<i>Gongora histrionica</i>	Rehb.f.
<i>Gongora irmgardiae</i>	Jenny
<i>Gongora latibasis</i>	(C. Schweinfurth & Allen) Jenny
<i>Gongora latispala</i>	Rolfe
<i>Gongora leucochila</i>	Lemaire
<i>Gongora maculata</i>	Lindley
<i>Gongora maculata</i> var. <i>lactea</i>	Teuscher
<i>Gongora minax</i>	Rehb.f.
<i>Gongora napoensis</i>	Jenny
<i>Gongora nigrita</i>	Lindley
<i>Gongora odoratissima</i>	Lemaire
<i>Gongora pardina</i>	Jenny
<i>Gongora pleiochroma</i>	Rehb.f.
<i>Gongora powellii</i>	Schlechter
<i>Gongora retrorsa</i>	Rehb.f.
<i>Gongora rufescens</i>	Jenny
<i>Gongora superflua</i>	Rehb.f.
<i>Gongora unicolor</i>	Schlechter
Section <i>Gratulabunda</i>	Jenny
<i>Gongora gratulabunda</i>	Rehb.f.
<i>Gongora flarveola</i>	Rehb.f.
<i>Gongora similis</i>	Rehb.f.
Section <i>Grossa</i>	Jenny
<i>Gongora grossa</i>	Rehb.f.
<i>Gongora atropurpurea</i>	Hooker
<i>Gongora hirtzii</i>	Dodson, Williams & Whitsen
<i>Gongora nigropunctata</i>	Schlechter
Section <i>Truncata</i>	Jenny
<i>Gongora truncata</i>	Lindley
<i>Gongora beyrodtiana</i>	Schlechter
<i>Gongora charontis</i>	Rehb.f.

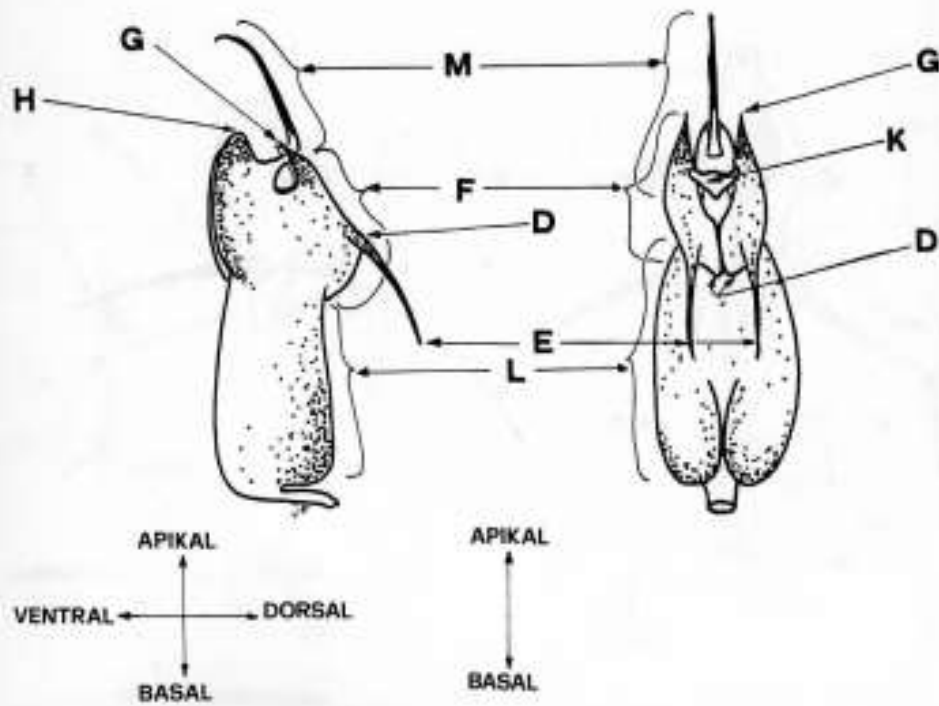


Fig. 5: Labellum of a member of the subgenus *Portentosa* with the recognized terminology.

D: tip of hypochile; E: bristle; F: mesochile; G: tip of mesochile; H: hump; K: callus; L: hypochile; M: epichile

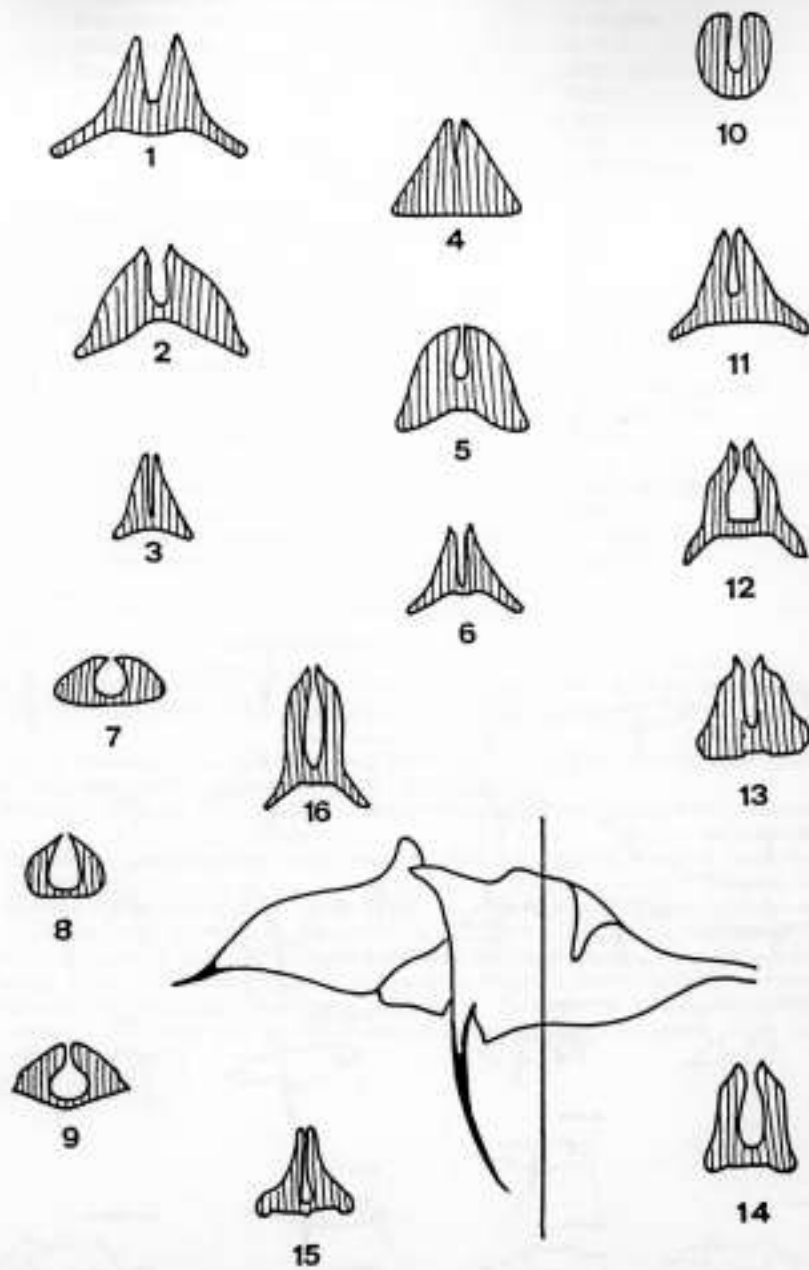


Fig. 6: Cross-sections of labella subgenus *Gongora*

1 *Gongora rufescens*, 2 *Gongora pardina*, 3 *Gongora gracilis*, 4 *Gongora aromatica*, 5 *Gongora tulva*, 6 *Gongora odoratissima*, 7 *Gongora grossa*, 8 *Gongora nigripunctata*, 9 *Gongora atropurpurea*, 10 *Gongora napoensis*, 11 *Gongora claviodora*, 12 *Gongora unicolor*, 13 *Gongora byfonia*, 14 *Gongora gibba*, 15 *Gongora galeottiana*, 16 *Gongora maculata*

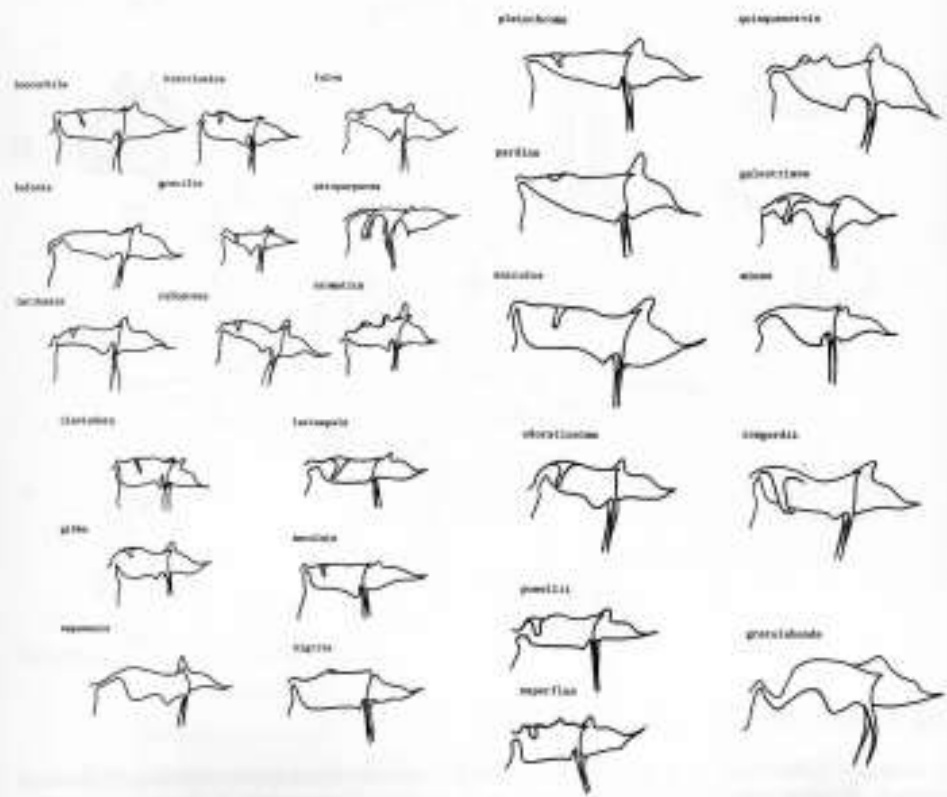


Fig. 7: *Labelia* of subgenus *Gongora* (not with exact measurements).

<i>Gongora dressleri</i>	Jenny
<i>Gongora longipes</i>	Schlechter
<i>Gongora saccata</i>	Rchb.f.
<i>Gongora scaphophorus</i>	Rchb.f. & Warsc.
<i>Gongora seideliana</i>	Rchb.f.
<i>Gongora sphaerica</i>	Jenny
<i>Gongora tracyana</i>	Rolle
Subgenus <i>Acropera</i>	(Pfitzer) Jenny
Section <i>Acropera</i>	
<i>Gongora galeata</i> (Lindley)	Rchb.f.
Section <i>Cassidea</i>	Jenny
<i>Gongora cassidea</i>	Rchb.f.
<i>Gongora amparoana</i>	Schlechter
Section <i>Armeniaca</i>	Jenny
<i>Gongora armeniaca</i>	(Lindley) Rchb.f.
<i>Gongora armeniaca</i> var. <i>bicornuta</i>	
<i>Gongora cornuta</i>	Schweinfurth & Allen
<i>Gongora horichiana</i>	(Klotzsch) Fowle
Subgenus <i>Portentosa</i>	Fowle
<i>Gongora portentosa</i>	Jenny
<i>Gongora ecornuta</i>	Linden & Rchb.f.
<i>Gongora portentosa</i> var. <i>rosea</i>	Jenny
<i>Gongora sanderiana</i>	Cogniaux
	Kränzlin

Key to the Subgenera of the Genus *Gongora*

A key is given here for the three subgenera of the genus *Gongora*. The key for the sections and species can always be found directly after the description of the relevant subgenus or section.

1. Labellum tripartite, comprising a distinct, clearly separate hypochile, mesochile and epichile, the mesochile always with two more or less long, extending bristles **2**
1. Labellum bipartite, comprising a distinct hypochile and epichile, mesochile and bristles absent **Subgenus *Acropera***
2. Epichile with a distinct hump when seen from above and a pointed triangular shape when seen from the side **Subgenus *Gongora***
2. Epichile with an indistinct and narrow hump seen from above and S-shaped, with an upwardly pointed tip, when seen from the side **Subgenus *Portentosa***

A further characteristic feature is the plant's habit. Such features are partly affected by the culture and not always of use. It is noticeable that all species of the subgenus *Portentosa* (with the exception of *Gongora ecornuta* Jenny) have single-leaved pseudobulbs. The species of the subgenus *Acropera* also have angled inflorescence axils between flowers, a feature missing in all species of the subgenera *Portentosa* and *Gongora*.

Anexo 1. Morfología y clasificación del género *Gongora* y sus diferentes subgéneros.

Fuente: (Jenny, 1993)

Anexo 2. Ubicación geográfica de las especies del género *Gongora*

Grupos	Especie	N.	Latitud	Longitud	Hábitat
I	<i>Gongora escobariana</i> Whitten	1	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		2	-3,454972	-78,547667	Ecuador: Morona Santiago.
	<i>Gongora ecornuta</i> Jenny	3	-1,410889	-78,193500	Ecuador: Tungurahua.
		4	-0,694389	-77,730500	Ecuador: Napo.
		5	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe.
		6	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
		7	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
	<i>Gongora portentosa</i> Rchb,f,	8	--	--	Ecuador.
		9	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
II	<i>Gongora cassidea</i> Rchb,f,	10	17,18333	-88,500000	Belice: Sibun Forest Reserve.
		11	--	--	Costa Rica.
		12	--	--	El Salvador.
		13	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
		14	15,225000	-86,258333	Honduras: Gualaco.
		15	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
	<i>Gongora horichiana</i> Fowlie	16	12,825000	-85,366667	Nicaragua: Matagalpa.
		17	10,160000	-84,500000	Costa Rica: Provincia de Alajuela.
	<i>Gongora amparoana</i> Schltr,	18	8,4416670	-80,108333	Panamá: Rio Hato.
		19	--	--	Costa Rica.
	<i>Gongora armeniaca</i> (Lindl, & Paxton) Rchb,f,	20	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
		21	--	--	Costa Rica.
		22	12,825000	-85,366667	Nicaragua: Matagalpa.
	<i>Gongora galeata</i> (Lindl, ex G, Lodd,) Rchb,f,	23	8,441667	-80,108333	Panamá: Rio Hato.
		24	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
	<i>Gongora seideliana</i> Rchb,f,	25	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
26		5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.	
III	<i>Gongora scaphephorus</i> Rchb,f, & Warsz,	27	-16,383333	-63,458333	Bolivia: El Puente.
		28	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		29	-3,433333	-78,516667	Ecuador: Morona Santiago.

		30	-2,455861	-78,175194	Ecuador: Morona Santiago.
		31	-3,439250	-78,591750	Ecuador: Morona Santiago.
		32	-1,650722	-77,921083	Ecuador: Pastaza.
		33	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
	<i>Gongora sanderiana</i> Kraenzl	34	-1,689667	-77,970194	Ecuador: Morona Santiago y Tungurahua.
		35	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
	<i>Gongora rufescens</i> Jenny	36	-16,383333	-63,458333	Bolivia: El Puente.
		37	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		38	-3,440111	-78,592194	Ecuador: Morona Santiago Zamora Chinchipe.
		39	-10,581667	-75,407222	Perú: Oxapampa.
	<i>Gongora pardina</i> Jenny	40	-2,683139	-78,317194	Ecuador: Morona Santiago.
		41	-3,645500	-78,573833	Ecuador: Morona Santiago - El Panguí 1300m.
		42	-3,283222	-78,281389	Ecuador: Morona Santiago - Cordillera del Condor, 1200m.
		43	-2,722972	-78,317194	Ecuador: Morona Santiago - Méndez 550m.
		44	-1,042833	-77,707361	Ecuador: Morona Santiago – Misahuallí Km 13, 450m.
		45	-1,066611	-77,618361	Ecuador: Napo - Jatun Sacha cerca de Misahualli, 450m.
		46	-1,043278	-77,709944	Ecuador: Napo - Río Napo.
		47	-1,042194	-77,710861	Ecuador: Napo - Pto. Napo 450m.
	<i>Gongora pleiochroma</i> Rchb,f,	48	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
		49	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		50	-1,033556	-77,731444	Ecuador: Napo - Pto, Napo a Misahualli, Km 13, 450m.
		51	-2,731583	-78,309861	Ecuador: Morona Santiago - Méndez, 550 m.
		52	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe - Zamora a lo largo del Río Jamboe.
		53	3,916667	-53,083333	Guyana Francesa: Saint-Elie.
		54	4,908333	-58,916667	Guyana: Potaro-Siparuni.
		55	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.

		56	3,891667	-55,916667	Surinam: Boven Saramacca.		
		57	6,583333	-66,583333	Venezuela: Bolivar.		
		58	9.162500	-79.841667	Panamá: Isla Barro Colorado.		
IV	<i>Gongora grossa</i> Rchb, f,	59	0,785000	-79,653056	Ecuador: Esmeraldas.		
		60	-1,06561	-80,239583	Ecuador: Manabí - Pto, viejo a Quevedo, 20 Km San Placido, 400m..		
		61	-1,066056	-80,241028	Ecuador: Manabí - Pto, Viejo, 180m.		
		62	-1,841667	-80,738889	Ecuador: Guayas – Manglar alto, 100m.		
		63	-2,916667	-79,816667	Ecuador: Guayas - Balao, 200m.		
		64	-1,241417	-79,668306	Ecuador: Los Ríos - Jauneche, 70m.		
		65	-1,772083	-79,270167	Ecuador: Los Ríos - Babahoyo a Guaranda, Montalvo, 500m.		
		66	-1,197083	-79,594278	Ecuador: Los Ríos – bosque de Jauneche, Km 70 Quevedo a Palenque, vía Mocachi.		
		67	-3,664833	-79,624528	Ecuador: El Oro - Malva, 8 Km Zaruma, 1200m.		
		68	-3,370306	-79,863444	Ecuador: El Oro - Buena Vista, Cerros de la Merced		
		69	-3,480000	-79,750000	Ecuador: El Oro - Hcda Daucay, 400m		
		70	-3,370278	-79,863639	Ecuador: El Oro - Buena Vista a Paccha.		
		71	-0,566500	-79,371889	Ecuador: Pichincha - Centinela, 650m.		
		72	-0,599833	-79,349944	Pichincha: Patricia Pilar en el puente sobre el Río Bimbe, 170m.		
		73	-1,772917	-79,174056	Ecuador: Babahoyo a Guaranda, Balzapamba, 730m.		
			<i>Gongora hirtzii</i> Dodson & N.H. Williams	74	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		75		1,100000	-78,266667	Ecuador: Carchi, San Marcos de los Coaiqueres a Gualpi Bajo, 800m.	
		76		0,902861	-78,545722	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 11-15, 800m.	
77	0,903444	-78,545722		Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 12, 750m.			
78	0,902861	-78,545722		Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km			

					11, 675m.
		79	0,903250	-78,545778	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 10, 700m.
		80	0,903694	-78,546028	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 17, 850m.
	<i>Gongora sphaerica</i> Jenny	81	--	--	-----
	<i>Gongora gratulabunda</i> Rchb, f,	82	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
	<i>Gongora bufonia</i> Lindl,	83	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
V	<i>Gongora quinquenervis</i> Ruiz & Pav,	84	17,183333	-88,500000	Belice: Sibun Forest Reserve.
		85	-16,383333	-63,458333	Bolivia: El Puente.
		86	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
		87	--	--	Caribe: Trinidad y Tobago.
		88	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		89	--	--	Costa Rica.
		90	-0,737500	-79,800167	Ecuador: Los Ríos - Río Palenque Science Center, 220m.
		91	0,050667	-77,304667	Ecuador: Napo - Lumbaquí, camino de Baeza a Lago Agrio, 800m.
		91	-1,035972	-77,675222	Ecuador: Napo cerca de Misahualli.
		92	-1,066611	-77,618361	Ecuador: Napo - Jatun Sacha, 450m.
		93	-2,732361	-78,309000	Ecuador: Morona Santiago - Méndez a Morona, Km 54, 1100m.
		94	-2,248694	-78,211667	Ecuador: Morona Santiago - Macas a Guamote, 1200m.
		95	-4,067722	-78,932111	Ecuador: Zamora Chinchipe cerca de Zamora, 1000m.
		96	-0,454000	-77,182278	Ecuador: Zamora Chinchipe, Río Payamino
		97	-4,057833	-78,970722	Ecuador: Zamora Chinchipe, Loja a Zamora, Zamora, 1000m
98	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe: Cordillera del Cóndor, a lo largo del Río Jamboe Km 11, 1200m.		

		99	-4,067167	-78,931889	Ecuador: Zamora Chinchipe: Río Jamboe, Km 6,6 del puente 1200m.
		100	--	--	El Salvador.
		101	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
		102	15,225000	-86,258333	Honduras: Gualaco.
		103	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
		104	12,825000	-85,366667	Nicaragua: Matagalpa.
		105	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
		106	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
		107	6,583333	-66,583333	Venezuela: Bolivar.
	<i>Gongora fulva</i> Lindl,	108	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		109	--	--	Costa Rica.
		110	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
	<i>Gongora flaveola</i> Rchb, f,	111	--	--	--
	<i>Gongora ionodesme</i> G, Gerlach	112	-4,133500	-78,940500	Ecuador: Zamora Chinchipe - La Pituca en el Río Jamboe cerca de Zamora, Km 12,2.
	<i>Gongora gracilis</i> Jenny	113	-1,066611	-77,618361	Ecuador: Napo - Jatun Sacha, 450m.
		114	-1,042194	-77,710861	Ecuador: Napo – Pto. Napo a Puyo, Km 25, 400m.
		115	-2,248694	-78,211667	Ecuador: Morona Santiago - Macas hacia Guamote, 1200m, 9 de octubre Alshi.
		116	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe - Zamora, 1200m.
		117	-4,989722	-78,903889	Perú: San José de Lourdes.
	<i>Gongora superflua</i> Rchb, f,	118	-3,324444	-79,761222	Ecuador: El Oro: Pasaje a Cuenca, Km 25, 340m.
		119	-3,323972	-79,583889	Ecuador: El Oro Uzchurrumi a Chilla, Km 14, 490m.
	<i>Gongora ilense</i> Whitten & Jenny	120	-17,079167	-65,463333	Bolivia: Shinahota.
		121	0,351194	-79,733417	Ecuador: Esmeraldas - Quinindé 400 - 600m.
		122	0,136333	-79,556139	Ecuador: Esmeraldas - La Unión.
		123	0,874389	-78,467917	Ecuador: Esmeraldas: Lita hacia San Lorenzo,

				Km 12, 800m.	
	124	0,340750	-79,728833	Esmeraldas: Estación Biológica Bilsa.	
	125	-0,737806	-79,800417	Ecuador: Los Ríos - Río Palenque Centro de Ciencia, 220m.	
	126	-0,737750	-79,800306	Ecuador: Los Ríos - Río Palenque Estación Biológica.	
	127	-0,583250	-79,366278	Ecuador: Los Ríos - Patricia Pilar hacia 25 de mayo, 650m.	
	128	-0,583333	-79,366667	Ecuador: Los Ríos - Patricia Pilar hacia 25 de Mayo, 220m.	
	129	-0,750000	-79,310000	Ecuador: Los Ríos - Valencia.	
	130	-0,500000	-79,500000	Ecuador: Manabí - El Carmen.	
	131	-0,276167	-79,158194	Ecuador: Sto, Domingo hacia Quevedo, Km 7, Río Chiguilpe, 450m.	
	132	-0,319806	-79,167250	Ecuador: Sto. Domingo para Quevedo, Km 28, Río Baba, 450m.	
	133	-0,566500	-79,371889	Ecuador: Pichincha - Centinela 650m.	
	134	-0,599861	-79,349833	Ecuador: Pichincha - Sto. Domingo Río Bimbe.	
	135	0,351194	-79,733417	Ecuador: Esmeraldas - Quinindé 400 - 600m.	
	136	0,136333	-79,556139	Ecuador: Esmeraldas: La Unión del Río Quininde para Pedernales, 200m.	
	<i>Gongora latisepala</i> Rolfe	137	--	--	
	<i>Gongora atroporpurea</i> Hook	138	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
		139	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		140	0,000000	-77,000000	Ecuador: Sucumbios: Lumbaqui, 500m.
		141	3,916667	-53,083333	Guayana Francesa: Saint-Elie.
		142	4,908333	-58,916667	Guyana: Potaro-Siparuni.
		143	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
		144	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
		145	3,891667	-55,916667	Surinam: Boven Saramacca.
		146	6,583333	-66,583333	Venezuela: Bolívar.

	<i>Gongora leucochila</i> Lem	147	9,860000	-83,790000	Costa Rica: Provincia de Cartago.
		148	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
		149	15,225000	-86,258333	Honduras: Gualaco.
		160	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
		161	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
		162	16,387222	-89,076944	Belice: Columbia Forest Reserve.
		163	13,000000	-85,233333	Nicaragua: Reserva Natural Cerro musún.
Grupos	Especie	N.	Latitud	Longitud	Hábitat
I	<i>Gongora escobariana</i> Whitten	1	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		2	-3,454972	-78,547667	Ecuador: Morona Santiago.
	<i>Gongora ecornuta</i> Jenny	3	-1,410889	-78,193500	Ecuador: Tungurahua.
		4	-0,694389	-77,730500	Ecuador: Napo.
		5	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe.
		6	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
	<i>Gongora portentosa</i> Rchb,f,	7	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		8	--	--	Ecuador.
		9	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
II	<i>Gongora cassidea</i> Rchb,f,	10	17,18333	-88,500000	Belice: Sibun Forest Reserve.
		11	--	--	Costa Rica.
		12	--	--	El Salvador.
		13	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
		14	15,225000	-86,258333	Honduras: Gualaco.
		15	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
		16	12,825000	-85,366667	Nicaragua: Matagalpa.
	<i>Gongora horichiana</i> Fowlie	17	10,160000	-84,500000	Costa Rica: Provincia de Alajuela.
		18	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
	<i>Gongora amparoana</i> Schltr,	19	--	--	Costa Rica.
		20	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
	<i>Gongora armeniaca</i> (Lindl, & Paxton) Rchb,f,	21	--	--	Costa Rica.
		22	12,825000	-85,366667	Nicaragua: Matagalpa.
		23	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
	<i>Gongora galeata</i> (Lindl, ex G,	24	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.

	Lodd,) Rchb,f,	25	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
	<i>Gongora seideliana</i> Rchb,f,	26	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca,
III	<i>Gongora scaphephorus</i> Rchb,f, & Warsz,	27	-16,383333	-63,458333	Bolivia: El Puente.
		28	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		29	-3,433333	-78,516667	Ecuador: Morona Santiago.
		30	-2,455861	-78,175194	Ecuador: Morona Santiago.
		31	-3,439250	-78,591750	Ecuador: Morona Santiago.
		32	-1,650722	-77,921083	Ecuador: Pastaza.
		33	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
	<i>Gongora sanderiana</i> Kraenzl	34	-1,689667	-77,970194	Ecuador: Morona Santiago y Tungurahua.
		35	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
	<i>Gongora rufescens</i> Jenny	36	-16,383333	-63,458333	Bolivia: El Puente.
		37	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		38	-3,440111	-78,592194	Ecuador: Morona Santiago Zamora Chinchipe.
		39	-10,581667	-75,407222	Perú: Oxapampa.
	<i>Gongora pardina</i> Jenny	40	-2,683139	-78,317194	Ecuador: Morona Santiago.
		41	-3,645500	-78,573833	Ecuador: Morona Santiago - El Panguí 1300m.
		42	-3,283222	-78,281389	Ecuador: Morona Santiago - Cordillera del Condor, 1200m.
		43	-2,722972	-78,317194	Ecuador: Morona Santiago - Méndez 550m.
		44	-1,042833	-77,707361	Ecuador: Morona Santiago - Misahuallí Km 13, 450m.
		45	-1,066611	-77,618361	Ecuador: Napo - Jatun Sacha cerca de Misahualli, 450m.
		46	-1,043278	-77,709944	Ecuador: Napo - Río Napo.
		47	-1,042194	-77,710861	Ecuador: Napo - Pto. Napo 450m.
<i>Gongora pleiochroma</i> Rchb,f,	48	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.	
	49	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.	
	50	-1,033556	-77,731444	Ecuador: Napo - Pto, Napo a Misahualli, Km 13, 450m.	
	51	-2,731583	-78,309861	Ecuador: Morona Santiago - Méndez, 550 m.	

		52	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe - Zamora a lo largo del Río Jamboe.
		53	3,916667	-53,083333	Guyana Francesa: Saint-Elie.
		54	4,908333	-58,916667	Guyana: Potaro-Siparuni.
		55	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
		56	3,891667	-55,916667	Surinam: Boven Saramacca.
		57	6,583333	-66,583333	Venezuela: Bolivar.
		58	9,162500	-79,841667	Panamá: Isla Barro Colorado.
		IV	<i>Gongora grossa</i> Rchb, f,	59	0,785000
60	-1,06561			-80,239583	Ecuador: Manabí - Pto, viejo a Quevedo, 20 km E San Placido, 400m..
61	-1,066056			-80,241028	Ecuador: Manabí - Pto, Viejo, 180m.
62	-1,841667			-80,738889	Ecuador: Guayas - Manglaralto, 100m.
63	-2,916667			-79,816667	Ecuador: Guayas - Balao, 200m.
64	-1,241417			-79,668306	Ecuador: Los Ríos - Jauneche, 70m.
65	-1,772083			-79,270167	Ecuador: Los Ríos - Babahoyo a Guaranda, Montalvo, 500m.
66	-1,197083			-79,594278	Ecuador: Los Ríos – bosque de Jauneche, km 70 Quevedo a Palenque, via Mocachi.
67	-3,664833			-79,624528	Ecuador: El Oro - Malva, 8 km Zaruma, 1200m.
68	-3,370306			-79,863444	Ecuador: El Oro - Buena Vista, Cerros de la Merced
69	-3,480000			-79,750000	Ecuador: El Oro - Hcda Daucay, 400m
70	-3,370278			-79,863639	Ecuador: El Oro - Buena Vista a Paccha.
71	-0,566500			-79,371889	Ecuador: Pichincha - Centinela, 650m.
72	-0,599833			-79,349944	Pichincha: Patricia Pilar en el puente sobre el Río Bimbe, 170m.
73	-1,772917			-79,174056	Ecuador: Babahoyo a Guaranda, Balzapamba, 730m.
	<i>Gongora hirtzii</i> Dodson & N.H. Williams	74	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		75	1,100000	-78,266667	Ecuador: Carchi, San Marcos de los Coaqueres a Gualpi Bajo, 800m.

		76	0,902861	-78,545722	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 11-15, 800m.
		77	0,903444	-78,545722	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 12, 750m.
		78	0,902861	-78,545722	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 11, 675m.
		79	0,903250	-78,545778	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 10, 700m.
		80	0,903694	-78,546028	Ecuador: Esmeraldas - Lita a Alto Tambo, Km 17, 850m.
	<i>Gongora sphaerica</i> Jenny	81	--	--	--
	<i>Gongora gratulabunda</i> Rchb, f,	82	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
	<i>Gongora bufonia</i> Lindl,	83	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
V	<i>Gongora quinquenervis</i> Ruiz & Pav,	84	17,183333	-88,500000	Belice: Sibun Forest Reserve.
		85	-16,383333	-63,458333	Bolivia: El Puente.
		86	-14,166667	-53,083333	Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
		87	--	--	Caribe: Trinidad y Tobago.
		88	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		89	MAR	MAR	Costa Rica.
		90	-0,737500	-79,800167	Ecuador: Los Ríos - Río Palenque Science Cente, 220m.
		91	0,050667	-77,304667	Ecuador: Napo - Lumbaqui, camino de Baeza a Lago Agrio, 800m.
		91	-1,035972	-77,675222	Ecuador: Napo cerca de Misahualli.
		92	-1,066611	-77,618361	Ecuador: Napo - Jatun Sacha, 450m.
		93	-2,732361	-78,309000	Ecuador: Morona Santiago - Méndez a Morona, Km 54, 1100m.
		94	-2,248694	-78,211667	Ecuador: Morona Santiago - Macas a Guamote, 1200m.
		95	-4,067722	-78,932111	Ecuador: Zamora Chinchipe cerca de Zamora, 1000m.
		96	-0,454000	-77,182278	Ecuador: Zamora Chinchipe, Río Payamino

		97	-4,057833	-78,970722	Ecuador: Zamora Chinchipe, Loja a Zamora, Zamora, 1000m
		98	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe: Cordillera del Cónдор, a lo largo del Río Jamboe km 11, 1200m.
		99	-4,067167	-78,931889	Ecuador: Zamora Chinchipe: Río Jamboe, km 6,6 del puente 1200m.
		100	--	--	El Salvador.
		101	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
		102	15,225000	-86,258333	Honduras: Gualaco.
		103	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
		104	12,825000	-85,366667	Nicaragua: Matagalpa.
		105	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
		106	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
		107	6,583333	-66,583333	Venezuela: Bolivar.
	<i>Gongora fulva</i> Lindl,	108	5,775000	-74,341667	Colombia: Cundinamarca.
		109	MAR	MAR	Costa Rica.
		110	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
	<i>Gongora flaveola</i> Rchb, f,	111	--	--	--
	<i>Gongora ionodesme</i> G, Gerlach	112	-4,133500	-78,940500	Ecuador: Zamora Chinchipe - La Pituca en el Río Jamboe cerca de Zamora, Km 12,2.
	<i>Gongora gracilis</i> Jenny	113	-1,066611	-77,618361	Ecuador: Napo - Jatun Sacha, 450m.
		114	-1,042194	-77,710861	Ecuador: Napo - Pto. Napo a Puyo, Km 25, 400m.
		115	-2,248694	-78,211667	Ecuador: Morona Santiago - Macas hacia Guamote, 1200m, 9 de octubre Alshi.
		116	-4,066917	-78,931833	Ecuador: Zamora Chinchipe - Zamora, 1200m.
		117	-4,989722	-78,903889	Perú: San José de Lourdes.
	<i>Gongora superflua</i> Rchb, f,	118	-3,324444	-79,761222	Ecuador: El Oro: Pasaje a Cuenca, Km 25, 340m.
		119	-3,323972	-79,583889	Ecuador: El Oro Uzchurrumi a Chilla, Km 14,

					490m.
<i>Gongora ilense</i> Whitten & Jenny	120	-17,079167	-65,463333		Bolivia: Shinahota.
	121	0,351194	-79,733417		Ecuador: Esmeraldas - Quinindé 400 - 600m.
	122	0,136333	-79,556139		Ecuador: Esmeraldas - La Unión.
	123	0,874389	-78,467917		Ecuador: Esmeraldas: Lita hacia San Lorenzo, km 12, 800m.
	124	0,340750	-79,728833		Esmeraldas: Estación Biológica Bilsa.
	125	-0,737806	-79,800417		Ecuador: Los Ríos - Río Palenque Centro de Ciencia, 220m.
	126	-0,737750	-79,800306		Ecuador: Los Ríos - Río Palenque Estación Biológica.
	127	-0,583250	-79,366278		Ecuador: Los Ríos - Patricia Pilar hacia 25 de mayo, 650m.
	128	-0,583333	-79,366667		Ecuador: Los Ríos - Patricia Pilar hacia 25 de Mayo, 220m.
	129	-0,750000	-79,310000		Ecuador: Los Ríos - Valencia.
	130	-0,500000	-79,500000		Ecuador: Manabí - El Carmen.
	131	-0,276167	-79,158194		Ecuador: Sto, Domingo hacia Quevedo, Km 7, Río Chiguilpe, 450m.
	132	-0,319806	-79,167250		Ecuador: Sto. Domingo para Quevedo, Km 28, Río Baba, 450m.
	133	-0,566500	-79,371889		Ecuador: Pichincha - Centinela 650m.
	134	-0,599861	-79,349833		Ecuador: Pichicnha - Sto. Domingo Río Bimbe.
	135	0,351194	-79,733417		Ecuador: Esmeraldas - Quinindé 400 - 600m.
136	0,136333	-79,556139		Ecuador: Esmeraldas: La Unión del Río Quininde para Pedernales, 200m.	
<i>Gongora latisepala</i> Rolfe	137	--	--	--	--
<i>Gongora atropurpurea</i> Hook	138	-14,166667	-53,083333		Brasil: Campinápolis – Mato Grosso.
	139	5,775000	-74,341667		Colombia: Cundinamarca.
	140	0,000000	-77,000000		Ecuador: Sucumbios: Lumbaqui, 500m.
	141	3,916667	-53,083333		Guayana Francesa: Saint-Elie.

<i>Gongora leucochila</i> Lem	142	4,908333	-58,916667	Guyana: Potaro-Siparuni.
	143	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
	144	-9,250000	-74,958333	Perú: Puerto Inca.
	145	3,891667	-55,916667	Surinam: Boven Saramacca.
	146	6,583333	-66,583333	Venezuela: Bolívar.
	147	9,860000	-83,790000	Costa Rica: Provincia de Cartago.
	148	15,775000	-90,225000	Guatemala: Chisec.
	149	15,225000	-86,258333	Honduras: Gualaco.
	160	23,616667	-102,575000	México: Villa de Cos, Zac.
	161	8,441667	-80,108333	Panamá: Río Hato.
	162	16,387222	-89,076944	Belice: Columbia Forest Reserve.
	163	13,000000	-85,233333	Nicaragua: Reserva Natural Cerro Musún.

Nota: Los guiones medios en las celdas se refieren a que las coordenadas son inválidas o no existen.

Fuente: (Dodson et al., 2006) y (Tropicos, 2017).

Elaborado por: (Las autoras, 2020)

Anexo 3. Fotografías de las especies del género *Gongora*



Gongora escobariana Whitten



Gongora ecornuta Jenny



Gongora portentosa Linden & Rchb.f.



Gongora cassidea Rchb.f.



Gongora horichiana Fowlie



Gongora amparoana Schltr.



Gongora armeniaca (Lindl.) Rchb.f.



Gongora galeata (Lindl.) Rchb.f.



Gongora seideliana Rchb.f.



Gongora scaphephorus Rchb.f. & Warsz.



Gongora sanderiana Kraenzl.



Gongora rufescens Jenny



Gongora ilense Whitten & Jenny



Gongora pardina Jenny



Gongora pleiochroma Rchb.f.



Gongora grossa Rchb, f.



Gongora hirtzii Dodson & N.H. Williams



Gongora sphaerica Jenny



Gongora gratulabunda Rehb. f.



Gongora bufonia Lindl.



Gongora quinquenervis Ruiz & Pav.



Gongora fulva Lindl.



Gongora flaveola Rchb. f.



Gongora ionodesme G. Gerlach



Gongora gracilis Jenny



Gongora superflua Rchb. f.



Gongora latisepala Rolfe



Gongora atroporpurea Hook



Gongora leucochila Lem

Fuente: (Tropicos, 2019; Pfahl, 2020)

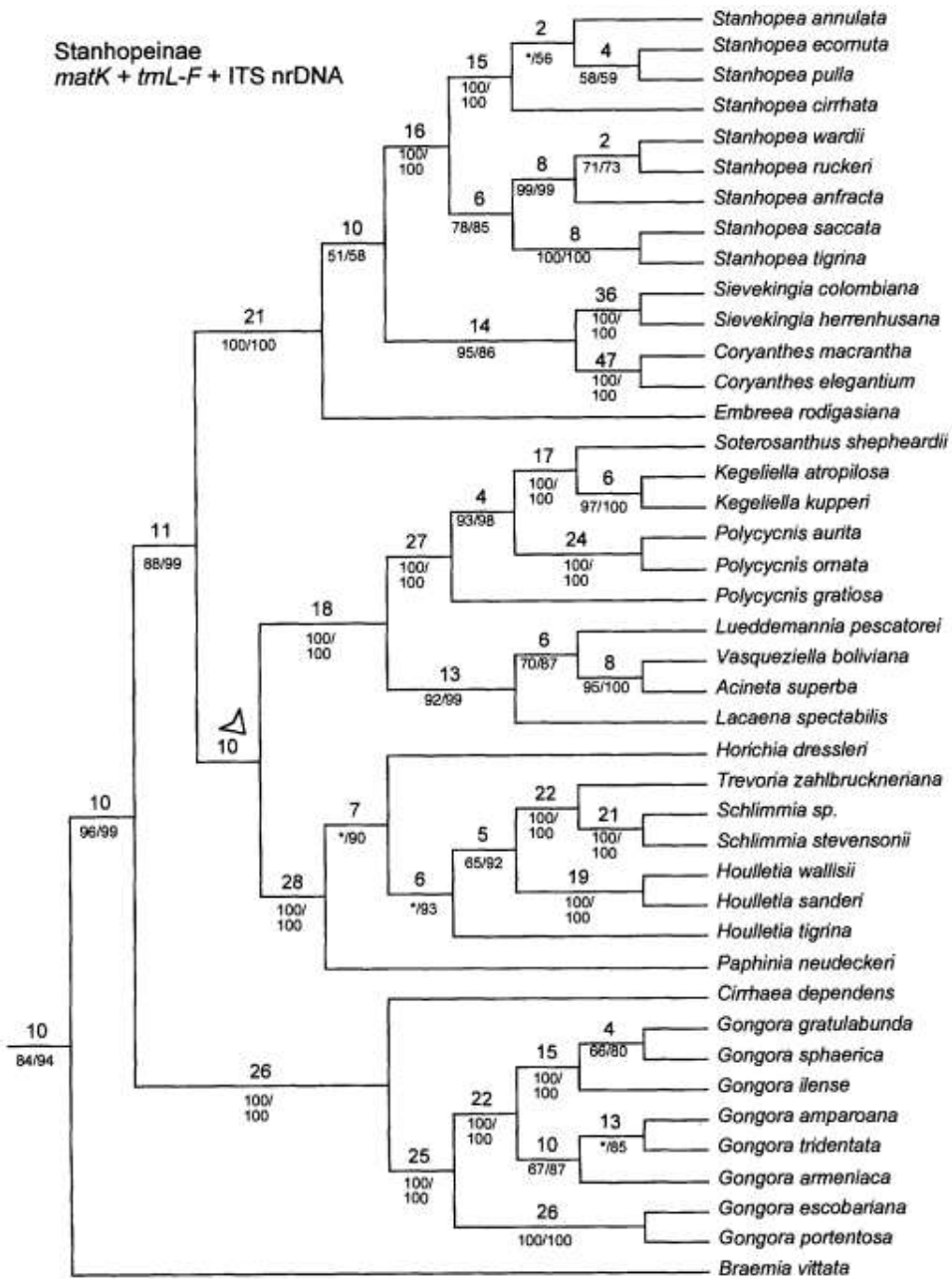
Árbol filogenético de la región *matK* de las especies del género *Gongora*



Anexo 4. Árbol filogenético de la región *matK* mediante el método de *Máxima Verosimilitud* y el modelo *Jukes-Cantor* con 1000 Bootstraps. *Stanhopea saccata* y *Coeliopsis hyacinthosma* como grupos externos.

Elaborado por: (Las autoras, 2020)

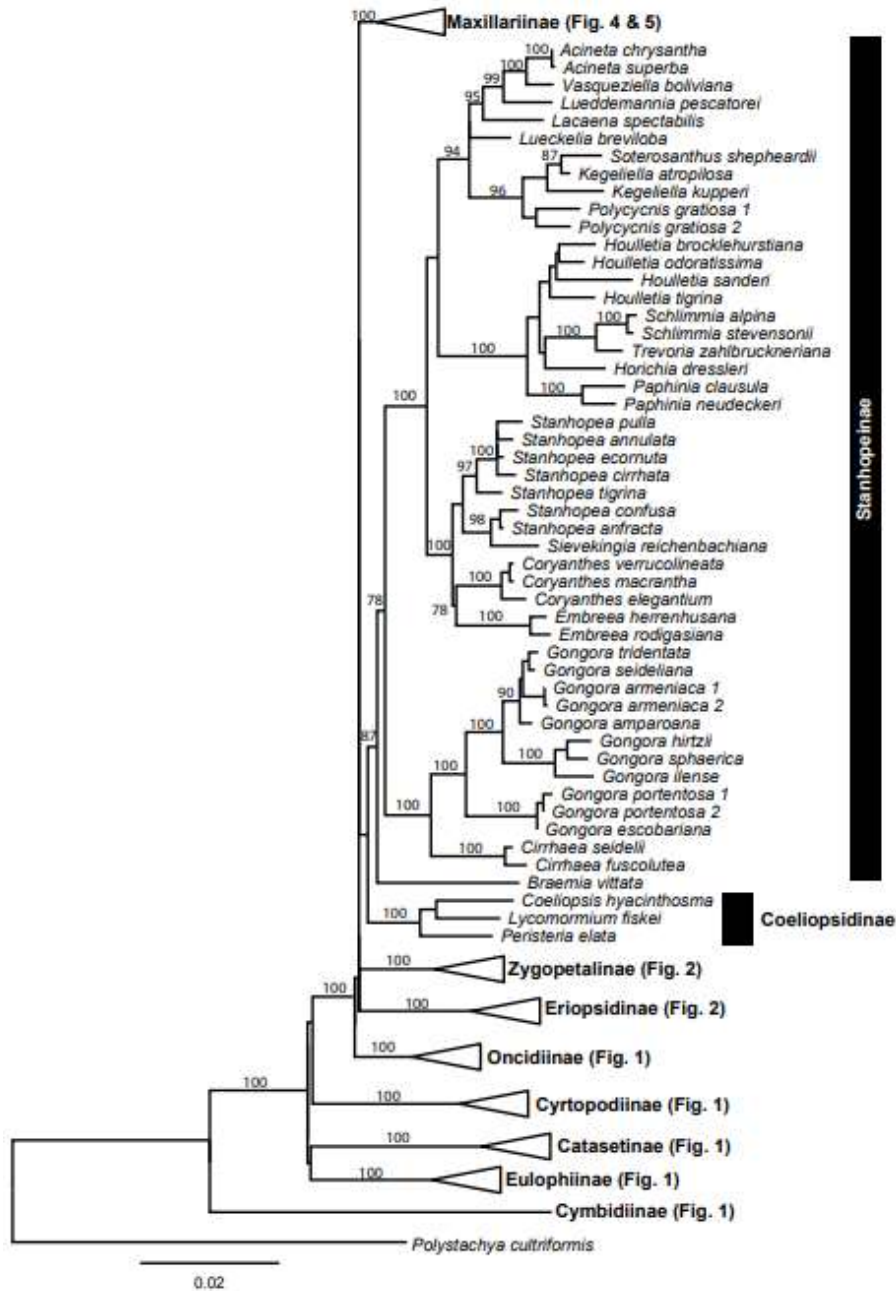
Árbol filogenético para Stanhopeinae con las regiones *matK* + *trnL* + ITS-nrDNA combinadas.



Anexo 5. Porción de Stanhopeinae con la combinación de los marcadores moleculares *matK/trnK-F/Its* nrDNA

Fuente: (Whitten et al., 2000)

Árbol de *Máxima Verosimilitud* con Bootstrap para Coeliopsidae y Stanhopeinae

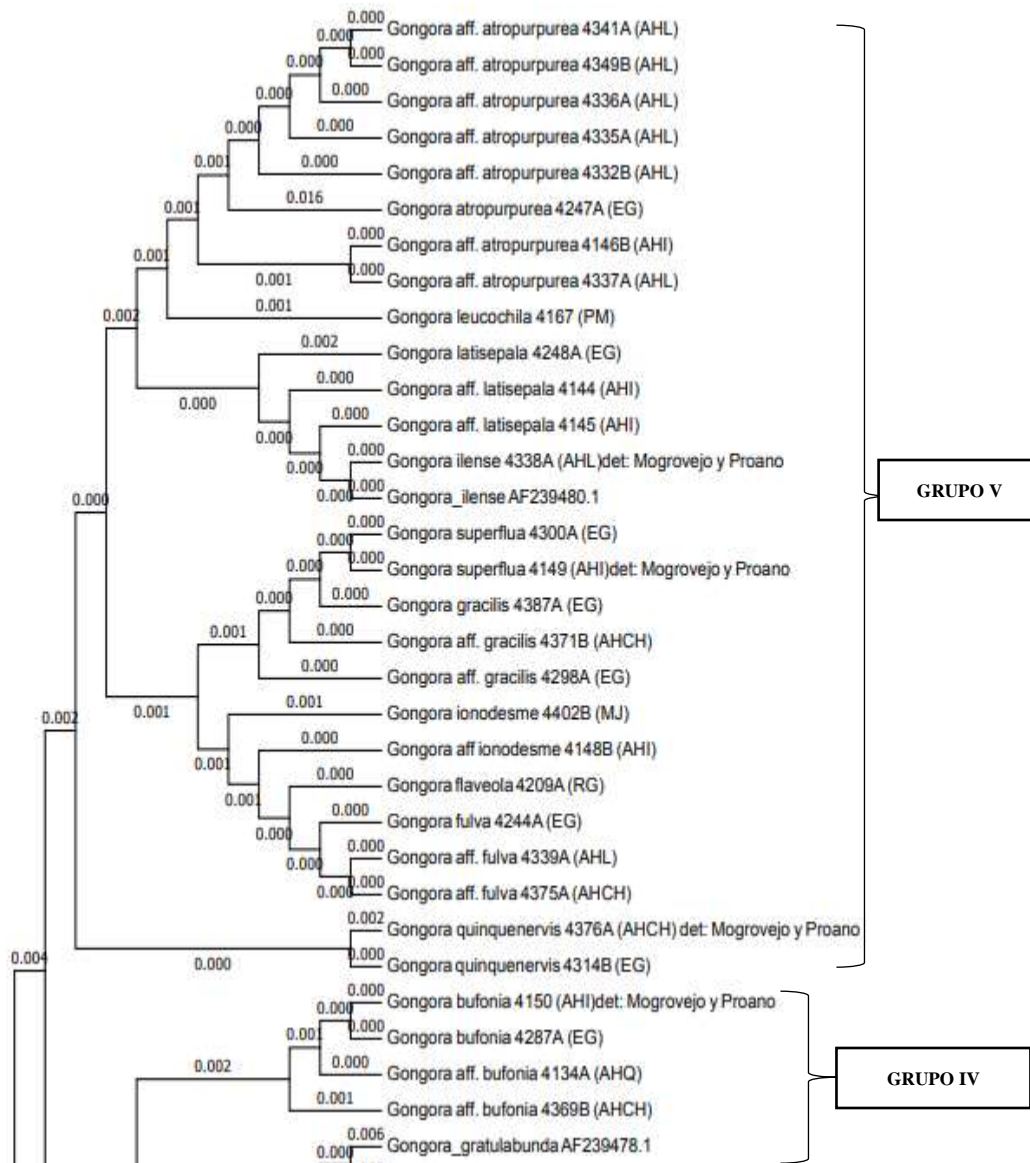


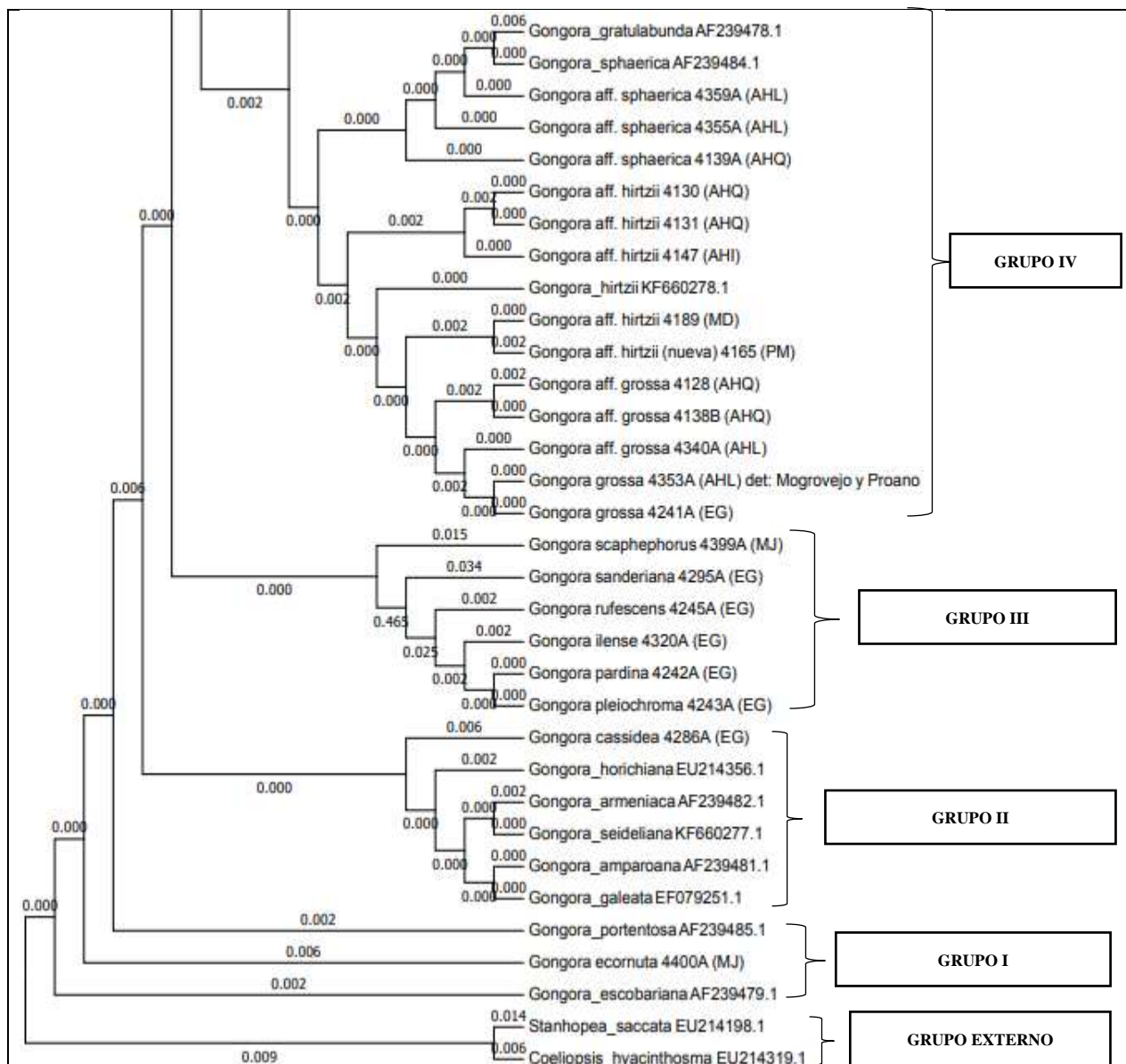
Anexo 6. Árbol de *Máxima Verosimilitud* para Coeliopsidae y Stanhopeinae.

Fuente: (M. Whitten et al., 2014).

Árbol filogenético para la región *matK* para la totalidad mediante el método de *Máxima*

Verosimilitud de las muestras y el modelo *Tamura-Nei*.





Anexo 7. Árbol filogenético para la región *matK* para la totalidad de las muestras, basado en el modelo *Tamura-Nei* mediante el método de *Máxima Verosimilitud* con 1000 Bootstraps. *Stanhopea saccata* y *Coeliopsis hyacinthosma* como grupos externos.

Elaborado por: (Las autoras, 2020).