

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

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

TEMA:

**REVISIÓN DE LAS ESPECIES LATINOAMERICANAS DE ORQUÍDEAS
DEL GÉNERO *DRACULA* MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR
BARCODE**

AUTORES:

Miguel Ángel Montalvo Pazmiño

Luciana Moncerrat Vargas García

TUTOR:

MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, Marzo del 2019

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Miguel Ángel Montalvo Pazmiño, con cedula de ciudadanía N° 171682280- 2, y Luciana Moncerrat Vargas García, con cedula de ciudadanía N° 020252269-4, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “REVISIÓN DE LAS ESPECIES LATINOAMERICANAS DE ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *DRACULA* MEDIANTE LA TÉCNICA BARCODE”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero 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 autores 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 formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.


Miguel Ángel Montalvo Pazmiño

CI. 171682280-2


Luciana Moncerrat Vargas García

CI. 0202522694

Quito, Marzo del 2019

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“REVISIÓN DE LAS ESPECIES LATINOAMERICANAS DE ORQUÍDEAS DEL
GÉNERO *DRACULA* MEDIANTE LA TÉCNICA BARCODE”, realizado por Miguel
Ángel Montalvo Pazmiño y Luciana Moncerrat Vargas García, obteniendo un producto que
cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para
ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Marzo del 2019



Marco Fernando Gerna Cevallos Ph.D.
CI. 0501872071

Dedicatoria

A Dios, por brindarme valor, salud y destreza en este emocionante camino al que
llamamos vida.

A mis padres, por su apoyo incondicional, amor y paciencia que ha fortalecido mi
espíritu, permitiéndome día a día dar pasos firmes en la búsqueda de mis sueños.

A Rocío García, Estefanía Guadalupe y Elsi Vargas, por ser uno de los pilares
fundamentales en mi crecimiento personal y profesional.

A Cindy Dávalos y Erika Villavicencio, por su amistad y cariño.

Luciana Vargas

Al Rey del universo, por regalarme la vida, por haberme guiado todos los días, por
darme salud y una hermosa familia.

A mis padres, Julio Miguel y Blanca Esperanza por haberme brindado su cariño, toda
la paciencia que salió de su corazón y todo el apoyo en este camino, a Paola, Vicky,
Richard y Jimmy mis hermanos amados que pusieron su granito de arena para poder
lograr este que es nuestro triunfo.

A Verónica, por haberme brindado su apoyo, sus consejos, su paciencia, su amor y
por haberme acompañado hasta la consecución de esta meta.

Miguel Montalvo

Agradecimiento

“El objeto más noble que puede ocupar el hombre es ilustrar a sus semejantes”.

Porque el educar no es dar carrera para vivir, sino templar el alma para las
dificultades de la vida”

Simón Bolívar.

A la Universidad Politécnica Salesiana por ser la cuna del saber que supo acogernos y ser el soporte de nuestro crecimiento personal y profesional.

A nuestro tutor Marco Cerna Ph.D., por confiar en nosotros y contagiarnos con ese entusiasmo investigativo que nos ha permitido crecer profesional y personalmente bajo parámetros de criticidad y respeto, siendo esto uno de los principales pilares de la educación.

A todos nuestros profesores, compañeros y amigos quienes nos guiaron y apoyaron en esta hermosa etapa de vida.

Además reconocemos la ayuda otorgada por el Jardín Botánico de Quito, las colecciones privadas pertenecientes a Beto Guerrero, Sara Gutiérrez, Alexander Marín, Héctor Yela, Ecuagenera, Mundiflora y Ecuafior, por la donación del tejido vegetal necesario para este estudio.

Finalmente y no menos importante a Luis Baquero y Vinicio Armijos por su orientación y apoyo en nuestro trabajo, así como al personal de los laboratorios de Biotecnología, al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN y al fondo de investigación de la Universidad Politécnica Salesiana, por destinar completamente su apoyo en la ejecución de este trabajo.

Índice

Introducción.....	1
Capítulo I.....	4
Marco Conceptual	4
1. Familia Orchidaceae	4
1.2. Clasificación taxonómica	5
1.3. Morfología floral.....	6
2. Género <i>Dracula</i>	7
2.2. Descripción morfológica	11
2.3. Polinización	13
2.4. Hibridación del género	13
3. Marcadores Moleculares	15
4. ADN Barcode	15
Capítulo II.....	20
1. Materiales y métodos.....	20
1.1. Colección de muestras	20
1.2. Estudio molecular	21
1.2.1. Extracción de ADN.....	21
1.2.2 Cuantificación de ADN.....	22
1.2.3. Amplificación de ADN	23
1.2.4. Secuenciación	24
1.3. Filogenia.....	25
1.4. Georreferenciación	25
Capítulo III	26
1. Resultados y discusión.....	26
1.1. Colección de muestras.....	26
1.2. Estudio molecular	32
1.3. Filogenia y georreferenciación	34
1.4. Sistemática tradicional vs filogenia molecular	52
Conclusiones.....	55
Recomendaciones	56
Bibliografía.....	57
Anexos.....	64

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación subgenérica actual de <i>Dracula</i>	10
Tabla 2. Trabajos comparativos de varios loci propuestos como códigos de barras genéticos en orquídeas.	19
Tabla 3. Mezcla PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix.....	24
Tabla 4. Lista de las especies Latinamericanas del género <i>Dracula</i> colectadas para el estudio.	26
Tabla 5. Propuesta para la clasificación subgenérica del género <i>Dracula</i>	54

Índice de figuras

Figura 1. Subfamilias de la familia Orchidaceae	6
Figura 2. Morfología floral de las orquídeas; esquema de una flor del género <i>Ophrys</i>	7
Figura 3. Área de distribución del Género <i>Dracula</i> en Latinoamérica.	9
Figura 4. Especies representativas en el género <i>Dracula</i>	11
Figura 5. Descripción morfológica de <i>Dracula hirtzii</i>	12
Figura 6. Polinización. Flores de <i>Dracula lafleurii</i>	14
Figura 7. Regiones de ADN destinadas al sistema BARCODE en plantas	17
Figura 8. Estructura de la región <i>matK</i> (maturase K) de angiospermas.	18
Figura 9. Esquema de la región <i>ITS</i> del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos <i>ITS1</i> e <i>ITS2</i> . Nota: Las flechas indican la posición de hibridación de los cebadores.	19
Figura 10. Electroforesis del ADN extraído de especies del género <i>Dracula</i>	33
Figura 11. Amplificación del producto PCR con el marcador <i>matK</i>	33
Figura 12. Amplificación del producto PCR con el marcador <i>ITS</i>	34
Figura 13. Árbol filogenético <i>Maximum Likelihood</i> de la región <i>ITS</i> mediante el método Tamura-Nei	36
Figura 14. Árbol filogenético <i>Maximum Likelihood</i> de la región <i>matK</i> mediante el método Tamura-Nei	39
Figura 15. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo I. Especies atípicas	41
Figura 16. Especies atípicas del género <i>Dracula</i>	41
Figura 17. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo II. <i>Dodsonia</i>	42
Figura 18. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo III. <i>Lotax-Saulii</i>	43
Figura 19. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo IV. Grupo <i>Costate</i>	44
Figura 20. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo V. Grupo <i>Gigas</i>	45
Figura 21. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo VI. Grupo <i>Tsubotae</i>	46
Figura 22. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo VII. Grupo diverso I	47
Figura 23. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo VIII. <i>Houtteana-Benedictii</i> ..	48
Figura 24. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo IX. Grupo diverso II.	49
Figura 25. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo X. Grupo andes orientales. ...	50
Figura 26. Distribución geográfica del género <i>Dracula</i> Grupo XI. Especies de posible origen híbrido.	52

Índice de Anexos

Anexo 1. Condiciones de temperatura del termociclador.....	64
Anexo 2. Lista de especies del género <i>Dracula</i> (Secuencias del grupo de investigación NUNKUI WAKAN)	64
Anexo 3. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN	66
Anexo 4. Especies del género <i>Dracula</i>	70
Anexo 5. Datos de georreferenciales del género <i>Dracula</i>	73
Anexo 6. Árbol filogenético comparativo con el gen matK y método Jukes-Cantor del género <i>Dracula</i>	78

Resumen

El género *Dracula*, pertenece a la familia Orchidaceae, la morfología de sus flores han hecho que se distinga fácilmente de otros géneros de orquídeas neotropicales y sean especies mayoritariamente polinizadas por dípteros. Se reconocen alrededor de 130 especies de *Dracula*, distribuidas desde el sureste de México hasta el Norte de Perú. Para el estudio se recolectaron 176 individuos de *Dracula* en orquidearios de las provincias de Azuay y Pichincha, se extrajo ADN mediante el método Doyle & Doyle modificado, mediante la técnica PCR convencional se amplificaron los segmentos de la región *matK* y el espaciador intergénico *ITS* con el uso del kit *Phire Plant Direct PCR Master Mix*, los productos fueron secuenciados mediante el método Sanger y estudiados con las herramientas bioinformáticas *Boldsystems* y *Blast* para verificar la identidad de las especies, se realizaron dos árboles uno por cada región con la técnica *Maximum Likelihood* y modelo *Tamura-Nei* del software *Mega 7*. Los resultados filogenéticos obtenidos señalan que la región *matK* presentó una mayor variabilidad interespecie, mientras que la región *ITS* demostró no ser discriminativa para diferenciar la clasificación subgenérica del género *Dracula*, además permitió proponer un cambio en la clasificación de la sistemática clásica dada por Luer (1993), el análisis biogeográfico propone que Carchi en Ecuador y la cordillera Oriental Putumayo en Colombia, son las zonas con mayor densidad del género.

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

Abstract

The genus *Dracula*, belongs to the family *Orchidaceae*, the morphology of his flowers has made it easily distinguishable from another genus of Neotropical orchids and is one of the species mostly pollinated by *Diptera*. Around 130 species of *Dracula* have been described, distributed from southeastern Mexico to northern Peru. For the study, 176 individuals of *Dracula* were collected in orchid orchards of the provinces of Azuay and Pichincha. DNA was extracted by the modified Doyle & Doyle method, by means of the conventional PCR technique the segments of the matK region and the ITS intergenic spacer were amplified with the use of the Phire Plant Direct PCR Master Mix kit, the products were sequenced using the Sanger method and studied with Boldsystems and Blast bioinformatics tools to verify the identity of the species, two trees were made one per region with the Maximum Likelihood technique and the Tamura-Nei model of the Mega 7 software. The obtained phylogenetic results indicate that the matK region presented a greater interspecies variability, while the ITS region proved not to be discriminative to differentiate the subgeneric classification of the genus *Dracula*, besides it allowed to propose a change in the classification of the classical systematics given by Luer (1993), the biogeographical analysis proposes that Carchi in Ecuador and the Putumayo Eastern Cordillera in Colombia, are the areas with the highest density of the genus.

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

Introducción

La familia Orchidaceae es uno de los linajes más grandes de angiospermas y cuenta con más de 27,801 especies y 880 géneros (Christenhusz y Byng, 2016; Luo *et al*, 2014; Parra, 2012). El género *Dracula*, pertenece a la subtribu Pleurothallidinae de la familia “Orchidaceae”, se encuentra distribuido desde sureste de México hasta el norte de Perú y sus especies crecen entre los 300 y 2800 m de altitud, principalmente en bosques nublados (Aguilar Palma, 2003; Baquero y Moncayo, 2017; Calderón y Farfán, 2003; Pupulin, Merino, Medina, y Páez, 2009). En la actualidad, es muy difícil definir un número exacto de las especies que conforman este género, por las características de su morfología floral y la información confusa sobre el origen geográfico de más de una especie de *Dracula*. Las cifras varían según distintos autores. Iza (2018), Zambrano y Solano (2011); Pupulin *et al*, (2009); Drinkell (2007) definen 120 especies con mayor concentración en Colombia y Ecuador (72 y 56 individuos respectivamente). Doucette (2011), por otra parte, define alrededor de 130 especies Latinoamericanas que incluyen 10 especies en América Central (6 en Panamá, 2 en Costa Rica y Nicaragua, respectivamente); The Plant List (2018), describe 216 especies, de las cuales 130 son aceptadas.

Las primeras investigaciones taxonómicas en este género fueron realizadas por Luer (1993), en 1978, basándose en características sistemáticas y morfológicas, lo que llevo a agruparlas en 3 subgéneros y 5 secciones.

De acuerdo con Aguilar (2003) e Iza (2018), en los últimos años, la identificación morfológica de las especies de este género es muy limitada cuando no existen muestras fértiles. Y aún en muestras fértiles, el lograr definir las diferencias e identidad de algunas especies en *Dracula* es sumamente difícil. Debido a lo anterior,

se propuso el empleo de técnicas moleculares que permitan una identificación eficaz de las especies de este género.

Entre las investigaciones de filogenias moleculares de orquídeas del Neotrópico se encuentra el estudio realizado por Iza (2018), quien expone la “Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula*, mediante el sistema BARCODE”, para ello utiliza los marcadores moleculares cloroplásticos *matK*, *rpoC1* y *rpoB*, de los cuales *matK* destaca en el análisis filogenético como la región que presentó mayor variabilidad interespecie, para este estudio se utilizaron especies ecuatorianas. A su vez, Cuéllar (citado en Iza, 2018), destaca a *matK* como la región con mayor eficiencia bajo la técnica BARCODE en su estudio de “Código de barras genéticos de algunas orquídeas veracruzanas bajo riesgo de extinción”. García (2015) y Mazo (2011), describen que la región cloroplástica *matK* puede ser empleado como código de barras para clasificar géneros y especies, en exsiccados de orquídeas. Por otra parte, Luo *et al*, (2014), detalla que *matK* e *ycf1* son los marcadores más empleados para análisis filogenéticos en orquídeas, mientras que, Chiron *et al*, (2012) y Parveen, Singh, Malik, Raghuvanshi, y Babbar (2017), resaltan la eficacia de ITS como un código de barras para especies de orquídeas. Carrión (2009), señala que del análisis filogenético en orquídeas de las tres regiones amplificadas (*matK*, *trnL-F* e *ITS*), *matK*, presenta buena variabilidad a nivel de especies.

Debido a la confusión en identificar las especies del género, así como la relación genética entre dichas especies, se realiza este estudio con el fin de revisar mediante la técnica molecular BARCODE las especies de orquídeas del género *Dracula* presentes en Latinoamérica y así dilucidar el gremio de esta taxa. Para ello se obtuvo muestras de tejido vegetal de las especies del género en jardines botánicos y colecciones privadas de orquídeas en Latinoamérica, para luego analizar el ADN de

las muestras mediante el estudio de la región cloroplástica *matK* y nuclear *ITS* con la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, y así generar una filogenia molecular y un análisis biogeográfico del género, que permita corroborar los aciertos o proponer cambios en la sistemática clásica dada por Luer (1993).

Capítulo I

Marco Conceptual

1. Familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae es considerada como uno de los linajes más grandes de angiospermas, que cuenta con más de 27,800 especies y 880 géneros (Christenhusz y Byng, 2016; Givnish *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2014), representando así un 10% de todas las plantas con flores y a su vez un 40% de endemismo en sus especies (Aguilar, 2003). El nombre Orchidaceae viene del griego “*orkhis*”, que significa testículos, como referencia a la forma de los pseudobulbos de algunas especies, las cuales forman tallos fotosintéticos engrosados que almacenan agua y nutrientes de reserva (Castellanos y Torres, 2018), dicho seudónimo fue otorgado por el filósofo griego Teofrasto en su obra “*De causis plantarum*” para nombrar una planta de este grupo (Dalglish *et al.*, 2007).

De acuerdo con Givnish *et al.*, (2016), hace aproximadamente 112 millones de años aparecieron las orquídeas en Australia y migraron a América del Sur a través de la Antártida por 90 millones de años, es así que esta dispersión permitió la distribución pantropical de los géneros *Vanilla*, *Corymborkis*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae*.

Ecuador es uno de los países con mayor diversidad que cuenta con una flora privilegiada y de acuerdo con Guzmán y Moreno (2014), una de cada cinco especies de orquídeas del mundo se encuentran en este país, existiendo más de 4,302 especies de orquídeas conocidas, de las cuales más de 1,714 son especies endémicas. Razón por la cual en el 2013, Ecuador fue declarado “País de las Orquídeas”(Ministerio de Turismo, 2013).

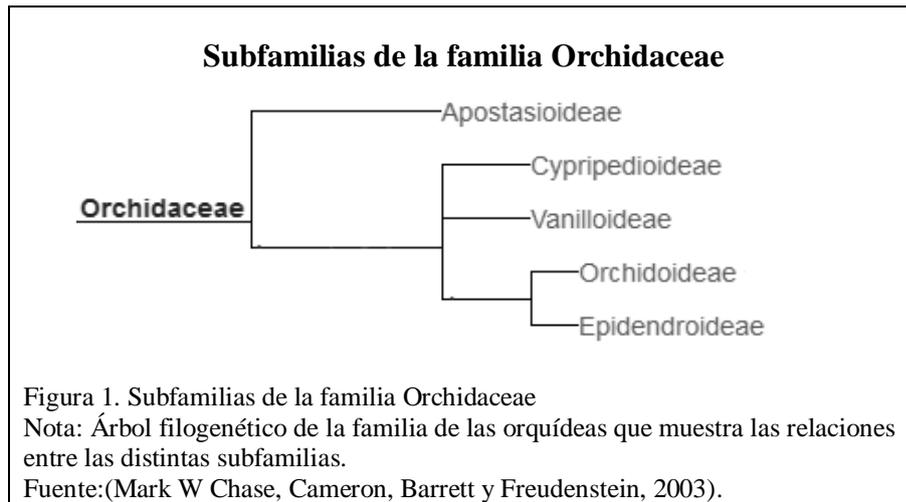
Es así que la diversidad y atractivo morfológico de las especies de la familia Orchidaceae, las han llevado a ser desde hace algún tiempo atrás, objeto de investigación, obteniendo resultados extraordinarios, como la identificación de nuevas especies lo que ha permitido comprender de mejor manera el comportamiento de este grupo (Aguilar, 2003).

1.1.Habitad

La familia Orchidaceae se encuentra distribuidas en casi todos los ecosistemas, con excepción de los polos y desiertos (Dalglish *et al.*, 2007), se estima que son uno de los grupos de angiospermas con más especies en la tierra (Parra, 2012). Los ecosistemas tropicales y bosques de nublados son los ambientes adecuados para su desarrollo, siendo las regiones de América tropical en donde se encuentran un mayor número de especies (López, 2018).

1.2.Clasificación taxonómica

Describir la taxonomía de la familia Orchidaceae resulta complicado, debido a su tendencia a hibridar entre especies y géneros distintos (Velita y Vilcapoma, 2010). Es así que, Palacios (2014), señala que han sido reconocidas dentro el sistema clásico dispuesto por Cronquist (1981), en donde basado en su morfología se las agrupo dentro de las angiospermas en la clase Liliopsida, subclase *Liliidae* y orden Orchidales. A su vez el sistema de clasificación APG IV, en relación a estudios moleculares las reúne en el orden Asparagales (M. W. Chase *et al.*, 2016), así mismo, Téllez (2011), clasifica a la familia Orchidaceae en cinco subfamilias, basado en las características morfológicas, en especial de la flor, véase en la Figura 1.



1.3. Morfología floral

De acuerdo con los estudios morfológicos florales realizados por Darwin, Siger (2009), describe que las flores de las orquídeas son 3-meras, con un verticilo externo de tres sépalos y uno interno de tres pétalos, el pétalo mediano es mayor y colorido (se conoce como labelo); el androceo y el gineceo de la inmensa mayoría de las orquídeas están fusionados en una única estructura denominada columna, la mayoría de las orquídeas presenta una única antera fértil, el polen se encuentra aglutinado en las polinias; además menciona que el gineceo consiste de tres lóbulos estigmáticos y uno de ellos (rostelo) secreta una sustancia pegajosa, que auxilia en el proceso de polinización adhiriendo las polínias al polinizador, véase en la figura 2.

1.4. Importancia de la familia Orchidaceae

Debido a la belleza de sus flores, sistema de polinización, propiedades terapéuticas (Dalglish *et al.*, 2007), su uso en la extracción de gomas y mucílagos, la elaboración de adhesivos, aglutinantes, hacen que las orquídeas sean motivo de atracción en el mundo científico, turístico y comercial (Dalglish *et al.*, 2007; Velita y Vilcapoma, 2010).

Morfología floral de la familia Orchidaceae

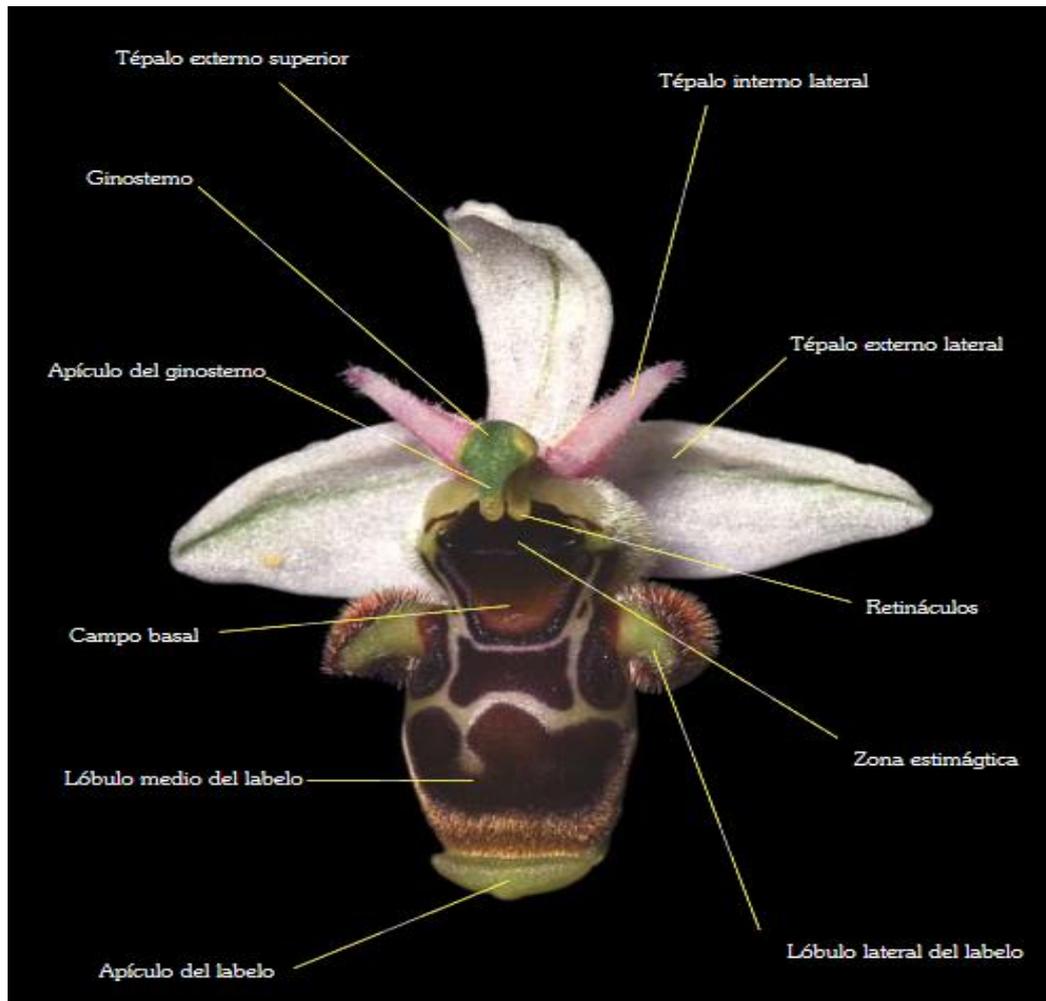


Figura 2. Morfología floral de las orquídeas; esquema de una flor del género *Ophrys*.
Fuente: (Dalglish *et al.*, 2007).

2. Género *Dracula*

Durante la era de la “fiebre de las orquídeas” tiempo en el cual aún pertenecían al género *Masdevallia*, las especies del género *Dracula* gozaron de gran popularidad debido a su belleza exótica que las hacía resaltar del resto de especies (Pupulin *et al.*, 2009). Luer en 1978 observó características peculiares en las flores de algunas especies del género *Masdevallia*, como caudas más largas; pétalos semejantes a la textura del cuerpo fructífero de un hongo; presencia de estructuras filamentosas en sus pétalos; flores con rostro, algo que no se observaba en *Masdevallia*, lo que lo

llevó a consolidarlas como un género distinto al que llamo *Dracula* (Meyer & Cameron, 2009).

Dracula en latín significa "pequeño dragón", razón por la cual Luer atribuyó este seudónimo a estas nuevas especies ya que su apariencia era parecida a la de un dragón o murciélago (Drinkell, 2007; C. Luer, 1993).

Este género pertenece a la subtribu más diversa de las orquídeas neotropicales, la Pleurothallidinae, cuyas diferencias vegetativas florales han hecho que *Dracula* se distinga fácilmente de otros géneros que pertenecen a esta subtribu y sean una de las especies mayoritariamente polinizadas por dípteros (Endara *et al.*, 2010; G. Meyer & Cameron, 2009; Zambrano & Solano, 2011). Además las flores de *Dracula* son clave principal para identificar sus especies (Baquero & Moncayo, 2017), por lo cual es difícil identificar especies de *Dracula* cuando las plantas no están floreciendo (Meyer & Cameron, 2009).

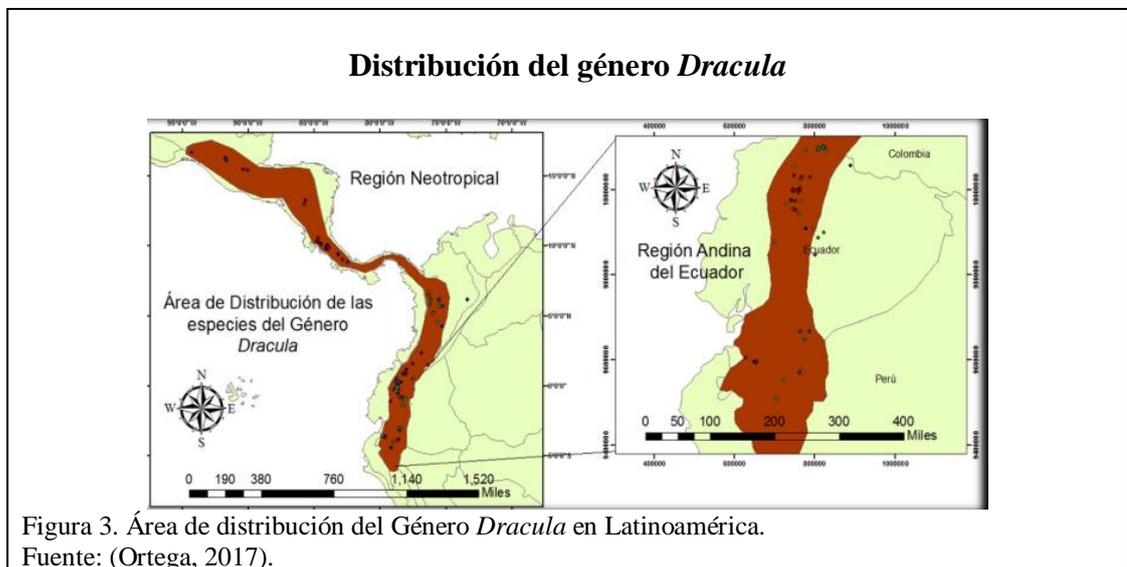
2.1. Diversidad y distribución del género

Desde su reagrupación en 1978, se han descrito casi cien especies nuevas de *Dracula*, mismas que presentan un bajo porcentaje de divergencia en las secuencias, y posiblemente no refleja en términos de patrones evolutivos, los modelos corrientes de clasificación subgenérica (Pupulin *et al.*, 2009).

El género es exclusivo del neotrópico, excluyendo a las Antillas, Venezuela, Bolivia y Brasil, distribuyéndose desde el sur de México hasta Perú, crece de entre los 1500 a 2500 metros, no obstante, en tierras bajas y cálidas se han encontrado poblaciones hasta los 200 a 300 metros, como también en bosques fríos con elevaciones de casi 3000 metros (Calderón & Farfán, 2003; Pupulin *et al.*, 2009), véase en la figura 3, su mayor diversidad se encuentra en los Andes septentrionales de Colombia y Ecuador,

encontrándose alrededor de 72 y 59 especies del este género respectivamente en esta zona, de las 120 especies conocidas de este género (Drinkell, 2007; Iza, 2018; Pupulin et al., 2009; Zambrano & Solano, 2011).

The Plant List (2018), describe 216 especies, de las cuales, 130 son aceptadas, Doucette (2011), a su vez menciona 130 especies en Latinoamérica 10 en América central, 6 en Panamá, 2 en Costa Rica y Nicaragua, e incluyen las especies de Colombia y Ecuador, a su vez Endara *et al.* (2010), refiere 148 especies, para este género.



La mayoría de las especies son epífitas, raramente terrestres en taludes húmedos cubiertos por capas espesas de humus y hojarasca (Pupulin *et al.*, 2009), las especies con hojas anchas crecen generalmente en los bosques nubosos oscuros y extremadamente húmedos, mientras que aquellas con hojas estrechas parecen adaptarse mejor a las áreas más secas y tolerar una luz solar más intensa (Baquero & Moncayo, 2017).

En Colombia, el género *Dracula* está diversificado en la cordillera central y los Andes occidentales (Calderón & Farfán, 2003), mientras que en Ecuador no se encuentran distribuidas de manera uniforme, es así que 49 especies registradas en

esta zona se encuentran restringidas a la vertiente occidental de los Andes y solamente 10 especies se conocen desde las alturas de la cuenca amazónica (el “Oriente” ecuatoriano) (Pupulin *et al.*, 2009).

La mayoría de las especies en el género son endémicas ya que poseen una distribución limitada, razón por la cual son vulnerables a factores externos como destrucción del hábitat o colecta excesiva y solo algunas como *Dracula vespertilio* se encuentra distribuida desde Nicaragua hasta el sur de Ecuador (Pupulin *et al.*, 2009), o *Dracula felix*, tienen grandes rangos geográficos (Baquero & Moncayo, 2017). Luer (1993), no solo reconoció formalmente el género, también desarrolló una clasificación subgenérica para las especies del género *Dracula*, dividiéndola en 3 subgéneros y 5 secciones para organizar la especie en grupos lógicos, véase en la tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación subgenérica actual de *Dracula*

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

Nota: Clasificación subgenérica del género *Dracula*, basada en las características morfológicas de sus flores. Se divide en 3 subgéneros incluyendo el subgénero *Dracula* que se divide en 5 secciones de las cuales la sección *Dracula* deriva en 2 subsecciones en donde la subsección *Dracula* se distribuye en 3 series.

Fuente: (Meyer & Cameron, 2009)

Especies representativas de la clasificación subgenérica del género *Dracula*

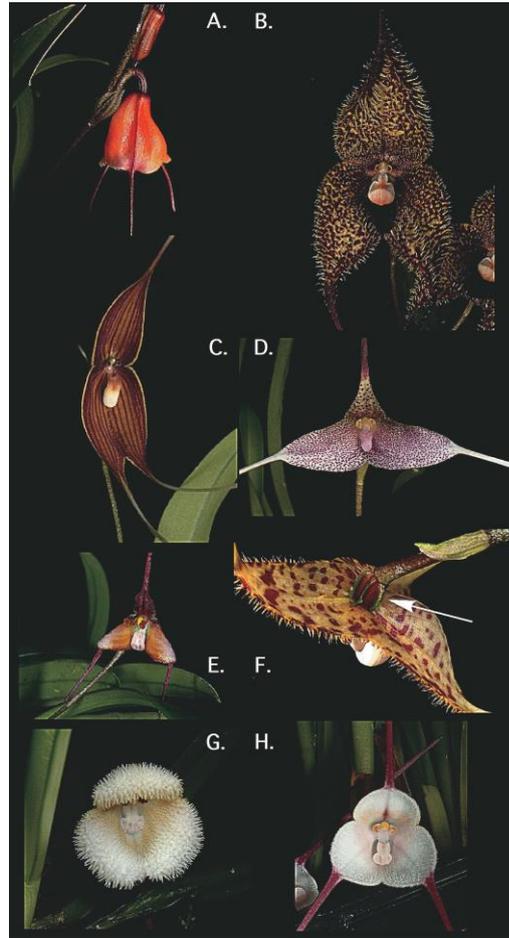


Figura 4. Especies representativas en el género Dracula.

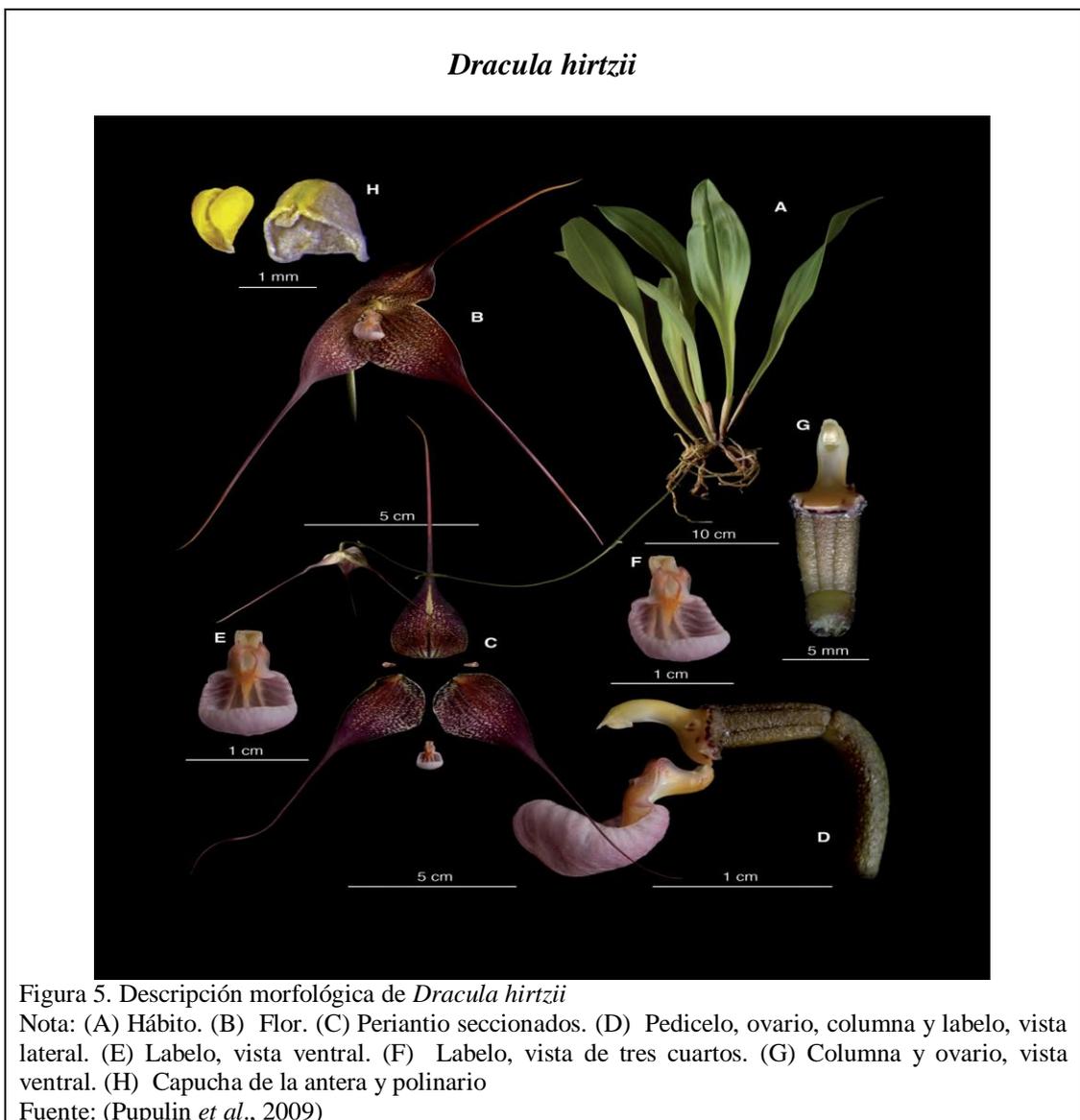
Nota: (A) *D. sodiroi*. (B) *D. wallisii*. (C) *D. dodsonii*. (D) *D. berthae*. (E) *D. cochliops*. (F) *D. vespertilio* (G) *D. saulii*. (H) *D. velutina*.

Fuente: (Meyer & Cameron, 2009).

2.2. Descripción morfológica

Las características vegetativas de las especies de *Dracula* las hacen sencillas de reconocer entre las especies de la familia Pleurothallidinae, es así que se caracterizan por poseer un tallo abreviado que está envuelto por brácteas membranosas, tubulares y sueltas que se vuelven parecidas al papel con la edad, contiene además una hoja que es delgada coriácea, adaxialmente sulcada, carinada abaxialmente, las inflorescencias nacen desde abajo en el tallo y brotan laterales una a una por pedúnculo, mismo que posee brácteas membranosas, tubulares y apretadas, y puede florecer individual o sucesivamente, sus sépalos están fusionados en su base y con

frecuencia forman una copa, son ovados, carnosos y de varios colores, poseen caudas de gran longitud y en su interior cubierto de pubescencia (Luer, 1993; Pupulin *et al.*, 2009). Es de gran importancia tener en cuenta que para el reconocimiento del género, la forma y disposición del labelo juega un papel importante, el labelo tiene forma cóncava con estrías que simulan un hongo y en algunos casos emiten una fragancia que parecida a un hongo (Policha *et al.*, 2016), a su vez, los pétalos flanquean la columna y son cartilagosos y pequeños, el labio se divide en un hipochilo hendido con una base cóncava articulada al pie de la columna y un epichilo que es cóncavo y está cubierto de quillas delgadas (laminillas) (Doucette, 2011).



2.3.Polinización

Córdoba *et al.* (2010), citado en Castellanos y Torres (2018), define a la polinización como el proceso de transferencia del polen desde los estambres hasta el estigma, para posteriormente dar origen a la capsula. Las orquídeas son plantas entomófilas, siendo los insectos sus principales polinizadores, no obstante existen varias especies que son polinizadas por aves y en ocasiones por el viento.

En los últimos años la investigación de la biología reproductiva de las especies de *Dracula* ha permitido una mayor comprensión en este tema, es así que los estudios sobre el mimetismo floral de estas especies, han exhibido la capacidad de sus flores para atraer a polinizadores (polinizadas por moscas que buscan hongos, generalmente dípteros, *Zygotricha spp*) en lugar de evitarlos, lo que ha dado lugar a la selección de rasgos florales por parte de los polinizadores, véase en la figura 6, *Dracula* posee flores que tienen un gran parecido en apariencia, fragancia, sincronización y ubicación con los hongos, ya que en la mayoría de estas orquídeas el labelo se asemeja a las superficies reproductivas de hongos (*Dentinger & Roy, 2010; Endara et al., 2010; Policha et al., 2016*).

Con su alta producción de semillas y su capacidad para viajar largas distancias y adaptarse en hábitats especializados, son uno de los pioneros ecológicos de la naturaleza. La polinización de una flor compatible puede resultar en la producción de miles de semillas similares, aumentando la posibilidad de mutaciones y quizás la evolución de nuevos taxones (*Dentinger & Roy, 2010; Guzmán & Moreno, 2014*).

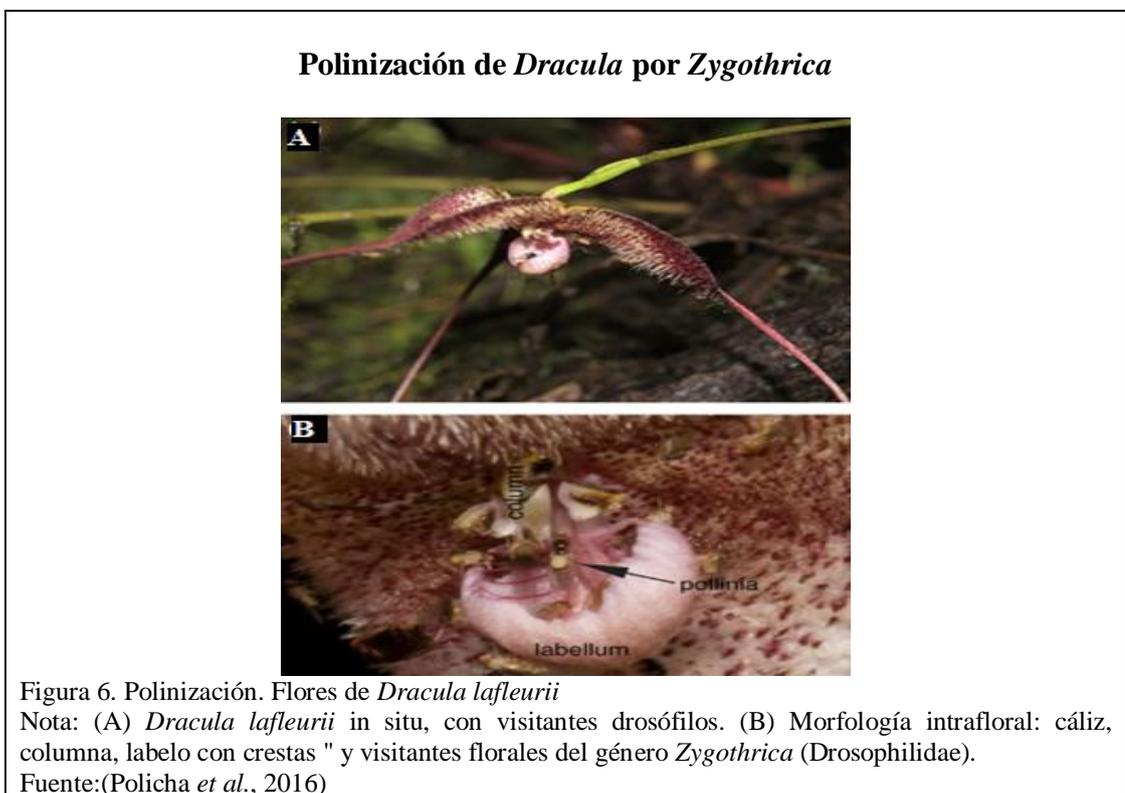
2.4.Hibridación del género

En los últimos años, los estudios realizados en especies del género *Dracula*, muestran la existencia de un alto grado de hibridación, señalando así la formación no

solo de híbridos de invernadero, si no también híbridos naturales como *D. calitrix*, *D. bellerophon* y *D. pinasensis* (Luer & Escobar, 1989; Pérez *et al.*, 2017).

Atribuyendo este proceso, a la coloración de las caudas y sépalos de sus flores, así como a la fragancia emitida por la columna y labelo que se asemejan a las moléculas aromáticas emitidas por los hongos, estas propiedades las hacen llamativas ante especies de moscas, en especial el género *Zygothrica* de la familia *Drosophilidae*, que participan en la polinización de las especies de este género, véase en la figura 6; es importante destacar que no existe especificidad de género de mosca por especie de *Dracula* (Policha *et al.*, 2016).

Es así que el paralelismo y la coevolución de los caracteres florales asociados con los polinizadores y la hibridación interespecífica han dado lugar a amplias variaciones morfológicas dentro de la especie. Esto hace que la identificación y clasificación de las especies usando solo caracteres morfológicos sea extremadamente difícil (Parveen, Singh, Malik, Raghuvanshi & Babbar, 2017).



3. Marcadores Moleculares

Se consideran marcadores moleculares a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que permite conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés, permitiendo estudiar y analizar el potencial genético de una población, con mayor precisión (Azofeifa, 2006; Barros, 2015; Hurtado, 2012), y a su vez facilita el estudio de prácticas de manejo y conservación, incluso de las especies en riesgo de extinción, no obstante, la viabilidad de estos estudios es limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, desde pequeñas muestras de tejido (Pérez *et al.*, 2011).

4. ADN Barcode

Carrión (2009), menciona que en los últimos años se ha estado estudiando nuevos métodos moleculares para la identificación rápida de orquídeas incluyendo aquellas que no están en floración, destacando entre ellos el método "DNA barcoding" (código de barra de ADN).

De acuerdo con Kress y Erickson (2012), citados por Parveen *et al.* (2017), el código de barras de ADN es una herramienta taxonómica que hace uso de una o más secuencias de genes cortas tomadas de un sector estandarizado del genoma para identificar especies mediante la comparación de secuencias de ADN registradas en bibliotecas genómicas. Parveen *et al.*(2017), Hollingsworth, Li, van der Bank, y Twyford (2016), señalan además, que esta herramienta molecular posee una gran ventaja ya que un organismo puede identificarse incluso cuando solo se dispone de un pequeño fragmento de tejido.

Para que una región de ADN sea empleada en el sistema barcode, debe presentar tres características, universalidad (que se encuentre presente en todas las plantas terrestres), facilidad técnica para obtener la secuencia y capacidad de discriminación (que varíe lo suficiente para distinguir a individuos de especies distintas), además la técnica del ADN barcode permite discriminar variaciones intra e inter específicas (conocido como barcoding gap), mediante la diferencia entre distancias genéticas de dichas variaciones dentro de un grupo de organismos (Hollingsworth, Li, van der Bank, & Twyford, 2016; Luo *et al.*, 2014; Parveen *et al.*, 2017).

Para el desarrollo del código de barra de ADN en plantas Singh, Parveen, Raghuvanshi y Babbar (2012), señalan que se tomó en cuenta tres genomas de las células vegetales, cloroplástico, mitocondrial (uniparental) y nuclear (biparental).

Es así que Parveen *et al.* (2017) y Hollingsworth *et al.* (2016), consideran al código de barras del ADN como una herramienta de identificación potencial y señalan cinco genes, *matK*, *rbcL*, *rpoB* *rpoC1* e *ITS*, como aquellos con mayor capacidad de discriminación de especies en orquídeas y plantas en general; A su vez Carrión (2009), señala a las regiones *matK*, *trnL-F* e *ITS*, como las secuencias universales para barcode; a esta lista Chen *et al.* (2010), añade las regiones *psbA-trnH*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *ITS2*, como marcadores universales en orquídeas, mientras que CBOL Plant Working Group *et al.* (2009), señala a *atpF-atpH*, *trnH-psbA*, y *psbK-psbI* como los espaciadores no codificantes más utilizados en estudios genéticos, véase en la figura 7.

Regiones de ADN empleadas en el sistema BARCODE

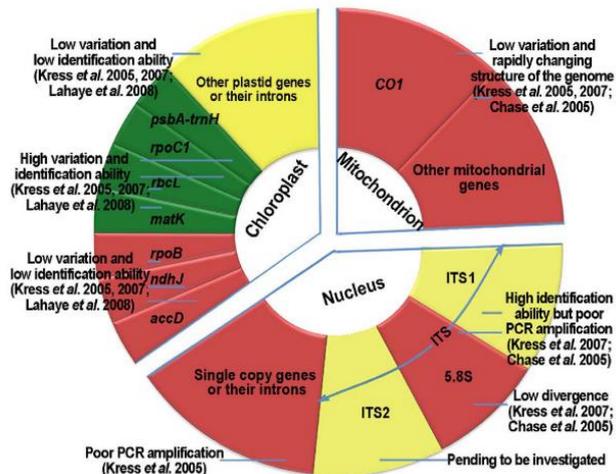


Figura 7. Regiones de ADN destinadas al sistema BARCODE en plantas

Nota: Las regiones verdes del sistema BARCODE son códigos de barras potenciales, los marcadores rojos no cumplen con el sistema Barcode y los marcadores amarillos se encuentran en investigación.

Fuente:(Chen et al., 2010).

Debido a que el empleo de las secuencias *ITS* y *matK* han proporcionado etiquetas de identificación molecular únicas en estudios realizados con especies de orquídeas de los géneros *Dendrobium* (Singh et al., 2012), *Epidendrum*, *Masdevallia* (Carrión, 2009), *Vanilla* (Hurtado, 2012) y especies ecuatorianas de *Dracula* (Iza, 2018), se ha decidido emplear dichos genes en este estudio, para comprobar su eficacia como herramientas moleculares dentro del género *Dracula*.

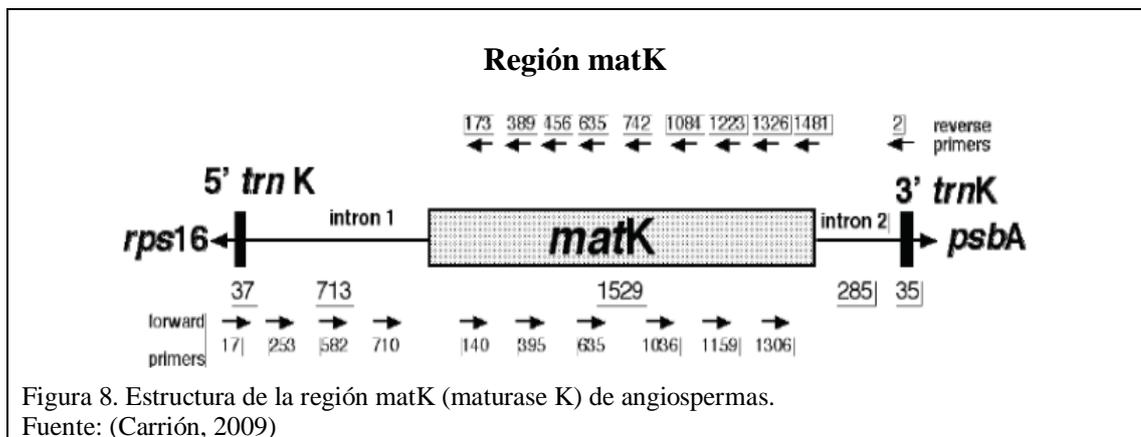
4.1. Región *matK*

El gen *matK* es una de las secciones de codificación de evolución más rápida del genoma del plástido y posee un signo filogenético alto, razón por la cual ha sido aceptado para el sistema código de barras de ADN en plantas con flores (Castellanos & Torres, 2018; Park, Kim, & Lee, 2017).

EL gen *matK* está formado por 1500bp alojadas entre dos intrones que son interrumpidos por los exones 5` y 3` de *trnK* en el genoma de cloroplastos de la mayoría de las plantas, véase en la figura 8, (Salazar, Chase, Soto Arenas, &

Ingrouille, 2003). La región 3` es relativamente conservada y la región 5` menos conservada ofreciendo dos conjuntos de caracteres que se pueden utilizar en diferentes niveles taxonómicos, proporcionando información molecular para resolver las relaciones filogenéticas a niveles más profundos (Carrión, 2009).

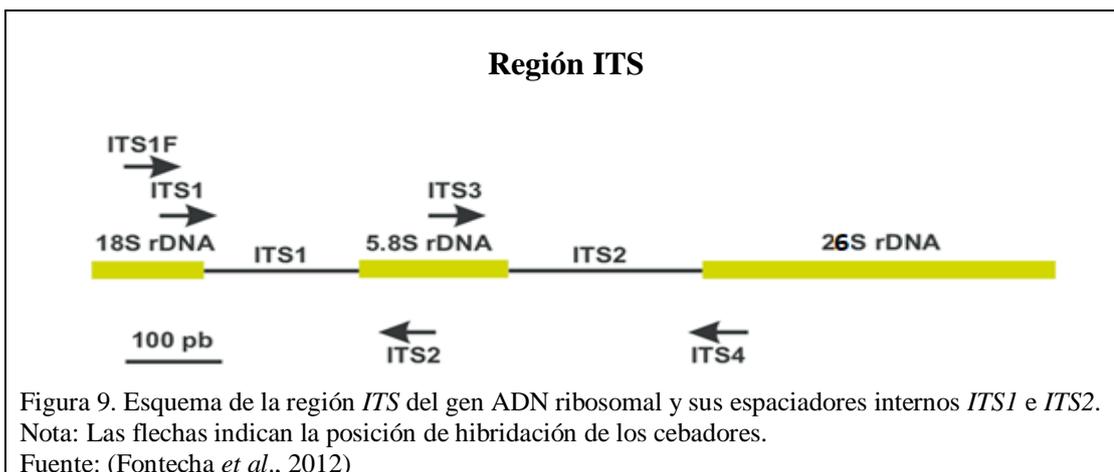
Este gen codifica la enzima Maturase, que ayuda a la conformación y maduración de un ARN de transferencia en los cloroplastos y es requerida para la función normal de la fotosíntesis (Hurtado, 2012; Luo *et al.*, 2014).



4.2. Región *ITS*

Carrión, (2009), señala que los genes de ADN nuclear ribosomal (ADNr) de las plantas se organizan en tandem repetido, que se organiza en una región transcrita entre los genes 16S y 28S. Se reconocen dos *ITS* en eucariotas; *ITS1* que se encuentra entre los genes 18S y 5.8S, mientras que *ITS2* se localiza entre los genes de 5.8S y 26S en plantas, 28S en opisthokonts, véase en la figura 9, (Rogers, 2012).

Los espaciadores *ITS1* e *ITS2* han mostrado constituir una valiosa fuente de caracteres moleculares para reconstruir la filogenética de las plantas desde el nivel de género hasta el nivel familiar (Han *et al.*, 2013). Las secuencias 5.8S- *ITS2* pueden proporcionar información a niveles filogenéticos más profundos, mientras que la región *ITS1*-5.8S-*ITS2* se ha usado para estudiar las relaciones entre grupos de Orchidaceae (Feng *et al.*, 2015).



A continuación se enlistan las regiones estudiadas y recomendadas en plantas dentro de la técnica del ADN BARCODE (Tabla 2).

Tabla 2.

Trabajos comparativos de varios loci propuestos como códigos de barras genéticos en orquídeas.

Estudio	Regiones estudiadas	Regiones recomendadas
(Kim y Chase, 2017)	<i>ycf1-rpl32</i>	<i>ycf1-rpl32</i>
(Han <i>et al.</i> , 2013)	<i>ITS, ITS2</i>	<i>ITS2</i>
(Yuan <i>et al.</i> , 2015)	<i>rbcL, matK, trnH-psbA, ITS</i>	<i>ITS, matK, rbcL</i>
(Pridgeon, Solano, y Chase, 2001)	<i>ITS1, ITS2, matK, trnL-F</i>	<i>ITS1, matK</i>
(Hurtado, 2012)	<i>ITS, matK, rbcL, rpoB, and rpoC1,</i>	<i>ITS, matK</i>
(Park, Kim, & Lee, 2017)	<i>rbcLa, matK, trnL-trnF, psbA-trnH</i>	<i>rbcLa, matK, trnL-trnF, psbA-trnH</i>
(Chen <i>et al.</i> , 2010)	<i>psbA-trnH, matK, rbcL, rpoC1, ycf5, ITS2, ITS</i>	<i>ITS2, rbcL + matK</i>
(Iza, 2018)	<i>matK, rpoC1 y rpoB</i>	<i>matK</i>
(Bogarín <i>et al.</i> , 2018)	<i>ITS, matK</i>	<i>ITS, matK</i>
(Carrión, 2009)	<i>matK, trnL-F, ITS</i>	<i>ITS, matK</i>
(Fazekas <i>et al.</i> , 2008)	<i>rpoB, rpoC1, rbcL, matK, 23S Rdna, trnH-psbA, psbK - psbI</i>	<i>trnH-psbA, psbK - psbI, matK</i>
(Hu <i>et al.</i> , 2016)	<i>ITS, matK, trnL-F</i>	<i>ITS, matK</i>
(Luo <i>et al.</i> , 2014)	<i>ycf1, matK, ccsA, accD</i>	<i>ycf1, matK,</i>
(Singh <i>et al.</i> , 2012)	<i>rbcL, rpoB, rpoC1, trnH-psbA, ITS, matK</i>	<i>ITS, matK, rpoB, rpoC1</i>
(Parveen <i>et al.</i> , 2017)	<i>rbcL, rpoB, rpoC1, ITS, matK</i>	<i>rbcL, rpoB, rpoC1, matK</i>

Elaborado por: Los autores, 2018.

Capítulo II

1. Materiales y métodos

1.1. Colección de muestras

El permiso de investigación y colección se lo realizó mediante el Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos No. MAE-DNB-CM-2018—0083 (Revisión molecular de las especies del género *Dracula* Orchidaceae, cultivo en invernadero e in-vitro).

El material vegetal estudiado pertenece a 119 especies Latinoamericanas del género *Dracula*; mismas que fueron recolectadas en el Jardín Botánico de Quito, colecciones privadas pertenecientes a Beto Guerrero, Sara Gutiérrez y Alexander Marín (Quito-Pichincha), Héctor Yela (Carchi), Ecuagenera (Pepe Portilla), Mundiflora (Iván Ácaro) y Ecuafior (Mario Portilla) (Cuenca-Azuay), muestras que fueron identificadas previamente por especialistas, alcanzando un total de 176 muestras incluyendo 3 especies del género *Masdevallia* y 1 especie del género *Trisetella*, véase en la tabla 4 y anexo 5.

Las muestras de tejido recolectado, fue material fresco, sin daños mecánicos y sin huellas de enfermedades, el corte se realizó con hoja de afeitar *Gillette* estéril para cada muestra, mismas que se almacenaron en bolsas de papel Kraf previamente etiquetadas. El transporte del material vegetal se lo realizó en un recipiente térmico con el fin de evitar la degradación de las muestras, finalmente se almacenaron en un congelador *TEMPLOW Selecta* a -20 °C, para su posterior análisis; técnica descrita por Agrocalidad (2015).

1.2. Estudio molecular

El desarrollo del estudio experimental se llevó a cabo en, el “Laboratorio de ciencias de la vida” de la Universidad Politécnica Salesiana, campus Girón, ubicado en la ciudad de Quito durante el período junio – diciembre del 2018.

1.2.1. Extracción de ADN

Para el estudio de la región *ITS*, el ADN total de los individuos se extrajo mediante la técnica referida por *Doyle & Doyle* (1987), modificado por García (2015); Iza (2018) y Mazo (2011), el método consiste en macerar 20-30 mg de muestra en microtubos de 2 mL con 600 μ L de Buffer de Lisis (100mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl), a continuación se agitan los tubos hasta obtener una mezcla homogénea, para luego añadir 94 μ L de Dodecilsulfato sódico SDS 10%, se mezcla por inversión de 5 a 8 veces y se incuba la solución durante 10 minutos a 65°C en un termo bloque; concluido este tiempo se añade 94 μ L de acetato de potasio (5M), se mezcla por inversión de 5 a 8 veces y se refrigera por 5 min; luego se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos, en este paso se forman 2 fases y se traslada el sobrenadante a un microtubo nuevo (2 mL), después se añade 600 μ L de fenol: cloroformo (1:1) y se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos; aquí se transfiere el sobrenadante (aproximadamente unos 250 μ L) con ayuda de una pipeta en un nuevo microtubo(1.5 mL), evitando tomar las proteínas precipitadas, después se añade 360 μ L de isopropanol frío, agitando por inversión de 5 a 8 veces y se almacena a -20°C por 30 min o toda la noche; una vez terminado el tiempo se centrifuga las muestras durante 3 minutos a 13 000 rpm y se observa al final del tubo el pellet, se elimina el sobrenadante mediante inversión, se realizan tres lavados añadiendo con 400 μ L de etanol (70%) y centrifugando cada vez por 3 minutos a 13000 rpm, para luego con

ayuda del termo bloque a 37°C evaporar el alcohol restante y así resuspender el pellet en 30 µL de TE 1X (10mM TrisCl (pH 8) y 1 mM EDTA) y almacenarlo a -20°C.

Para trabajar con la región *matK*, se extrajo el ADN y amplificó con el kit comercial *Thermo Scientific, Phire Plant Direct*, PCR, siguiendo el protocolo directo para plantas (tejido fresco), se tomó un corte circular de 0.5mm de tejido foliar de la muestra previamente desinfectada y se colocó en un microtubo de PCR, a continuación se preparó la solución *Master mix PCR kit* para 25 µL como menciona *Thermo Fisher Scientific* (2018).

1.2.2 Cuantificación de ADN

La presencia o ausencia de ADN se determinó mediante la técnica electroforesis horizontal, bajo el protocolo referido por Lee, Costumbrado, Hsu, y Kim (2012); para lo cual se preparó 50ml de gel de agarosa al 1% , el cual se elaboró con 0,5g de agarosa, 5 µL del flurocromo *Sybr safe* y 50 mL de TBE 1X (se obtiene a partir del TBE 10X, elaborado con: 54 g de tris base; 27.5 g de ácido bórico y 2.93 g EDTA 0.5 M, aforado a 500 ml con un pH8). El gel se dispuso en una cámara de electroforesis *Labnet* y cada posillo se inoculó con una combinación de 4 µL de ADN y 4 µL de tampón de carga *Blue Juice 2X*, el programa de la cámara fue de 90V por 40 minutos.

Para estimar el tamaño y concentración de las bandas de ADN obtenidas se utilizó el marcador molecular *O`GeneRuler Express DNA Ladder* 100 a 5000 bp y 40 – 100 ng/0.5µg (Thermo Fisher Scientific, 2018), para lo cual se pone 3µL del marcador molecular en el primer posillo del gel. Finalmente el gel fue visualizado y

digitalizado en el foto documentador *Bio-imaging systems* ® técnica empleada por (Fuertes & Mallitasig, 2018; Iza, 2018; Luo *et al.*, 2014).

1.2.3. Amplificación de ADN

Se amplificaron las regiones de ADN cloroplástico empleando los primers matK-1RKIM (F) (5'ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3') y matK-3FKIM (R) (5'CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3') y las regiones nucleares con los primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, empleando el kit *Phire Plant Direct PCR Master* de *Thermo Fisher Scientific* (2018), como describe en la tabla 3; para la amplificación de la región intergénica *ITS* se utilizó el ADN extraído mediante la técnica *Doyle & Doyle*, mientras que para el gen *matK*, se realizó la amplificación directa, este proceso se realizó en el termociclador *MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler*. Durante el proceso de amplificación de la región nuclear *ITS* se añadió en la master mix sulfóxido de dimetilo DMSO en una concentración del 8% del total de la mezcla, con el fin de mejorar la reacción mediante la interrupción de apareamiento de bases y reduciendo efectivamente la Temperatura de melting (Lorenz, 2012).

Tabla 3.**Mezcla PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix**

Reactivo/concentración	Volumen para 1 muestra	Volumen para 13 muestras
Phire Plant Direct PCR Master Mix	12.5 µL	162.5 µL
Primer Forward (10 µM)	0.5 µL	6.5 µL
Primer Reverse (10 µM)	0.5 µL	6.5 µL
Disolution	1.25 µL	16.25 µL
Agua libre de ARNasas	7.25 µL	120.25 µL
DMSO	2 µL	26 µL
ADN	1 µL	1 µL para cada muestra
Total	25 µL	325 µL

Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Las condiciones de temperatura empleadas para la amplificación de la región cloroplástica *matK* fueron: 1min a 94 °C, 30 ciclos de: (30 seg. a 94 °C; 40 seg. a 53 °C; 40 seg. a 72 °C) y 5 min a 72 °C; condiciones empleadas por Iza (2018).

Mientras que la amplificación de la región nuclear *ITS* se llevó a cabo a una temperatura de hibridación de 56 °C, la secuencia de temperatura del termociclador fue: 1min a 94 °C, 30 ciclos de: (30 seg. a 94 °C; 40 s a 56 °C; 40 s a 72 °C) y 5 min a 72 °C.

El producto PCR fue evaluado mediante la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. El protocolo de elaboración del gel, programa de la cámara electroforética y visualización de los resultados, es similar al empleado en la cuantificación de ADN. Cada pocillo del gel se inoculó con 4 µL del producto PCR y la concentración de ADN se comparó con el marcador molecular de 100 a 1500 bp *DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, 2018).

1.2.4. Secuenciación

La secuenciación y purificación de los productos PCR se realizaron en la empresa *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea), siguiendo el método clásico de Sanger; para ello se

envió al vacío en fundas ziploc, microtubos (1,5mL) con un volumen de 20µL del producto PCR diluido con agua libre de nucleasas a una concentración de 20 ng/uL.

1.3. Filogenia

La calidad de las secuencias de los segmentos de la región *matK* e *ITS* obtenidas se determinó mediante el programa *FinchTV* versión 1.4.0, mientras que, la alineación se realizó con el software *Muscle* del programa *Mega 7* (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016), para así formar los árboles filogenéticos con el método estadístico *Maximum Likelihood*, y el modelo evolutivo *Tamura-Nei*, técnica empleada por (Costa & Wilkinson, 2017). A continuación las secuencias fueron comparadas en la *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), para determinar si dichas secuencias corresponden a alguna especie registrada en esta base de datos.

Se trabajó con los géneros *Masdevallia* y *Trisetella* de la familia Orchidaceae como grupo externo, estas secuencias permitieron la comparación y enraizamiento de las secuencias obtenidas, tal como señala Carrión (2009), quien además asume que la divergencia que existe entre el grupo externo e interno se debe a que los caracteres que se hallan en los grupos externos son más parecidos a las secuencias restantes del grupo interno.

1.4. Georreferenciación

El análisis de los datos geográficos se realizaron en el programa *DIVA GIS v7* (2018), a partir de la ubicación y distribución de las especies del género *Dracula* dispuesta por Luer (1993) en el libro “*Icones Pleurothallidarum X. Systematics of Dracula (Orchidaceae)*”, coordenadas geográficas que fueron encontradas “*Google Earth*” (2018) y en la base de datos “*Tropicos*” (2018).

Capítulo III

1. Resultados y discusión

1.1. Colección de muestras

La colección de muestras de tejido foliar de las especies Latinoamericanas del género *Dracula* se realizó en 7 orquidearios: Jardín Botánico de Quito 96 muestras, Beto Guerrero 13 muestras, Alexander Marín 21 muestras, Sara Gutiérrez 1 muestra, Ecuagenera 29 muestras, Mundiflora 7 muestras y Ecuaflore 9 muestras, obteniendo un total de 176 muestras, véase en la tabla 4, de las cuales 3 especies son del género *Masdevallia*, 1 del género *Trisetella* y 119 del género *Dracula*, lo que representa el 91% de las especies según lo descrito en The Plant List (2018).

Tabla 4.

Lista de las especies Latinoamericanas del género *Dracula* colectadas para el estudio.

Número de muestra	Nombre científico	Código de colección	Lugar de colección	Lugar de origen	Fecha de colecta
1	<i>Dracula agnosia</i>	4035	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
2	<i>Dracula alcithoe</i>	3914	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
3	<i>Dracula alcithoe</i>	4055	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
4	<i>Dracula amaliae</i>	3915	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
5	<i>Dracula amaliae</i>	4056	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
6	<i>Dracula andreetae</i>	3916	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
7	<i>Dracula anicula</i>	4080	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
8	<i>Dracula antonii</i>	3990	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
9	<i>Dracula anthracina</i>	3917	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
10	<i>Dracula anthracina</i>	3918	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
11	<i>Dracula anthracina</i>	3988	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
12	<i>Dracula anthracina</i>	3989	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018

13	<i>Dracula antonii</i>	3900	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
14	<i>Dracula aphrodes</i>	3919	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
15	<i>Dracula astuta</i>	3878	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
16	<i>Dracula astuta</i>	4044	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
17	<i>Dracula astuta</i>	3872	Ecuafior	Colombia	31/5/2018
18	<i>Dracula barrowii</i>	3920	Jardín Botánico Quito	Perú	6/7/2018
19	<i>Dracula bella</i>	3921	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
20	<i>Dracula bella</i>	3922	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
21	<i>Dracula bellerophon</i>	3898	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
22	<i>Dracula benedictii</i>	4045	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
23	<i>Dracula benedictii</i>	3871	Ecuafior	Colombia	31/5/2018
24	<i>Dracula benedictii</i>	3905	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
25	<i>Dracula benedictii</i>	3907	Mundiflora	Colombia	2/6/2018
26	<i>Dracula benedictii</i>	3908	Mundiflora	Colombia	2/6/2018
27	<i>Dracula venefica</i>	4029	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
28	<i>Dracula berthae</i>	3923	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
29	<i>Dracula brangeri</i>	4004	Jardín Botánico Quito	Colombia	12/9/2018
30	<i>Dracula brangeri</i>	4038	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
31	<i>Dracula callitrix</i>	4050	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
32	<i>Dracula carcinopsis</i>	3886	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
33	<i>Dracula carlueri</i>	4067	Alexander Marín	Costa Rica	4/12/2018
34	<i>Dracula chestertonii</i>	3924	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
35	<i>Dracula chestertonii</i>	3925	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
36	<i>Dracula chimaera</i>	3926	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
37	<i>Dracula chimaera</i>	3927	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
38	<i>Dracula chiroptera</i>	3928	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
39	<i>Dracula chiroptera</i>	3929	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
40	<i>Dracula circe</i>	3930	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
41	<i>Dracula citrina</i>	3880	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
42	<i>Dracula citrina</i>	4082	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
43	<i>Dracula cochliops</i>	3931	Jardín Botánico	Colombia	6/7/2018

			Quito		
44	<i>Dracula colombiana</i>	3932	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
45	<i>Dracula cordabae</i>	3933	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
46	<i>Dracula christineana</i>	4070	Alexander Marín	Ecuador	4/12/2018
47	<i>Dracula cutis bufonis</i>	3934	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
48	<i>Dracula dalesandroi</i>	4033	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
49	<i>Dracula deniseana</i>	3901	Ecuagenera	Perú	1/6/2018
50	<i>Dracula dens canis</i>	3935	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
51	<i>Dracula diabola</i>	3936	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
52	<i>Dracula diabola</i>	3937	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
53	<i>Dracula diana</i>	3938	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
54	<i>Dracula dodsonii</i>	4047	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
55	<i>Dracula dodsonii</i>	3992	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
56	<i>Dracula ecuagenerensi porroglosum</i>	4052	Beto Guerrero	Ecuador	29/11/2018
57	<i>Dracula erythrochaete</i>	3939	Jardín Botánico Quito	Costa Rica	6/7/2018
58	<i>Dracula erythrochaete</i>	3940	Jardín Botánico Quito	Costa Rica	6/7/2018
59	<i>Dracula exasperata</i>	3941	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
60	<i>Dracula felix</i>	3942	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
61	<i>Dracula felix</i>	3943	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
62	<i>Dracula fuligifera</i>	3944	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
63	<i>Dracula gigas</i>	3945	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
64	<i>Dracula gorgona</i>	3946	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
65	<i>Dracula gorgona</i>	3947	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
66	<i>Dracula gorgonella</i>	3897	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
67	<i>Dracula gorgonella</i>	4081	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
68	<i>Dracula hawleyi</i>	4066	Alexander Marín	Ecuador	4/12/2018
69	<i>Dracula hirtzii</i>	3948	Jardín Botánico	Ecuador	6/7/2018

			Quito		
70	<i>Dracula hirtzii</i>	3949	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
71	<i>Dracula houtteana</i>	3952	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
72	<i>Dracula houtteana</i>	3950	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
73	<i>Dracula houtteana</i>	3951	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
74	<i>Dracula hubeinii</i>	4068	Alexander Marín		4/12/2018
75	<i>Dracula inaequalis</i>	3887	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
76	<i>Dracula inaequalis</i>	3870	Ecuaflores	Colombia	31/5/2018
77	<i>Dracula insolita</i>	3953	Tervor	Colombia	24/5/2018
78	<i>Dracula trichroma</i>	3954	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
79	<i>Dracula janetiae</i>	3902	Ecuagenera	Perú	1/6/2018
80	<i>Dracula janetiae</i>	4074	Alexander Marín	Perú	4/12/2018
81	<i>Dracula lemurella</i>	3955	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
82	<i>Dracula levii</i>	3906	Ecuagenera	Ecuador	1/6/2018
83	<i>Dracula levii</i>	3869	Ecuaflores	Ecuador	31/5/2018
84	<i>Dracula levii</i>	4003	Jardín Botánico Quito	Ecuador	12/9/2018
85	<i>Dracula ligiae</i>	4034	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
86	<i>Dracula ligiae</i>	4064	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
87	<i>Dracula lotax</i>	4032	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
88	<i>Dracula maduroi</i>	3891	Ecuagenera	Panamá	1/6/2018
89	<i>Dracula mantissa</i>	3893	Ecuagenera	Ecuador	1/6/2018
90	<i>Dracula mantissa</i>	4058	Beto Guerrero	Ecuador	29/11/2018
91	<i>Dracula marsupialis</i>	4046	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
92	<i>Dracula marsupialis</i>	3912	Mundiflora	Ecuador	2/6/2018
93	<i>Dracula marsupialis</i>	3913	Mundiflora	Ecuador	2/6/2018
94	<i>Dracula mendozae</i>	3956	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
95	<i>Dracula minax</i>	3957	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
96	<i>Dracula mopsus</i>	4040	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
97	<i>Dracula mopsus</i>	3958	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
98	<i>Dracula morleyi</i>	4053	Beto Guerrero	Ecuador	29/11/2018
99	<i>Dracula morleyi</i>	4073	Alexander Marín	Ecuador	4/12/2018
100	<i>Dracula nosferatu</i>	4049	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
101	<i>Dracula navarrorum</i>	4048	Jardín Botánico	Ecuador	29/11/2018

			Quito		
102	<i>Dracula navarrorum</i>	4061	Beto Guerrero	Ecuador	29/11/2018
103	<i>Dracula nycterina</i>	3884	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
104	<i>Dracula nycterina</i>	4078	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
105	<i>Dracula octavioi</i>	4075	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
106	<i>Dracula olmosii</i>	4041	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
107	<i>Dracula olmosii</i>	3959	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
108	<i>Dracula olmosii</i>	3960	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
109	<i>Dracula ophioceps</i>	3961	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
110	<i>Dracula orientalis</i>	4059	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
111	<i>Dracula orientalis</i>	3888	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
112	<i>Dracula papillosa</i>	4037	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
113	<i>Dracula pholeodytes</i>	3962	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
114	<i>Dracula pinacensis</i>	3910	Mundiflora		2/6/2018
115	<i>Dracula platycrater</i>	3882	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
116	<i>Dracula platycrater</i>	4063	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
117	<i>Dracula polyphemus</i>	3991	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
118	<i>Dracula portillae</i>	3876	Ecuaflo	Ecuador	31/5/2018
119	<i>Dracula posadarum</i>	3885	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
120	<i>Dracula posadarum</i>	4062	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
121	<i>Dracula presbys</i>	3963	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
122	<i>Dracula psittacina</i>	3883	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
123	<i>Dracula psyche</i>	4030	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
124	<i>Dracula pubescens</i>	4072	Alexander Marín	Ecuador	4/12/2018
125	<i>Dracula radiosa</i>	3874	Ecuaflo	Colombia	31/5/2018
126	<i>Dracula radiosa</i>	4002	Jardín Botánico Quito	Colombia	12/9/2018
127	<i>Dracula radiosa</i>	3964	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
128	<i>Dracula radiosa</i>	3903	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
129	<i>Dracula raven</i>	3873	Ecuaflo	Colombia	31/5/2018
130	<i>Dracula raven</i>	3895	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
131	<i>Dracula ripleyana</i>	3899	Ecuagenera	Costa Rica	1/6/2018
132	<i>Dracula robledorum</i>	4060	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
133	<i>Dracula robledorum</i>	3890	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
134	<i>Dracula roezlii</i>	3894	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
135	<i>Dracula saulii</i>	4031	Jardín Botánico Quito	Perú	29/11/2018

136	<i>Dracula senex furens</i>	4054	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018
137	<i>Dracula sergioi</i>	4069	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
138	<i>Dracula severa</i>	3965	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
139	<i>Dracula sibundoyensis</i>	3966	Jardín Botánico Quito	Ecuador Colombia	6/7/2018
140	<i>Dracula sijmii</i>	4076	Alexander Marín	Ecuador	5/12/2018
141	<i>Dracula simia</i>	4036	Jardín Botánico Quito	Ecuador	29/11/2018
142	<i>Dracula smaug</i>	3967	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
143	<i>Dracula sp</i>	3909	Mundiflora		2/6/2018
144	<i>Dracula sp</i>	3911	Mundiflora		2/6/2018
145	<i>Dracula syndactyla</i>	3968	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
146	<i>Dracula trichroma</i>	3879	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
147	<i>Dracula tsubotae</i>	3877	Ecuaflo	Colombia	31/5/2018
148	<i>Dracula tsubotae</i>	3896	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
149	<i>Dracula tsubotae</i>	4077	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
150	<i>Dracula tubeana</i>	3993	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
151	<i>Dracula veleziana</i>	3969	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
152	<i>Dracula velutina</i>	3970	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
153	<i>Dracula venefica</i>	3892	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
154	<i>Dracula venosa</i>	3971	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
155	<i>Dracula sp</i>	3875	Ecuaflo		31/5/2018
156	<i>Dracula verticulosa</i>	4042	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
157	<i>Dracula verticulosa</i>	3972	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
158	<i>Dracula verticulosa</i>	3973	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
159	<i>Dracula vespertilio</i>	4043	Jardín Botánico Quito	Nicaragua	29/11/2018
160	<i>Dracula vespertilio</i>	3974	Jardín Botánico Quito	Nicaragua	6/7/2018
161	<i>Dracula vierlingii</i>	3975	Tervor	Ecuador	24/5/2018
162	<i>Dracula villegasii</i>	3889	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
163	<i>Dracula vinacea</i>	3904	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
164	<i>Dracula vinacea</i>	4079	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
165	<i>Dracula vlad-tepes</i>	3881	Ecuagenera	Colombia	1/6/2018
166	<i>Dracula wallisii</i>	3976	Jardín Botánico Quito	Colombia	6/7/2018
167	<i>Dracula wallisii</i>	4057	Beto Guerrero	Colombia	29/11/2018

168	<i>Dracula wolwardiae</i>	3977	Jardín Botánico Quito	Ecuador	6/7/2018
169	<i>Dracula x olmosii</i>	4039	Jardín Botánico Quito	Colombia	29/11/2018
170	<i>Dracula x rojasi</i>	4051	Beto Guerrero		29/11/2018
171	<i>Dracula xanthina</i>	4071	Alexander Marín		4/12/2018
172	<i>Dracula xenos</i>	4065	Alexander Marín	Colombia	4/12/2018
173	<i>Masdevallia picturata</i>	3980	Jardín Botánico Quito	Costa Rica	4/6/2018
174	<i>Masdevallia picturata</i>	3981	Jardín Botánico Quito	Costa Rica	4/6/2018
175	<i>Masdevallia picturata</i>	3982	Jardín Botánico Quito	Costa Rica	4/6/2018
176	<i>Trisetella sp.</i>	3987	Jardín Botánico Quito		4/6/2018

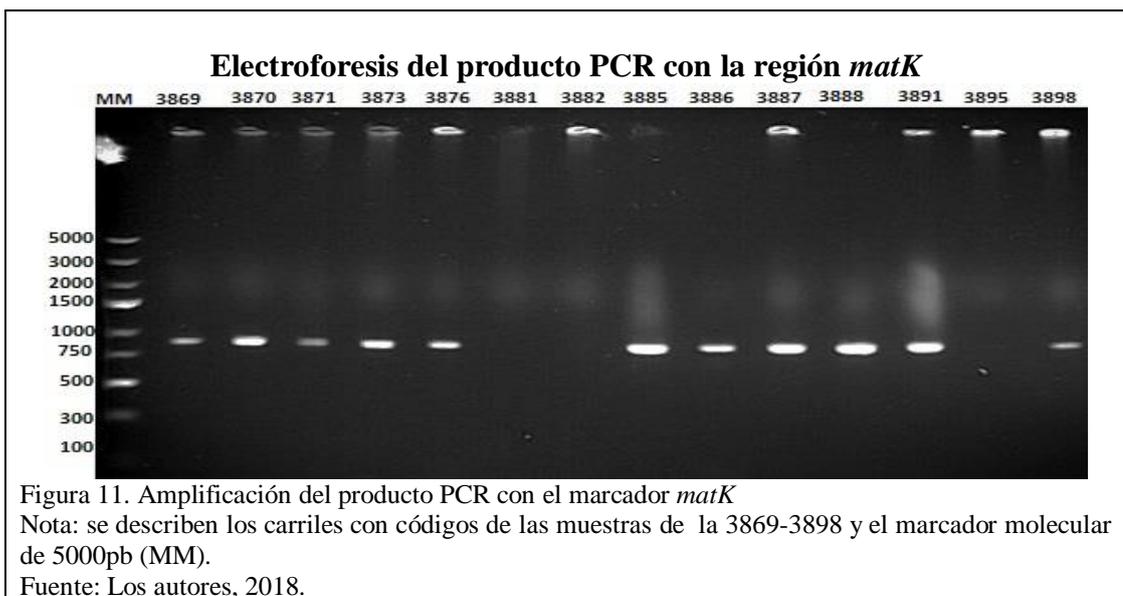
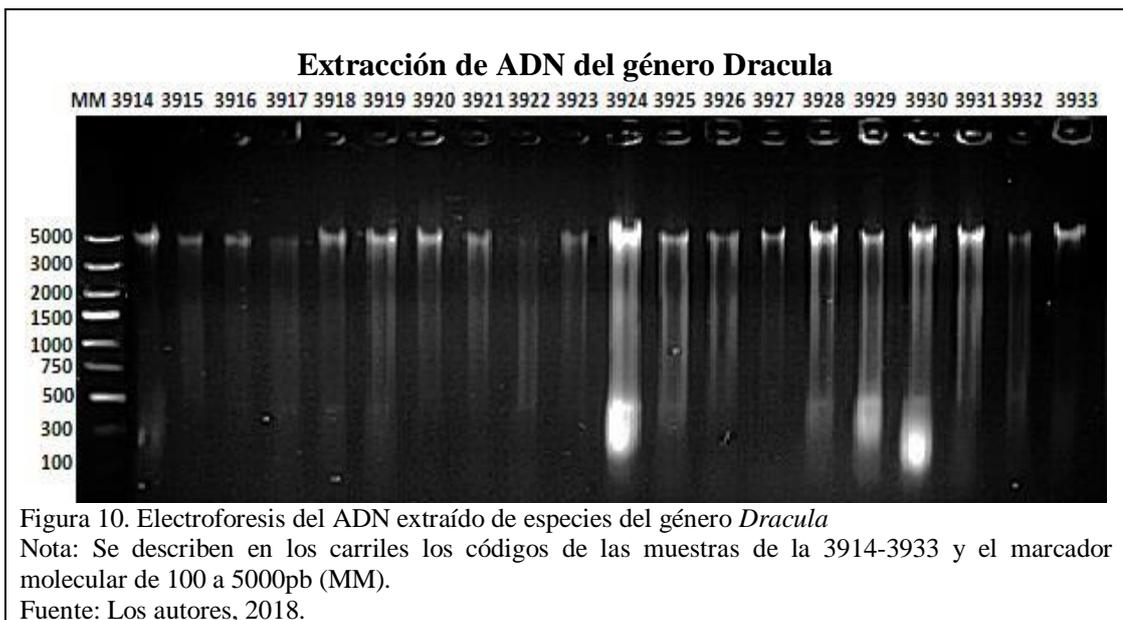
Nota: Especies del género *Dracula* validadas en The Plant List (2018), código de colección del libro de campo del grupo de investigación NUNCUI WAKAN
Fuente: Los autores, 2018.

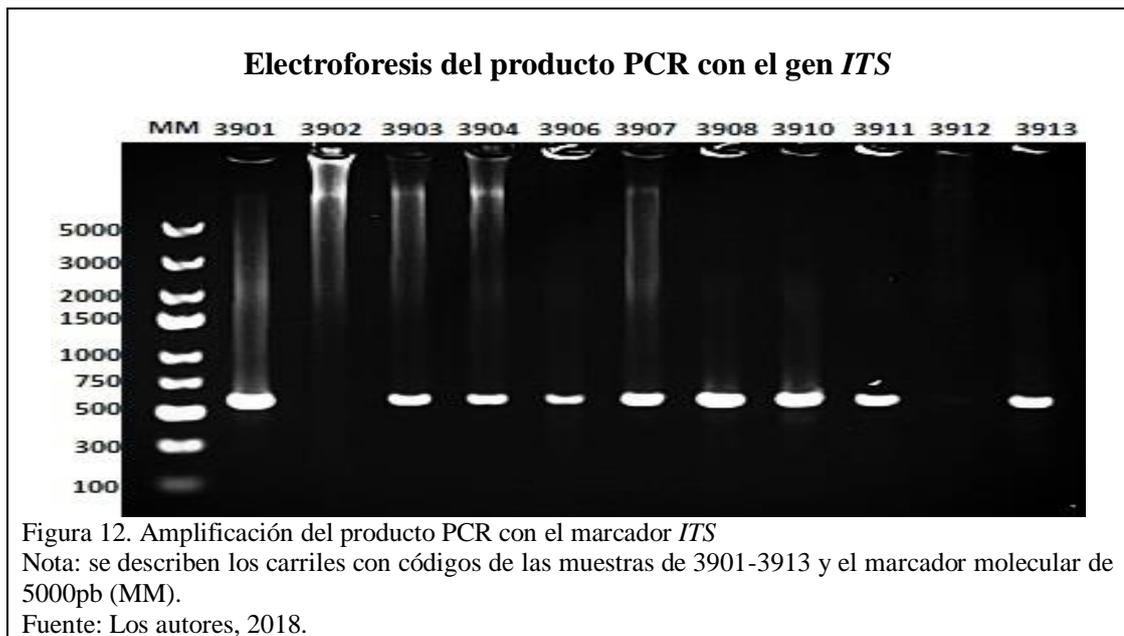
1.2. Estudio molecular

De las 176 muestras colectadas se extrajo ADN de 119 individuos (68%) bajo el método modificado de Doyle & Doyle (1987), no se pudo obtener ADN del 32% restante debido a la degradación del tejido foliar por presencia de altas concentraciones de glúcidos en algunas especies. Las bandas de ADN obtenidas presentaron alrededor de 5000pb, este resultado coincide con los datos obtenidos en el estudio “Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula*, mediante el sistema BARCODE” realizado por Iza (2018), véase en la figura 10.

De las 119 muestra de ADN se logró amplificar 40 muestras con el espaciador intergénico *ITS*. Las secuencias obtenidas tuvieron una calidad superior al 70%, el tamaño del amplicón promedio fue de 550 pb, resultado que concuerda con lo descrito por Tang *et al*, (2017), en el estudio “DNA barcoding identification of endangered medicinal plants of Orchidaceae” utilizando la región intergénica *ITS*, véase en la figura 12.

En el estudio de región *matK* se amplificó mediante la técnica PCR 112 muestras de los 176 individuos colectados, de las cuales 84 secuencias tuvieron una calidad superior al 70%, el tamaño del amplicón tuvo una longitud promedio de 750pb después de eliminar los extremos con ruido, coincidiendo con lo obtenido por Iza (2018), véase en la figura 11.





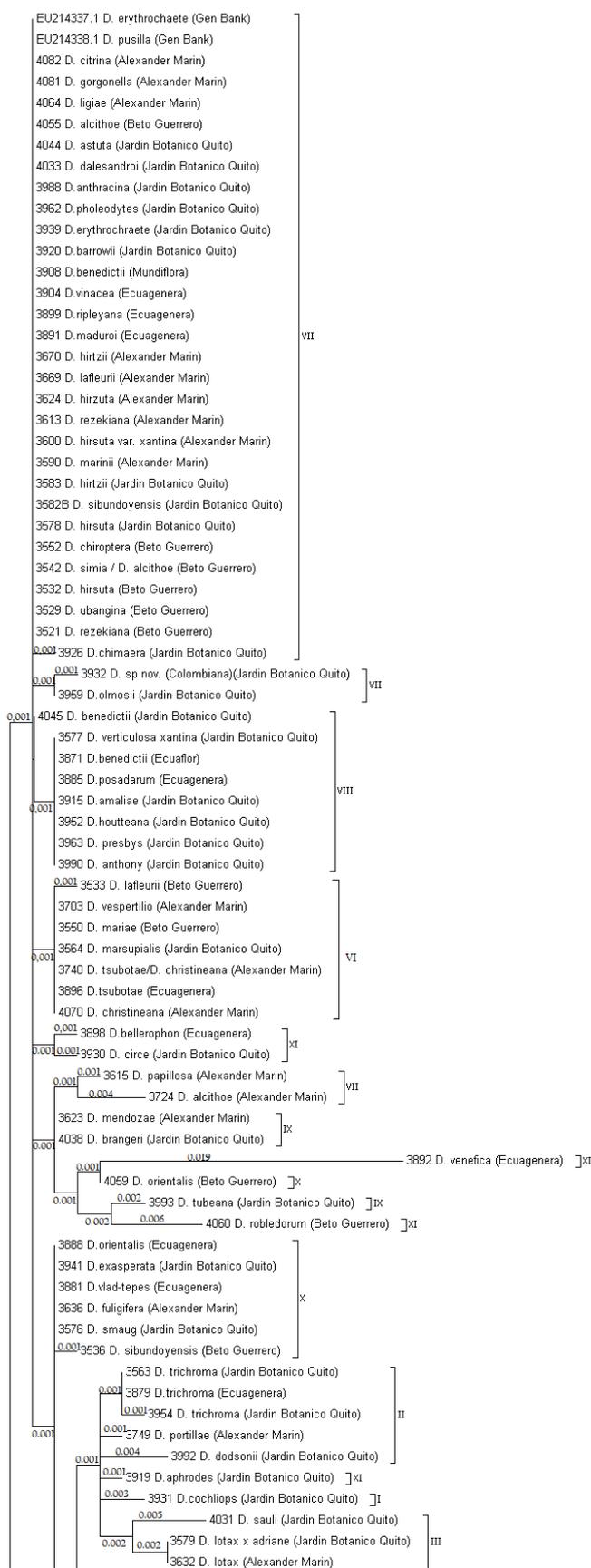
1.3.Filogenia y georreferenciación

Con las 84 secuencias de *matK* y las 40 de *ITS* con una calidad superior al 70% se elaboraron los respectivos árboles filogenéticos, basados en el método de estimación *Maximum Likelihood* (Kumar et al., 2016), ver figura 13 y 14, debido a que es un método estadístico basado en modelos de evolución molecular, en donde se toma en cuenta secuencias de nucleótidos de ADN, así menciona Peña (2011). Se empleó además, los modelos evolutivos *Tamura-Nei* y *Jukes-Cantor*, de los cuales se escogió el modelo evolutivo *Tamura-Nei*, ya que este toma en cuenta las diferencias en la proporción de la sustitución y desigualdad de la repetición de los nucleótidos, se desiste del modelo evolutivo *Jukes-Cantor* debido a que no corrige la tasa más alta de transición de nucleótidos y supone una igualdad de tasa de sustitución entre sitios (gaps) (Kumar, Stecher y Tamura, 2016), los arboles presentan la misma tipología con muy leves cambios, véase en la imagen 14 y anexo 6. Los resultados obtenidos con el gen *matK* bajo el modelo *Tamura-Nei*, dieron la pauta para la utilizar de este modelo en la creación de un único árbol filogenético con la región *ITS*.

La filogenia molecular con la región nuclear *ITS* se realizó con 40 secuencias de total de muestras, añadiendo 13 secuencias de GenBank, en el árbol filogenético, las especies se agruparon en 4 grupos más el grupo externo, véase en la imagen 13. Los resultados de la filogenia mostraron que el marcador *ITS* no presenta mayor variación para diferenciar entre especies, por esta razón no es una herramienta discriminativa para la clasificación subgenérica *Dracula*, esto se comprobó ya que los resultados obtenidos no tienen coherencia con la sistemática tradicional descrita por Luer (1993) y Zelenko (2014), estos autores describen a *D. psyche* como una especie primitiva del género y el árbol filogenético con la región intergénica *ITS* la ubica dentro de un clado con especies más derivadas del GRUPO II, véase en la Figura 13.

Para el análisis filogenético de las secuencias de la región cloroplástica *matK*, se usaron 84 secuencias descritas anteriormente, 3 secuencias del GenBank y 62 secuencias de la base de datos perteneciente al grupo de investigación NUNKUI WAKAN, véase en el anexo 2, lo que permitió agrupar a las especies en 11 grupos más un grupo externo, véase en la Figura 14, esta asociación de especies permite debatir las diferencias entre la sistemática molecular y taxonómica tradicional descrita por Luer (1993), en su libro “Icones Pleurothallidinarum X. Systematics of *Dracula* (Orchidaceae)” y la realizada por Zelenko (2014), titulada “Orchids *Masdevallia* with its segregates including *Dracula*”. A continuación se describen los grupos con la región cloroplástica *matK*.

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



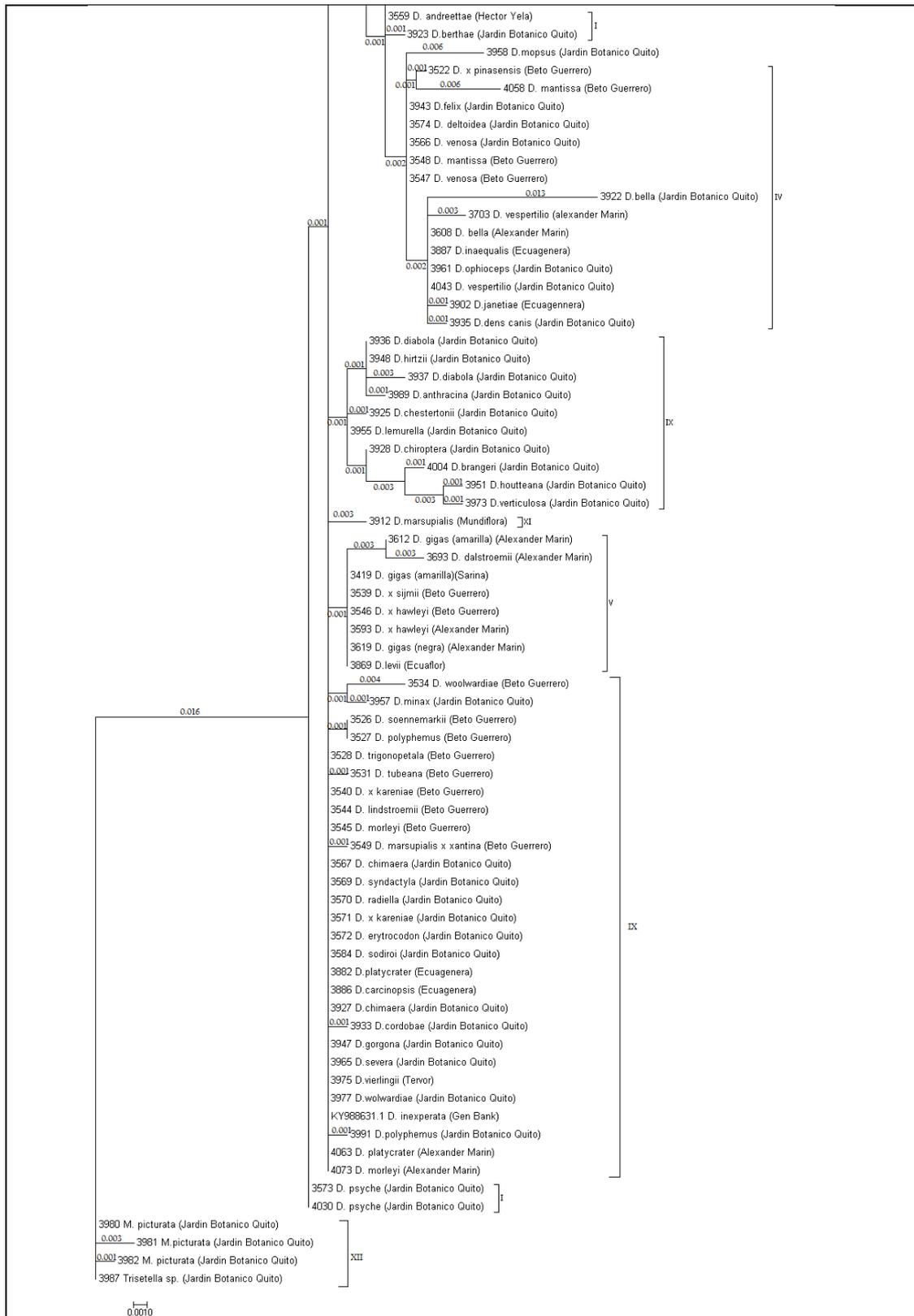


Figura 14. Árbol filogenético *Maximum Likelihood* de la región *matK* mediante el método *Tamura-Nei*.

Nota: El análisis involucró 145 secuencias de nucleótidos de las cuales *D. inexperata*, *D. pusilla*, *D. erythrochaete* son secuencias tomadas del Genbank. Las especies del género *Dracula* se agruparon en 12 grupos.

Datos procesados con el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

GRUPO I. Especies atípicas: dentro de este grupo se consideran especies morfológicamente diferentes al resto del género, mismas que pueden pertenecer a especies ancestrales, como se describe a continuación:

Dracula psyche (Luer & Andreetta) Luer; esta especie aparece junto al grupo externo en el árbol filogenético, lo que señala un comportamiento basal, que se refleja morfológicamente de acuerdo con Luer (1993), en su forma única de labelo (cóncavo profundo con cinco lamelas elevadas y un hipochilo oblongo) y sépalos. Esta especie, además, es endémica de la Provincia de Carchi en el Noroccidente de Ecuador, véase en la imagen 16, (“Tropicos,” 2018).

Dracula berthae Luer & R.Escobar y *Dracula andreettae* (Luer) Luer; En el árbol filogenético las dos especies aparecen cerca pero al mismo tiempo, fuera de cualquier clado. *Dracula berthae* es una de las especies más peculiares en el género y recuerda, muchas veces, a una *Masdevallia*. Es una de las pocas especies en la que la flor no mira hacia el suelo (Baquero, 2019). Mientras que *D.andreettae* de acuerdo con Luer (1993), es una especie única en el género por poseer pétalos alargados, un labelo convexo en lugar de cóncavo o plano como se observa en la mayoría de especies del género, posee una columna corta, su hipochilo y ovario es ancho en comparación con el resto de especies, véase en la imagen 16.

Dracula cochliops Luer & R.Escobar; Es una de las plantas más pequeñas del género, con hojas cortas, afiladas en el ápice, las flores poseen pétalos alargados (la única otra especie con este rasgo es *D. andreettae*) engrosados al final, que asemejan a los ojos de un caracol, de ahí su nombre en latín, sus sépalos se encuentran llamativamente separados lo que recuerda a ciertas especies de *Masdevallia*, véase en la imagen 16, (Luer, 1993).

Ubicación geográfica del género *Dracula* Grupo I

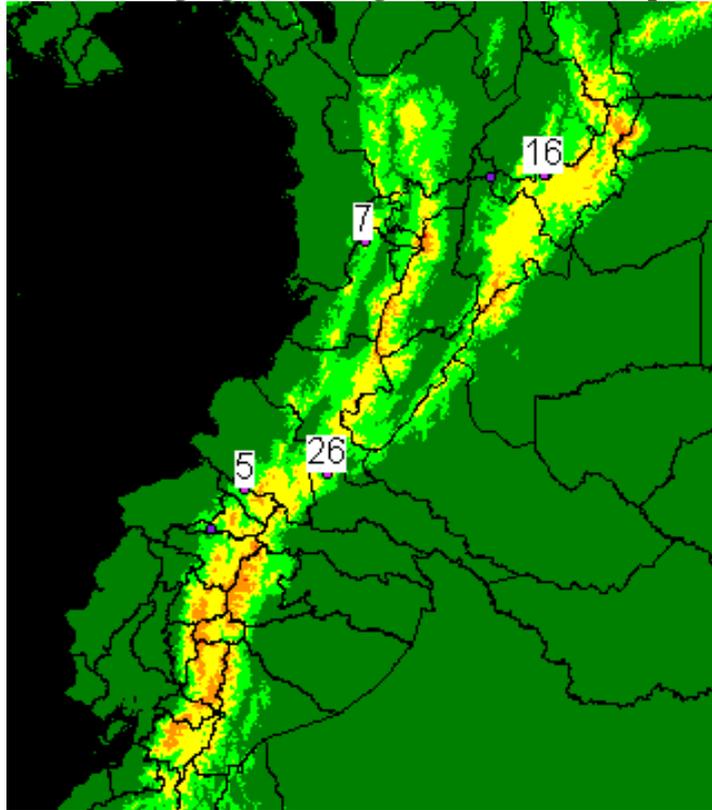


Figura 15. Distribución geográfica del género *Dracula* Grupo I. Especies atípicas
Nota: (5) *D. andreettae* (7) *D. andreettae* (16) *D. berthae* (26) *D. cochliops*
Elaborado con: DIVA GIS (2018).

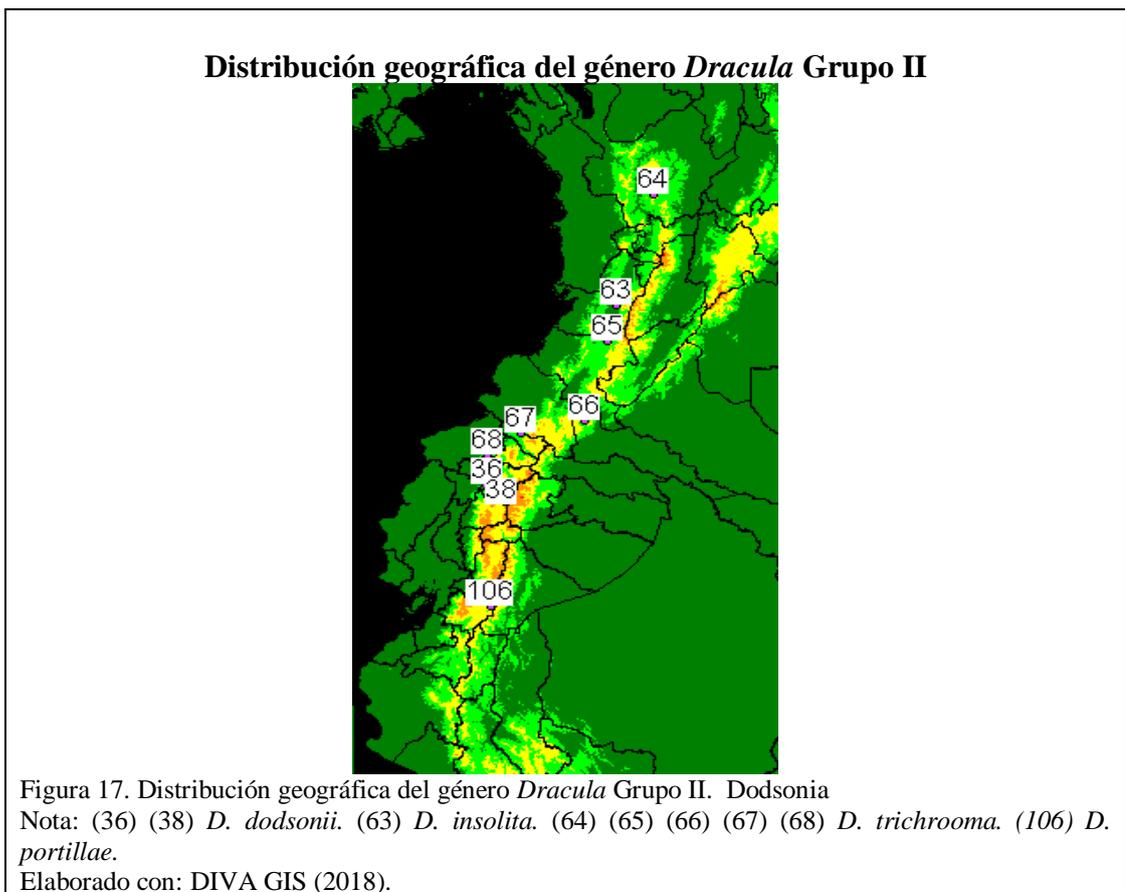
Como se observa en la figura 14, los registros de las especies del GRUPO I señalan que, *D. andreettae* se encuentra en los andes occidentales en Carchi-Ecuador y Chocó-Colombia, mientras que *D. berthae* se encuentran en Boyacá- Colombia y *D. cochliops* en Putumayo-Colombia en los andes orientales (“Tropicos,” 2018).

Especies atípicas del género *Dracula*



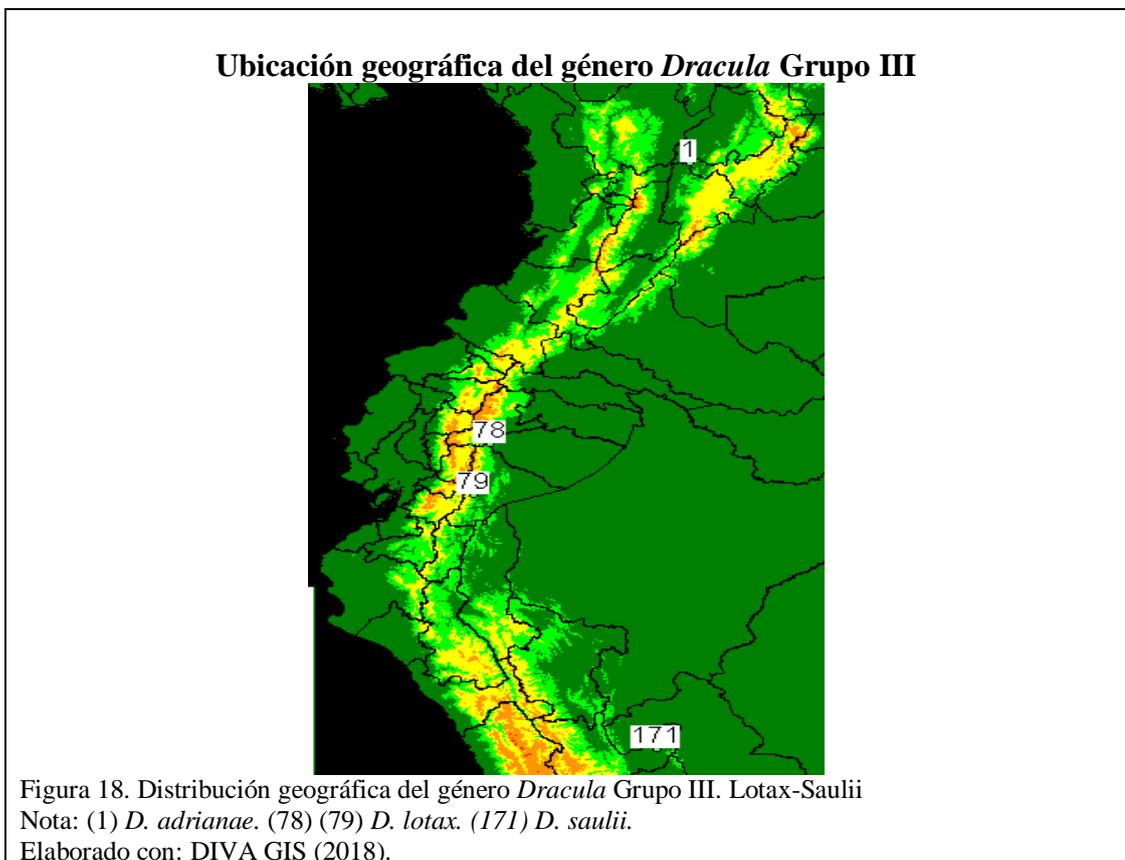
Figura 16. Especies atípicas del género *Dracula*
Nota: (A) *D. psyche*, (B) *D. berthae*, (C) *D. andreettae*, (D) *D. cochliops*
Fuente: (A) (Quimbaya, 2007), (B) (Diabola, 2013), (C) y (D) (Baquero, 2014).

GRUPO II. Grupo Dodsonia: Zelenko (2014), menciona que este grupo está formado por *D. dodsonii*, *D. trichroma*, *D. portillae* y *D. insolita*. El árbol filogenético presenta a este grupo como un clado (con ausencia de *D. insolita*), las especies de este grupo se caracterizan por poseer labelos espatulados o piriformes con epichilos planos, inflorescencias erectas que aparecen por dentro de las brácteas foliares (Luer, 1993).



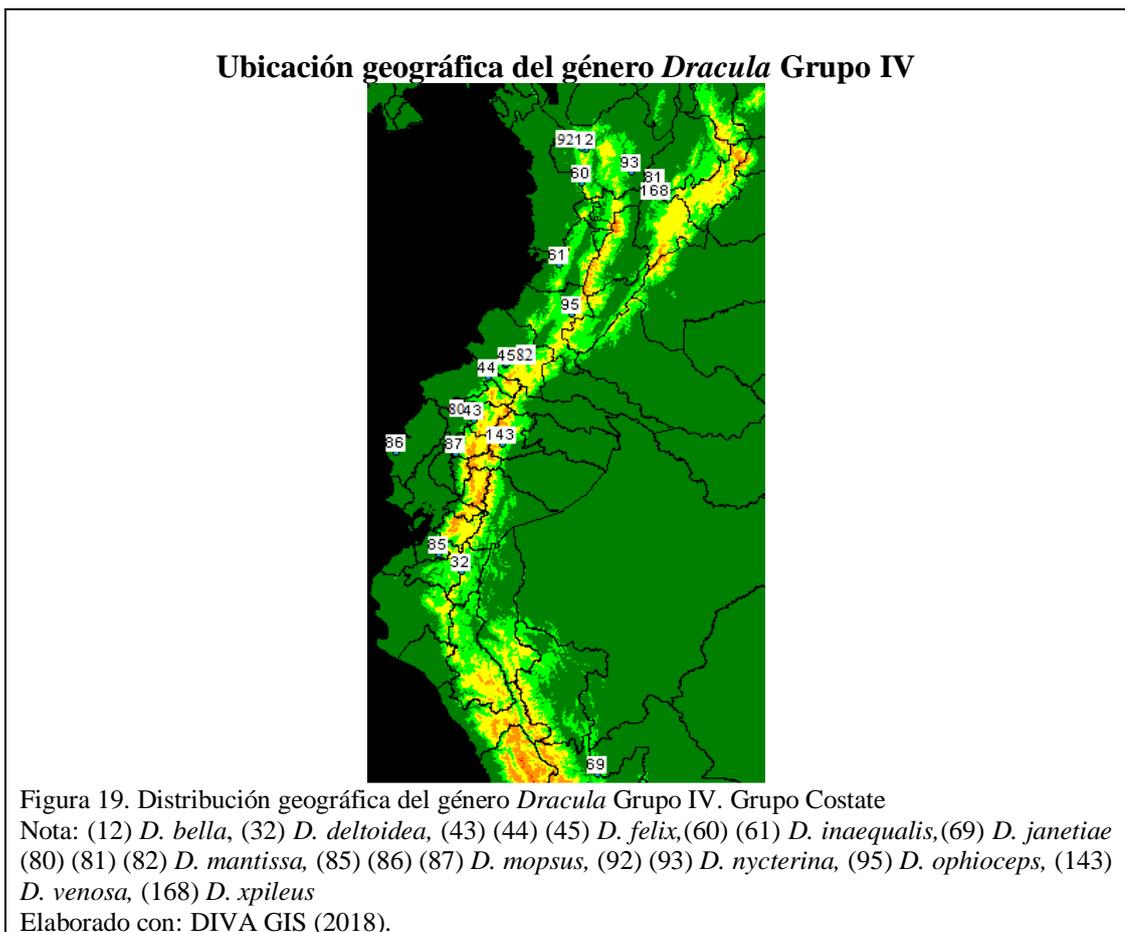
El estudio biogeográfico ubica a las especies del GRUPO II de la siguiente manera: *D. dodsonii* en Pichincha-Ecuador en los andes occidentales, *D. insolita*, en el Valle del Cauca-Colombia en los andes orientales, a su vez se observa la distribución de *D. trichroma* desde Antioquia-Colombia hasta Carchi-Ecuador en los andes occidentales (“Tropicos,” 2018).

GRUPO III. Grupo Lotax-Saulii: Zelenko (2014), señala dentro de este grupo a *D. lotax*, *D. adrianae* y *D. saulii*, mismas que se encuentran dentro del árbol filogenético, las diferencias morfológicas entre *D. adrianae* y *D. lotax* son leves, molecularmente aparecen como las más cercanas, *D. saulii* aparece como la especie hermana de las anteriormente mencionadas, estas especies poseen plantas reptantes con hojas estrechas, flores de color claro, ovarios con crestas bajas y ondulantes (Luer, 1993).



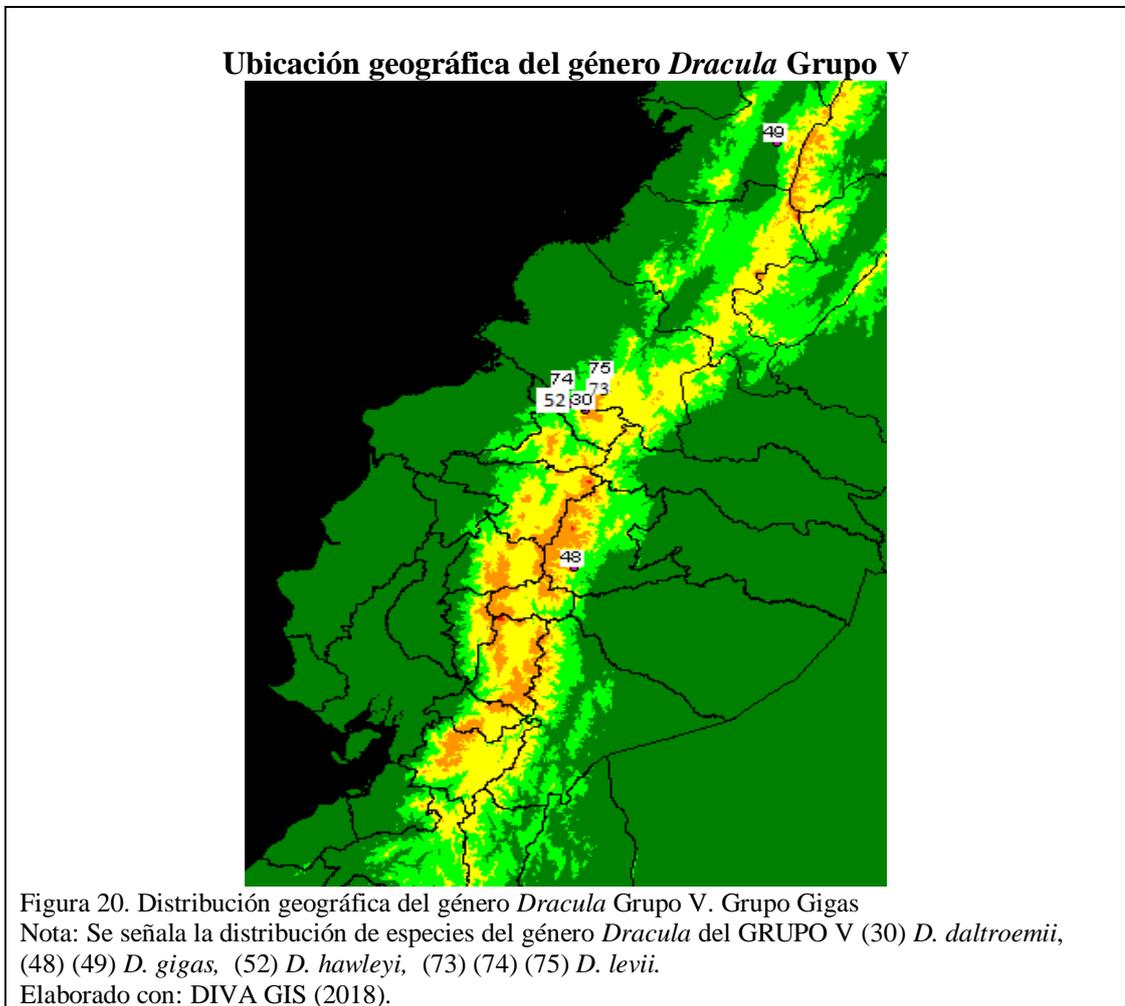
Los registros de las especies del GRUPO III señalan que se ubican en los Andes orientales, *D. adrianae* en Antioquia-Colombia (Baquero (2019), menciona que este registro es dudoso, puesto que existen grandes poblaciones en el sur de Ecuador), *D. lotax* en Pastaza y Morona Santiago en Ecuador y *D. saulii* en norte de Perú (véase en la figura 18). Aparentemente, este grupo se restringe a los Andes Orientales de Ecuador y Perú (Luer, 1993).

GRUPO IV. Grupo Costatae: La característica distintiva de este grupo es su ovario crestado Luer (1993), el estudio molecular arrojó dentro de un mismo clado a las especies con este rasgo, donde, *D. deltoidea*, *D. venosa*, *D. inequalis*, *D. felix*, *D. mantissa*, *D. mopsus* y *D. ophioceps*, poseen flores pequeñas, mientras que *D. denscanis*, *D. janetiae*, *D. bella* y *D. vespertillo*, tienen flores grandes y planas (Zelenko, 2014).



El estudio biogeográfico del GRUPO IV señala que este posee una gran distribución en Latinoamérica, que va desde el norte de Colombia en Antioquia hasta el norte de Perú en Huánuco (véase en la figura 19), se destaca *D. vespertillo* como la especie con más amplia distribución del género, llegando hasta Nicaragua en el norte y la provincia de Zamora Chinchipe en el sur de Ecuador, además, es la única especie que cruza la cordillera oriental de los Andes (Luer, 1993).

GRUPO V. Grupo Gigas: Zelenko (2014), menciona dentro de este grupo a *D. gigas*, *D. levii*, *D. dalstroemii* y *D. hawleyi*, esto se comprueba en el árbol filogenético a excepción de a *D. x sijmi* que posiblemente se considera un híbrido natural entre *D. erythrochodon* y *D. gigas*, así lo menciona (Baquero, 2019). Luer (1993), agrupo a estas especies en la serie *Grandiflorae-parvilabiatae* (véase en la tabla 2), ya que se caracterizan por poseer hojas delgadas, flores grandes, floración erecta y labelo pequeño, debido a esto es un clado claramente distinguible del resto de *Dracula*.



Como se observa en la figura 20, el GRUPO V, se ubica al noroccidente de Ecuador y suroccidente de Colombia y en la provincia del Carchi se encuentran casi todas las especies (“Tropicos,” 2018).

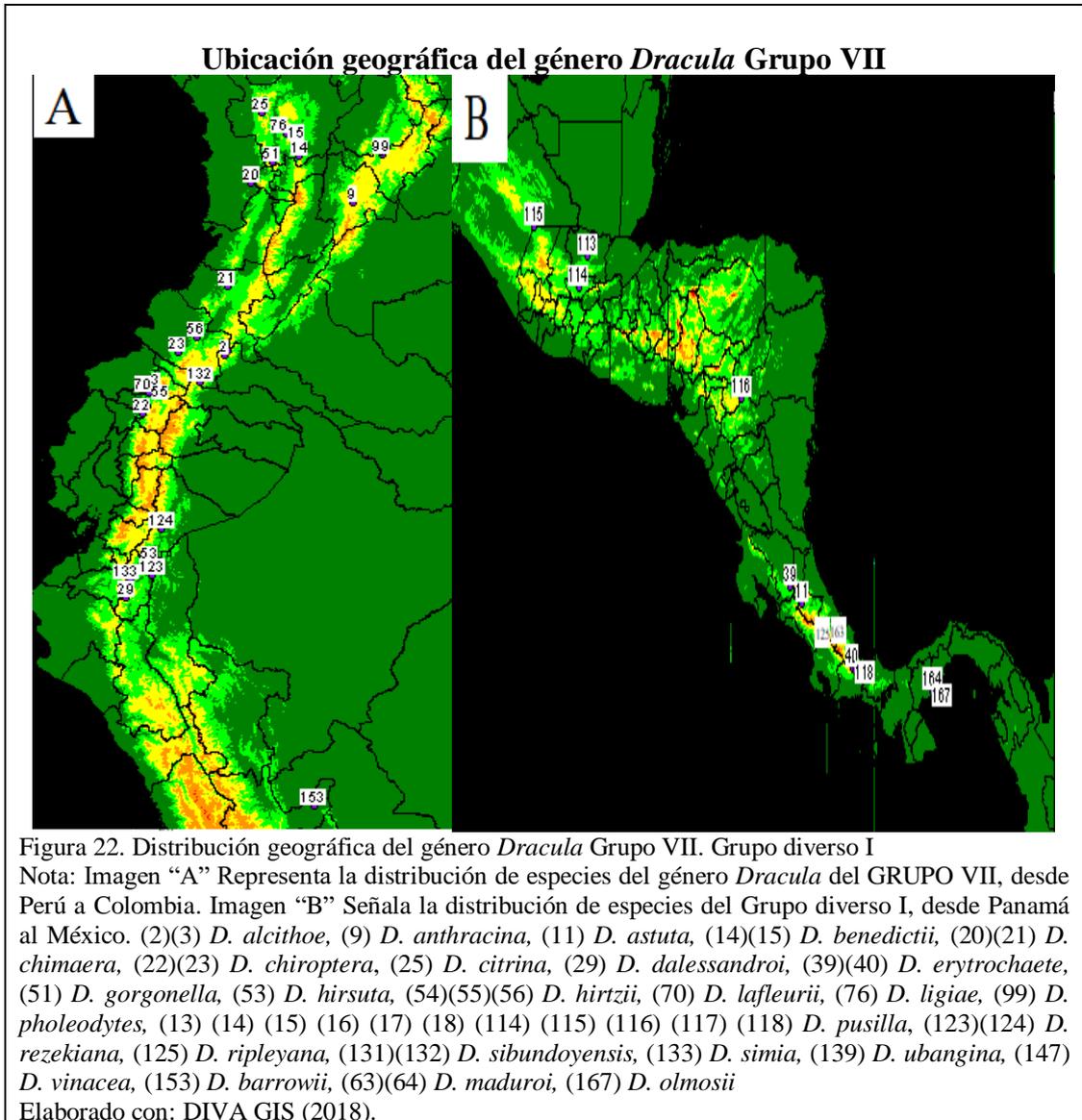
GRUPO VI. Grupo tsubotae: Zelenko (2014), señala dentro de este grupo a *D. tsubotae* y *D. christineana*, el estudio filogenético arrojó a estas dos especies juntas, mismas que se caracterizan por poseer el labelo redondo y esférico, además el color de sus flores es más oscuro en el centro y claro en el exterior lo que difiere con el resto de especies ya que sucede lo contrario.



La figura 21 muestra los registros de las especies del GRUPO VI, ubicadas al norte de Cundinamarca (“Tropicos,” 2018).

GRUPO VII. Grupo diverso I: El árbol filogenético presenta a este grupo como uno de los más grandes clados, pero este no especifica relaciones notables entre ellas, varios individuos dentro de este grupo pertenecen a especies centroamericanas como *D. erythrochaete*, *D. astuta*, *D. riplejana*, *D. pusilla*, también se encuentra *D. simia* y *D. alcithoe*, cuyas marcas florales y labelo semejan la cara de un mono; dentro de este grupo la filogenia muestra además especies de hojas anchas como, *D.*

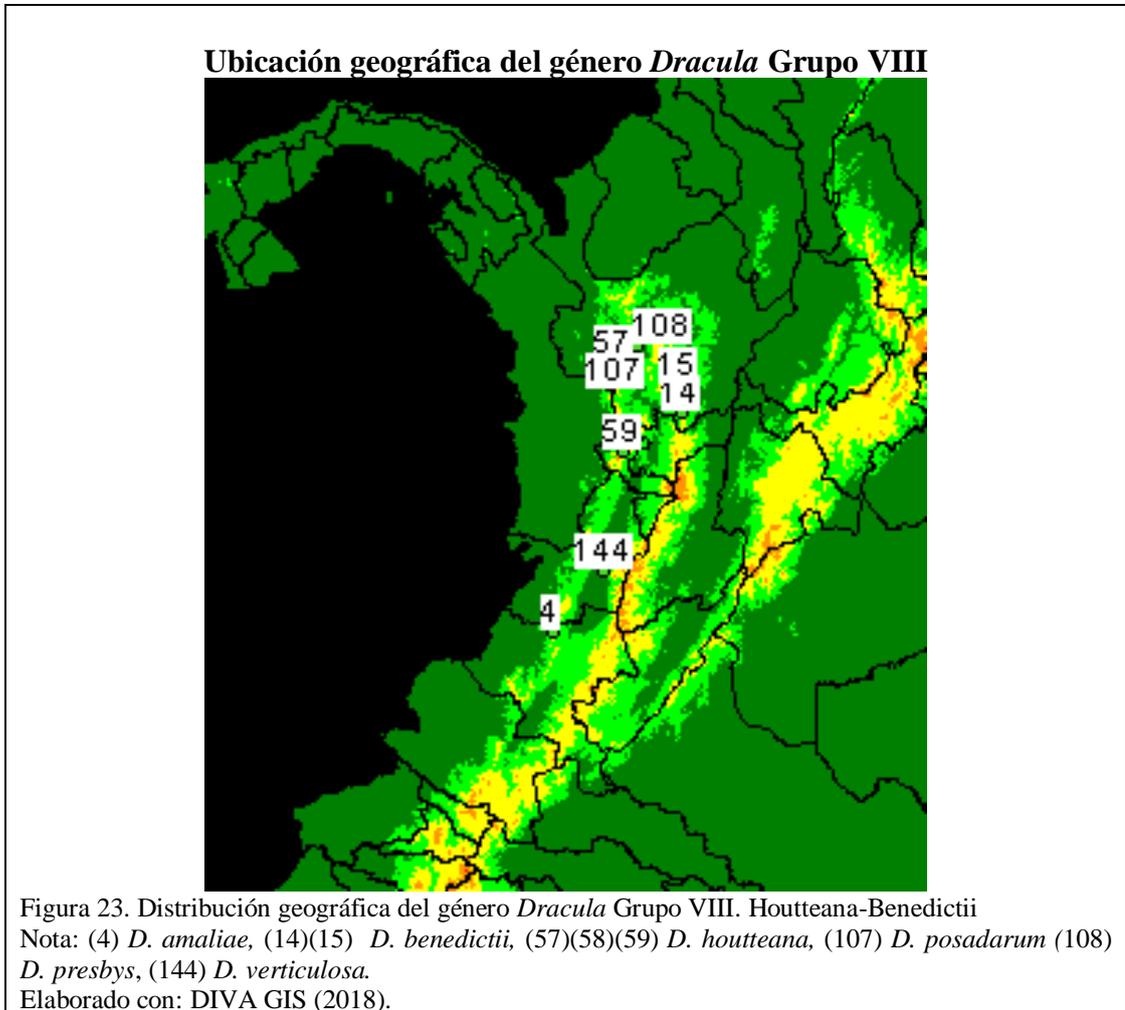
hirtzii, *D. chimaera*, *D. ligiae*, *D. gorgonella*, *D. chiroptera*, *D. ubangina*, *D. lafleurii*, de hojas estrechas, la lamela central dominante y flores con pelos cortos como *D. barrowii*, *D. hirsuta*.



De acuerdo con el análisis biogeográfico el GRUPO VII, presenta una gran distribución en Latinoamérica, ubicándose desde el sur de México hasta el norte de Perú, véase en la figura 22.

Grupo VIII *houtteana-benedictii*: Zelenko (2014), incluye dentro del grupo Houteana a *D. houtteana* y *D. antonii*, el análisis filogenético agrupó dentro de este

clado a estas dos especies incluyendo a *D. benedictii*, *D. amaliae*, *D. posadarum*, *D. presbys* y *D. verticulosa*, todos estos individuos poseen hojas delgadas y lamela central dominante en forma de pala.



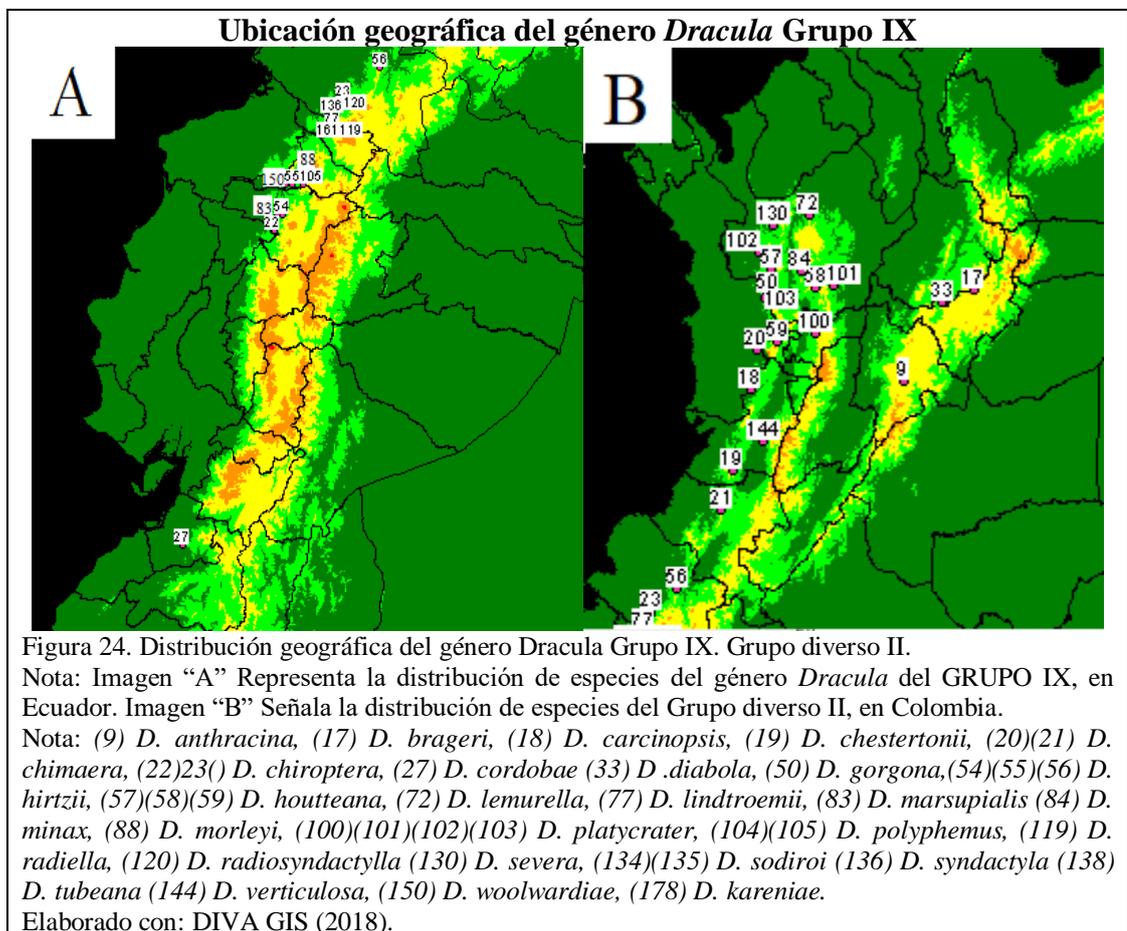
La figura 23 muestra los registros de las especies del GRUPO VIII, ubicadas en la cordillera occidental de Colombia (“Tropicos,” 2018).

GRUPO IX. Grupo diverso II. El estudio filogenético presenta a este grupo como una mezcla de especies que no especifican relaciones notables entre ellas, sin embargo en el árbol filogenético *D. sodiroi* y *D. erythrocodon* aparecen juntas, encontrándose las dos en grupo Sodiroi formado por Zelenko (2014).

Dentro de este grupo se reúnen además las especies de hojas anchas con flores grandes: *D. hirtzii*, *D. chiroptera*, *D. woolwardiae*, *D. marsupialis*, *D. chimera*, *D.*

severa, *D. vierlingii*, *D. inexperata* (Luer, 1993). Así también se encuentran *D. polyphemus* y *D. cordobae*, que pertenecen al grupo Polyphemos descrito por Zelenko (2014), que junto con *D. tubeana*, poseen un epichilo ancho con tres lamelas centrales paralelas y lamelas secundarias paralelas anchas.

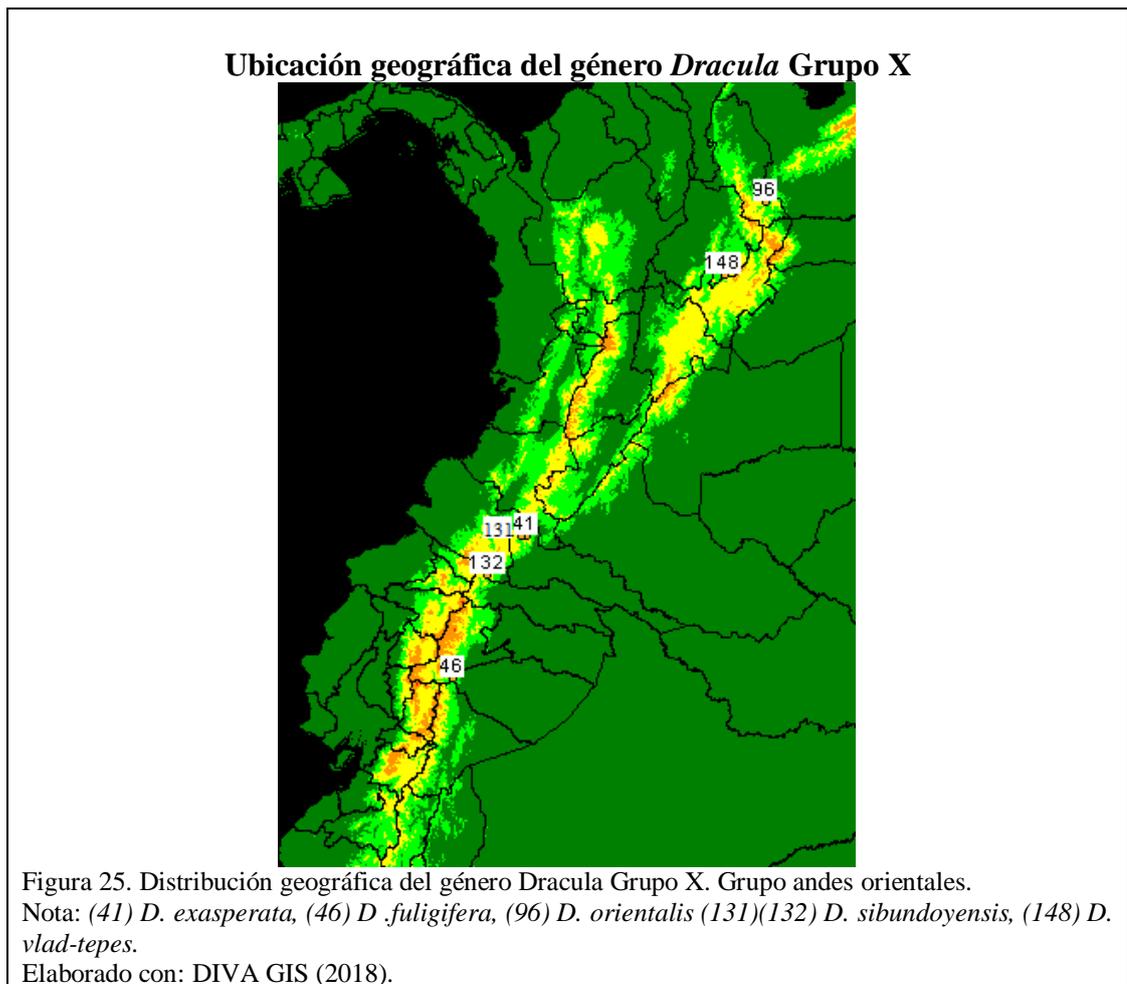
Dentro de este grupo se encuentran además *D. radiella*, *D. morleyii*, *D. carcinopsis*, *D. trigonopetala*, *D. lindstroemii*, *D. xkareniaae*, descritas por Zelenko (2014), dentro del grupo Radiosa, dichas especies que se caracterizan por sus hojas anchas, ramicaulo delgado, ápice de la hoja afilado como lanza y un epichilo con lamelas en forma de radio de bicicleta.



De acuerdo con el análisis biogeográfico el GRUPO IX, presenta una gran distribución en Latinoamérica, ubicándose desde Costa Rica hasta el sur de Ecuador,

a diferencia del GRUPO VII, Grupo diverso I, este clado posee una mayor diversidad de especies y densidad en zonas como Carchi e Imbabura (véase en la figura 24).

GRUPO X. Grupo andes orientales. Este grupo se ha formado con las especies de hojas delgadas y flores pequeñas, encontrándose así *D.Orientalis*, *D.exasperata*, *D. vlad-tepes*, *D. fuligifera*, *D. smaug*, *D. sibundoyensi* (Luer, 1993).



El estudio filogenético señala que el GRUPO X posee una distribución en los andes orientales entre Ecuador y Colombia (véase en la figura 25).

GRUPO XI. Especies de posible origen híbrido. Luer (1993), señala que la mayoría de las especies del género *Dracula* son distintas y se identifican fácilmente por la apariencia de la flor, sin embargo, algunas especies causan confusión acerca de

su origen, es así que poblaciones de estas especies podrían ser el resultado de la hibridación natural

Zambrano y Solano (2011), describen uno de los ejemplos acerca de la hibridación natural en el género *Dracula* en la colección de “Orquiecuador”, en donde señala que *D. xpinasensis* es un híbrido natural de *D. mopsus* con alguna especie simpátrica del mismo género de los andes del Ecuador, que posiblemente sea *D. mantissa*,

La similitud morfológica de hojas grandes y sépalos pubescentes largos sugieren a *D. circe* como un híbrido natural de *D. goorgona* o *D. wallisii* con otra especie del género *Dracula*; así también *D. dalstroemii* y *D. hawleyii* son especies intermedias entre *D. gigas* y *D. levii*, ya que poseen sépalos pubescentes y labelo similar a los de *D. gigas*; de igual manera *D. venefica* puede ser un híbrido natural de *D. chimaera*, ya que posee sépalos con pubescencia gruesa y un labelo inflexible, además se mencionan a *D. roezlii* y *D. wallisii* como sus progenitores, *D. mariae* es un híbrido entre *D. felix* y *D. marsupialis*, mientras que *D. xsijmi* entre *D. erytrochodon* y *D. gigas* (Luer, 1993).

Ubicación geográfica del género *Dracula* Grupo XI

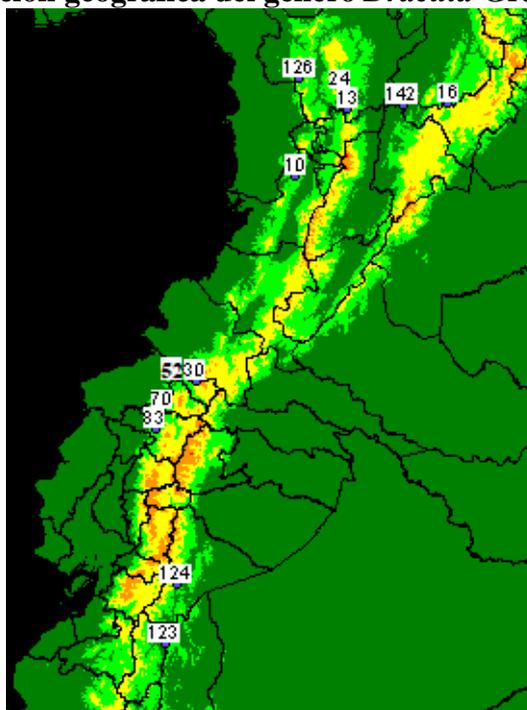


Figura 26. Distribución geográfica del género *Dracula* Grupo XI. Especies de posible origen híbrido. Nota: (10) *D.aphrodes*, (13) *D.bellerophon*, (16) *D.berthae*, (24) *D.circe*, (30) *D.dalstroemii*, (52) *D.hawleyi*, (70) *D.lafleurii*, (83) *D.marsupialis*, (123)(124) *D.rezekiana*, (126) *D.robledorum*, (142) *D.venefica*, (141) *D.kareniae*, (144) *D.sijmi*. Elaborado con: DIVA GIS (2018).

Los registros de las especies del GRUPO XI señalan que se distribuyen entre Ecuador y Colombia, como se observa en la imagen 26.

1.4. Sistemática tradicional vs filogenia molecular

El análisis filogenético de las secuencias de la región cloroplástica *matK* del género *Dracula* permite debatir con la sistemática y taxonómica tradicional descrita por Luer (1993), en su libro “Icones Pleurothallidinarum X. Systematics of *Dracula* (Orchidaceae)”, en donde clasifica al género en tres subgéneros, *Xenosia*, *Sodiroa*, *Dracula*, este último se divide en cinco secciones *Andrettaea*, *Chestertonia*, *Cochliopsida*, *Dodsonia*, *Dracula*, la sección *Dracula* se distribuye en dos subsecciones *Costatae* y *Dracula* que incluye tres series *Parviflorae*, *Grandiflorae-Parvilabiatae*, *Dracula*, véase en la tabla 2.

En la filogenia molecular realizada por Pridgeon *et al.*, (2001) “Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences” se determina que *D. xenos* es hermana de *Masdevallia picturata* y que potencialmente sea un híbrido natural entre *Masdelia* y un individuo de *Dracula* no especificado, por tanto el subgénero *Xenosia* descrito por Luer (1993), no debería ser considerado como un subgénero.

En la filogenia realizada, *D. sodiroi* no discrimina su clado ya que aparece incluida en un gran grupo (GRUPO IX, diverso II) junto a otras especies posiblemente hermanas, como *D. erythrocodon* así menciona Zelenko (2014) en “Orchids *Masdevallia* with its segregates including *Dracula*”, es por ello que no debería ser considerada como un subgénero.

La morfología floral así como el estudio filogenético demuestra que *D. berthae* y *D. andrettae*, poseen características que las hacen distinguirse de los demás individuos de este género, es por eso que se debería proponer a estas especies como sección del subgénero *Dracula*.

El GRUPO IV. Grupo *Costatae*, es uno de los clados más completos dentro de la filogenia, formado por las especies descritas por Luer (1993) con ovario crestado, característica única de la subsección *Costatae*, es por ello que debería ascender de subsección a sección del subgénero *Dracula*.

Así mismo Luer (1993), describe la serie *Grandiflorae-parvilabiatae*, con las especies de flores grandes y labelo pequeño, mismas que se presentan en la filogenia como un clado uniforme, distinguiendo al GRUPO V grupo *gigas*, del resto de los grupos formados con las especies del género *Dracula*, por lo que se pone en consideración el ascenso de esta serie a subsección de la sección *Dracula*.

D. tsubotae y *D. lafleurii*, poseen características morfológicas similares como hojas anchas y labelo redondo, atributos descritos por Luer (1993), en la filogenia molecular aparecen dentro de un mismo clado, por lo que se puede deducir que estas dos especies pueden pertenecer a una sección dentro del subgénero *Dracula*.

D. psyche, aparece como una de las especies más primitiva ya que se encuentra junto al grupo externo, así también sus características morfológicas la hace única del resto de especies, por lo cual se la propone como un subgénero del género *Dracula*.

Los resultados obtenidos en la filogenia molecular del género *Dracula*, permiten proponer una nueva clasificación subgenérica de este género, véase en la tabla 5.

Tabla 5.

Propuesta para la clasificación subgenérica del género *Dracula*

Subgénero	Sección	Subsección	Series	Especies representativas
<i>Psyche</i>				<i>D. psyche</i>
<i>Dracula</i>	<i>Andreettaea</i>			<i>D. andreettae</i>
	<i>Chestertonia</i>			<i>D. chestertonii</i>
	<i>Cochliopsia</i>			<i>D. cochliops</i>
	<i>Dodsonia</i>			<i>D. dodsonii</i>
	<i>Costatae</i>			<i>D. felix</i> <i>D. bella</i>
	<i>Berthae</i>			<i>D. berthae</i>
	<i>Tsubotae</i>			<i>D. tsubotae</i>
	<i>Dracula</i>	<i>Gigas</i>		<i>D. gigas</i>
		<i>Dracula</i>	<i>Grupo diverso I</i>	<i>D. erythrochaete</i>
			<i>Grupo diverso II</i>	<i>D. radiosa</i>

Nota: Propuesta para la clasificación subgenérica del género *Dracula*, basada en las características moleculares con el gen *matK*, morfológicas florales y de sus hojas. Se divide en 2 subgéneros incluyendo el subgénero *Dracula* que se divide en 7 secciones de las cuales la sección *Dracula* deriva en 2 subsecciones en donde la subsección *Dracula* se distribuye en 2 series.

Fuente: Autores (2018).

Conclusiones

Se colectaron 176 individuos en 8 orquidearios, pertenecientes a 119 especies del género *Dracula* presentes en Latinoamérica, que corresponde al 91% de las especies aceptadas en The Plant List (2018).

Con el segmento de la región matK se pudo amplificar 112 individuos de los cuales 84 secuencias fueron viables con un mínimo del 70%, con esta información se desarrolló el análisis filogenético, además con el espaciador intergénico *ITS* se amplificaron 40 muestras viables, las que se usaron para elaborar el respectivo árbol filogenético. Al comparar los dos sistemas se evidencia que *matK* tiene más capacidad discriminativa y tiene mayor coherencia con la filogenia morfológica presentada por Luer y Zelenko.

En base a la información molecular se presenta una nueva clasificación subgenérica de *Dracula*; en la cual se eliminan 2 subgéneros y se incluye el subgénero *Psyche*, en las secciones se añade a *Costatae*, *Berthae*, *Tsubotae*, además *Gigas* asciende de serie a subsección.

Los datos biogeográficos de distribución de las especies, manifiestan que las zonas más diversas se encuentran en la provincia Carchi en Ecuador y la cordillera Oriental Putumayo en Colombia, el género *Dracula* se distribuye desde el sureste de México hasta el norte de Perú y se observa que la especie primitiva *D. psyche* es endémica del Ecuador.

Recomendaciones

Se recomienda mejorar los sistemas y bases de datos de identificación de las colecciones de los jardines botánicos y orquidearios privados con el fin de sistematizar las colecciones y así aportar mayor valor a los bancos genéticos.

Trabajar con nuevas regiones de ADN cloroplasmático como *ycf1* o *ycf5*, mitocondrial *COI* y nuclear ya que en otros géneros de orquídeas han permitido obtener mayor variabilidad entre especies y por tanto podrían aportar con información para determinar inconsistencias subgenéricas del género *Dracula*.

Es importante trabajar con secuencias con una calidad superior al 70%, para obtener resultados filogenéticos más confiables, además se recomienda trabajar con programas bio-informáticos avanzados, que permitan un mejor análisis comparativo de secuencias génicas y así simplificar el proceso de elaboración filogenética.

Se recomienda el estudio de las regiones *MYB* y *bHLH*, genes encargados de la expresión génica de antocianinas, cuya acumulación en el género *Dracula* produce franjas de colores que van desde el negro al rojo intenso en sus flores y son un atrayente de sus polinizadores, lo que señala una nueva forma de estudiar las relaciones evolutivas entre las especies del género.

Se debería tomar en cuenta la nueva propuesta de la clasificación subgenérica del género *Dracula*, para posteriores estudios de filogenia molecular.

Bibliografía

- Agrocalidad. (2015). Instructivo “De toma de muestra para le laboratorio de biología molecular- diagnostico vegetal.” Quito.
- Aguilar Palma, S. E. (2003). *Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas*. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana. Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1960/1/IAD-2003-T001.pdf>
- Azofeifa, Á. (2006). REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA USO DE MARCADORES MOLECULARES EN PLANTAS ; APLICACIONES EN FRUTALES DEL TRÓPICO. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, 17(2).
- Baquero, L. (2014). *Dracula andretteae*, a very low pigmented and warted. Retrieved January 24, 2019, from <https://www.flickr.com/photos/7222772@N08/13531515443/>
- Baquero, L. (2019). Orquídeas del género *Dracula*. In *Orquídeas del género Dracula*. Quito.
- Baquero, L., & Moncayo, N. (2017). *Dracula* of Ecuador, (May), 0–4. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10086.63048>
- Barros, B. De. (2015). Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas : uma revisão, 495–503.
- Bogarín, D., Pérez-Escobar, O. A., Groenenberg, D., Holland, S. D., Karremans, A. P., Lemmon, E. M., ... Gravendeel, B. (2018). Anchored hybrid enrichment generated nuclear, plastid and mitochondrial markers resolve the *Lepanthes horrida* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 129, 27–47. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.07.014>
- Calderón, E., & Farfán, J. (2003). Especies de los géneros *Dracula* y *Masdevallia* (Orchidaceae) en Colombia. *Biota Colombiana*, 4(2), 187–201.
- Carrión Jiménez, M. del C. (2009). *Identificación de orquídeas epifitas del Ecuador mediante DNA Barcoding*. Loja: Universidad TPL. Retrieved from <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1851>
- Castellanos Castro, C., & Torres Morales, G. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca: Conservación y aprovechamiento sostenible*. (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Ed.). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- CBOL Plant Working Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L., & Freudenstein, J. V. (2003). Dna

Data and Orchidaceae Systematics : a New Phylogenetic Classification. *Orchid Conservation*, 69–89.

- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., ... Stevens, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Chiron, G. R., Guiard, J., & Van Den Berg, C. (2012). Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis* sensu lato (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa*, 46, 34–58. Retrieved from www.mapress.com/phytotaxa/
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). *Phytotaxa*. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Costa, R. J., & Wilkinson, H. (2017). Inference of Gene Flow in the Process of Speciation: An Efficient Maximum-Likelihood Method for the Isolation-with-Initial-Migration Model. *Genetics*, 205(4), 1597–1618. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.188060>
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press. Retrieved from https://books.google.com.ec/books/about/An_Integrated_System_of_Classification_on_o.html?id=EB6qflbmcrwC&redir_esc=y
- Dalglish, T., Williams, J. M. G., Golden, A.-M. J., Perkins, N., Barrett, L. F., Barnard, P. J., ... Watkins, E. (2007). Las orquídeas. *Journal of Experimental Psychology: General*, 136.
- Dentinger, B. T. M., & Roy, B. a. (2010). A mushroom by any other name would smell as sweet : *Dracula* orchids. *Most*, 19(1), 1–13.
- Diabola. (2013). *Dracula berthae* Luer & R.Escobar. Retrieved January 24, 2019, from https://www.flickr.com/photos/bilder_heinzg/9008506535/in/photolist-eDguDS-2dMiRQZ-RFPh1N-YKwz15-eJ3X9c-26bhsr5-mCsbvg-aEGRZH-7RwGXE-ffveKg-ds6kfJ-itxJBE-aEGRPR-fa9d56-aEGSrV-ffvfaZ-ittr1J-8nyg3m-aELHws-6rJ5Jm-6rDWRz-aEGSep-2sL5Ta-225YMn9-Nj65Tg-QPgpRQ-2c
- DIVA GIS. (2018). DIVA-GIS. Retrieved November 16, 2018, from <http://www.diva-gis.org/node/1>
- Doucette, A. (2011). *Dracula immunda* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), a new species from Panama. *Phytotaxa*, 16(1), 37. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.16.1.2>
- Doyle, & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19.

- Drinkell, C. (2007). *Dracula cordobae*. *Curtis's Botanical Magazine*, 24(2), 101–107. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.2007.00570.x>
- Endara, L., Grimaldi, D., & Roy, B. (2010). Lord of the flies : Pollination of *Dracula* Orchids. *Lankesteriana*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.5958/0974-4517.2015.00025.7>
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., ... Barrett, S. C. H. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PloS One*, 3(7), e2802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
- Feng, S., Jiang, Y., Wang, S., Jiang, M., Chen, Z., Ying, Q., & Wang, H. (2015). Molecular Identification of *Dendrobium* Species (Orchidaceae) Based on the DNA Barcode ITS2 Region and Its Application for Phylogenetic Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21975–21988. <https://doi.org/10.3390/ijms160921975>
- Fontecha, G., Trabanino, R., Pérez, B., Catalán, P., Aguilar, E., Gallego, F. J., ... Benito, C. (2012). Caracterización Molecular de Aislados Centroamericanos de *Beauveria bassiana* para el Control de la Broca del Café. *Revista Ciencia y Tecnología*, 0(8). <https://doi.org/10.5377/rct.v0i8.699>
- Fuertes Flores, B. G., & Mallitasig Quishpe, D. A. (2018). Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Dracula* y *Epidendrum* (Orchidaceae). Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15158>
- García Rodríguez, T. M. (2015). *Evaluación y adaptación de un protocolo de extracción y amplificación de ADN en orquídeas conservadas en Herbarios en un exsicado de *Oncidium ornithorhynchum* con más de 200 años*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/17928/RodriguezGarciaMariaTeresa2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., ... Cameron, K. M. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography*, 43(10), 1905–1916. <https://doi.org/10.1111/jbi.12854>
- Google Earth. (2018). Retrieved November 13, 2018, from <https://www.google.es/intl/es/earth/index.html>
- Guzmán Salinas, N., & Moreno Coronado, B. (2014). *Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos Micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador*. Universidad del Azuay. <https://doi.org/10798>
- Han, J., Zhu, Y., Chen, X., Liao, B., Yao, H., Song, J., ... Meng, F. (2013). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed Research International*, 2013, 741476. <https://doi.org/10.1155/2013/741476>

- Hollingsworth, P. M., Li, D.-Z., van der Bank, M., & Twyford, A. D. (2016). Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1702). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0338>
- Hu, C., Tian, H., Li, H., Hu, A., Xing, F., Bhattacharjee, A., ... Chung, S. (2016). Phylogenetic Analysis of a “Jewel Orchid” Genus *Goodyera* (Orchidaceae) Based on DNA Sequence Data from Nuclear and Plastid Regions. *PloS One*, 11(2), e0150366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150366>
- Hurtado, H. F. (2012). *Caracterización morfológica y filogenia del género Vanilla en el distrito de buenaventura-valle del cauca (Colombia)*. Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10885>
- Iza, M. L. (2018). Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula*, mediante el sistema BARCODE, 70. Retrieved from <https://www.dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15043>
- Kim, H. T., & Chase, M. W. (2017). Independent degradation in genes of the plastid *ndh* gene family in species of the orchid genus *Cymbidium* (Orchidaceae; Epidendroideae). *PloS One*, 12(11), e0187318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187318>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62). <https://doi.org/10.3791/3923>
- López, M. (2018). *DIVERSIDAD DE ORQUÍDEAS EN ÁREAS SILVESTRES Y DE USO ANTRÓPICO DE LA REGIÓN DEL TEQUENDAMA, CORDILLERA ORIENTAL DE COLOMBIA*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63). <https://doi.org/10.3791/3998>
- Luer, C. (1993). *Icones Pleurothallidinarum X. Systematics of Dracula (Orchidaceae)*. St Louis, MO, USA: Missouri Botanical Garden.
- Luer, C. A. (1993). *Icones Pleurothallidinarum X Systematics of Dracula*. Florida: Missouri Botanical Garden.
- Luer, C., & Escobar, R. (1989). Spontaneous Hybrids in *Dracula*, 981–993.
- Luo, J., Hou, B.-W., Niu, Z.-T., Liu, W., Xue, Q.-Y., & Ding, X.-Y. (2014). Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. *PloS One*, 9(6), e99016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099016>
- Mazo Molina, L. C. (2011). *Evaluación y Comparación de 3 protocolos de*

extracción y amplificación del ADN contenido en Exsiccados de orquídeas conservadas en colecciones de herbario. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8874/tesis812.pdf;sequence=1>

Meyer, G., & Cameron, K. (2009). A PRELIMINARY PHYLOGENETIC STUDY OF DRACULA (PLEUROTHALLIDINAE , EPIDENDROIDEAE , ORCHIDACEAE), 100–114.

Meyer, G. E., Baquero, L., & Cameron, K. M. (2012). A New Ecuadorian species of Dracula: Pleurothallidinae (Orchidaceae). *OrchideenJournal*, 19, 107–113. Retrieved from http://orchideen-journal.de/permalink/MEYER_BAQUERO_CAMERON_Dracula_trigonopetal_a_final.pdf

Ministerio de Turismo. (2013). Ecuador declarado “País de las Orquídeas” – Ministerio de Turismo. Retrieved November 15, 2018, from <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-declarado-pais-de-las-orquideas/>

Ortega Andrade, S. (2017). Modelamiento de nicho ecológico : verdad o desafío para la gestión de la biodiversidad Aspectos históricos.

Palacios Leal, H. (2014). *INVENTARIO TAXONÓMICO DE ESPECIES DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE EN UN ÁREA DE BOSQUE ANDINO DEL PREDIO LA SIERRA, SANTUARIO DE FAUNA Y FLORA GUANENTÁ ALTO RIO FONCE.* *British Journal of Psychiatry.* UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA (UNAD). <https://doi.org/10.1192/bjp.205.1.76a>

Park, E., Kim, J., & Lee, H. (2017). Plant dna barcoding system for forensic application. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e282–e283. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.141>

Parra, E. A. (2012). Efecto de los patrones del paisaje sobre la diversidad de orquídeas de bosques nublados del Valle del Cauca. *Tesis Magistral*, 108. <https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.406.6206>

Parveen, I., Singh, H. K., Malik, S., Raghuvanshi, S., & Babbar, S. B. (2017). Evaluating five different loci (rbcL, rpoB, rpoC1, matK, and ITS) for DNA barcoding of Indian orchids. *Genome*, 60(8), 665–671. <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>

Pérez-Almeida, I., Graterol, L. A., Osorio, G., Ramis, C., Bedoya, Á. M., Figueroa-Ruiz, R., ... Infante, D. (2011). Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*, 23(1), 27–34. Retrieved from [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev23\(1\)/4](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev23(1)/4). Método modificado de obtención de ADN.pdf

Pérez, O. A., Chomicki, G., Condamine, F. L., Karremans, A. P., Bogarín, D.,

- Matzke, N. J., ... Antonelli, A. (2017). Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot. *The New Phytologist*, 215(2), 891–905. <https://doi.org/10.1111/nph.14629>
- Policha, T., Davis, A., Barnadas, M., Dentinger, B. T. M., Raguso, R. A., & Roy, B. A. (2016). Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula* orchids using realistic three-dimensional printed flowers. *New Phytologist*, 210(3), 1058–1071. <https://doi.org/10.1111/nph.13855>
- Pridgeon, A. M., Solano, R., & Chase, M. W. (2001). Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, 88(12), 2286–2308. <https://doi.org/10.2307/3558390>
- Pupulin, F., Merino, G., Medina, H., & Páez, J. (2009). *Draculas del Ecuador*. (Universidad Alfredo Pérez Guerrero & Centro de Investigación en Orquídeas de los Andes “Ángel Andretta,” Eds.). Quito: Ecuagenera. Retrieved from [http://www.epidendra.org/LITERATURE/Pupulin et al. 2009 - Dracula book/Pupulin 2009 & al. - DRACULAS OF ECUADOR light.pdf](http://www.epidendra.org/LITERATURE/Pupulin%20et%20al.%202009%20-%20Dracula%20book/Pupulin%202009%20&%20al.%20-%20DRACULAS%20OF%20ECUADOR%20light.pdf)
- Quimbaya. (2007). *Dracula psyche* (Luer & Andretta) Luer. Retrieved January 24, 2019, from <https://www.flickr.com/photos/quimbaya/690613547/in/photolist-q8J1bC-99As86-6jjwuu-8kuMYS-rvDQ16-GMiCnd-nGp6xu-qNiQfT-r3rngb-oLnQu6-ozEDsJ-r5zGpP-hc9wdf-nGp78L-c3fA9W-9jPp9W-8Koui9-8Kounq-97F8bP-97F82H-bpX4yF-9kjHYZ-242zm8>
- Rogers, S. O. (2012). *Integrated molecular evolution*. CRC Press.
- Salazar, G. A., Chase, M. W., Soto Arenas, M. A., & Ingrouille, M. (2003). Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany*, 90(5), 777–795. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.5.777>
- Siger, R. (2009). MORFOLOGÍA FLORAL Y POLINIZACIÓN DE ORQUÍDEAS : EL SEGUNDO LIBRO DE CHARLES DARWIN Floral Morphology and Pollination in Orchidaceae : Charles Darwin ' s Second Book. *Acta Biológica Colombiana ISSN:*, 14, 337–349.
- Singh, H., Parveen, I., Raghuvanshi, S., & Babbar, S. B. (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC Research Notes*, 5(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-42>
- Tang, H., Xiang, L., Li, X.-W., Sun, W., Wang, M.-N., Huang, Y.-F., & Ye, M. (2017). DNA barcoding identification of endangered medicinal plants of Orchidaceae. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 42(11), 2058–2067. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.2017.0090>
- Téllez Velasco, M. de los Á. A. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México*.

- The Plant List. (2018). *Dracula* The Plant List. Retrieved November 16, 2018, from <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/Dracula/>
- Thermo Fisher Scientific. (2018). Phire Plant Direct PCR Master Mix. Retrieved November 11, 2018, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F160S>
- Tropicos. (2018). Retrieved December 26, 2018, from <https://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=dracula&commonname=>
- Velita, N., & Vilcapoma, K. (2010). *Estudio de la Diversidad y Morfología de la Familia Orchidaceae en el Pajonal de Chontabamba – Oxapampa*. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ. Retrieved from [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/2591/Velita Ruiz - Vilcapoma Olivera.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/2591/Velita_Ruiz_-_Vilcapoma_Olivera.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Yuan, Q.-J., Zhang, B., Jiang, D., Zhang, W.-J., Lin, T.-Y., Wang, N.-H., ... Huang, L.-Q. (2015). Identification of species and materia medica within *Angelica* L. (Umbelliferae) based on phylogeny inferred from DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 358–371. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12296>
- Zambrano, B. J., & Solano, R. (2011). Un nuevo híbrido natural de *Dracula* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) del suroccidente de Ecuador. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(3), 758–761. <https://doi.org/10.7550/rmb.27821>
- Zelenko, H. (2014). *Orchids Masdevallia with its segregates including Dracula*. ZAI Publ.

Anexos

Anexo 1. Condiciones de temperatura del termociclador

Etapas	<i>matK</i>			<i>ITS</i>		
	Temperatura (°C)	Tiempo	ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	ciclos
Desnaturalización inicial	94	1 min	1	94	1 min	1
Desnaturalización	94	30 s	30	94	30 s	30
Hibridación	53	40s		56	40s	
Elongación	72	40 s		72	40 s	
Elongación final	72	5 min	1	72	5 min	1

Nota: protocolo de amplificación en PCR convencional, para *matK* e *ITS*

Fuente: Los autores, 2018.

Anexo 2. Lista de especies del género *Dracula* (Secuencias del grupo de investigación NUNKUI WAKAN)

Número de muestra	Nombre científico	Código de colección	Lugar de colección	Fecha de colecta
1	<i>Dracula hirtzii</i>	3670	Alexander Marín	12/11/2017
2	<i>Dracula lafleurii</i>	3669	Alexander Marín	12/11/2017
3	<i>Dracula hirsuta</i>	3624	Alexander Marín	12/11/2017
4	<i>Dracula rezeckiana</i>	3613	Alexander Marín	12/11/2017
5	<i>Dracula hirsuta</i> var. <i>xantina</i>	3600	Alexander Marín	12/11/2017
6	<i>Dracula marinii</i>	3590	Alexander Marín	12/11/2017
7	<i>Dracula hirtzii</i>	3583	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
8	<i>Dracula sibundoyensis</i>	3582B	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
9	<i>Dracula hirsuta</i>	3578	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
10	<i>Dracula chiroptera</i>	3552	Beto Guerrero	8/9/2017
11	<i>Dracula simia</i> / <i>D. alcithoe</i>	3542	Beto Guerrero	8/9/2017
12	<i>Dracula hirsuta</i>	3532	Beto Guerrero	8/9/2017
13	<i>Dracula ubangina</i>	3529	Beto Guerrero	8/9/2017
14	<i>Dracula rezeckiana</i>	3521	Beto Guerrero	8/9/2017
15	<i>Dracula lafleurii</i>	3533	Beto Guerrero	8/9/2017
16	<i>Dracula terborchii</i>	3525	Beto Guerrero	8/9/2017
17	<i>Dracula x felix</i>	3550	Beto Guerrero	8/9/2017
18	<i>Dracula marsupialis</i>	3564	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
19	<i>Dracula tsubotae</i> / <i>D. christineana</i>	3740	Alexander Marín	12/11/2017
20	<i>Dracula mendozae</i>	3623	Alexander Marín	12/11/2017
21	<i>Dracula papillosa</i>	3615	Alexander Marín	12/11/2017
22	<i>Dracula alcithoe</i>	3724	Alexander Marín	12/11/2017

23	<i>Dracula verticulosa xantina</i>	3577	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
24	<i>Dracula fuligifera</i>	3636	Alexander Marín	12/11/2017
25	<i>Dracula smaug</i>	3576	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
26	<i>Dracula sibundoyensis</i>	3536	Beto Guerrero	8/9/2017
27	<i>Dracula lotax x adriane</i>	3579	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
28	<i>Dracula lotax</i>	3632	Alexander Marín	12/11/2017
29	<i>Dracula trichroma (iricolor)</i>	3563	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
30	<i>Dracula portillae</i>	3749	Alexander Marín	12/11/2017
31	<i>Dracula andreettae</i>	3559	Héctor Yela	27/9/2017
32	<i>Dracula deltoidea</i>	3574	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
33	<i>Dracula venosa</i>	3566	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
34	<i>Dracula mantissa</i>	3548	Beto Guerrero	8/9/2017
35	<i>Dracula venosa</i>	3547	Beto Guerrero	8/9/2017
36	<i>Dracula x pinasensis</i>	3522	Beto Guerrero	8/9/2017
37	<i>Dracula vespertilio</i>	3703	Alexander Marín	12/11/2017
38	<i>Dracula bella</i>	3608	Alexander Marín	12/11/2017
39	<i>Dracula trigonopetala</i>	3528	Beto Guerrero	8/9/2017
40	<i>Dracula lindstroemii</i>	3544	Beto Guerrero	8/9/2017
41	<i>Dracula morleyi</i>	3545	Beto Guerrero	8/9/2017
42	<i>Dracula marsupialis x xantina</i>	3549	Beto Guerrero	8/9/2017
43	<i>Dracula chimaera</i>	3567	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
44	<i>Dracula syndactyla</i>	3569	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
45	<i>Dracula radiella</i>	3570	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
46	<i>Dracula sodiroi</i>	3584	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
47	<i>Dracula erytrocodon</i>	3572	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
48	<i>Dracula x kareniae</i>	3571	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
49	<i>Dracula trigonopetala</i>	3560	Héctor Yela	27/9/2017
50	<i>Dracula x kareniae</i>	3540	Beto Guerrero	8/9/2017
51	<i>Dracula wolwardiae</i>	3534	Beto Guerrero	8/9/2017
52	<i>Dracula tubeana</i>	3531	Beto Guerrero	8/9/2017
53	<i>Dracula soennemarkii</i>	3526	Beto Guerrero	8/9/2017
54	<i>Dracula polyphemus</i>	3527	Beto Guerrero	8/9/2017
55	<i>Dracula gigas (amarilla)</i>	3612	Alexander Marín	12/11/2017
56	<i>Dracula dalstroemii</i>	3693	Alexander Marín	12/11/2017
57	<i>Dracula gigas (amarilla)</i>	3419	Sara Gutiérrez	7/9/2017
58	<i>Dracula x sijmii</i>	3539	Beto Guerrero	8/9/2017
59	<i>Dracula x hawleyi</i>	3546	Beto Guerrero	8/9/2017
60	<i>Dracula x hawleyi</i>	3593	Alexander Marín	12/11/2017
61	<i>Dracula gigas (negra)</i>	3619	Alexander Marín	12/11/2017
62	<i>Dracula psyche</i>	3573	Jardín Botánico Quito	2/10/2017
63	<i>Dracula gastrophora</i>	3603	Alexander Marín	12/11/2017
64	<i>Dracula cordobae</i>	3413	Sara Gutiérrez	7/9/2017

65	<i>Dracula hirtzii</i>	3524	Beto Guerrero	8/9/2017
66	<i>Dracula erythrocodon</i>	3412	Sara Gutiérrez	7/9/2017
67	<i>Dracula vampira</i>	3402	Sara Gutiérrez	7/9/2017
68	<i>Dracula sodiroii</i>	3403	Sara Gutiérrez	7/9/2017
69	<i>Dracula thricroma</i>	3770	Alexander Marín	12/11/2017
70	<i>Dracula trigonopetala</i>	3618	Alexander Marín	12/11/2017
71	<i>Dracula simia</i>	3400	Sara Gutiérrez	7/9/2017
72	<i>Dracula mendozae</i>	3609	Alexander Marín	12/11/2017
73	<i>Dracula sibundoyensis</i>	3717	Alexander Marín	12/11/2017
74	<i>Dracula simia</i>	3401	Sara Gutiérrez	7/9/2017
75	<i>Dracula vesperilio</i>	3441	Sara Gutiérrez	7/9/2017
76	<i>Dracula psyche</i>	3405	Sara Gutiérrez	7/9/2017
77	<i>Dracula marsupialis</i>	3428	Sara Gutiérrez	7/9/2017
78	<i>Dracula venosa</i>	3771	Alexander Marín	12/11/2017

Nota: Especies colectadas y secuenciadas por el grupo de investigación NUNCUI WAKAN.
Fuente: Los autores, 2018.

Anexo 3. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Número de muestra	Nombre científico	Código de colección	Extracción de ADN	Amplificación		Secuenciación	
				<i>matK</i>	<i>ITS</i>	<i>matk</i>	<i>ITS</i>
1	<i>Dracula agnosia</i>	4035	-	SI	-	-	-
2	<i>Dracula alcithoe</i>	3914	SI	SI	SI	SI	-
3	<i>Dracula alcithoe</i>	4055	-	SI	SI	SI	-
4	<i>Dracula amaliae</i>	3915	SI	SI	-	SI	-
5	<i>Dracula amaliae</i>	4056	-	-	SI	-	-
6	<i>Dracula andreetae</i>	3916	SI	SI	SI	-	-
7	<i>Dracula anicula</i>	4080	-	-	-	-	-
8	<i>Dracula anthony</i>	3990	SI	SI	SI	SI	-
9	<i>Dracula anthracina</i>	3917	SI	SI	SI	-	-
10	<i>Dracula anthracina</i>	3918	SI	SI	SI	SI	-
11	<i>Dracula anthracina</i>	3988	SI	SI	SI	SI	-
12	<i>Dracula anthracina</i>	3989	SI	SI	SI	SI	-
13	<i>Dracula antoni</i>	3900	-	-	-	-	-
14	<i>Dracula aphrodes</i>	3919	SI	SI	SI	SI	-
15	<i>Dracula astuta</i>	3872	SI	SI	-	SI	-
16	<i>Dracula astuta</i>	3878	SI	-	-	-	-
17	<i>Dracula astuta</i>	4044	-	SI	-	SI	-
18	<i>Dracula barrowii</i>	3920	SI	SI	SI	SI	-
19	<i>Dracula bella</i>	3921	SI	-	SI	-	SI
20	<i>Dracula bella</i>	3922	SI	SI	SI	SI	SI
21	<i>Dracula bellerophon</i>	3898	SI	SI	SI	SI	-
22	<i>Dracula benedictii</i>	3871	SI	SI	SI	SI	-

23	<i>Dracula benedictii</i>	3905	SI	SI	-	SI	-
24	<i>Dracula benedictii</i>	3907	SI	SI	SI	SI	-
25	<i>Dracula benedictii</i>	3908	SI	SI	SI	SI	SI
26	<i>Dracula benedictii</i>	4045	-	SI	SI	SI	SI
27	<i>Dracula benefica</i>	4029	-	-	SI	-	-
28	<i>Dracula berthae</i>	3923	SI	SI	SI	SI	-
29	<i>Dracula brangeri</i>	4004	SI	SI	-	SI	-
30	<i>Dracula brangeri</i>	4038	-	SI	SI	SI	-
31	<i>Dracula callitrix</i>	4050	-	-	SI	-	-
32	<i>Dracula carcinopsis</i>	3886	SI	SI	SI	SI	-
33	<i>Dracula carlueri</i>	4067	-	-	-	-	-
34	<i>Dracula chestertonii</i>	3924	SI	-	SI	-	-
35	<i>Dracula chestertonii</i>	3925	SI	SI	SI	SI	-
36	<i>Dracula chimaera</i>	3926	SI	SI	SI	SI	-
37	<i>Dracula chimaera</i>	3927	SI	SI	SI	SI	-
38	<i>Dracula chiroptera</i>	3928	SI	SI	SI	SI	-
39	<i>Dracula chiroptera</i>	3929	SI	SI	SI	-	-
40	<i>Dracula christineana</i>	4070	SI	SI	SI	SI	-
41	<i>Dracula circe</i>	3930	SI	-	-	SI	-
42	<i>Dracula citrina</i>	3880	-	-	-	-	-
43	<i>Dracula citrina</i>	4082	SI	SI	SI	SI	-
44	<i>Dracula cochliops</i>	3931	SI	SI	SI	SI	-
45	<i>Dracula colombiana</i>	3932	SI	SI	SI	SI	-
46	<i>Dracula cordabae</i>	3933	-	-	-	SI	-
47	<i>Dracula cutis bufonis</i>	3934	SI	SI	-	-	-
48	<i>Dracula dalesandroi</i>	4033	-	SI	SI	SI	-
49	<i>Dracula deniseana</i>	3901	SI	-	SI		-
50	<i>Dracula dens canis</i>	3935	SI	SI	-	SI	-
51	<i>Dracula diabola</i>	3936	SI	SI	SI	SI	-
52	<i>Dracula diabola</i>	3937	SI	SI	SI	SI	-
53	<i>Dracula diana</i>	3938	SI	-	SI	-	-
54	<i>Dracula dodsonii</i>	3992	SI	SI	SI	SI	-
55	<i>Dracula dodsonii</i>	4047	-	SI	SI	-	-
56	<i>Dracula ecuagenerensi porroglosum</i>	4052	-	SI	SI	-	-
57	<i>Dracula erythrochaete</i>	3939	SI	SI	-	SI	-
58	<i>Dracula erythrochaete</i>	3940	SI	SI	SI	-	-
59	<i>Dracula exasperata</i>	3941	SI	SI	SI	SI	-
60	<i>Dracula felix</i>	3942	SI	SI	-	-	-
61	<i>Dracula felix</i>	3943	SI	SI	SI	SI	-
62	<i>Dracula fuligifera</i>	3944	SI	SI	SI	-	-

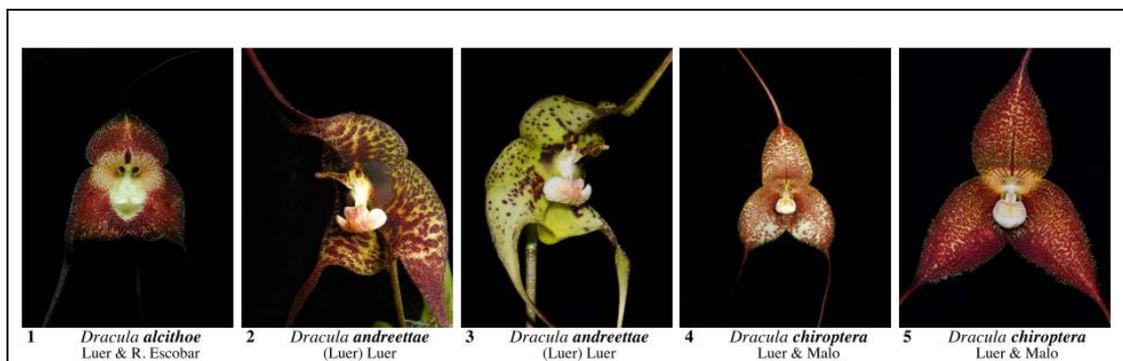
63	<i>Dracula gigas</i>	3945	SI	SI	SI	-	-
64	<i>Dracula gorgona</i>	3946	SI	SI	SI	-	-
65	<i>Dracula gorgona</i>	3947	SI	SI	SI	SI	-
66	<i>Dracula gorgonella</i>	3897	SI	SI	SI	-	-
67	<i>Dracula gorgonella</i>	4081	-	SI	-	SI	-
68	<i>Dracula hawleyi</i>	4066	-	-	SI	-	-
69	<i>Dracula hirtzii</i>	3948	SI	SI	SI	SI	-
70	<i>Dracula hirtzii</i>	3949	SI	-	SI	-	-
71	<i>Dracula houtteana</i>	3950	SI	SI	SI	SI	-
72	<i>Dracula houtteana</i>	3951	SI	SI	SI	SI	-
73	<i>Dracula houtteana</i>	3952	SI	SI	SI	SI	-
74	<i>Dracula hubeinii</i>	4068	-	-	-	-	-
75	<i>Dracula inaequalis</i>	3870	SI	SI	SI	SI	-
76	<i>Dracula inaequalis</i>	3887	SI	SI	SI	SI	-
77	<i>Dracula insolita</i>	3953	SI	SI	SI	SI	-
78	<i>Dracula iricolor</i>	3954	SI	SI	SI	SI	-
79	<i>Dracula janetiae</i>	3902	SI	SI	SI	SI	-
80	<i>Dracula janetiae</i>	4074	-	-	-	-	-
81	<i>Dracula lemurella</i>	3955	SI	SI	SI	SI	-
82	<i>Dracula levii</i>	3869	SI	SI	SI	SI	SI
83	<i>Dracula levii</i>	3906	SI	SI	SI	-	-
84	<i>Dracula levii</i>	4003	SI	SI	SI	SI	-
85	<i>Dracula ligiae</i>	4034	-	SI	-	-	-
86	<i>Dracula ligiae</i>	4064	-	SI	SI	SI	-
87	<i>Dracula lotax</i>	4032	-	SI		-	-
88	<i>Dracula maduroi</i>	3891	SI	SI	SI	SI	-
89	<i>Dracula mantissa</i>	3893	SI	SI		SI	-
90	<i>Dracula mantissa</i>	4058	-	SI		SI	-
91	<i>Dracula marsupialis</i>	3912	SI	SI	SI	SI	-
92	<i>Dracula marsupialis</i>	3913	SI	-	SI	-	-
93	<i>Dracula marsupialis</i>	4046	-	-	-	-	-
94	<i>Dracula mendozae</i>	3956	SI	SI	-	-	-
95	<i>Dracula minax</i>	3957	SI	SI	SI	SI	-
96	<i>Dracula mopsus</i>	3958	SI	SI	SI	SI	-
97	<i>Dracula mopsus</i>	4040	-	SI	SI	SI	-
98	<i>Dracula morleyi</i>	4053	-	SI	SI	-	-
99	<i>Dracula morleyi</i>	4073	-	SI	SI	SI	-
100	<i>Dracula nosferatum</i>	4049	-	SI	-	-	-
101	<i>Dracula novarrorum</i>	4048	-	SI	SI	-	-
102	<i>Dracula novarrorum</i>	4061	-	SI	SI	SI	-
103	<i>Dracula nycterina</i>	3884	SI	-	-	-	-
104	<i>Dracula nycterina</i>	4078	-	-	-	-	-
105	<i>Dracula octavioi</i>	4075	-	-	-	-	-
106	<i>Dracula olmosii</i>	3959	SI	SI	SI	SI	-

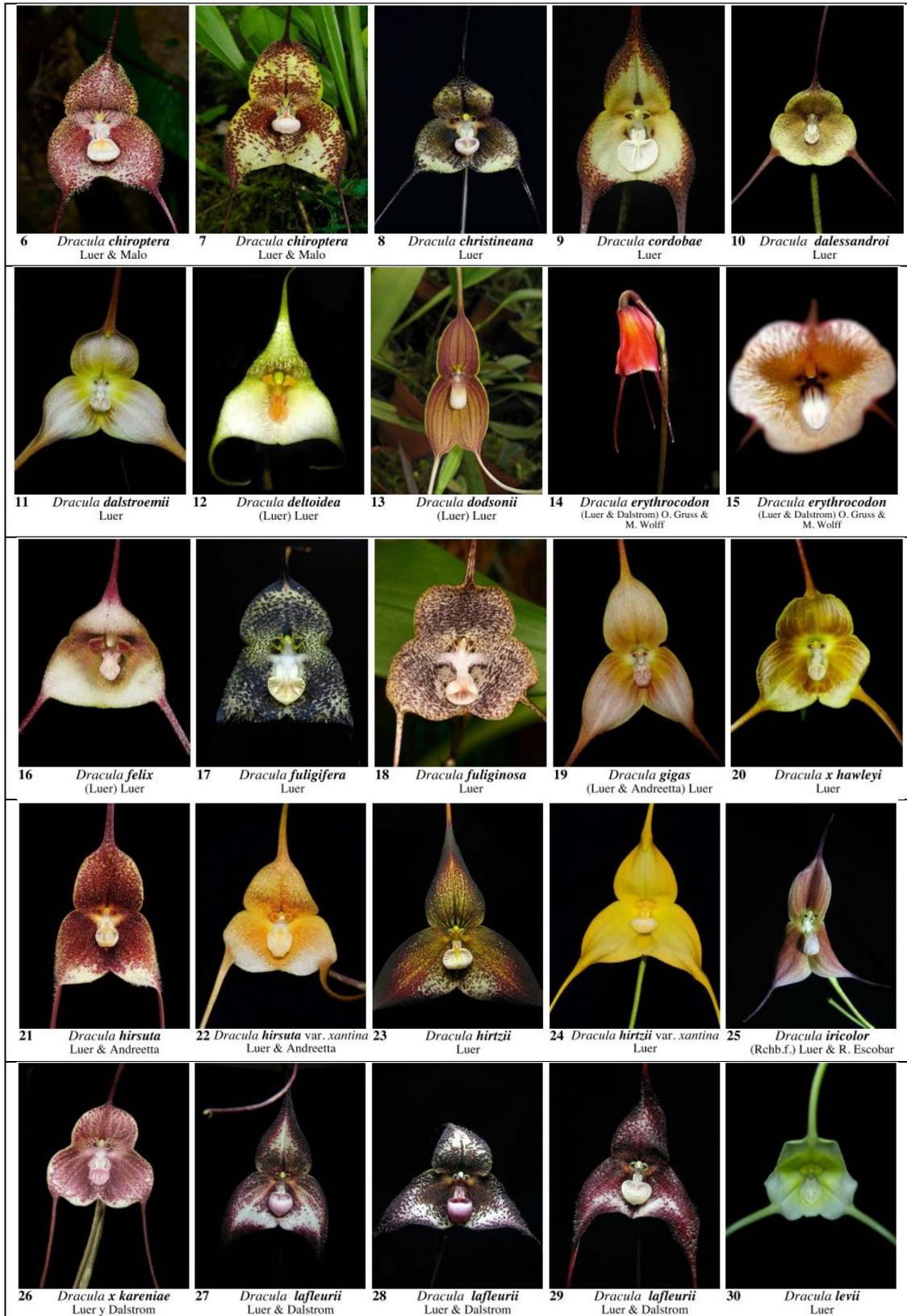
107	<i>Dracula olmosii</i>	3960	SI	SI	-	SI	-
108	<i>Dracula olmosii</i>	4041	-	SI	SI	-	-
109	<i>Dracula ophioceps</i>	3961	SI	SI	SI	SI	-
110	<i>Dracula orientalis</i>	3888	SI	SI	SI	SI	-
111	<i>Dracula orientalis</i>	4059	-	SI	-	SI	-
112	<i>Dracula papillosa</i>	4037	-	SI	-	SI	-
113	<i>Dracula pholeodytes</i>	3962	SI	SI	SI	SI	-
114	<i>Dracula pinacensis</i>	3910	SI	SI	SI	SI	-
115	<i>Dracula platycrater</i>	3882	SI	SI	SI	SI	-
116	<i>Dracula platycrater</i>	4063	-	SI	-	SI	-
117	<i>Dracula polyphemus</i>	3991	SI	SI	SI	SI	-
118	<i>Dracula portillae</i>	3876	SI	SI	SI	SI	-
119	<i>Dracula posadarum</i>	3885	SI	SI	SI	SI	-
120	<i>Dracula posadarum</i>	4062	-	-	SI	-	-
121	<i>Dracula presbys</i>	3963	SI	-	-	SI	-
122	<i>Dracula psittacina</i>	3883	SI	-	SI	-	-
123	<i>Dracula psyche</i>	4030	-	SI	SI	SI	-
124	<i>Dracula pubescens</i>	4072	-	-	-	SI	-
125	<i>Dracula radiosa</i>	3874	-	-	SI	-	-
126	<i>Dracula radiosa</i>	3903	SI	-	SI	SI	-
127	<i>Dracula radiosa</i>	3964	SI	SI	SI	-	-
128	<i>Dracula radiosa</i>	4002	SI	SI	SI	-	-
129	<i>Dracula raven</i>	3873	SI	SI	SI	SI	-
130	<i>Dracula raven</i>	3895	SI	SI	SI	SI	-
131	<i>Dracula ripleyana</i>	3899	SI	SI	-	SI	-
132	<i>Dracula robledorum</i>	3890	SI	-	-	-	-
133	<i>Dracula robledorum</i>	4060	-	-	-	SI	-
134	<i>Dracula roezlii</i>	3894	SI	-	SI	-	-
135	<i>Dracula sauli</i>	4031	-	SI	-	SI	-
136	<i>Dracula senex furens</i>	4054	-	SI	-	-	-
137	<i>Dracula sergioi</i>	4069	-	-	-	-	-
138	<i>Dracula severa</i>	3965	SI	SI	SI	SI	-
139	<i>Dracula sibundoyensis</i>	3966	SI	SI	SI	-	-
140	<i>Dracula sijmii</i>	4076	-	-	SI	-	-
141	<i>Dracula simia</i>	4036	-	SI	SI	-	-
142	<i>Dracula smaug</i>	3967	SI	SI	SI	SI	-
143	<i>Dracula sp</i>	3909	SI	SI	SI	-	-
144	<i>Dracula sp</i>	3911	SI	SI	-	-	-
145	<i>Dracula syndactyla</i>	3968	SI	SI	SI	-	-
146	<i>Dracula trichroma</i>	3879	SI	SI	-	SI	-
147	<i>Dracula tsubotae</i>	3877	SI	SI	-	SI	-
148	<i>Dracula tsubotae</i>	3896	SI	SI	-	SI	-
149	<i>Dracula tsubotae</i>	4077	-	-	SI	-	-

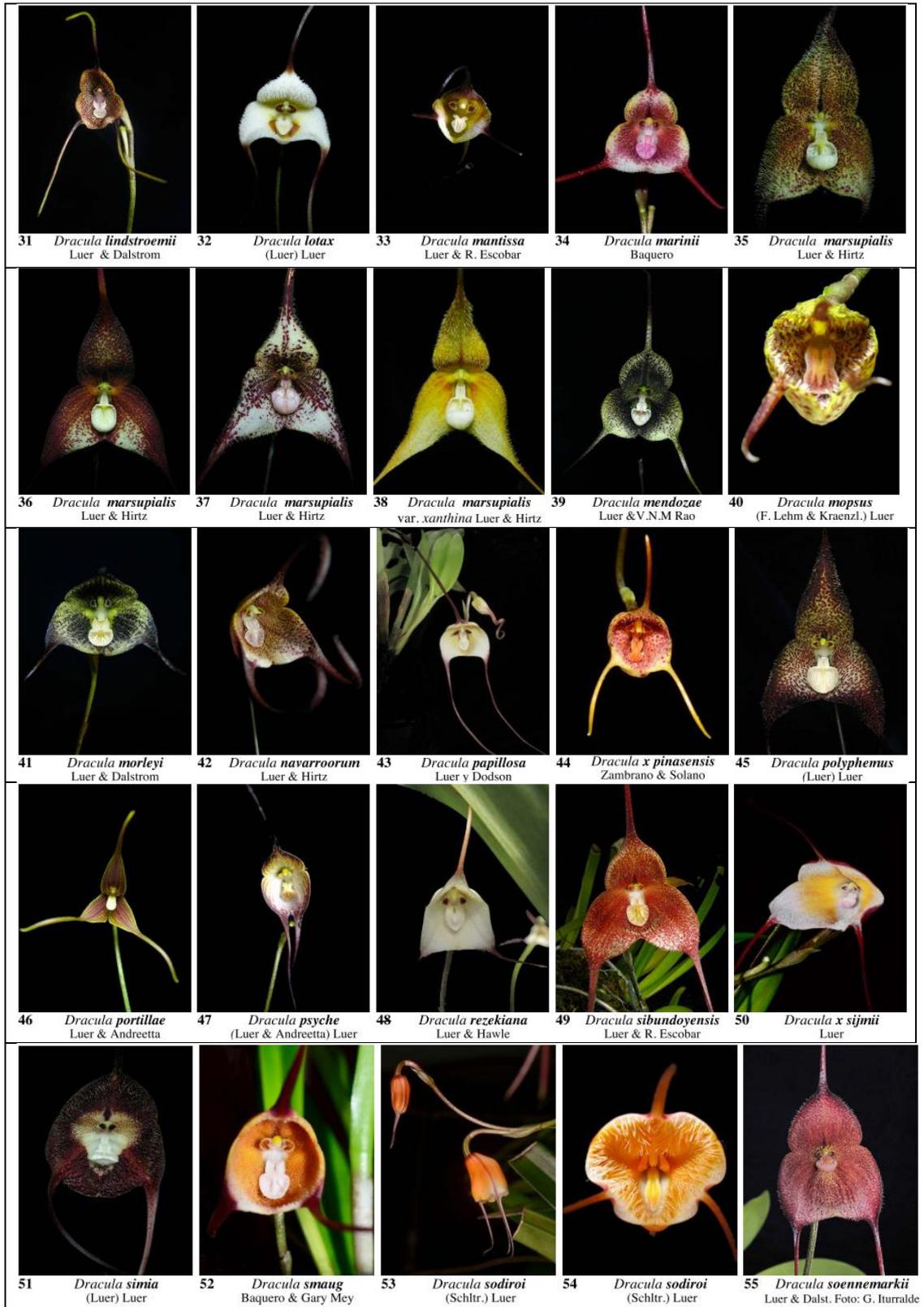
150	<i>Dracula tubeana</i>	3993	SI	SI	SI	SI	-
151	<i>Dracula veleziana</i>	3969	SI	-	SI	-	-
152	<i>Dracula velutina</i>	3970	SI	SI	-	-	-
153	<i>Dracula venefica</i>	3892	SI	-	SI	SI	-
154	<i>Dracula venosa</i>	3971	-	-	-	-	-
155	<i>Dracula verde</i>	3875	SI	SI	-	SI	-
156	<i>Dracula verticulosa</i>	3972	SI	-	SI	-	-
157	<i>Dracula verticulosa</i>	3973	SI	SI	-	SI	-
158	<i>Dracula verticulosa</i>	4042	-	SI	-	-	-
159	<i>Dracula vespertilio</i>	3974	SI	-	SI	SI	-
160	<i>Dracula vespertilio</i>	4043	-	SI	-	SI	-
161	<i>Dracula vierlingii</i>	3975	SI	SI	SI	SI	-
162	<i>Dracula villegasii</i>	3889	SI	SI	SI	-	-
163	<i>Dracula vinacea</i>	3904	SI	SI	SI	SI	-
164	<i>Dracula vinacea</i>	4079	-	-	-	-	-
165	<i>Dracula vlad-tepes</i>	3881	SI	SI	SI	SI	-
166	<i>Dracula wallisii</i>	3976	SI	-	SI	-	-
167	<i>Dracula wallisii</i>	4057	-	-	-	-	-
168	<i>Dracula wolwardiae</i>	3977	SI	SI	SI	SI	-
169	<i>Dracula x olmosii</i>	4039	-	SI	-	-	-
170	<i>Dracula x rojasi</i>	4051	-	SI	SI	-	-
171	<i>Dracula xanthina</i>	4071	-	SI	SI	-	-
172	<i>Dracula xenos</i>	4065	-	SI	SI	SI	-
173	<i>Masdevallia picturata</i>	3980	SI	SI	SI	SI	-
174	<i>Masdevallia picturata</i>	3981	SI	SI	SI	SI	-
175	<i>Masdevallia picturata</i>	3982	SI	SI	-	SI	-
176	<i>Trisetella sp.</i>	3987	SI	SI	SI	SI	-

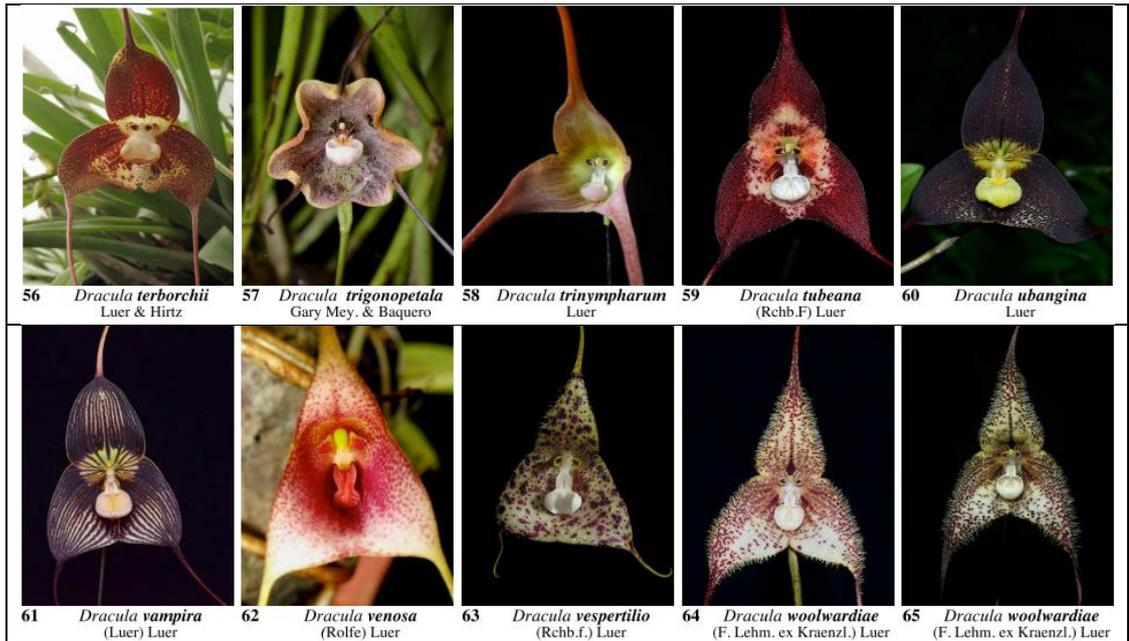
Fuente: Los autores, 2018.

Anexo 4. Especies del género *Dracula*









Nota: Especies del género *Dracula* descritas en Ecuador.

Fuente: (Baquero & Moncayo, 2017)

Anexo 5. Datos de georreferenciales del género *Dracula*

Numero	Especie	Latitud	Longitud	País
1	<i>Dracula adriane</i>	5,775000	-74,341667	Colombia
2	<i>Dracula alcithoe</i>	1,111367	-76,961620	Colombia
3	<i>Dracula alcithoe</i>	0,353922	-78,478081	Colombia
4	<i>Dracula amaliae</i>	2,970513	-76,897907	Colombia
5	<i>Dracula andreettae</i>	0,894288	-78,114286	Ecuador
6	<i>Dracula andreettae</i>	1,033333	-78,216777	Ecuador
7	<i>Dracula andreettae</i>	4,777589	-76,271864	Colombia
8	<i>Dracula anicula</i>	6,373635	-75,700155	Colombia
9	<i>Dracula anthracina</i>	4,643172	-74,103432	Colombia
10	<i>Dracula aphrodes</i>	4,507561	-76,247935	Colombia
11	<i>Dracula astuta</i>	9,863809	-83,916194	Costa Rica
12	<i>Dracula bella</i>	6,730719	-76,043046	Colombia
13	<i>Dracula bellerophon</i>	5,707777	-75,307777	Colombia
14	<i>Dracula benedictii</i>	5,690917	-75,291893	Colombia
15	<i>Dracula benedictii</i>	6,063024	-75,338229	Colombia
16	<i>Dacula berthae</i>	5,804726	-73,519038	Colombia
17	<i>Dracula brangeri</i>	5,996188	-73,006010	Colombia
18	<i>Dracula carcinopsis</i>	4,501804	-76,457529	Colombia
19	<i>Dracula chestertonii</i>	3,291918	-76,737814	Colombia
20	<i>Dracula chimaera (chocó)</i>	5,095274	-76,355602	Colombia
21	<i>Dracula chimaera (cauca)</i>	2,699759	-76,895479	Colombia
22	<i>Dracula chiroptera</i>	-0,228659	-78,795795	Ecuador
23	<i>Dracula chiroptera</i>	1,190289	-77,991681	Colombia

24	<i>Dracula circe</i>	6,028172	-75,431355	Colombia
25	<i>Dracula citrina</i>	6,708397	-76,135704	Colombia
26	<i>Dracula cochliops</i>	1,158986	-76,862313	Colombia
27	<i>Dracula cordobae</i>	-3,598662	-79,819634	Ecuador
28	<i>Dracula cutis-bufonis</i>	5,778975	-75,323792	Colombia
29	<i>Dracula dalessandroi</i>	-4,450166	-79,154722	Ecuador
30	<i>Dracula dalstroemii</i>	0,807317	-78,020364	Ecuador
31	<i>Dracula decussata</i>	5,724280	-76,045364	Colombia
32	<i>Daracula deltoidea</i>	-4,130022	-79,075319	Ecuador
33	<i>Dracula diabola</i>	5,813283	-73,484747	Colombia
34	<i>Dracula diana</i>	3,919267	-76,595056	Colombia
35	<i>Dracula diana</i>	5,775550	-74,341700	Ecuador
36	<i>Dracula dodsonii</i>	-0,226685	-78,771271	Ecuador
37	<i>Dracula dodsonii</i>	0,066777	-78,666777	Ecuador
38	<i>Dracula dodsonii</i>	-0,231444	-78,802800	Ecuador
39	<i>Dracula erythrochaete</i>	10,146689	-84,245487	Costa Rica
40	<i>Dracula erythrochaete</i>	8,822997	-82,446348	Panamá
41	<i>Dracula exasperata</i>	1,201794	-76,784504	Colombia
42	<i>Dracula fafnir</i>	-3,895380	-78,688574	Ecuador
43	<i>Dracula felix</i>	-0,233196	-78,765403	Ecuador
44	<i>Dracula felix</i>	0,886190	-78,406226	Ecuador
45	<i>Dracula felix</i>	1,205427	-78,010928	Colombia
46	<i>Dracula fuligifera</i>	-1,402480	-78,142012	Ecuador
47	<i>Dracula gastrophora</i>	-0,169863	-78,698442	Ecuador
48	<i>Dracula gigas</i>	-0,925520	-78,117919	Ecuador
49	<i>Dracula gigas</i>	3,740952	-76,228232	Colombia
50	<i>Dracula gorgona</i>	5,928088	-76,193899	Colombia
51	<i>Dracula gorgonella</i>	5,558834	-75,901618	Colombia
52	<i>Dracula hawleyi</i>	0,877492	-78,129920	Ecuador
53	<i>Dracula hirsuta</i>	-3,640616	-78,642229	Ecuador
54	<i>Dracula hirtzii</i>	-0,048749	-78,686922	Ecuador
55	<i>Dracula hirtzii</i>	0,272169	-78,573111	Ecuador
56	<i>Dracula hirtzii (colombia)</i>	1,527761	-77,576269	Colombia
57	<i>Dracula houtteana</i>	6,314068	-76,123096	Colombia
58	<i>Dracula houtteana</i>	6,028729	-75,446322	Colombia
59	<i>Dracula houtteana</i>	5,217778	-76,039390	Colombia
60	<i>Dracula inaequalis</i>	5,893044	-76,142553	Colombia
61	<i>Dracula inaequalis</i>	3,768978	-76,695621	Colombia
62	<i>Dracula incognita</i>	7,020012	-76,069042	Colombia
63	<i>Dracula insolita</i>	3,739202	-76,251852	Colombia
64	<i>Dracula trichrooma</i>	6,175710	-75,530701	Colombia
65	<i>Dracula trichrooma</i>	2,940885	-76,450429	Colombia
66	<i>Dracula trichrooma</i>	1,171018	-76,875818	Colombia
67	<i>Dracula trichrooma</i>	0,898256	-78,115740	Ecuador
68	<i>Dracula trichrooma</i>	0,413129	-78,788736	Ecuador

69	<i>Dracula janetiae</i>	-9,322055	-75,760203	Perú
70	<i>Dracula lafleurii</i>	0,268885	-78,627984	Ecuador
71	<i>Dracula lehmanniana</i>	2,537262	-77,105888	Colombia
72	<i>Dracula lemurella</i>	7,111945	-75,557774	Colombia
73	<i>Dracula levii</i>	0,841968	-78,035522	Ecuador
74	<i>Dracula levii</i>	1,033333	-78,216700	Ecuador
75	<i>Dracula levii</i>	1,143210	-77,857287	Colombia
76	<i>Dracula ligiae</i>	6,237908	-75,580386	Colombia
77	<i>Dracula lindstroemii</i>	0,897766	-78,111814	Ecuador
78	<i>Dracula lotax</i>	-1,446098	-78,082883	Ecuador
79	<i>Dracula lotax</i>	-2,734169	-78,417626	Ecuador
80	<i>Dracula mantissa</i>	-0,221097	-78,765623	Ecuador
81	<i>Dracula mantissa</i>	5,775000	-74,341700	Ecuador
82	<i>Dracula mantissa</i>	1,219736	-77,959264	Colombia
83	<i>Dracula marsupialis</i>	-0,048386	-78,741822	Ecuador
84	<i>Dracula minax</i>	6,278360	-75,681895	Colombia
85	<i>Dracula mopsus</i>	-3,676222	-79,613780	Ecuador
86	<i>Dracula mopsus</i>	-1,054122	-80,669564	Ecuador
87	<i>Dracula mopsus</i>	-1,080058	-79,212728	Ecuador
88	<i>Dracula morleyi</i>	0,317142	-78,514012	Ecuador
89	<i>Dracula navarroorum</i>	0,006543	-78,680835	Ecuador
90	<i>Dracula navarroorum</i>	0,006222	-78,673946	Ecuador
91	<i>Dracula nosferatu</i>	5,905476	-75,329689	Colombia
92	<i>Dracula nycterina</i>	6,777925	-76,143547	Colombia
93	<i>Dracula nycterina</i>	6,166631	-74,950906	Colombia
94	<i>Dracula octavioi</i>	1,221003	-76,099734	Colombia
95	<i>Dracula ophioceps</i>	2,486364	-76,396643	Colombia
96	<i>Dracula orientalis</i>	7,330653	-72,472537	Colombia
97	<i>Dracula ortiziana</i>	3,730627	-76,263583	Colombia
98	<i>Dracula papillosa</i>	0,876292	-78,721589	Ecuador
99	<i>Dracula pholeodytes</i>	5,752350	-73,440679	Colombia
100	<i>Dracula platycrater</i>	5,344474	-75,440085	Colombia
101	<i>Dracula platycrater</i>	6,059170	-75,180817	Colombia
102	<i>Dracula platycrater</i>	6,550000	-76,316700	Colombia
103	<i>Dracula platycrater</i>	5,881099	-76,217538	Colombia
104	<i>Dracula polyphemus</i>	-0,221102	-78,772640	Ecuador
105	<i>Dracula polyphemus</i>	0,276687	-78,451890	Ecuador
106	<i>Dracula portillae</i>	-2,905012	-78,719647	Ecuador
107	<i>Dracula posadarum</i>	6,310346	-76,122180	Colombia
108	<i>Dracula presbys</i>	6,550720	-75,834879	Colombia
109	<i>Dracula psittacina</i>	6,195313	-75,548284	Colombia
110	<i>Dracula psittacina</i>	6,062817	-75,493039	Colombia
111	<i>Dracula psittacina</i>	4,582105	-74,363364	Colombia
112	<i>Dracula psyhe</i>	0,901667	-78,113979	Ecuador
113	<i>Dracula pusilla</i>	15,600721	-90,154164	Guatemala

114	<i>Dracula pusilla</i>	15,078753	-90,412523	Guatemala
115	<i>Dracula pusilla</i>	16,096440	-91,707976	México
116	<i>Dracula pusilla</i>	13,253639	-85,673421	Nicaragua
117	<i>Dracula pusilla</i>	10,102375	-84,045191	Costa Rica
118	<i>Dracula pusilla</i>	8,778896	-82,367647	Panamá
119	<i>Dracula radiela</i>	0,840450	-78,029783	Ecuador
120	<i>Dracula X radiosyndactyla</i>	1,155751	-77,978141	Colombia
121	<i>Dracula radiosa</i>	7,034933	-76,260891	Colombia
122	<i>Dracula radiosa</i>	0,291113	-78,493664	Ecuador
123	<i>Dracula rezekiana</i>	-3,935848	-78,570481	Ecuador
124	<i>Dracula rezekiana</i>	-2,866777	-78,366111	Ecuador
125	<i>Dracula ripleyana</i>	8,450000	-84,825000	Costa Rica
126	<i>Dracula robledorum</i>	6,244753	-76,176501	Colombia
127	<i>Dracula roezlii</i>	6,060112	-75,406630	Colombia
128	<i>Dracula roezlii</i>	5,295679	-75,888479	Colombia
129	<i>Dracula sergioi</i>	6,765752	-76,175374	Colombia
130	<i>Dracula severa</i>	6,960984	-76,094556	Colombia
131	<i>Dracula sibundoyensis</i>	1,209966	-76,898197	Colombia
132	<i>Dracula sibundoyensis</i>	0,500000	-77,500000	Ecuador
133	<i>Dracula simia</i>	-4,050817	-79,043635	Ecuador
134	<i>Dracula sodiroi</i>	-0,216699	-78,793432	Ecuador
135	<i>Dracula sodiroi</i>	0,012063	-78,681687	Ecuador
136	<i>Dracula syndactyla</i>	1,157840	-77,979218	Colombia
137	<i>Dracula trinympharum</i>	0,897567	-78,114039	Ecuador
138	<i>Dracula tubeana</i>	-0,223179	-78,771199	Ecuador
139	<i>Dracula ubangina</i>	-0,038813	-78,781204	Ecuador
140	<i>Dracula vampira</i>	-2,166667	-81,833333	Ecuador
141	<i>Dracula velutina</i>	6,675031	-76,183712	Colombia
142	<i>Dracula venefica</i>	5,775550	-74,341666	Colombia
143	<i>Dracula venosa</i>	-0,859479	-78,084545	Ecuador
144	<i>Dracula verticulosa</i>	3,733312	-76,247692	Colombia
145	<i>Dracula vespertilio</i>	-	-	Colombia
146	<i>Dracula vespertilio</i>	1,000000	-78,733333	Ecuador
147	<i>Dracula vinacea</i>	5,801933	-73,471823	Colombia
148	<i>Dracula vlad-tepes</i>	5,983340	-73,216590	Colombia
149	<i>Dracula wallisii</i>	6,772631	-76,116448	Colombia
150	<i>Dracula woolwardiae</i>	0,273453	-78,646709	Ecuador
151	<i>Dracula xenos</i>	3,541711	-76,743556	Colombia
152	<i>Dracula antonii</i>	-	-	Colombia
153	<i>Dracula barrowii</i>	-9,250000	-74,958333	Perú
154	<i>Dracula callitrix</i>	-	-	-
155	<i>Dracula carlueri</i>	8,450000	-84,816666	Costa Rica
156	<i>Dracula christineana</i>	2,166666	-81,833333	Ecuador
157	<i>Dracula deniseana</i>	-9,250000	-74,958333	Perú
158	<i>Dracula fuliginosa</i>	-2,166666	-81,833333	Ecuador

159	<i>Dracula immunda</i>	8,441666	-80,108333	Panamá
160	<i>Dracula inexperata</i>	8,450000	-84,816666	Costa Rica
161	<i>Dracula kareniae</i>	0,894050	-78,105855	Ecuador
162	<i>Dracula leonum</i>	-9,250000	-74,958333	Perú
163	<i>Dracula maduroi</i>	8,450000	-84,816666	Costa Rica
164	<i>Dracula maduroi</i>	8,441666	-80,108333	Panamá
165	<i>Dracula mendozae</i>	-2,166666	-81,833333	Ecuador
166	<i>Dracula nigritella</i>	-2,166666	-81,833333	Ecuador
167	<i>Dracula olmosii</i>	8,441666	-80,108333	Panamá
168	<i>Dracula pileus</i>	5,775000	-74,341666	Colombia
169	<i>Dracula pubecens</i>	-2,166666	-81,833333	Ecuador
170	<i>Dracula rojasii</i>	-	-	-
171	<i>Dracula saulii</i>	-9,250000	-74,958333	Perú
172	<i>Dracula schudelii</i>	-	-	Ecuador
173	<i>Dracula senex-furens</i>	-	-	-
174	<i>Dracula sijmii</i>	1,009359	-78.238.668	Ecuador
174	<i>Dracula terborchii</i>	1,009359	-78.238.668	Ecuador
176	<i>Dracula tsubotae</i>	5,775000	-74,341666	Colombia
177	<i>Dracula veleziana</i>	5,775000	-74,341666	Colombia
178	<i>Dracula villegasii</i>	5,775000	-74,341666	Colombia

Fuente:("Tropicos," 2018) (Luer, 1993).

