

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Tesis de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Botánica

TÍTULO

**Polinización, biología floral y estrategia reproductiva de *Masdevallia striatella*
(Orchidaceae: Pleurothallidinae) en un bosque nuboso de Costa Rica**

POSTULANTE

Noelia Belfort Oconitrillo

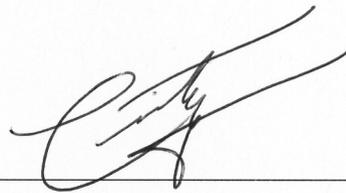
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica

Julio 2023

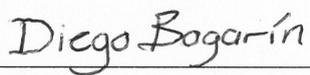
TRIBUNAL EXAMINADOR DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN



Ph.D. ADAM P. KARREMANS LOK
Director de Tesis



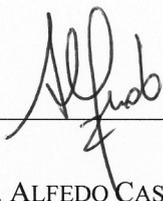
Ph.D. CINDY FERNÁNDEZ GARCÍA
Presidente del Tribunal



Ph.D. DIEGO BOGARÍN CHAVES
Asesor de Tesis



Ph.D. RAFAEL ACUÑA CASTILLO
Miembro del Tribunal



Ph.D. ALFEDO CASCANTE MARÍN
Asesor de Tesis



B.Sc. NOELIA BELFORT OCONTRILLO
Postulante

DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL

© 2023. Noelia Belfort Oconitrillo

Todos los derechos reservados

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	4
Morfología floral en Orchidaceae	4
Polinización en Orchidaceae	5
Síndromes y mecanismos de polinización en la subtribu Pleurothallidinae	7
Síndromes de polinización en <i>Masdevallia</i>	9
Sistemas reproductivos en Orchidaceae con énfasis en <i>Masdevallia</i>	10
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. OBJETIVOS	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	15
Sitio de estudio	15
Especie de estudio	15
Diversidad y comportamiento de visitantes florales	17
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	17
Procedimientos histoquímicos	18
Caracterización de la secreción del labelo	19
Experimentos de polinización e indicadores de éxito reproductivo	19

VI.	RESULTADOS	22
	Diversidad y comportamiento de visitantes florales	22
	Identificación taxonómica y genética de los dípteros visitantes y polinizadores	30
	Descripción morfológica y anatómica del perianto	33
	Caracterización de las gotículas secretadas en el labelo	47
	Sistema e indicadores de éxito reproductivo	47
VII.	DISCUSIÓN	51
	Polinizadores efectivos y potenciales	51
	Otros visitantes florales	53
	Micromorfología e histología del perianto	53
	Mecanismo y síndrome de polinización	56
	Sistema reproductivo	59
VIII.	CONCLUSIONES	62
IX.	LITERATURA CITADA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Análisis floral de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **A.** Flor. **B.** Disección del perianto. **C.** Columna en vistas $\frac{3}{4}$, frontal con la antera, y frontal sin la antera. **D.** Vista lateral de la columna, el labelo y el ápice del ovario. **E.** Diferentes vistas del labelo (adaxial, $\frac{3}{4}$, lateral, y abaxial). **F.** Capa de la antera. **G.** Polinario. Nótese las gotículas secretadas en la base del labelo (D, E). Basado en *N.Belfort 676* (JBL).....16
- FIGURA 2. Diseño de experimentos controlados de polinización aplicados a flores de 23 individuos de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. **A.** Cinco tratamientos de cruzamiento en un mismo individuo, siendo el control la flor abierta sin embolsar (nótese la presencia de una mosca sobre la bolsa de tela). **B.** Detalle de una mosca posada sobre la bolsa de tela, evidencia de la efectividad de la exclusión de los visitantes florales.....20
- FIGURA 3. Frecuencia de visitantes florales de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) según el orden taxonómico al que pertenecen. Registrados con fotografías y videos durante las floraciones de octubre y noviembre entre 2016 y 2022 en el Jardín de Orquídeas de la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica.....22
- FIGURA 4. Visitantes florales de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) documentadas durante octubre y noviembre entre 2016 y 2022, Jardín de Orquídeas, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Diptera (A–F), Hemiptera (G), Hymenoptera (H), Coleoptera (I–K), Lepidoptera (L–N), y Araneae (O–P). **A.** Drosophilidae. **B.** Empididae. **C–D.** Sciaridae. **E.** cf. Tephritidae o Ulidiidae. **F.** cf. Bibionidae. **G.** Pyrrhocoridae. **H.** Formicidae. **I–J.** Chrysomelidae. **K.** Lampyridae, estadio larval. **L–N.** Lepidoptera, estadio larval. **O.** Thomisidae. **P.** Restos de Diptera en una tela de araña.....24
- FIGURA 5. Moscas (Diptera: Lauxaniidae) que polinizan *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) documentadas durante octubre y noviembre entre 2016 y 2022, Jardín de Orquídeas, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Se encontraron tres morfotipos: *morfo1* (A–D), *morfo2* (E–H), y *morfo3* (I–L). Las moscas exploran los sépalos (A, E, I), proyectan su probóscide en un comportamiento alimenticio (B, L) y excretan un líquido similar a orina (F, J). Finalmente se introducen hasta la base del labelo en contacto con la columna (C, F, G, K) y remueven la antera al salir (D, H, L).....25

FIGURA 6. **A.** Labelo de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) con un exudado acuoso en la porción central basal de la lámina. **B.** Posicionamiento de una mosca Lauxaniidae *morfo2* dentro de la flor, entre el labelo y la columna (sépalos y pétalos removidos).....26

FIGURA 7. Secuencia (5 min) de un evento de remoción de polinario de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) por una mosca Lauxaniidae *morfo3*. **A.** 9:54 a.m. remueve el polinario junto con la capa de la antera. **B.** 9:55 a.m. camina hacia la flor del lado aproximándose por la cola sepalina hacia la parte abaxial de los sépalos donde se posa unos 20 s (nótese que aún conserva la capa de la antera). **C.** 9:57 se posa sobre una hoja, ya se ha caído la capa de la antera y conserva el polinario adherido al escutelo. **D.** 10:00 la mosca con el polinario adherido retoma el comportamiento de alimentación con la probóscide claramente extendida en la parte adaxial de los sépalos. Evento grabado en video el 27 de octubre de 2019.....27

FIGURA 8. Huevos de Diptera (A–E) y Lepidoptera (F) documentados en ocho flores de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) entre 2018 y 2022. **A–D.** T1: huevo de Lauxaniidae *morfo3* depositado mientras la mosca atrapada en la columna era comida viva por hormigas. **C.** Detalle del huevo T1 con forma ovoide elongada y surcos longitudinales en el córion (capa externa del huevo). **D.** Detalle de la mosca decapitada y el polinario en el escutelo. **E.** T2: huevo color blanco, con el córion estriado y cuatro apéndices respiratorios dorsales, probablemente *Drosophila* sp. **F.** T3: huevo esférico, perlado y brillante, probablemente de Lepidoptera. Fotos por N.Belfort-Oconitrillo, excepto A y E por K.Gil-Amaya.....29

FIGURA 9. Dípteros (machos y hembras) de las familias Lauxaniidae y Drosophilidae que visitan y polinizan *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Poe = *Poecilominettia* (2 especies, 4 individuos). Xen = *Xenochaetina* (1 sp, 3 individuos). Gen_Indet = Género indeterminado. Dro = *Drosophila* (5 spp). Escala = 5 mm.....31

FIGURA 10. Relaciones filogenéticas entre las moscas de las familias Drosophilidae y Lauxaniidae que visitan y polinizan *Masdevallia striatella* y otras especies relacionadas (*M. calura*, *M. picturata* y *Diodonopsis erinacea*). Los árboles se produjeron mediante el análisis del conjunto de datos COI utilizando BEAST v1.6.0. y el polinizador (Nematocera: Ceratopogonidae: *Forcipomyia*) de *Trichosalpinx reflexa* como grupo externo. Generado por

A.P.Karremans utilizando FigTree v.1.3.1 y editado por N.Belfort-Oconitrillo utilizando Adobe Photoshop.....33

FIGURA 11. Pigmentación natural de los sépalos (A–D), labelo (E–G), pétalos (H–K) y columna (L–O) de *Masdevallia striatella*. **A.** Venas sepalinas. **B.** Cola sepalina, superficie adaxial. **C–D.** Detalle las colas sepalinas, superficie abaxial. **E.** Base del labelo. **F.** Callo del ápice del labelo, cerca del margen. **G.** Contenidos celulares no identificados en el ápice del labelo. **H–I.** Vena del pétalo. **J.** Rafidios en el margen del pétalo. **K.** Ápice del pétalo. **L–M.** Coloración morada y rafidios en el margen de la columna. **N.** Detalle del margen de la antera. **O.** Polinario. Escalas = 20 μm (A, I, J, L, M), 50 μm (D, G, N), 100 μm (B, F, H, K), 200 μm (C, O), 500 μm (E).....35

FIGURA 12. Sépalos de *Masdevallia striatella* con vesículas en forma de domo (A–C, G–H) y papilas unicelulares cónicas (B, D–F) en el indumento adaxial. **A–B.** Distribución y proporción basal (A) y media (B) de las vesículas y papilas. **C–D.** Detalle de las glándulas y sus secreciones. **E–F.** Tinciones en tejido fresco con Rojo Neutro (E), Coomassie Brilliant Blue (F–G) y Sudan Black B (H). Escalas = 10 μm (C), 20 μm (D, E, F, H), 100 μm (B, G), 200 μm (A).....37

FIGURA 13. Sépalos de *Masdevallia striatella* con tricomas glandulares multicelulares pedunculados en el indumento abaxial. **A.** Distribución de las glándulas. **B–C.** Detalle de la morfología de las glándulas y las secreciones. **D–E.** Tinciones en tejido fresco con Rojo Neutro (D) y Sudán Black B (E). **F–H.** Tinciones en tejido parafinado con Coomassie Brilliant Blue (F) y Ácido Peryódico de Schiff (G–H). Escalas = 10 μm (C), 20 μm (D, E, F, G, H), 30 μm (B), 300 μm (A).....38

FIGURA 14. Cola sepalina de *Masdevallia striatella* documentada con Microscopía Electrónica de Barrido (A–B) y Microscopía de Luz (C–H). **A.** Superficie adaxial, mostrando la porción estrecha donde se diferencia la cola sepalina, se disminuye la proporción de las papilas y aparecen estomas (flechas blancas). **B–D.** Superficie abaxial, mostrando la proporción de tricomas glandulares multicelulares pedunculados (flechas negras) y los estomas (flechas blancas). **E–F.** Corte transversal, superficie adaxial arriba. Tinciones: Rojo Neutro (C), Sudán Black B (D, G), Coomassie Brilliant Blue (E), Ácido Peryódico de Schiff (F, H). Escalas = 20 μm (G, H), 100 μm (B, C, D, E, F), 200 μm (A).....39

FIGURA 15. Pétalos de *Masdevallia striatella* documentados con Microscopía Electrónica de Barrido. **A.** Superficie adaxial y abaxial, respectivamente. **B.** Detalle del ápice. **C.** Estomas (flechas

blancas) presentes en la superficie abaxial cerca del ápice. **D–E.** Estructura celular ordenada y geométrica de las células. Escalas = 20 μm (B), 30 μm (D, E), 100 μm (C), 1 mm (A).....41

FIGURA 16. Pétalos de *Masdevallia striatella* teñidos con Coomassie Brilliant Blue (A, C–D, F) y Sudan Black B (B, E, G, H) para Microscopía de Luz. **A–B.** Ápice, CBB+ indicativo de la presencia de proteínas (A) y SBB– indicativo de la ausencia de cuerpos lipofílicos (B). **C–E.** Tricomas de dos células encontrados en la base de la superficie adaxial, CBB– indicativo de la ausencia de proteínas (C–D) y SBB+ indicativo de la presencia de cuerpos lipofílicos (E). **F.** Detalle de la célula basal de un tricoma de dos células, visto desde la superficie abaxial y célula con contenido grisáceo no identificado. **G–H.** Estomas de la superficie abaxial SBB+. Escalas = 20 μm (C, D), 50 μm (E, F, G, H), 100 μm (A, B).....42

FIGURA 17. Labelo de *Masdevallia striatella* documentado con Microscopía Electrónica de Barrido. **A.** Superficie adaxial (base arriba, ápice abajo). **B.** Detalle de los lóbulos basales. **C.** Nectario del tipo papilar unicelular en la porción central de la lámina. **D–E.** Detalle de las papilas secretoras de néctar. **F.** Detalle del pliegue marginal. **G.** Detalle del callo del ápice con papilas en forma de dedo densamente agrupadas. Escalas = 10 μm (E), 20 μm (D, G), 100 μm (B, C, F), 1 mm (A).....44

FIGURA 18. Labelo de *Masdevallia striatella* teñido con Azul de Toluidina TBO (A–B), Coomassie Brilliant Blue CBB (C, E–F) y Ácido Peryódico-Schiff PAS (D, G) para Microscopía de Luz. **A.** Vista completa del labelo (base arriba, ápice abajo). **B–D.** Nectario. **E–G.** Callo del ápice. Todas las imágenes orientadas con la superficie adaxial hacia el lado derecho. Escalas = 50 μm (B, C, D), 200 μm (F, G), 1 mm (A).....45

FIGURA 19. Morfoanatomía de la columna (A–H) y el ovario (I–K) de *Masdevallia striatella* documentada con Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Luz. Tinciones: Sudán IV (SIV), Coomassie Brilliant Blue (CBB), Sudán Black B (SBB), Azul de Toluidina (TBO) y Ácido Peryódico-Schiff (PAS). **A.** Ápice de la columna. **B.** Detalle del rostelo. **C.** Polinario. **D.** Capa de la antera. **E.** Detalle de la caudícula SIV– (ausencia de lípidos). **F.** Detalle de la antera CBB+ (presencia de proteínas). **G.** Rostelo SBB+ (presencia de lípidos) **H.** Células con núcleo bien definido y presencia de rafidios en el margen de la columna. **I–K.** Ovario, con detalle de los tricomas glandulares multicelulares pedunculados PAS+ en la pared externa (J) e invaginaciones (K). Escalas = 20 μm (B, H, K), 100 μm (C, D, G, I), 200 μm (A).....46

- FIGURA 20. Diferentes frutos (cápsulas) de *Masdevallia striatella* mostrando la secuencia de maduración y dispersión de semillas de los frutos. Nótese el cambio de coloración en el último estadio cuando ya se han liberado las semillas. No a la misma escala.....48
- FIGURA 21. Proporción de frutos de *Masdevallia striatella* (Pleurothallidinae) desarrollados según el tratamiento de polinización aplicado en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. APO = Apomixis. AUTa = Autopolinización autónoma. C = Control (polinización natural). EXO = Exocruzamiento. AUTm = Autopolinización manual.....49
- FIGURA 22. Semillas de *Masdevallia striatella* producidas por alogamia y teñidas con Tetrazolio. Las teñidas de rojo consideradas viables, las no teñidas o levemente teñidas de rosado se consideraron no viables. Escala = 1 mm.....50
- FIGURA 23. Porcentaje de viabilidad de semillas de *Masdevallia striatella* en frutos producidos por polinización cruzada (EXO) y autopolinización manual (AUTm). Se muestra la mediana (línea horizontal), el rango intercuatílico (caja) y los valores mínimo y máximo (bigotes).....50

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Diversidad y frecuencia de los taxones que visitan las flores de <i>Masdevallia striatella</i> en la población de estudio, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. NI = No identificado. *Polinizadores efectivos. **Grupo informal.....	23
CUADRO 2. Huevos documentados en ocho flores de <i>Masdevallia striatella</i> entre 2018 y 2022, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Se incluye la cantidad de puestas encontradas, su descripción y el grupo taxonómico al que pertenecen.....	30
CUADRO 3. Determinación taxonómica y sexo de las moscas visitantes y polinizadoras de <i>Masdevallia striatella</i> (Orchidaceae: Pleurothallidinae) en la Reserva Biológica Bosque de Paz. El análisis de similitud se realizó comparando las secuencias del gen COI generadas en este estudio con las secuencias de referencia depositadas en NCBI (2023).....	32
CUADRO 4. Diversidad, histoquímica y posible función de las glándulas y los estomas del perianto de <i>Masdevallia striatella</i> (Orchidaceae: Pleurothallidinae). Se indican las reacciones (+ y -) de las tinciones aplicadas con Rojo Neutro (NR), Ácido peryódico-Schiff (PAS), Azul de Coomassie (CBB), Sudan Black B (SBB) y Sudán IV (SIV).....	34
CUADRO 5. Detección de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) en cuatro extractos de <i>Masdevallia striatella</i> aplicando un volumen de inyección de 20 µL. ND = no detectable (<30 mg/100 mL).....	47
CUADRO 6. Resultados de los tratamientos de polinización controlada aplicados en <i>Masdevallia striatella</i> (Pleurothallidinae), Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Se presentan la proporción promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE), error estándar (EE) y número de réplicas (N) para los tratamientos de polinización aplicados. APO = Apomixis. AUTa = Autopolinización autónoma. C = Control (polinización natural). EXO = Exocruzamiento. AUTm = Autopolinización manual.....	48

A mi madre, por todo su amor y por ser mi mayor ejemplo.

A Nilo, por su luz que es una fuente interminable de inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por el don de la vida, la salud, por su amor y protección.

A mi hijo amado, Nilo, mi mayor inspiración y fuente de amor, por amar la naturaleza tanto como yo, por su sonrisa y su nobleza. A Sergio, por su compañía tan especial y por ser el mejor papá para Nilo. A mi mamá por enseñarme el valor del amor y la dedicación, por el apoyo constante en cada paso de mi vida y por hacerme ver el fruto del trabajo honesto. A mi hermano y mis hermanas porque no imagino la vida sin ustedes y por hacerme tía de seres tan hermosos, César Joel, Camille, Lukas Joel y Lía Zoé, quienes me acompañan en los momentos más importantes de mi vida. A mi papá por tantos viajes a la montaña cuando era pequeña y por inculcarme un respeto profundo por ella. A la familia Camacho Rodríguez por su cariño y su apoyo.

A los miembros de mi Comité Asesor de Tesis, Dr. Adam Karremans (director), Dr. Diego Bogarín (lector) y Dr. Alfredo Cascante (lector), profesores de la Escuela de Biología (EB) de la Universidad de Costa Rica (UCR), por el apoyo para realizar esta investigación, el aporte de ideas y de literatura, así como la guía en el análisis y la interpretación de los datos generados y las discusiones que nutrieron el presente texto.

El Centro de Investigación Jardín Botánico Lankester (JBL) de la UCR, santuario nacional de epífitas de Costa Rica, es el lugar en el que he logrado alcanzar muchísimo de mi crecimiento personal y profesional. Allí he encontrado mentores, mentoras, colegas, amigas y amigos que me han apoyado y acompañado durante muchos años de formación, donde he aprendido la aplicación de las técnicas de documentación más avanzadas para el estudio de la flora de orquídeas de nuestro país, técnicas que son aplicables a muchas otras áreas de la vida. En particular agradezco a mi director de tesis y director del JBL, Adam Karremans, por sus grandes enseñanzas sobre la polinización de orquídeas y por inspirarme a seguir estudiando las interesantes y megadiversas orquídeas miniatura. A nuestro querido profesore, Franco Pupulin, por el desarrollo del sistema de documentación Lankester y por enseñar abiertamente sus trucos más sofisticados de fotografía y composición gráfica, que han moldeado la mirada hasta prestar atención a los pequeños detalles y lograr los resultados más exquisitos. A Diego Bogarín, por sus tutorías, su ejemplar manera de desarrollar investigación científica y por impulsarme a ser mejor investigadora cada día. A Franco, Diego y Adam les agradezco también interminables enseñanzas en el camino de la edición de la revista Lankesteriana, que me ha brindado tantas herramientas para la escritura científica. A Melania Fernández Campos, por quien llegué como estudiante al JBL hace tantísimos años, por su amistad, su guía y su apoyo durante el desarrollo de esta investigación y por las interesantes discusiones al respecto. A Jorge

Warner, por toda su entrega y trabajo de tantísimos años en el JBL. A todo el equipo de horticultura, en especial a Gerson Villalobos por su talento en el cultivo de orquídeas, especialmente las miniaturas, que mantiene vivas y alegres en los invernaderos del JBL. A mis colegas, amigas y amigos, Meli, Grettel, Liz, Isler, Gustavo, Pablo, Darha, Karen, Ale, Sara, así como tantos estudiantes y asistentes que han apoyado las labores de investigación del JBL. A todo el equipo administrativo, de recepción y de mantenimiento de las áreas verdes, por su incesante trabajo para que el JBL sea uno de los centros de disfrute en familia más bellos de Costa Rica.

La inclusión de datos de polinización basados en más de cinco años de observaciones de campo es sólo gracias a la existencia y constancia del Proyecto de Conservación de Orquídeas de la Reserva Biológica Bosque de Paz, ubicada en Bajos del Toro, Costa Rica, donde he tenido la oportunidad de desenvolverme profesionalmente como bióloga encargada del proyecto. Agradezco a doña Vanessa Sotela de González y don Federico González-Pinto, por su visión y entrega a la conservación de los bosques que alberga BdP, su tesoro biodiverso y su mayor legado. A Stephen H. Kirby y su esposa, Lyle Rice, por su constante apoyo desde 1998 a los esfuerzos de conservación de las orquídeas de BdP y por su incesante impulso para alcanzar esta meta académica y profesional en mi vida. A todos ellos por su apoyo incondicional y por ser más que jefes, sino casi familia, en mi vida. Al *staff* de BdP por sus amables atenciones, su trabajo y entrega.

Por su valiosa amistad, a mis colegas y amigas: Darha Solano Ulate, por su ayuda en la identificación de algunos insectos mediante fotografías y su acompañamiento moral en la recta final de esta investigación. Karen Gil Amaya, por su amistad, su compañía en algunas de las giras de campo, sus recomendaciones para el desarrollo de las pruebas histoquímicas, así como valiosas discusiones y literatura compartida durante el desarrollo de este trabajo. Bea, Nene y Hanny por siempre estar y ser inspiración en mi vida.

De la UCR agradezco también al histotecnólogo Miguel Benavides por sus recomendaciones para las preparaciones histológicas, así como a la proveeduría de la Escuela de Química y al Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), por el aporte de los reactivos para la tinción de ácido peryódico-Schiff. A Andrea Hernández del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) por su amable colaboración administrativa, así como a Manuel Jiménez y José Miguel Marín por su amable colaboración durante la preparación y observación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). A Graciela Chavarría del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) por el apoyo para definir la metodología para los análisis de azúcares.

Agradezco a los profesores eméritos, Dr. Nancy Dengler y Dr. Ron Dengler (*University of Toronto*, Canadá), que amablemente compartieron conmigo sus consideraciones sobre los resultados de la parte de anatomía de mi trabajo. Estoy en deuda con los entomólogos especialistas: Dr. Paul Hanson (Universidad de Costa Rica, CR), quien identificó la familia Lauxaniidae desde el primer avistamiento y compartió sus valiosos pensamientos sobre mis observaciones y datos; Dr. David Grimaldi (*American Museum of Natural History*, USA), que hizo la identificación morfológica y sexual de las moscas secuenciadas; y Dr. William Murphy (*Smithsonian Institute*, USA), que desinteresadamente compartió toda la literatura que tenía disponible sobre Lauxaniidae y otros dípteros así como me dio una gran motivación para continuar haciendo ciencia. La secuenciación de las moscas se llevó a cabo en el Naturalis Biodiversity Center, Leiden, Holanda.

Al Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE) y al Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) de Costa Rica que otorgaron los permisos de colecta de especímenes para este estudio. A la Vicerrectoría de Investigación de la UCR por su apoyo financiero mediante el proyecto C2048 “Importancia de la polinización por moscas en Orchidaceae: biología reproductiva y ecología de polinización de *Dracula*, *Masdevallia* y grupos afines en Pleurothallidinae”.

Finalmente, agradezco a mi querida UCR donde me formé como bióloga y que hoy recibe el fruto de varios años de investigación. A las profesoras y los profesores de la EB que me inspiraron y al personal administrativo, especialmente a Nancy Alvarado, por su guía durante la inscripción y defensa de este trabajo final de graduación.

RESUMEN. Orchidaceae es una de las familias de plantas más diversas del planeta con alrededor de 30,000 especies. Se ha hipotetizado que la especialización de los polinizadores es uno de los factores que ha promovido una amplia variedad morfológica floral en la familia. Dentro de las orquídeas, Pleurothallidinae es una subtribu megadiversa con más de 5400 especies en más de 48 géneros. Entre ellos, *Masdevallia* es el tercero más diverso con más de 600 especies. A pesar de su popularidad, se conoce muy poco sobre la polinización de *Masdevallia* y la evidencia de remoción efectiva de los polinarios es escasa. Se ha comprobado que *Masdevallia* es polinizado por moscas, descartando otras hipótesis como la polinización por aves y mariposas en las especies estudiadas. Para la atracción de las moscas a larga distancia, se le ha atribuido una función osmofórica a las colas sepalinas de las flores, pero no hay estudios que lo confirmen y, en general, hay poca documentación sobre la diversidad de glándulas secretoras del perianto de *Masdevallia* relacionadas con el mecanismo de polinización. En cuanto a los sistemas reproductivos de Pleurothallidinae, hay especies auto-compatibles y auto-incompatibles, y especies que combinan ambas estrategias, ya sea que cuenten o no con mecanismos de autofecundación. Sin embargo, los estudios que abordan el tipo de sistema reproductivo en especies de *Masdevallia* son limitados. Comprender la ecología de la polinización y el tipo de reproducción de las especies de *Masdevallia* puede contribuir a un mejor entendimiento de las relaciones evolutivas en Pleurothallidinae.

Este trabajo se centra en el estudio de la diversidad de visitantes florales y polinizadores efectivos de *Masdevallia striatella* en una población de Costa Rica, así como su biología floral y estrategia reproductiva. Se documentó una amplia variedad de visitantes florales distribuidos en tres clases (Insecta, Arachnida y Gastropoda) y siete órdenes de invertebrados, siendo Diptera el más abundante, seguido por Hemiptera, Hymenoptera, Coleoptera, Araneae, Lepidoptera y Pulmonata (como grupo informal). Sin embargo, los polinizadores efectivos pertenecen únicamente a la familia Lauxaniidae (Diptera), con al menos tres especies en los géneros *Poecilominettia* y *Xenochaetina*. Se documentó una amplia variedad de tricomas papilares y glandulares, así como estomas en el perianto de *M. striatella*. Los contenidos de estos varían entre proteínas, lípidos, polisacáridos insolubles y azúcares simples. Se sugiere que hay varios sitios posibles para la producción y liberación de sustancias volátiles funcionales para la atracción de los visitantes y la guía de los polinizadores hacia el interior de la flor. Además, en la base del labelo se acumula néctar compuesto de glucosa y fructosa. Este estudio evidencia la presencia de características miofílicas en *M. striatella*, con néctar como recompensa para sus polinizadores. Finalmente, se determinó que *M. striatella* es altamente auto-compatible, aunque incapaz de autofecundarse de forma autónoma, con la presencia de algunos mecanismos que pueden evitar la autopolinización.

PALABRAS CLAVE: auto-compatibilidad, Bosque de Paz, Diptera, Drosophilidae, Epidendreae, Epidendroideae, Lauxaniidae, morfoanatomía, miofilia, néctar, nectario, osmóforo, polinización

KEYWORDS: Bosque de Paz, Diptera, Drosophilidae, Epidendreae, Epidendroideae, Lauxaniidae, morphoanatomy, myophily, nectar, nectary, osmophore, pollination, self-compatibility

I. INTRODUCCIÓN

Con alrededor de 30,000 especies, Orchidaceae representan el 10% de la diversidad de angiospermas del mundo y casi el 50% del total de especies monocotiledóneas, constituyendo la familia más diversa de este grupo (Pires *et al.* 2006). Se subdivide en cinco subfamilias, de las cuales cuatro están representadas en el Neotrópico. De estas, Epidendroideae es la más derivada y diversa con aproximadamente 576 géneros y 22,000 especies (Pridgeon *et al.* 2001, Chase 2005, Chase *et al.* 2003). La mayor diversidad de la familia se reporta en el Neotrópico, con puntos calientes de diversidad en países andinos como Ecuador y Colombia (con más de 4,000 especies cada uno) y el sur de Centroamérica en la zona biogeográfica conformada por Costa Rica y Panamá, con más de 2,000 especies en total y el 40% de ellas endémicas (Bogarín *et al.* 2016). En su pequeño territorio, Costa Rica tiene la mayor cantidad de especies por área, con más de 1,600 especies hasta la fecha.

Orchidaceae se ha considerado un modelo para el estudio de los procesos evolutivos que han promovido la diversificación de la familia, debido a los variados mecanismos de polinización relacionados con la gran diversidad de rasgos florales, de la mano además de las estrategias de reproducción (Ackerman *et al.* 2023, Darwin 1862). La polinización se considera una de las mayores presiones evolutivas que ha impulsado la amplísima variación floral en esta familia (Karremans *et al.* 2015b). Sin embargo, sólo se conocen aspectos de la biología de la polinización para un 10% de las especies de orquídeas y, más crítico aún, las estrategias reproductivas se han estudiado sólo en 1076 especies que representan menos del 5% de especies (Ackerman *et al.* 2023). Los estudios empíricos existentes representan una base importante para el entendimiento de la familia. Sin embargo, la identidad de los polinizadores, la biología de la polinización y las estrategias reproductivas de las orquídeas continúan siendo un campo de estudio muy activo en la actualidad.

Pleurothallidinae Lindl. ex G.Don (Epidendroideae: Epidendreae) es la subtribu Neotropical más diversa de Orchidaceae, con 5,481 especies distribuidas en 48 géneros (*sensu* Karremans & Vieira Uribe 2020). La subtribu presenta altas tasas de diversificación en la familia y un origen reciente de *ca.* 15 Mya (Givnish *et al.* 2015, Pérez-Escobar *et al.* 2017). Los géneros más diversos incluyen *Stelis* Sw. (1,246 especies), *Lepanthes* Sw. (1,158 spp.) y *Masdevallia* Ruiz & Pav. (639 spp.) (*sensu* Karremans & Vieira-Uribe 2020). Este último se distribuye desde el sur de México, Centroamérica, y el norte de los Andes hasta Perú, Bolivia y el sur de Brasil, con la mayor diversidad en los bosques premontanos y montanos de los Andes de Colombia (152 spp), Ecuador (269 spp) y Perú (197 spp) (Bogarín *et al.* 2017). En Centroamérica existen *ca.* 50 especies de *Masdevallia* y

específicamente en Costa Rica se registran 35 especies (Pupulin & collaborators 2020), considerando la circunscripción tradicional del género (Luer 1986, Pridgeon 2005).

El estudio de la polinización y las estrategias reproductivas en géneros megadiversos de Orchidaceae se ha considerado clave para dilucidar las estrategias evolutivas y el rol de los polinizadores en la diversificación de la familia (Bogarín *et al.* 2018). Sin embargo, este conocimiento sigue siendo escaso. Con la finalidad de cubrir algunos vacíos de información sobre la polinización, la biología floral y los sistemas reproductivos en Pleurothallidinae y específicamente *Masdevallia*, la presente investigación se enfoca en estudiar *Masdevallia striatella* Rchb.f., una especie endémica de Costa Rica y el oeste de Panamá.

II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

Morfología floral en Orchidaceae

Las orquídeas presentan una enorme variación morfológica, tanto vegetativa como floral. Las flores son zigomórficas (con simetría bilateral) y trímeras, es decir, poseen un verticilo externo de tres sépalos (el cáliz) y uno interno de tres pétalos (la corola) que juntos conforman el perianto. Sin embargo, presentan características únicas que permiten identificarlas: 1. El pétalo medio, denominado el **labelo**, se ha modificado en una estructura con un rol esencial en la polinización y usualmente difiere de los otros dos pétalos. 2. El androceo (los estambres) y el gineceo (el pistilo) están fusionados o parcialmente fusionados en una estructura central (columna o ginostemio), en la que el rostelo, el cual forma parte del lóbulo medio del estigma, es la estructura que los separa, actuando como barrera física que evita la autopolinización y está implicado en la polinización. 3. Los estambres se han reducido a una antera fértil (en algunos casos dos o tres) cuya posición varía entre ventral, apical o dorsal, lo que también está estrechamente relacionado con los mecanismos de polinización. 4. Los granos de polen usualmente están empaquetados en **polinios**, que junto con el viscidio -derivado del rostelo- y, a menudo, también el estípite, conforman el **polinario** que es el paquete que se transfiere durante la polinización como una sola unidad (Dressler 1981, 1993). El viscidio es la porción apical pegajosa del polinario, que puede desprenderse como una unidad y es responsable de adherir el polinario al cuerpo del polinizador. Al contrario del viscidio, el viscario no se desprende como una unidad, sino que actúa como una goma que permite la remoción del polinario cuando éste carece de viscidio (Dressler & Salazar 1991). Tanto el viscidio como el viscario pueden tener un rol importante en mecanismos especializados de polinización.

En Pleurothallidinae es frecuente encontrar especies con los sépalos laterales fusionados formando un sinsépalo (e.g. *Pleurothallis* R.Br.) o todos los sépalos fusionados formando un tubo sepalino (e.g. *Masdevallia*). Esta evolución floral en Orchidaceae está estrechamente relacionada con la atracción de los polinizadores y su comportamiento (Darwin 1862, van der Pijl & Dodson 1966), mostrando una amplia diversidad de mecanismos adaptativos para la transferencia efectiva del polen, es decir, la polinización, que consiste en la remoción del polinario y su posterior deposición en el estigma.

Polinización en Orchidaceae

Se le denomina síndrome de polinización al conjunto de caracteres florales adaptados al comportamiento y características de un grupo particular de polinizadores (van der Pijl & Dodson 1966, van der Cingel 2001). Aunque existen unos pocos registros de orquídeas que presentan autopolinización asistida por vectores abióticos como el viento (anemofilia) y el agua (hidrofilia) (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1981, Borba & Semir 1998, Tremblay *et al.* 2005, Pansarin *et al.* 2008, Aguiar *et al.* 2011, Fan *et al.* 2012, Breitkopf *et al.* 2014), la mayoría de las especies de orquídeas requieren de un vector de polinización biótico (un animal). Los síndromes de polinización más frecuentes en Orchidaceae incluyen la polinización por Hymenoptera (melitofilia, especialmente mediada por abejas y avispas), Diptera (miofilia y sapromiofilia, mediadas por moscas y mosquitos), Lepidoptera (psicofilia, mediada por mariposas; falenofilia, mediada por polillas; y esfingofilia, mediada por esfingidos), con reportes minoritarios de polinización por Coleoptera (cantarofilia, mediada por escarabajos), aves (ornitofilia), y otros grupos de polinizadores atípicos (Ackerman *et al.* 2023).

La polinización por dípteros es el segundo síndrome más frecuente en las orquídeas, participando en la polinización de las subtribus más ricas en especies, como Dendrobiinae G.Don (principalmente *Bulbophyllum* Thouars), Malaxidinae Benth. & Hook.f. y Pleurothallidinae (Ackerman *et al.* 2023). Puede ser mediada por moscas que buscan néctar como alimento (**miofilia**) o sustancias en descomposición como la carroña, ya sea para alimentarse o para depositar sus huevos (**sapromiofilia**). Las características florales asociadas a la miofilia y la sapromiofilia sobresalen las señales olfatorias que son clave para la atracción a larga distancia (Vogel 1962, 1966, Kaiser 1993). Las flores miofílicas emiten aromas dulces, nectarios superficiales y flores abiertas; mientras que las flores sapromiofílicas producen aromas putrefactos, tienen colores apagados u oscuros -similar a carne en descomposición u otras sustancias desagradables- y a menudo no producen néctar (van der Pijl & Dodson 1966). La miofilia ocurre en varios clados no relacionados dentro de Orchidaceae, pero se ha propuesto como una sinapomorfia de Pleurothallidinae (Barbosa *et al.* 2009, Borba *et al.* 2011), el grupo más grande de orquídeas polinizado por moscas, con un 17% del total de especies de la familia (Karremans & Díaz-Morales 2019).

Las orquídeas pueden recurrir a dos estrategias de polinización: **por engaño** y **por recompensa**. Los engaños más frecuentes son el sexual y el alimenticio (Jersáková *et al.* 2006). En el **engaño sexual**, los insectos machos son atraídos mediante imitación de las feromonas sexuales y la apariencia de sus hembras. En algunos casos el insecto intenta copular con la flor y toca la columna

removiendo el polinario (pseudocopulación, Blanco & Barboza 2005, Bohman *et al.* 2016, Pouyanne 1917 en Proctor *et al.* 1996, Steiner *et al.* 1994, van der Pijl & Dodson 1966); en otros casos queda atrapado en una flor trampa (Singer 2002, Singer *et al.* 2005). El **engaño alimenticio** consiste en atraer a los polinizadores mediante señales visuales típicas de especies que ofrecen recompensa, ya sea imitando a una especie modelo (mimetismo Batesiano) o tomando ventaja de los patrones de forrajeo de los polinizadores sin imitar a una especie modelo específica (engaño generalizado) (Jersáková *et al.* 2006). La **imitación de sitios de cría u oviposición** es un engaño menos frecuente en el que las orquídeas logran engañar a insectos que buscan un sitio adecuado dónde poner sus huevos.

El término **recompensa** es empleado para denotar aquellas partes florales o secreciones que de alguna manera pueden ser consumidas, recolectadas o almacenadas por los polinizadores para su uso en sus ciclos de vida (Flach *et al.* 2004). Estas pueden incluir néctar, fragancias, aceites, resinas, ceras, proteínas, tricomas almidonados (o pseudopolen), así como sitios de reproducción y descanso (Dressler 1993, van der Pijl & Dodson 1966). Estos compuestos se producen en diferentes estructuras llamadas nectarios (néctar), osmóforos (fragancias), o elaióforos (aceites) y tienen células especializadas que pueden localizarse en diversas partes del perianto. La recompensa más frecuente es el **néctar**, que se puede producir en tubos nectarios dentro del ovario, en diversas estructuras del labelo (surcos superficiales, espolones y callos), así como en forma de gotículas exudadas en el labelo, los sépalos y raramente en la columna (Karremans *et al.* 2015b, Neubig *et al.* 2015, Nunes *et al.* 2015, van der Cingel 2001, van der Pijl & Dodson 1966). Las **fragancias** como recompensa se han estudiado especialmente en géneros de Catasetinae y Stanhopeinae cuyas especies dependen exclusivamente de los machos de abejas euglosinas (Apidae: Euglossini) recolectoras de fragancias que luego utilizan para el cortejo de las hembras (Dressler 1968, Nunes *et al.* 2017, Pansarin *et al.* 2008, 2018, Williams & Dodson 1972). Un número significativo de especies recompensa a los polinizadores con sustancias ricas en lípidos como **aceites y resinas**, que generalmente se producen en las áreas superficiales del labelo y que se han relacionado con la construcción y reparación de nidos (Flach *et al.* 2004, van der Cingel 2001, van der Pijl & Dodson 1966), pero que también tienen valor nutricional y pueden usarse como fuente de alimento (Pansarin *et al.* 2009).

Con base en la más reciente recopilación de datos sobre polinización de orquídeas, sólo se conoce el mecanismo de polinización para un 10% de las especies de la familia. Entre estas, la atracción de polinizadores basada en recompensas ocurre en el 54% de las especies, mientras que el 46% utiliza algún medio de engaño (Ackerman *et al.* 2023), lo cual supera las estimaciones anteriores (Ackerman 1986, Dressler 1981, van der Pijl & Dodson 1966). En todo caso, la diferencia entre

recompensa y engaño radica en la presencia o ausencia de un beneficio para los polinizadores, lo cual puede ser muy difícil de determinar si no se utilizan las herramientas y metodologías adecuadas para este fin (Shrestha *et al.* 2020).

Síndromes y mecanismos de polinización en la subtribu Pleurothallidinae

Pleurothallidinae es una subtribu polinizada principalmente por moscas y mosquitas (orden Diptera) (Dressler 1981, Karremans & Díaz-Morales 2019, Pridgeon 2005, van der Pijl & Dodson 1966), aunque la melitofilia, ornitofilia y psicofilia han sido propuestos para algunas especies debido a sus características florales. Según estimaciones recientes, sólo se han reportado visitantes florales en un tercio de los géneros de Pleurothallidinae y tan sólo para un 2% del total de especies (Karremans & Díaz-Morales 2019). Dípteros de las familias Anthomyiidae, Calliphoridae, Cecidomyiidae, Ceratopogonidae, Chloropidae, Drosophilidae, Keroplatidae, Mycetophilidae, Otitidae, Phoridae, Richardidae, Sarcophagidae, Sciaridae, Tephritidae y Ulidiidae se han reportado como visitantes florales en géneros como *Acianthera* Scheidw., *Andinia* (Luer) Luer, *Dracula* Luer, *Dresslerella* Luer, *Echinosepala* Pridgeon & M.W.Chase, *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Octomeria* R.Br., *Phloeophila* Hoehne & Schltr., *Pleurothallis*, *Porroglossum* Schltr., *Scaphosepalum* Pfitzer, *Specklinia* Lindl., *Stelis*, *Teagueia* (Luer) Luer y *Trichosalpinx* Luer (Karremans & Díaz-Morales 2019). Sin embargo, muchos de estos reportes se basan en observaciones ocasionales o fotografías con las cuales no se puede hacer una determinación taxonómica precisa. Aquellos que evidencian la remoción y/o deposición de polinarios por polinizadores efectivos son aún muy escasos.

Las adaptaciones y mecanismos para la atracción de los insectos polinizadores en Pleurothallidinae frecuentemente están relacionadas con la estimulación de los instintos alimenticios o reproductivos de estos (Bogarín *et al.* 2018, Borba & Semir 2001, de Melo *et al.* 2010, Karremans *et al.* 2015b). La atracción inicial de los insectos a larga distancia es posible gracias a la síntesis y secreción de sustancias volátiles en los osmóforos (Pridgeon & Stern 1983, 1985, van der Cingel 1995), que son glándulas con la capacidad de emitir aromas y que pueden o no distinguirse anatómica y morfológicamente de sus tejidos adyacentes (Pridgeon & Stern 1983, van der Cingel 1995). Mediante estudios anatómicos, se han analizado con detalle los osmóforos en especies de *Acianthera* (de Melo *et al.* 2010), *Restrepia* (Millner & Baldwin 2016, Pridgeon & Stern 1983), *Restrepiella*, *Scaphosepalum* (Pridgeon & Stern 1985), *Specklinia* (Karremans *et al.* 2015a) y *Trichosalpinx* (Bogarín *et al.* 2018). También se ha propuesto que existe función osmofórica en el ápice de sépalos y pétalos de *Anathallis*, los pétalos de *Myoxanthus reymondii* (H.Karst.) Luer, los sépalos de *Dresslerella hirsutissima* (C.Schweinf.) Luer, el labelo de especies de *Dryadella* Luer y las colas

sepalinas en *Masdevallia* y *Dracula* (Pridgeon 2005, van der Cingel 2001, Vogel 1962, 1990). En *Dracula erythrochaete* (Rchb.f.) Luer, las glándulas osmofóricas están detalladamente caracterizadas y también hay presencia de estomas (Gil-Amaya 2022). Específicamente en *Masdevallia*, se ha reportado función osmofórica en las colas sepalinas de *M. nidifica* Rchb.f., *M. calura* Rchb.f., *M. caudata* Lindl. y *M. horrida* Teusch. & Garay (Vogel 1990). En contraste con las prolongaciones aparentemente no glandulares, lineares, parenquimatosas y sin olor perceptible por el olfato humano (i.e. *M. picturata* Rchb.f.), aquellas desarrolladas en glándulas de fragancia son robustas, mayoritariamente cilíndricas o anguladas y se diferencian del tejido circundante por su color amarillo-naranja y un brillo grasoso (Vogel 1990).

Una vez que los insectos han sido atraídos a las flores, hay otros elementos que “invitan” a los insectos a explorar las flores y eventualmente entrar en contacto con el labelo y la columna. En *Trichosalpinx* se ha documentado la polinización exclusivamente por moscas hembra del género *Forcipomyia* (Ceratopogonidae) que colectan carbohidratos y proteínas del labelo como parte de un mecanismo de engaño que involucra la presencia de fragancia y modificaciones morfológicas como la coloración, los tricomas y la articulación del labelo (Bogarín *et al.* 2018). En el complejo de *Specklinia endotrachys* (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase se documentó la agregación de moscas Drosophilidae -hembras y machos de diferentes especies relacionadas- que son atraídas por la liberación de feromonas y la secreción de gotículas de néctar en los sépalos de las cuales las moscas se alimentan por largos periodos antes de entrar en la cavidad entre la columna y el labelo (Karremans *et al.* 2015b). También se ha demostrado la presencia de néctar en especies de *Octomeria* (Barbosa *et al.* 2009), *Pleurothallis* (Duque-Buitrago *et al.* 2014) y *Stelis* (van der Cingel 2001). En algunas especies de *Stelis* se produce un exudado acuoso semejante al néctar, tanto en los pétalos como en la base del labelo, pero que por su escasez es muy difícil de medir (Albores-Ortiz & Sosa 2006).

Las características morfológicas relacionadas con la polinización tales como el labelo, la posición de la antera y el estigma, así como la morfología de los polinarios, han evolucionado de forma independiente en diversos clados de la subtribu, y es posible encontrar convergencia de caracteres en especies no relacionadas que han desarrollado mecanismos de polinización similares (Karremans & Díaz-Morales 2019). Recientemente se ha propuesto clasificar los mecanismos de polinización de Pleurothallidinae en “lepantiforme”, “steliforme” y “masdevaliforme”. El **mecanismo lepantiforme** hace alusión a la pseudocopulación como engaño sexual, descrito para la subtribu por primera vez en *Lepanthes glicensteinii* Luer mediado por sciáridos (Diptera: Sciaridae) (Blanco & Barboza 2005). Ocurre en grupos no relacionados dentro de la misma subtribu como en *Andinia*, *Lepanthes* y posiblemente *Stelis* sect. *Salpistele*. El **mecanismo steliforme** hace referencia

al mecanismo de polinización de las especies con flores planas y la presencia de un glenio (estructura en la base del labelo cuya función ecofisiológica es desconocida, pero que se ha relacionado con la atracción de polinizadores y su posicionamiento en la flor) que los insectos intentan alcanzar, dando como resultado la remoción del polinario con la parte frontal. Ocurre en *Lepanthopsis* (Cogn.) Ames, *Platystele* Schltr., *Pleurothallis* y *Stelis* subgen. *Stelis*. El **mecanismo masdevaliforme** involucra un encaje perfecto del cuerpo del insecto en la cavidad entre la columna y el labelo, ayudado por la posición de los pétalos, en la que la remoción se da cuando el insecto retrocede para salir de la flor, se llena del viscario en el rostelo y luego se le adhiere el polinario. Este se encuentra en los demás grupos de Pleurothallidinae, como *Acianthera*, *Anathallis*, *Dracula*, *Echinosepala*, *Masdevallia*, *Myoxanthus* Poepp. & Endl., *Octomeria*, *Porroglossum*, *Scaphosepalum*, *Specklinia*, *Stelis* subgen. *Uncifera* y *Trichosalpinx* (Karremans & Díaz-Morales 2019).

Síndromes de polinización en *Masdevallia*

Las especies de *Masdevallia* se reconocen por tener flores relativamente grandes, ya sea con colores llamativos brillantes o con colores oscuros opacos, y los sépalos caudados con diversos grados de fusión, frecuentemente formando un tubo sepalino (Luer 2006). Los pétalos son callosos y están dispuestos de tal forma que crean un túnel junto con la columna y el labelo. El labelo es articulado, por lo que fácilmente desencadena un movimiento en vertical hacia la columna. Los polinarios son lateralmente aplanados, amarillos y carecen de un viscidio pegajoso, con las caudículas en forma de colita de ballena (Pridgeon 2005).

Rasgos florales como el olor desagradable, las coloraciones oscuras en el perianto (incluyendo puntos, manchas o rayas), así como las colas sepalinas y la presencia de un labelo articulado, son características tradicionalmente relacionadas con la sapromiofilia (van der Cingel 2001, Pridgeon 2005). Las fragancias de siete especies de *Masdevallia* fueron descritas por Kaiser (1993), encontrando compuestos de olor desagradable (i.e. ácido butírico y ácido isovalérico) en las especies *M. caesia* Roesl, *M. elephanticeps* Rchb.f. & Warsz., *M. striatella* y *M. tridens* Rchb.f., con la hipótesis de que están relacionados con la atracción de insectos que se alimentan de carroña (Pridgeon 2005). Las especies hermanas *M. angulata* Rchbf., *M. fractiflexa* F.Lehm. & Kraenzl., y *M. peristeria* Rchbf., caracterizadas por su olor pútrido y labelo verrugoso, son visitadas por moscas de las familias Calliphoridae y Sarcophagidae (Oestroidea) (Karremans & Díaz Morales 2019). En *M. floribunda* Lindl. y *M. tuerckheimii* Ames, con coloraciones oscuras y presencia de puntos morados en sépalos y labelo, se ha reportado la remoción de polinarios tanto por hembras como por machos de dos especies de moscas del género *Zygothrica* (Drosophilidae) (Lipinska *et al.* 2019). En

ocasiones, los autores observaron moscas de ambos sexos en la flor, hipotetizando que estas flores pueden ser un lugar tanto de alimentación como de cópula (Lipinska *et al.* 2019).

En contraste, algunas especies tienen olor dulce, por ejemplo, *M. estradae* Rchb.f. presenta una alta proporción de cis-(z)-jasmonato de metilo que provoca una fragancia agradable según la percepción humana (Kaiser 1993). Otras especies más bien carecen de fragancia perceptible para el sentido del olfato humano y tienen tubos sepalinos de colores brillantes, lo que ha llevado a muchos autores a pensar en polinización mediante ornitofilia e inclusive psicofilia (Dodson 1962, Gerritsen & Parsons 2005, Meisel *et al.* 2014, Pridgeon 2005, van der Pijl & Dodson 1966). Este es el caso de las especies pertenecientes a *Masdevallia* subsección *Coccineae* H.J.Veitch, con flores tubulares de colores llamativos como rojo, rosado y anaranjado (e.g. *M. coccinea* Linden ex Lindl., *M. ignea* Rchb.f., *M. rosea* Lindl., *M. veitchiana* Rchb.f.), así como de *M. limax* Luer, *M. maxilimax* (Luer) Luer y *M. mendozae* Luer. Sin embargo, muy pocos de estos reportes presentan evidencia y en los que hay fotografías disponibles sólo se aprecian los colibríes cerca de las flores. Los colibríes pueden ser atraídos por los colores brillantes y hasta puede que exploren algunas flores con sus picos, pero hay poca probabilidad de que remuevan los polinarios que no tienen viscidio pegajoso (Karremans 2023, Karremans & Díaz Morales 2019). Cuervo Martínez (2012) estudió la polinización de las especies suramericanas *M. coccinea* y *M. ignea*, con flores tubulares de atractivo color rosado y anaranjado respectivamente, y demostró que las flores son polinizadas por moscas de la familia Drosophilidae (Diptera), descartando la ornitofilia para estas especies. En otras especies con estas características, como *M. veitchiana*, también se ha reportado visitación por moscas (Karremans y Díaz-Morales 2019). Entre los visitantes reportados para especies de *Masdevallia* se incluyen moscas de las familias Calliphoridae, Chloropidae, Drosophilidae y Sarcophagidae (Ackerman 2023, Karremans & Díaz-Morales 2019). Se ha generalizado que la polinización en *Masdevallia* se da por engaño (Ackerman *et al.* 2023); sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de polinización para la mayoría de especies.

Sistemas reproductivos en Orchidaceae con énfasis en *Masdevallia*

El sistema reproductivo de cada especie determina que una flor pueda fecundarse preferentemente con el polen de otra flor de un individuo genéticamente diferente (**alogamia**), con su propio polen (**autogamia**) o con el polen de una flor diferente dentro del mismo individuo (**geitonogamia**) (van der Pijl & Dodson 1966). La **polinización cruzada** es la transferencia del polinirio hacia el estigma de una flor de un individuo diferente de la misma especie, dando como resultado el **exocruzamiento o exogamia**. Las orquídeas con este sistema se denominan alógamas y

existen mecanismos que las favorecen como la auto-incompatibilidad, la dicogamia (i.e. separación temporal de la maduración de los sexos) y la hercogamia (i.e. separación espacial del androceo y el gineceo). Por otro lado, la **autopolinización** es la transferencia del polinario hacia el estigma de la misma flor, lo cual puede ocurrir de forma autónoma antes de la apertura de la flor (**cleistogamia**), o después, mediada por factores morfológicos (e.g. rostelo rudimentario o ausente), ontogenéticos (e.g. diferentes posiciones del polinario durante la antesis), o ecológicos (e.g. vectores bióticos y abióticos que pueden asistir el proceso). Debido a que la autopolinización aumenta la endogamia y disminuye la variabilidad genética, frecuentemente es evitada mediante barreras morfológicas, mecánicas o etológicas (Borba *et al.* 2011). Sin embargo, en las orquídeas parece haber una predominancia de la autogamia como una estrategia evolutiva de aseguramiento reproductivo ante la limitación de polinizadores (Darwin 1862, Cozzolino & Widmer 2005). También es posible encontrar grupos con especies auto-compatibles y auto-incompatibles. Por ejemplo, la auto-incompatibilidad se ha propuesto como un factor determinante en mantener la alta variabilidad en las especies de Pleurothallidinae polinizadas por moscas, cuyo comportamiento puede promover la autopolinización debido a sus periodos largos de visitación pasando por varias flores en una misma inflorescencia (Borba *et al.* 2001a,b, 2011, de Melo *et al.* 2011).

Sobre los sistemas reproductivos en *Masdevallia* sólo existe un estudio empírico con *M. infracta* Lindl., una especie endémica de Brazil a Bolivia que mostró 50% de auto-incompatibilidad completa y otro 50% de auto-compatibilidad en la población estudiada. Los autores de dicho estudio sugieren que el sistema reproductivo de esta especie es complejo, mezclando ambas estrategias para asegurar tanto el éxito reproductivo como la variabilidad genética (Borba *et al.* 2011). Según otros estudios, la autofecundación no autónoma se da en *M. coccinea* y *M. ignea* (Cuervo Martínez 2012). Estas son las únicas tres especies de *Masdevallia* en las que se ha estudiado la estrategia reproductiva, lo que refleja la necesidad de hacer más estudios en el género para tener un panorama más claro sobre el efecto de la ecología reproductiva sobre la radiación evolutiva del grupo.

III. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre los sistemas de polinización y las estrategias reproductivas en géneros megadiversos de Pleurothallidinae, y Orchidaceae en general, es escaso (Ackerman *et al.* 2023). Con más de 600 especies, *Masdevallia* es el género de la subtribu más cultivado y cotizado por su valor ornamental (Pridgeon 2005). A pesar de ser un género que incluye especies muy atractivas, se conoce relativamente poco sobre su ecología. Los estudios con datos sobre la identidad de los polinizadores existen sólo para 30 especies de *Masdevallia* (Ackerman *et al.* 2023), lo que representa menos del 5% de las especies del género. Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y los estudios histológicos que permitan describir y analizar con detalle las estructuras posiblemente involucradas en los mecanismos de atracción de los polinizadores son prácticamente nulos. Más crítico aún, sólo se conocen aspectos sobre las estrategias reproductivas para cuatro especies del género (Ackerman *et al.* 2023, Cuervo Martínez 2012).

En Costa Rica se ha evidenciado la existencia de tres clados de *Masdevallia* definidos por sus afinidades genéticas y biogeográficas. El clado A tiene la distribución más amplia, el 56% del total de especies del género y el 30% de endemismo en Costa Rica, indicativo de una radiación local (Oses Salas 2017). *Masdevallia striatella* es una especie endémica de Costa Rica y Panamá que pertenece a este clado, siendo una de las especies más comunes del género y con más amplia distribución tanto geográfica como ecológica en Costa Rica (Luer 2006, Oses Salas 2017). Aunque se ha reportado visitación por moscas tipo drosófilidas en esta especie (Karremans & Díaz-Morales 2019), no se tienen bien identificados sus polinizadores efectivos. También se ha reportado la función osmofórica de sus colas sepalinas, pero dicha hipótesis no se ha puesto a prueba y las estructuras involucradas en el mecanismo de polinización no han sido descritas; menos se ha estudiado su sistema reproductivo. Por lo anterior, se considera que proporcionar información sobre la diversidad y el comportamiento de los polinizadores efectivos de *M. striatella*, su biología floral, así como de sus estrategias reproductivas, puede ser clave para la comprensión de las relaciones evolutivas dentro y entre los clados del género en Costa Rica y otras regiones.

Se plantean las siguientes preguntas de investigación: 1. ¿Cuáles son los visitantes florales y polinizadores efectivos de *Masdevallia striatella*? 2. ¿Cuál es el síndrome de polinización de esta especie? 3. ¿Cómo son las microestructuras del perianto posiblemente relacionadas con la atracción de los polinizadores? 4. ¿Qué es la sustancia acuosa secretada en el labelo? 5. ¿Puede *M. striatella* autofecundarse? Se hipotetiza que esta especie es polinizada por moscas (Diptera) y que presenta el síndrome de sapromiofilia mediada por engaño alimenticio generalizado y/o de sitio de oviposición,

como se ha generalizado para este género (Ackerman *et al.* 2023). Se hipotetiza también que la sustancia acuosa del labelo cumple un rol fundamental en el mecanismo de polinización. Se pretende poner a prueba la hipótesis de que las colas sepalinas tienen osmóforos para la atracción de los polinizadores. Finalmente, se hipotetiza que *M. striatella* es auto-compatible como se ha reportado para otras especies del género.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Aportar conocimiento sobre la polinización, la biología floral y el sistema reproductivo de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) para un mejor entendimiento de las relaciones evolutivas dentro y entre los clados del género.

Objetivos específicos

1. Documentar los visitantes florales y los polinizadores efectivos de *M. striatella* en una población de Costa Rica.
2. Describir la morfoanatomía de las estructuras que se encuentran en el perianto de *M. striatella* y su posible función en la atracción de polinizadores y remoción efectiva de polinarios.
3. Determinar qué es la sustancia acuosa secretada en el labelo de *M. striatella* y cuál es su rol en el mecanismo de polinización.
4. Estudiar el sistema reproductivo de *M. striatella* mediante la aplicación de experimentos controlados de polinización en una población de Costa Rica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio.— La Reserva Biológica Bosque de Paz (BdP) se localiza en el flanco Caribe de la Cordillera Volcánica Central, entre dos extensos Parques Nacionales (Volcán Poás y Juan Castro Blanco), en la cuenca del Río Toro Amarillo, provincia de Alajuela, Costa Rica (10° 12' 15.59''N, 84° 19' 01.54''O). Tiene un rango de elevación entre 1450 y 2200 m. En BdP se ha llevado un inventario de las orquídeas desde el 2004 con la creación de un jardín de 1500 m² en el que crecen la mayoría de las especies reportadas, lo que facilita las observaciones fenológicas y ecológicas a largo plazo.

Especie de estudio.— *Masdevallia striatella* (Fig. 1) fue descrita por Heinrich Gustav Reichenbach en 1886 a partir de un espécimen proveniente de Costa Rica. Se considera una de las especies del género más comunes y de más amplia distribución en Costa Rica encontrándose entre los 200 y 2400 m s.n.m. (Luer 2006, Oses Salas 2017). Crecen como epífitas en bosques pluviales, nubosos y de roble en la vertiente Pacífica y cerca de la División Continental (Hammel *et al.* 2003). En el sitio de estudio, la floración de esta especie se da entre los meses de setiembre y diciembre, con un pico de floración en noviembre.

Las plantas de *M. striatella* son cespitosas y miden 15–20 cm, con los ramicaules (tallos secundarios) delgados, erectos a suberectos y las hojas obovadas y semi-pecioladas de color verde brillante. Las inflorescencias son unifloreas, a veces con una segunda flor sucesiva (Hammel *et al.* 2003, Luer 2006). Las flores son blancas con nueve venas moradas (tres en cada sépalo), los sépalos son connados en la base formando un tubo que se abre hacia los extremos en tres colas sepalinas cortas de color verde-amarillo (Fig. 1A–B). Los pétalos son pequeños, blancos y tienen una vena central morada; son estrechos en la base y se ensanchan hacia el medio, con un callo en el margen inferior y con el ápice mucronado, están dispuestos a cada lado de la columna formando un túnel estrecho en conjunto con el labelo que está articulado a la base de ésta (Fig. 1D–E). El labelo tiene tres venas, es oblongo, presenta dos lóbulos y dos cavidades redondeadas de color amarillo en la base, la lámina del labelo presenta un exudado en forma de gotículas transparentes en la porción central basal que desaparece a la altura de los pliegues marginales oblicuos, el ápice presenta un callo diminutamente verrugoso de color amarillo (Fig. 1E). La columna es blanca, subarquada, con los márgenes de color morado (Fig. 1C–D); la capa de la antera es blanca y los polinarios consisten en dos polinios obovados color amarillo claro unidos por una caudícula en forma de cola de ballena (Fig. 1F–G). En la población de estudio, las flores presentan un aroma algo desagradable para sentido del olfato humano, que tradicionalmente se ha relacionado con la atracción de dípteros que se alimentan

de carroña (Pridgeon 2005), aunque esto nunca ha sido verificado. Dicha fragancia fue estudiada por Kaiser (1993), quien describió la presencia de ácido butírico y ácido isovalérico entre los volátiles de *M. striatella* (y otras especies).

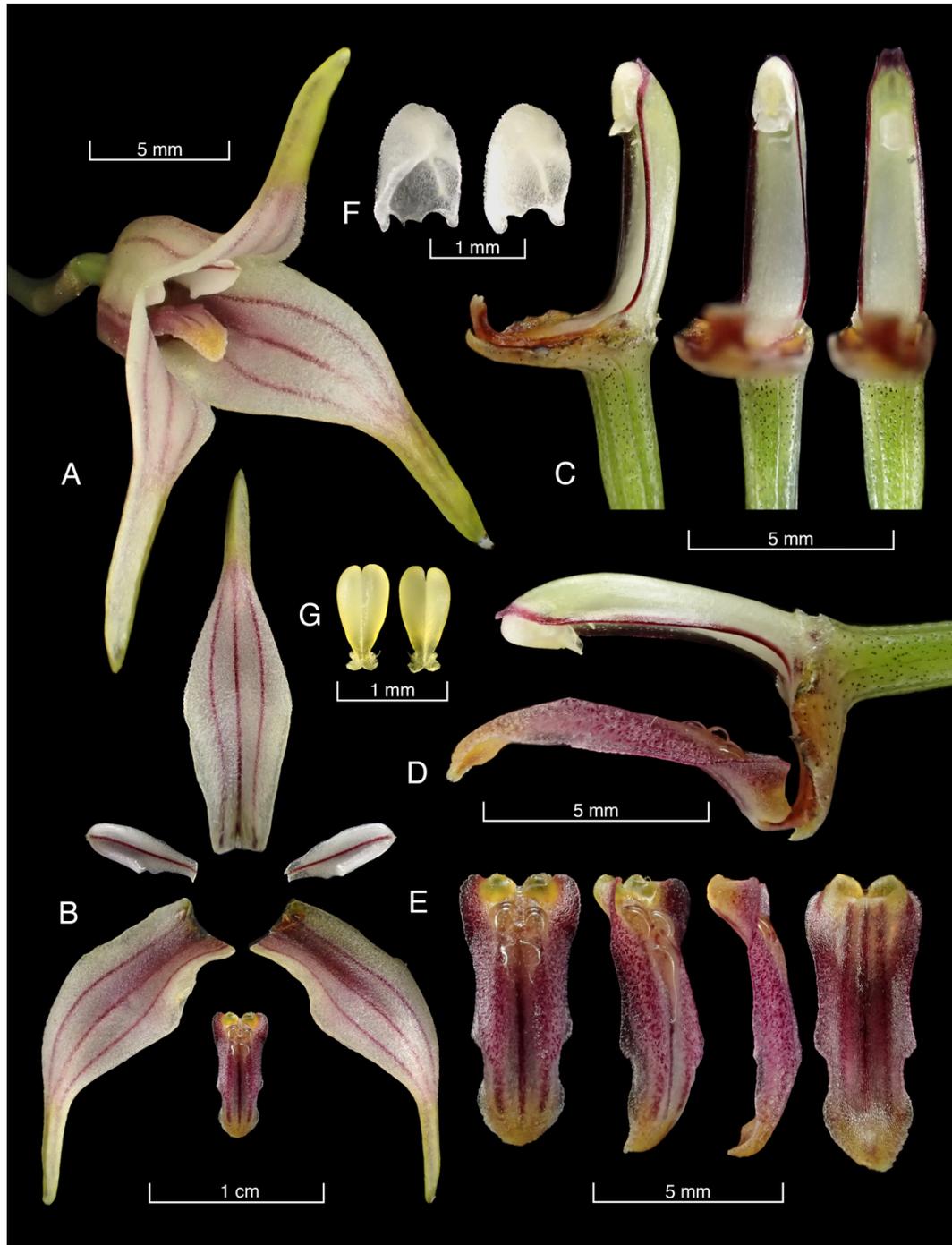


FIGURA 1. Análisis floral de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **A.** Flor. **B.** Dissección del perianto. **C.** Columna en vistas $\frac{3}{4}$, frontal con la antera, y frontal sin la antera. **D.** Vista lateral de la columna, el labelo y el ápice del ovario. **E.** Diferentes vistas del labelo (adaxial, $\frac{3}{4}$, lateral, y abaxial). **F.** Capa de la antera. **G.** Polinario. Nótese las goticulas secretadas en la base del labelo (D, E). Basado en *N.Belfort* 676 (JBL).

Diversidad y comportamiento de visitantes florales.— La diversidad y el comportamiento de los invertebrados que interactúan con las flores de *M. striatella* se registró con fotografías y videos tomados en el Jardín de Orquídeas de Bdp durante las floraciones de octubre y noviembre de cinco años (2016, 2018–2020 y 2022). Los polinizadores efectivos se diferenciaron de otros visitantes florales porque cargaron polinarios en su cuerpo (remoción) y/o los depositaron en el estigma de la flor (deposición), en ambos casos documentando la evidencia respectiva. Se categorizaron en morfotipos según su tamaño y sus patrones de coloración. Al menos un individuo de cada morfotipo fue colectado y depositado en la colección de visitantes florales y polinizadores del JBL para su documentación con una cámara Nikon D810 y lente Zeiss de 63 mm montado en un fuelle, así como su posterior identificación morfológica.

Una muestra de 16 dípteros visitantes y polinizadores de *Masdevallia striatella* (n=13) y especies relacionadas [*M. calura* (n=1), *M. picturata* (n=1) y *Diodonopsis erinacea* (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase (n=1)] se conservaron a -4°C para análisis del código de barras genético. Especímenes completos se utilizaron en una extracción no destructiva por medio del DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), de acuerdo con las indicaciones del protocolo del fabricante. Para obtener el fragmento de código de barras de ADN estándar para animales, el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) (Hebert *et al.* 2003), el PCR se hizo usando los imprimadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.* 1994), y, Lep-F1 y Lep-R1 (Hebert *et al.* 2004). Se siguió la metodología detallada en Karremans *et al.* (2015b) para la secuenciación de Sanger, la edición de las secuencias generadas y su alineamiento. La región COI del polinizador (Nematocera: Ceratopogonidae: *Forcipomyia*) de *Trichosalpinx reflexa* Mel.Fernández & Bogarín se utilizó como grupo externo. Los árboles filogenéticos se produjeron con un análisis del conjunto de datos COI utilizando BEAST v1.6.0. (Drummond & Rambaut 2007), siguiendo la metodología de Karremans *et al.* (2015b) para la configuración de los parámetros, la combinación de los árboles y la edición del árbol resultante. Las probabilidades posteriores (PP) se dan para cada nodo en forma decimal. Finalmente, con el apoyo de un experto entomólogo se determinó el sexo y el género/especie de los especímenes secuenciados, comparando la determinación taxonómica con el primer hit revelado por la comparación de secuencias de Gene Bank (NCBI 2023).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).— Con el fin de localizar y caracterizar posibles glándulas secretoras sobre la epidermis de sépalos, pétalos, columna y labelo, se obtuvieron imágenes MEB en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica (UCR). Se colectaron, disectaron y fijaron flores de *M. striatella* en una solución Karnovsky 0.1 M (glutaraldehído 2%, paraformaldehído 10% en un buffer de fosfato de sodio 0.2 M

con un pH de 7.4) (Karnovsky 1965). Se colocaron las muestras en una cámara de vacío o desgasificadora por 15 min para asegurar la inclusión del fijador en todos los tejidos. Se realizaron tres lavados de 20 min c/u en un buffer de fosfato de sodio 0.1 M (fórmula Sorensen). Luego se sumergieron en una solución de tetra óxido de osmio al 2% durante 1 h. Se realizaron tres lavados de 20 min c/u con agua destilada y se dejaron en agua de un día para otro. Para deshidratar los tejidos, se aplicó un gradiente de alcoholes (EtOH 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, $\geq 99.9\%$, $\geq 99.9\%$, $\geq 99.9\%$) sumergiendo las muestras por 20 min en cada repetición. Se sumerge 2 veces durante 20 min c/u en una solución de EtOH $\geq 99.9\%$ y acetato de amilo (1:1 v/v). Utilizando un secador de punto crítico automatizado LEICA EM CPD300, se aplicaron 6 ciclos de intercambio de CO₂ de 10 min c/u, aplicando calor en el último ciclo hasta alcanzar una temperatura y presión críticos de 35 °C y 79 bar (1146 psi), respectivamente. Finalmente se sacó el gas lentamente hasta alcanzar 31 °C y 15 psi. Las muestras secas se montan en una placa de metal y se recubren con oro en un cobertor iónico. Las muestras montadas se observaron con un microscopio de barrido HITACHI S-3700N, a una aceleración de voltaje de 10kV mientras se capturan las imágenes digitales.

Procedimientos histoquímicos.— Con el fin de identificar zonas de actividad metabólica (síntesis de lípidos, polisacáridos y proteínas) en las flores de *M. striatella*, se aplicaron una serie de protocolos de tinción en flores frescas y en cortes histológicos fijados en parafina. Para aclarar los tejidos fuertemente pigmentados se utilizaron flores conservadas en EtOH 70% por 1 a 4 días. La pigmentación natural se exploró en flores frescas sin teñir montadas en portaobjetos para microscopio de luz utilizando glicerina como medio de montaje y se hicieron los correspondientes controles.

Para identificar áreas de emisión de fragancias (presencia de osmóforos) las muestras se sumergieron en una solución de Rojo Neutro (NR por sus siglas en inglés) al 0.1% (p/v, agua corriente) por 10–15 min y luego se enjuagaron con agua corriente (Vogel 1962, Ruzin 1999). Para identificar presencia de lípidos (grasas, aceites y ceras) diferentes muestras se sumergieron en las soluciones Sudan IV (SIV) al 0.5% (p/v, EtOH 70%) o Sudan Black B (SBB) al 0.07% (p/v, EtOH 70%) durante 15–20 min, luego en EtOH 50% durante unos segundos después de sumergirlas en el tinte y se diferenciaron con EtOH 50% durante 1 min (Bronner 1975, Gerlach 1969, Ruzin 1999). Las proteínas se detectaron sumergiendo las muestras en una solución de Azul de Coomassie R-250 (CBB por sus siglas en inglés) al 0.25% (p/v) durante 3 min y enjuagando con agua corriente (Fisher 1968). Las muestras teñidas se montaron en portaobjetos para microscopía de luz (ML) empleando glicerina líquida como medio de montaje.

Se utilizaron flores previamente disectadas y fijadas en FAA (formalina, ácido acético, alcohol, agua) para la infiltración de las muestras en parafina. Primero se enjuagaron con agua y se colocaron en EtOH 50% durante 24 h, luego se deshidrataron aplicando un gradiente de alcoholes (70%, 90%, 96%, $\geq 99.9\%$) por 2 h en cada repetición y luego en EtOH $\geq 99.9\%$ durante una noche. Se sumergieron en las soluciones 3:1, 1:1, 1:3 de EtOH $\geq 99.9\%$: xileno a 60 °C durante 4 h cada una y se almacenaron en xileno durante una noche. Se utilizó Leica Paraplast Plus® para preparar soluciones xileno:paraplast en las proporciones 2:1, 1:1 y 1:2 a 60 °C durante 4 h cada una. Las muestras se dejaron en la parafina durante 24 h a 60 °C, luego se infiltraron utilizando moldes de incrustación desechables Leica Tissue Cassette® y se solidificaron a temperatura ambiente. Se hicieron cortes de los bloques de parafina para obtener secciones de 7 μm de espesor con un micrótopo rotatorio Leica RM2265. Las cintas de parafina se colocaron en portaobjetos para microscopio y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La preparación de las muestras para las tinciones consistió en desparafinar sumergiéndolas en dos repeticiones de xileno, un gradiente de EtOH ($\geq 99.9\%$, $\geq 99.9\%$, 95%, 70%) y agua destilada por 2 min en cada paso. Los polisacáridos insolubles y el almidón se detectaron con una reacción de Ácido Peryódico-Schiff (PAS por sus siglas en inglés) al oxidar las muestras en una solución acuosa de ácido peryódico (HIO₄) al 5% (p/v) durante 30 min, realizando tres enjuagues de 2 min en agua destilada y añadiendo gotas de reactivo de Schiff al portaobjetos con una pipeta limpia cubriendo las muestras durante al menos 30 min, finalmente sumergiendo en agua corriente a 50–60°C durante 5 min (Ruzin 1999). También se tiñeron con Azul de Toluidina y Azul de Coomassie por 20 min cada uno para determinar la presencia de celulosa en las paredes celulares y de proteínas, respectivamente. Una vez teñidas, las muestras se deshidrataron aplicando un gradiente de EtOH (95%, $\geq 99.9\%$, $\geq 99.9\%$) y dos repeticiones de xileno durante 2 min en cada paso. Las muestras se aclararon y montaron utilizando el medio de montaje resinoso Leica CV Mount®.

Caracterización de la secreción del labelo.— A partir de plantas de *M. striatella* cultivadas en el Jardín Botánico Lankester (JBL) (*Belfort 676*, *Chinchilla 3046*, *Rojas-Alvarado 478 & 491*; JBL!) se colectaron labelos para realizar análisis de contenido de azúcares (glucosa, fructuosa y sacarosa) en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la UCR. Los labelos se colocaron en viales con 1 mL de agua ultra pura y luego se aplicó 30 min de ultrasonido con calor. El líquido se filtró utilizando jeringas con filtros de 0.22 μm y se sometió a un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC-RID, SHIMADZU Prominence, aplicando un volumen de inyección de 20 μL .

Experimentos de polinización e indicadores de éxito reproductivo.— Se realizaron experimentos controlados de cruzamiento en dos periodos fenológicos (2020 y 2021) utilizando flores de 23 individuos de *M. striatella* creciendo en el Jardín de Orquídeas de BdP. La exclusión de los visitantes florales se aseguró cubriendo los botones florales con una bolsa de tela blanca porosa que permitía a la vez la recepción lumínica y el intercambio gaseoso adecuados para el desarrollo floral (Fig. 2). Una vez abiertas las flores, entre el 24 de octubre y el 28 de noviembre de 2020 y entre el 25 de setiembre y el 10 de octubre de 2021, se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) Apomixis o agamospermia (**APO**): se removió el polinario (emasculación de la flor) para determinar si se da formación de frutos sin la unión de gametos; 2) Autopolinización autónoma (**AUTa**): la antesis transcurrió sin manipulación de la flor para determinar si hay transferencia autónoma del polinario al estigma; 3) Autopolinización manual (**AUTm**): se transfirió el polinario manualmente al estigma de la misma flor; 4) Polinización cruzada (**EXO**): se transfirió el polinario manualmente al estigma de una flor de un individuo distinto; 5) Polinización natural o grupo control (**C**): los botones se marcaron sin embolsar. Una vez aplicados los tratamientos, las flores se embolsaron nuevamente (excepto las del grupo control), se etiquetaron con color verde y se monitorearon hasta el aborto de la flor o la formación del fruto (cápsula). En la medida de lo posible, se aplicaron los cinco tratamientos en una misma planta. Adicionalmente, durante la floración de 2022 se evaluó el éxito reproductivo a nivel de frutos (promedio \pm desviación estándar de flores marcadas que desarrollaron frutos) en 16 plantas creciendo en condiciones seminaturales en el Jardín de Orquídeas de BdP.

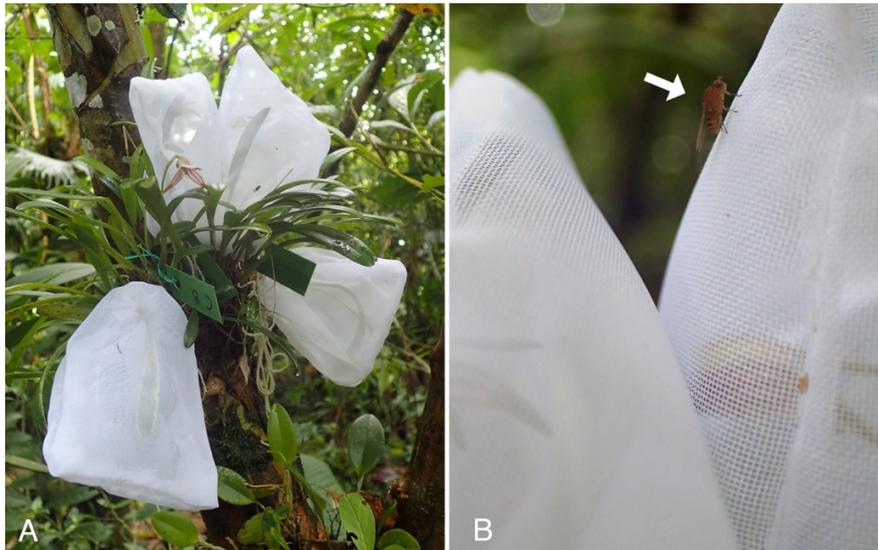


FIGURA 2. Diseño de experimentos controlados de polinización aplicados a flores de 23 individuos de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. **A.** Cinco tratamientos de cruzamiento en un mismo individuo, siendo el control la flor abierta sin embolsar (nótese la presencia de una mosca sobre la bolsa de tela). **B.** Detalle de una mosca posada sobre la bolsa de tela, evidencia de la efectividad de la exclusión de los visitantes florales.

Las cápsulas desarrolladas se colectaron al punto de maduración (en pocos casos abiertas) y se evaluó la viabilidad de las semillas mediante una prueba indirecta con Tetrazolio. Una réplica correspondió a una única muestra de semillas por cada fruto diferente formado en cada tratamiento. Las semillas de cada réplica se colocaron en viales de vidrio debidamente identificados, se sumergieron en una solución de tetrazolio al 1% con 6.5 de pH envueltas en papel aluminio para bloquear la entrada de luz y se colocaron en una estufa a 30°C por 24 horas, siguiendo el protocolo de Borba *et al.* (2001b). Una vez transcurrido este periodo, las semillas se colocaron en platos Petri y se fotografiaron con una cámara Nikon D810 lente a máximo aumento, dicha área definida como el campo visual en el que se determinó la proporción de semillas viables/teñidas por réplica. Se documentó la morfología las semillas con embriones no viables, rudimentarios o ausentes.

El índice de compatibilidad se calculó dividiendo el porcentaje de frutos de AUTm entre el porcentaje obtenido por EXO. Un valor de 0 es auto-incompatible completo, mientras que 1 es auto-compatible completo. Se calculó el porcentaje (\pm desviación estándar) de la producción de frutos (variable respuesta) en cada tratamiento (variable predictora). Se calculó la viabilidad promedio de semillas (porcentaje por fruto) aplicando una prueba Wilcoxon (no paramétrica). Los datos se analizaron utilizando R Studio (R Core Team 2020) usando los paquetes plyr v.1.8.8 (Wickham 2011) y ggplot2 (Wickham 2016).

VI. RESULTADOS

Diversidad y comportamiento de visitantes florales. — Se analizaron 532 fotografías y 49 videos (71.6 min en total) para un total de 67 eventos de interacción flor-visitante registrados en al menos 85 flores entre las 8:00 a.m. y 6:00 pm. Todos los visitantes fueron invertebrados pertenecientes a tres clases y siete órdenes, siendo Diptera el más abundante (Fig. 3, Cuadro 1) con representantes de las familias Bibionidae, Drosophilidae, Empididae, Lauxaniidae, Sciaridae y posiblemente Tephritidae o Ulidiidae (Fig. 4–5). Hemiptera (chinchas y áfidos) fue el segundo orden más abundante, seguido por Hymenoptera (al menos dos especies de hormigas, no abejas, ni avispas), Coleoptera (escarabajos adultos y una larva de luciérnaga), Araneae (arañas), Lepidoptera (larvas de mariposa y/o polilla) y Pulmonata (grupo informal que incluye a las babosas y caracoles) (Fig. 3, Cuadro 1). Todos representaron adultos excepto los estadios larvales de al menos una especie de Lampyridae (Coleoptera) y dos especies de Lepidoptera no identificadas (Fig. 4K–N). La mayoría de visitantes florales se encontraron solitarios en las flores, a excepción de las hormigas que en ocasiones estaban agregadas.

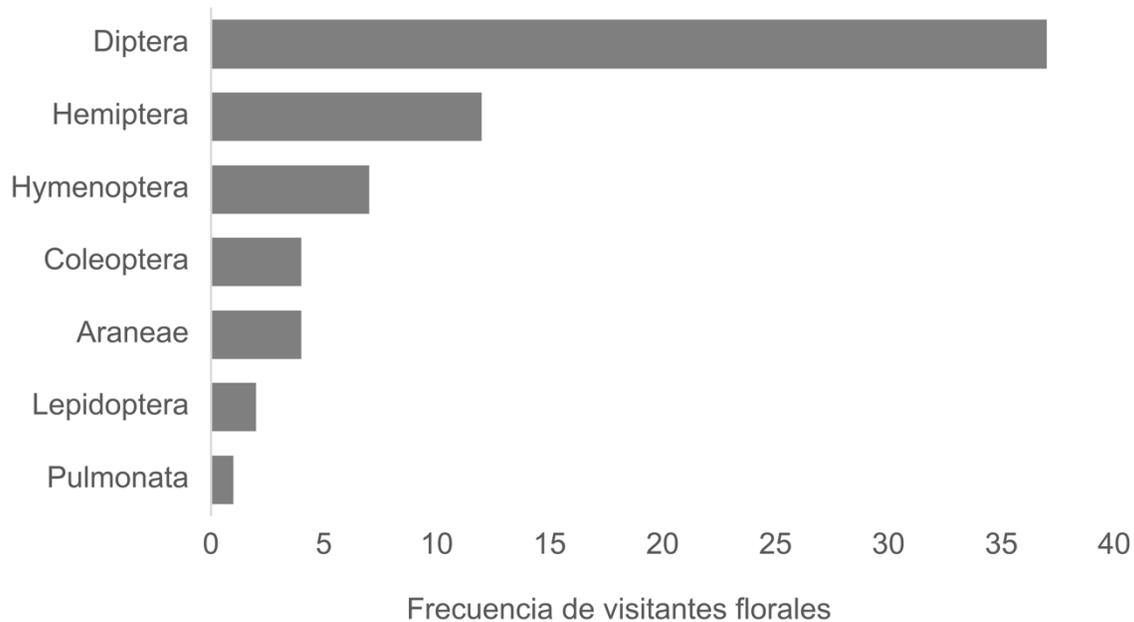


FIGURA 3. Frecuencia de visitantes florales de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) según el orden taxonómico al que pertenecen. Registrados con fotografías y videos durante las floraciones de octubre y noviembre entre 2016 y 2022 en el Jardín de Orquídeas de la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica.

CUADRO 1. Diversidad y frecuencia de los taxones que visitan las flores de *Masdevallia striatella* en la población de estudio, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. NI = No identificado. *Polinizadores efectivos. **Grupo informal.

Clase	Orden	Familia	Frecuencia
Arachnida	Araneae	Thomisidae	1
		NI	3
Insecta	Coleoptera	Chrysomelidae	1
		Curculionidae	2
		Lampyridae (larva)	1
	Diptera	cf. Bibionidae	1
		Drosophilidae	3
		Empididae	1
		Lauxaniidae*	20
		Sciaridae	4
		cf. Tephritidae o Ulidiidae	1
		NI	7
	Hemiptera	Aphididae	5
		Pyrrhocoridae	6
		NI	1
	Hymenoptera	Formicidae	7
	Lepidoptera	NI (larva)	2
Gastropoda	Pulmonata**	NI	1



FIGURA 4. Visitantes florales de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) documentadas durante octubre y noviembre entre 2016 y 2022, Jardín de Orquídeas, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Diptera (A–F), Hemiptera (G), Hymenoptera (H), Coleoptera (I–K), Lepidoptera (L–N), y Araneae (O–P). A. Drosophilidae. B. Empididae. C–D. Sciaridae. E. cf. Tephritidae o Ulidiidae. F. cf. Bibionidae. G. Pyrrhocoridae. H. Formicidae. I–J. Chrysomelidae. K. Lampyridae, estadio larval. L–N. Lepidoptera, estadio larval. O. Thomisidae. P. Restos de Diptera en una tela de araña.

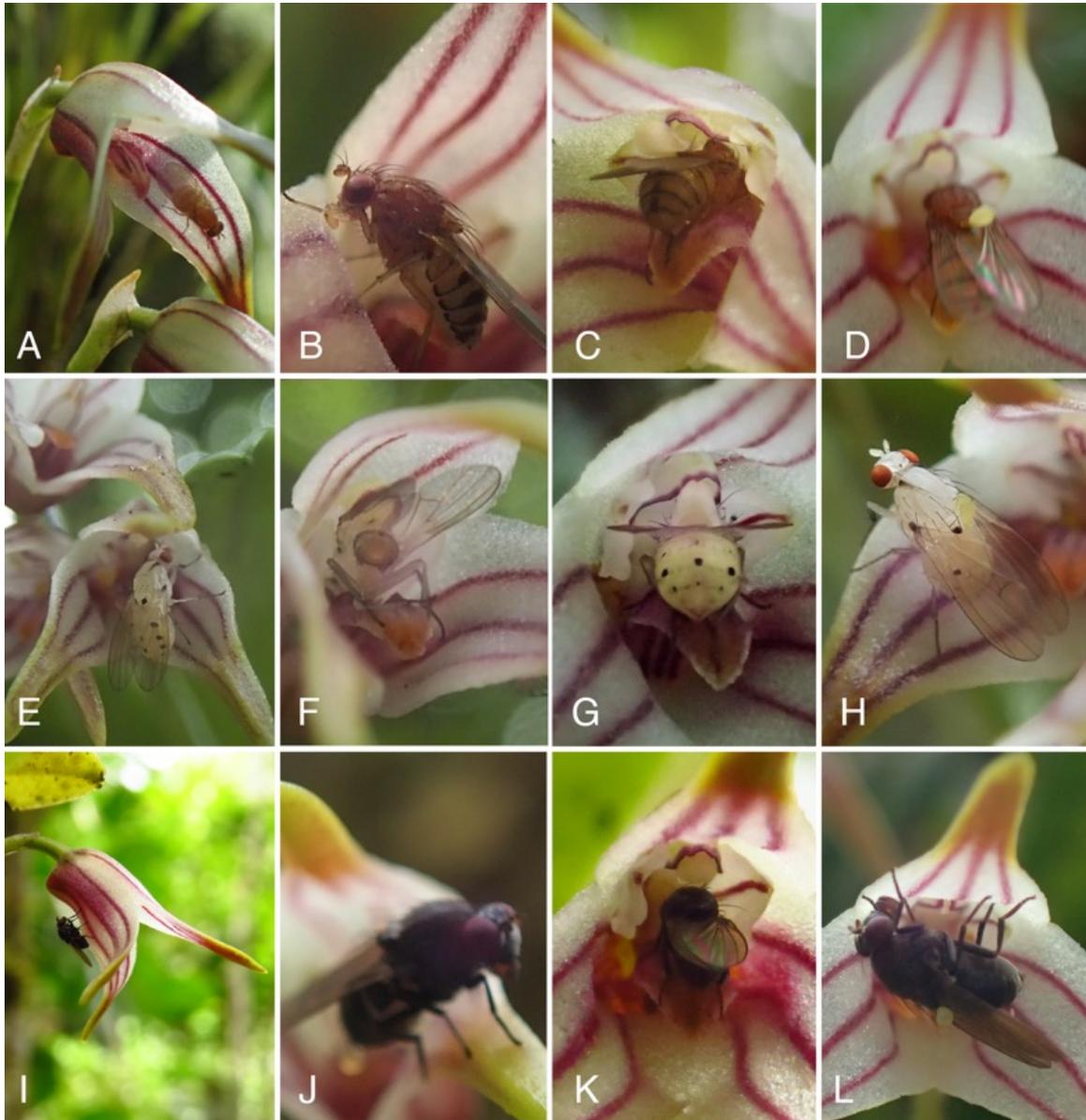


FIGURA 5. Moscas (Diptera: Lauxaniidae) que polinizan *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) documentadas durante octubre y noviembre entre 2016 y 2022, Jardín de Orquídeas, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Se encontraron tres morfotipos: *morfo1* (A–D), *morfo2* (E–H), y *morfo3* (I–L). Las moscas exploran los sépalos (A, E, I), proyectan su probóscide en un comportamiento alimenticio (B, L) y excretan un líquido similar a orina (F, J). Finalmente se introducen hasta la base del labelo en contacto con la columna (C, F, G, K) y remueven la antera al salir (D, H, L).

Entre los dípteros, Lauxaniidae fue la única familia con moscas involucradas en eventos de remoción (n=8) y deposición (n=3) de polinarios. La mayoría de visitas se registraron cuando las moscas ya se encontraban en las flores, sin lograr identificar el sitio de aterrizaje. Sin embargo, pasan la mayor parte del tiempo sobre la superficie adaxial de los sépalos extendiendo su probóscide sobre

el tejido repetidamente (Fig. 5A, E), considerado un comportamiento alimenticio que no mostraron en las colas sepalinas, solo en las porciones anchas del sépalo (Fig. 5B, L). En varias ocasiones se observaron moscas excretando gotas de un líquido amarillo claro similar a orina mientras mostraban el comportamiento alimenticio sobre los sépalos y el labelo (Fig. 5F, J). También es posible ver las moscas sobre la superficie abaxial de los sépalos mostrando un comportamiento de descanso o espera (Fig. 5I) o caminando para dirigirse a otras flores de una misma planta (a veces las colas sepalinas que están en contacto entre flores sucesivas pueden funcionar como puente sobre el que las moscas caminan para cambiar de flor). Las moscas forrajean entre los sépalos y el labelo varias veces antes de introducirse completamente en la flor. Una vez introducidas hasta la base del labelo (Fig. 5C, F, G, K, 6), mueven sus patas I en un movimiento repetido como “escarbando” la base del labelo, mientras se sostienen apoyando las patas II sobre los sépalos laterales y las patas III sobre el ápice del labelo. Debido a este movimiento y al peso de las moscas, se desencadena el movimiento vertical del labelo articulado, a lo que las moscas responden balanceándose con movimientos contrarios del abdomen y las alas (el abdomen hacia abajo y las alas hacia arriba y viceversa), mientras su tórax entre en contacto con la columna.



FIGURA 6. A. Labelo de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) con un exudado acuoso en la porción central basal de la lámina. B. Posicionamiento de una mosca Lauxaniidae *morfo2* dentro de la flor, entre el labelo y la columna (sépalos y pétalos removidos).

Cuando las moscas polinizadoras entran a las flores sin cargar polinario, las visitas son cortas (88 ± 20 s, $n=4$). En algunas ocasiones remueven el polinario solitario y en otras también la capucha de la antera, siendo capaces de volar con ambas estructuras por varios minutos antes de que ocurra la

pérdida de la capucha (Fig. 7). Durante un posible evento de deposición y cuando el estigma es aún receptivo, se registraron visitas más largas (2135 ± 422 s, $n=3$). Es posible que, el hecho de que las moscas quedan atrapadas con el polinario adherido al escutelo en su extremo apical (las caudículas) y al estigma viscoso en el extremo basal (los polinios), dificulte la salida de las moscas, excepto cuando los estigmas están ya engrosados y no son receptivos. Con respecto a las deposiciones observadas, las moscas se encontraron ya en las flores, por lo que este tiempo podría ser aún mayor. Finalmente logran salir de la flor al anclar la uña de sus patas III en el margen apical del labelo o en el margen de los sépalos por debajo del labelo y jalar hasta liberarse. Otras no logran liberarse y mueren en la flor (Fig. 8A–D). En ocasiones, luego de haber salido del interior, las moscas salen a explorar los sépalos nuevamente y en una misma visita puede ingresar hasta la base del labelo nuevamente; en otras ocasiones, caminan hacia las colas sepalinas o la superficie abaxial de los sépalos antes de alzar el vuelo.

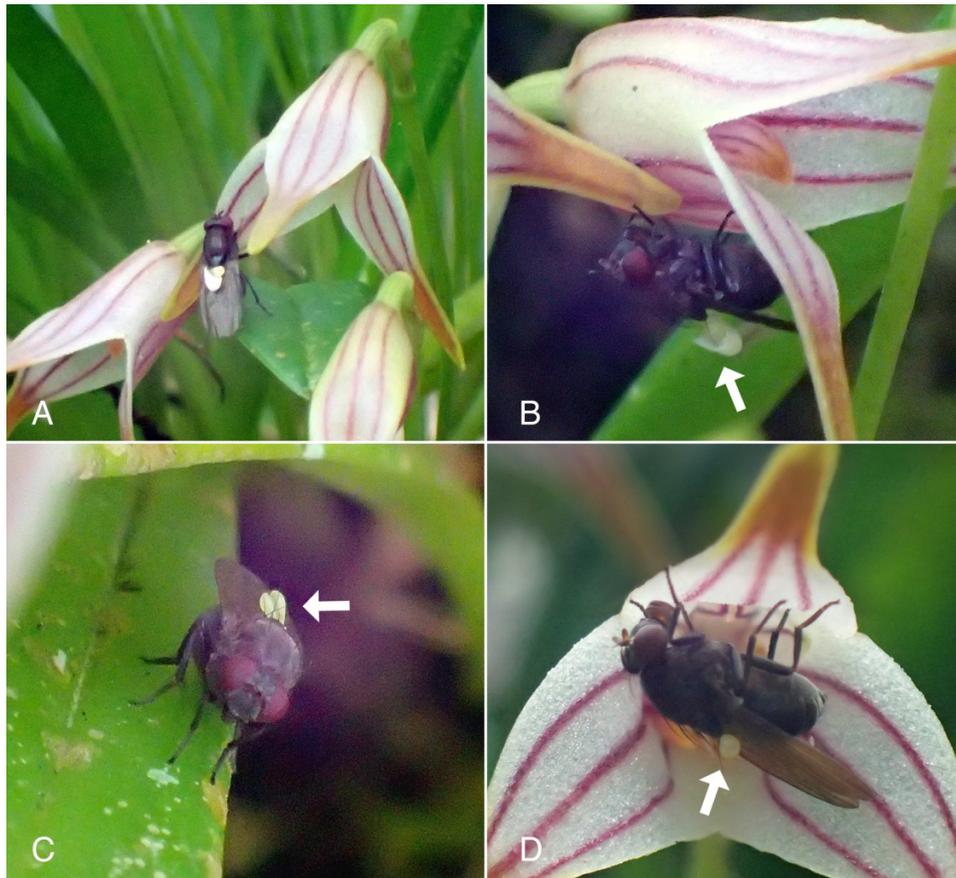


FIGURA 7. Secuencia (5 min) de un evento de remoción de polinario de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) por una mosca Lauxaniidae morfo3. **A.** 9:54 a.m. remueve el polinario junto con la capa de la antera. **B.** 9:55 a.m. camina hacia la flor del lado aproximándose por la cola sepalina hacia la parte abaxial de los sépalos donde se posa unos 20 s (nótese que aún conserva la capa de la antera). **C.** 9:57 se posa sobre una hoja, ya se ha caído la capa de la antera y conserva el polinario adherido al escutelo. **D.** 10:00 la mosca con el polinario adherido retoma el comportamiento de alimentación con la probóscide claramente extendida en la parte adaxial de los sépalos. Evento grabado en video el 27 de octubre de 2019.

Nunca se observó más de un individuo de Lauxaniidae en una misma flor, pero al menos dos individuos de diferentes morfos se observaron visitando flores diferentes en una misma planta al mismo tiempo, así como un mismo individuo puede visitar entre 1 y 3 flores en 10 minutos de observación. Las moscas de las familias Bibionidae (Fig. 4F), Drosophilidae (Fig. 4A), Empididae (Fig. 4B) y Sciaridae (Fig. 4C–D) también exploran los sépalos de las flores y las colas sepalinas e inclusive el labelo, algunas introduciéndose hasta la base donde se encuentra el exudado, pero nunca se vieron cargando polinarios. Algunas de estas moscas también mostraron comportamientos de acicalamiento antes y después de entrar a las flores, contrariamente a las moscas Lauxaniidae que rara vez mostraron este comportamiento.

Finalmente, entre 2018 y 2022 se documentaron tres morfotipos de huevo en ocho flores de *Masdevallia striatella* (Cuadro 2). El huevo tipo 1 (T1) fue depositado sobre el labelo por una mosca Lauxaniidae *morfo3* que estaba atrapada y era comida viva por hormigas en una flor (Fig. 8A–B); el huevo era de color blanco-amarillento, ovoide alargado con los extremos agudos y el córion sulcado (capa externa del huevo con surcos longitudinales) (Fig. 8C). Este fue el único avistamiento de este tipo de huevo y se considera una respuesta innata de supervivencia ante un evento depredador; la mosca cargaba polinario (Fig. 8D). El T2 fue el huevo más frecuente con cinco puestas encontradas; son huevos blancos, oblongos vistos lateralmente, el corión estriado y con cuatro apéndices respiratorios dorsales cortos similares en longitud (Fig. 8E). El huevo T3 es esférico, perlado, cambiando de coloración de blanco a amarillo cuando está cerca de eclosionar, probablemente de Lepidoptera (Fig. 8F). A pesar de ver huevos, no se observaron pupas ni larvas de Diptera y es posible que el huevo de Lepidoptera esté asociado a la larva avistada en otra flor horas después en la misma fecha (Fig. 4N).

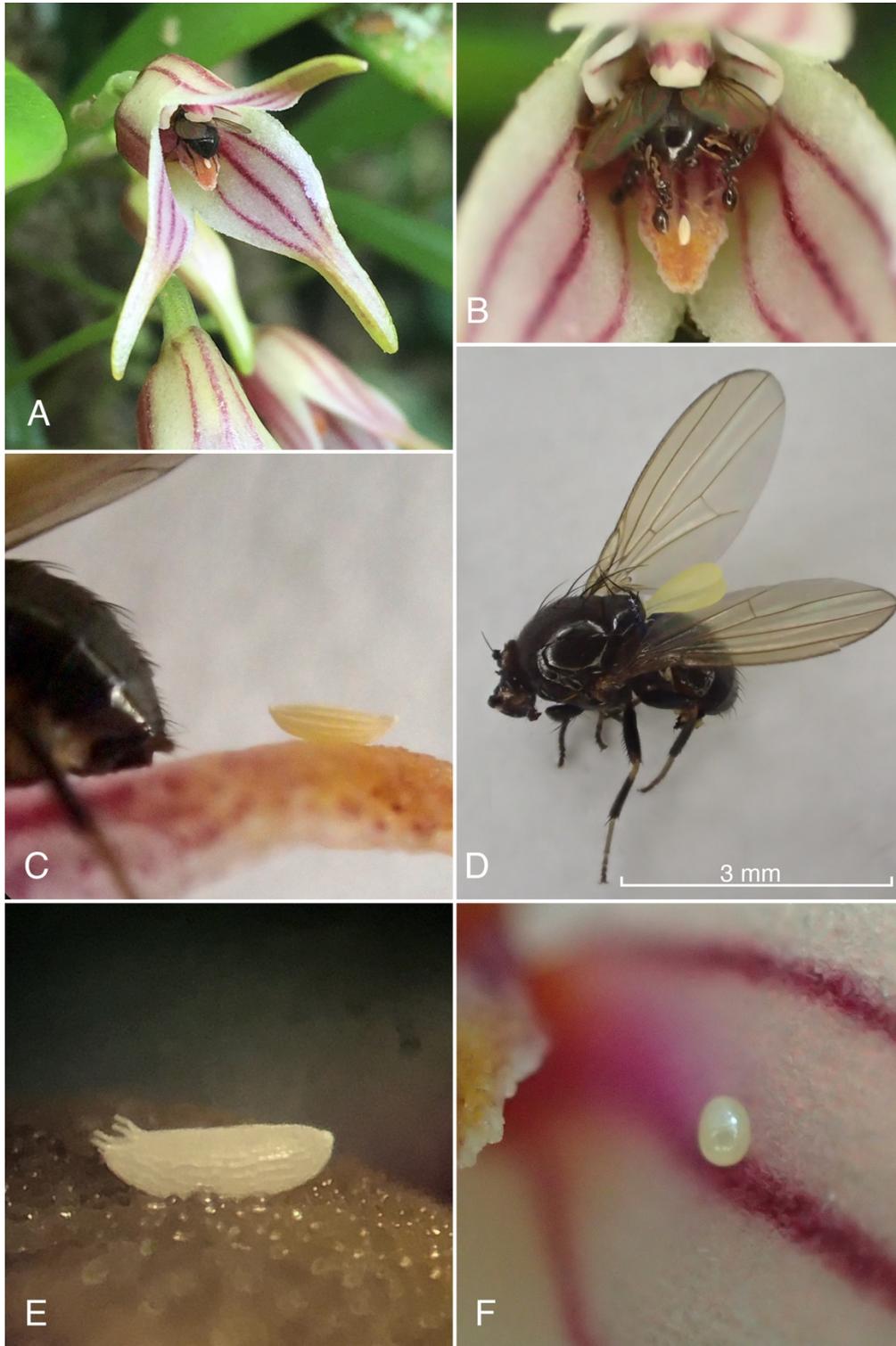


FIGURA 8. Huevos de Diptera (A–E) y Lepidoptera (F) documentados en ocho flores de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) entre 2018 y 2022. **A–D.** T1: huevo de Lauxaniidae *morfo3* depositado mientras la mosca atrapada en la columna era comida viva por hormigas. **C.** Detalle del huevo T1 con forma ovoide elongada y surcos longitudinales en el córion (capa externa del huevo). **D.** Detalle de la mosca decapitada y el polinario en el escutelo. **E.** T2: huevo color blanco, con el córion estriado y cuatro apéndices respiratorios dorsales, probablemente *Drosophila* sp. **F.** T3: huevo esférico, perlado y brillante, probablemente de Lepidoptera. Fotos por N.Belfort-Oconitrillo, excepto A y E por K.Gil-Amaya.

CUADRO 2. Huevos documentados en ocho flores de *Masdevallia striatella* entre 2018 y 2022, Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Se incluye la cantidad de puestas encontradas, su descripción y el grupo taxonómico al que pertenecen.

Tipo de huevo	Cantidad de huevos	Posición en la flor	Descripción	Grupo taxonómico
T1	1	Labelo	Huevo blanco amarillento con forma de banano y córion con surcos longitudinales	Lauxaniidae <i>morfo3</i>
T2	5	Labelo y sépalos	Huevo oblongo, blanco, córion con patrón estriado, con cuatro apéndices respiratorios dorsales cortos	<i>Drosophila</i> sp.
T3	2	Sépalos	Huevo perlado, brillante, coloración entre blanco y amarillenta	Lepidoptera

Identificación taxonómica y genética de los dípteros visitantes y polinizadores.— Los trece dípteros colectados en flores de *M. striatella* pertenecen a dos familias del suborden Brachycera (Schizophora, Acalyptratae) incluyendo al menos cuatro géneros y ocho especies distintas (Fig. 9, Cuadro 3). De la familia Lauxaniidae se encontraron tres géneros: *Poecilominettia* Hendel (2 especies), *Xenochaetina* Malloch. (1 sp.) y un género indeterminado que podría ser uno de varios no descritos de América Central (Grimaldi com. pers. 2023). De la familia Drosophilidae se identificaron al menos cinco especies del género *Drosophila* (Fig. 9, Cuadro 3). Se logró amplificar la región COI para nueve de las trece moscas secuenciadas; no se logró amplificar para *Poecilominettia* sp.2 ni para el espécimen perteneciente a un género indeterminado de Lauxaniidae, por lo que no se incluyeron en el análisis.

Las tres especies identificadas de *Poecilominettia* y *Xenochaetina* coinciden con los morfotipos de polinizadores efectivos identificados en campo. *Poecilominettia* sp.1 son moscas mayormente café con rayas longitudinales en la sección dorsal del tórax y manchas oscuras en el abdomen (Fig. 9), similar al *morfo1* (Fig. 5A–D). *Poecilominettia* sp.2 son moscas de color blanco o amarillento, con un patrón de puntos negros muy evidentes en el abdomen (Fig. 9), similar al *morfo2* (Fig. 5E–H, 6). *Xenochaetina* sp.1 es la más grande y robusta de las tres especies, con el cuerpo predominantemente de color negro, sin rayas o puntos distinguibles (Fig. 9), que coincide con el *morfo3* (Fig. 5I–L, 7–8). Los especímenes de ambas especies de *Poecilominettia* fueron hembras. En *Xenochaetina* sp.1 dos especímenes fueron machos. A un tercer espécimen no se le identificó el sexo, mientras que una mosca documentada *in situ* con polinario fue hembra (Fig. 8A–D). Por lo tanto ambos sexos

remueven polinarios. En *Drosophila* dos especímenes fueron machos y otros dos especímenes fueron hembras. Al quinto espécimen no se le logró identificar el sexo (Cuadro 3).

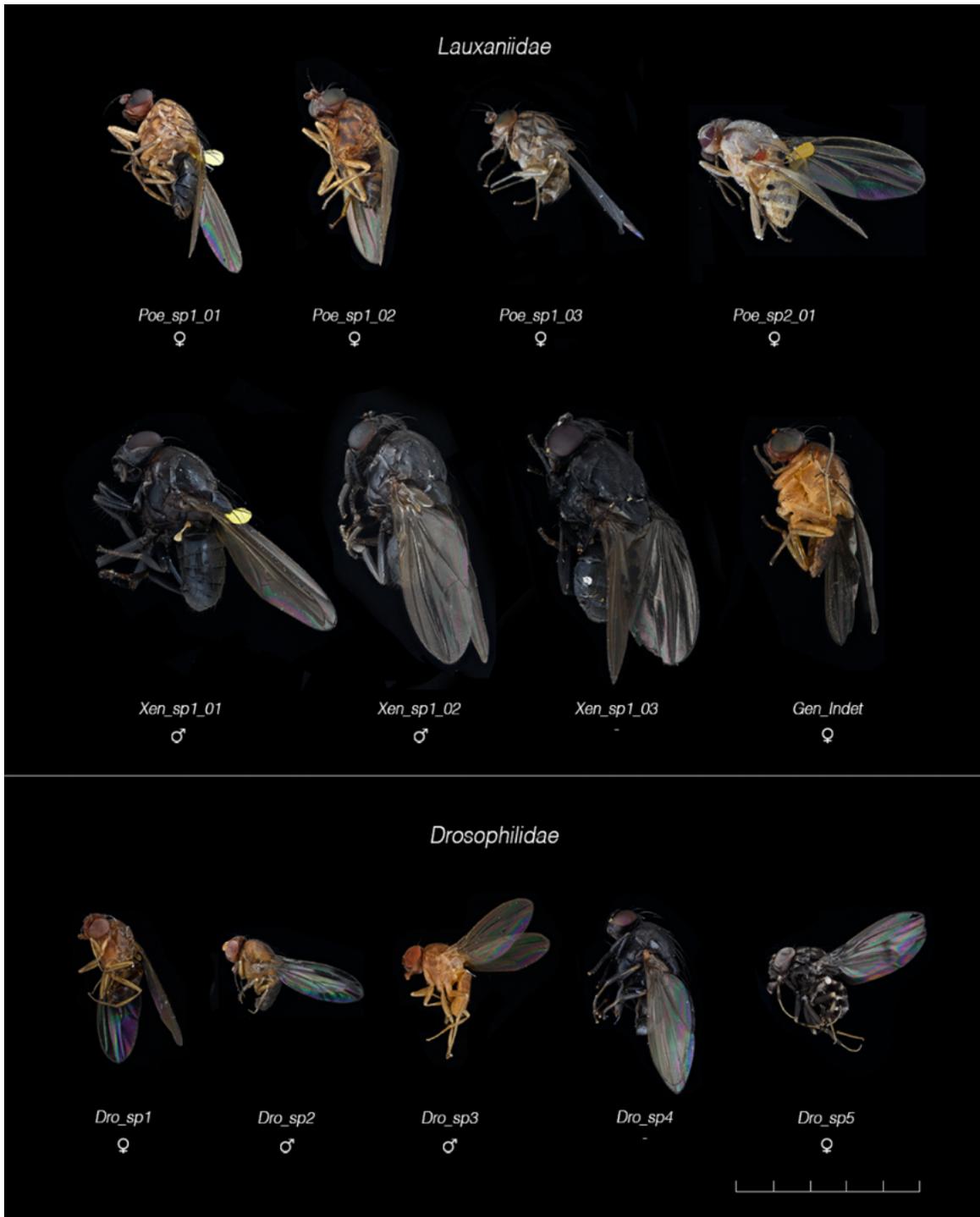


FIGURA 9. Dípteros (machos y hembras) de las familias Lauxaniidae y Drosophilidae que visitan y polinizan *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Poe = *Poecilominettia* (2 especies, 4 individuos). Xen = *Xenochaetina* (1 sp, 3 individuos). Gen_Indet = Género indeterminado. Dro = *Drosophila* (5 spp). Escala = 5 mm.

CUADRO 3. Determinación taxonómica y sexo de las moscas visitantes y polinizadoras de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) en la Reserva Biológica Bosque de Paz. El análisis de similitud se realizó comparando las secuencias del gen COI generadas en este estudio con las secuencias de referencia depositadas en NCBI (2023).

Código*	Familia	Sexo	ID morfológica	NCBI (1e hit)	NCBI (1e hit) % Identidad (% Cobertura)
Gen_Indet	Lauxaniidae	♀	Género Indet.	-	-
Poe_sp1_01	Lauxaniidae	♀	<i>Poecilominettia</i> sp.1	<i>Limosiniinae</i> sp.	91.03% (100%)
Poe_sp1_02	Lauxaniidae	♀	<i>Poecilominettia</i> sp.1	<i>Limosiniinae</i> sp.	91.03% (100%)
Poe_sp1_03	Lauxaniidae	♀	<i>Poecilominettia</i> sp.1	<i>Rachispoda</i> sp.	91.19% (100%)
Poe_sp2	Lauxaniidae	♀	<i>Poecilominettia</i> sp.2	-	-
Xen_sp1_01	Lauxaniidae	♂	<i>Xenochaetina</i> sp.1	<i>Lauxaniidae</i> sp. <i>Rachispoda</i> sp.	89.51% (100%)
Xen_sp1_02	Lauxaniidae	♂	<i>Xenochaetina</i> sp.1	<i>Rachispoda</i> sp.	88.60% (100%)
Xen_sp1_03	Lauxaniidae	-	<i>Xenochaetina</i> sp.1	-	-
Dro_sp1	Drosophilidae	♀	<i>Drosophila</i> sp. 1	<i>Drosophila falleni</i>	91.31% (99%)
Dro_sp2	Drosophilidae	♂	<i>Drosophila</i> sp. 2	<i>Drosophila flavopilosa</i> <i>Drosophila cordeiroi</i>	92.07% (97%)
Dro_sp3	Drosophilidae	♂	<i>Drosophila</i> sp. 3	<i>Drosophila leonis</i>	89.36% (100%)
Dro_sp4	Drosophilidae	-	<i>Drosophila</i> sp. 4	-	-
Dro_sp5	Drosophilidae	♀	<i>Drosophila</i> sp. 5	<i>Leucophenga shillongensis</i> <i>Leucophenga mejerei</i>	90.12% (100%)

*Asociado al código asignado en la Fig. 9.

En el análisis filogenético (Fig. 10) se incluyeron las nueve secuencias del gen COI generadas a partir de moscas visitantes de *Masdevallia striatella* y las tres secuencias generadas de moscas del género *Drosophila* que visitan y/o polinizan especies relacionadas a *M. striatella* (*M. calura*, *M. picturata* y *Diodonopsis erinacea*). Las familias Lauxaniidae y Drosophilidae se separan en dos clados bien definidos (PP = 1). En Lauxaniidae, los géneros *Poecilominettia* y *Xenochaetina* también se separan en dos clados con claras diferencias genéticas (PP = 1). Tanto el análisis genético como el morfológico distinguen siete especies de *Drosophila* cercanamente relacionadas que visitan especies de orquídeas cercanamente relacionadas también (*Diodonopsis erinacea*, *M. calura*, *M. picturata* y *M. striatella*).

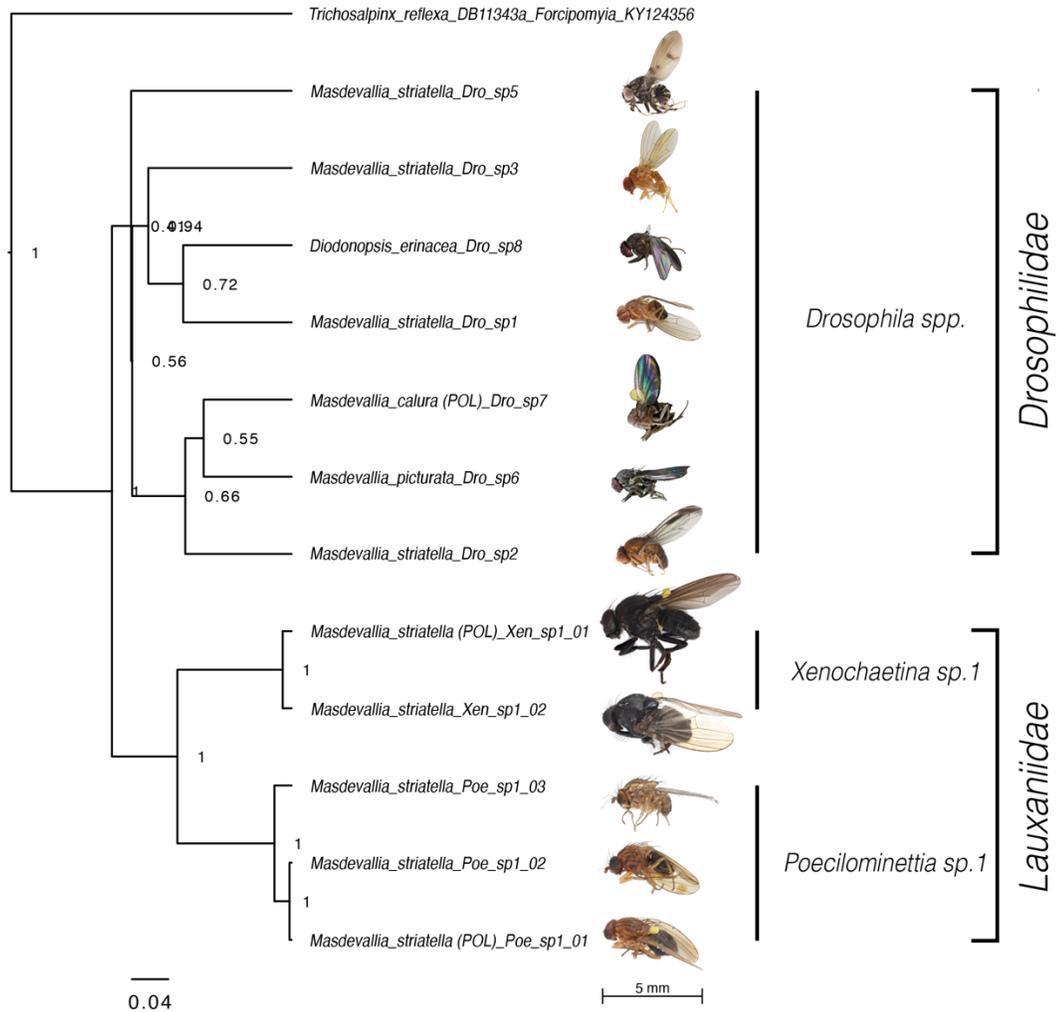


FIGURA 10. Relaciones filogenéticas entre las moscas de las familias Drosophilidae y Lauxaniidae que visitan y polinizan *Masdevallia striatella* y otras especies relacionadas (*M. calura*, *M. picturata* y *Diodonopsis erinacea*). Los árboles se produjeron mediante el análisis del conjunto de datos COI utilizando BEAST v1.6.0. y el polinizador (Nematocera: Ceratopogonidae: *Forcipomyia*) de *Trichosalpinx reflexa* como grupo externo. Generado por A.P.Karremans utilizando FigTree v.1.3.1 y editado por N.Belfort-Oconitrillo utilizando Adobe Photoshop.

Descripción morfológica y anatómica del perianto.— Las flores de *Masdevallia striatella* tienen un indumento heterótrico, es decir, tienen glándulas de diferentes tipos cuyo contenido varía entre proteínas, cuerpos lipofílicos, polisacáridos insolubles y azúcares simples (Cuadro 4). La diversidad de glándulas incluye papilas unicelulares y tricomas glandulares de diferentes morfologías, así como estomas (Fig. 11–19).

CUADRO 4. Diversidad, histoquímica y posible función de las glándulas y los estomas del perianto de *Masdevallia striatella* (Orchidaceae: Pleurothallidinae).

Se indican las reacciones (+ y -) de las tinciones aplicadas con Rojo Neutro (NR), Ácido peryódico-Schiff (PAS), Azul de Coomassie (CBB), Sudan Black B (SBB) y Sudán IV (SIV).

Tipo de glándula	Morfología	Posición	NR (actividad metabólica)	PAS (polisacáridos insolubles)	CBB (proteínas)	SBB o SIV (lípidos)	Posible función
Papilas cónicas	Unicelulares, ápice puntiagudo o redondeado	Sépalo, adaxial, base-medio	+	-	+	-	Osmóforos
Papilas con forma de domo	Unicelulares, forma de domo o cúpula, diámetro > que papilas, a menudo colapsadas	Sépalo, adaxial, base-medio	+	?	+	+	Elaióforos/Osmóforos
Tricomas glandulares pedunculados	Tricomas multicelulares formados de una cabeza globular multicelular y un tallo de 1-2 células	Sépalo, abaxial, embebidos en la epidermis	+	+	+	-	Protección, lubricación, osmóforos
		Pared externa e invaginaciones del ovario	?	?	?	?	Protección, lubricación, osmóforos
Tricomas glandulares de 2 células	Célula oblonga grande subtendida por una célula basal pequeña y cóncava	Pétalos, adaxial, base	?	?	-	+	?
Papilas semiplanadas	Células alargadas, semiplanadas, el extremo apical sobresaliente en una papila corta	Lámina del labelo, porción basal central	+	-	-	-	Nectario
Papilas con forma de dedo	Papilas cónicas densamente agrupadas	Callo del ápice	+	?	+	-	
Estomas	Un poro, dos células oclusivas, 5-6 células subsidiarias	Cola sepalina, adaxial y abaxial	+	+	?	+	Osmóforos
		Pétalos, abaxial					

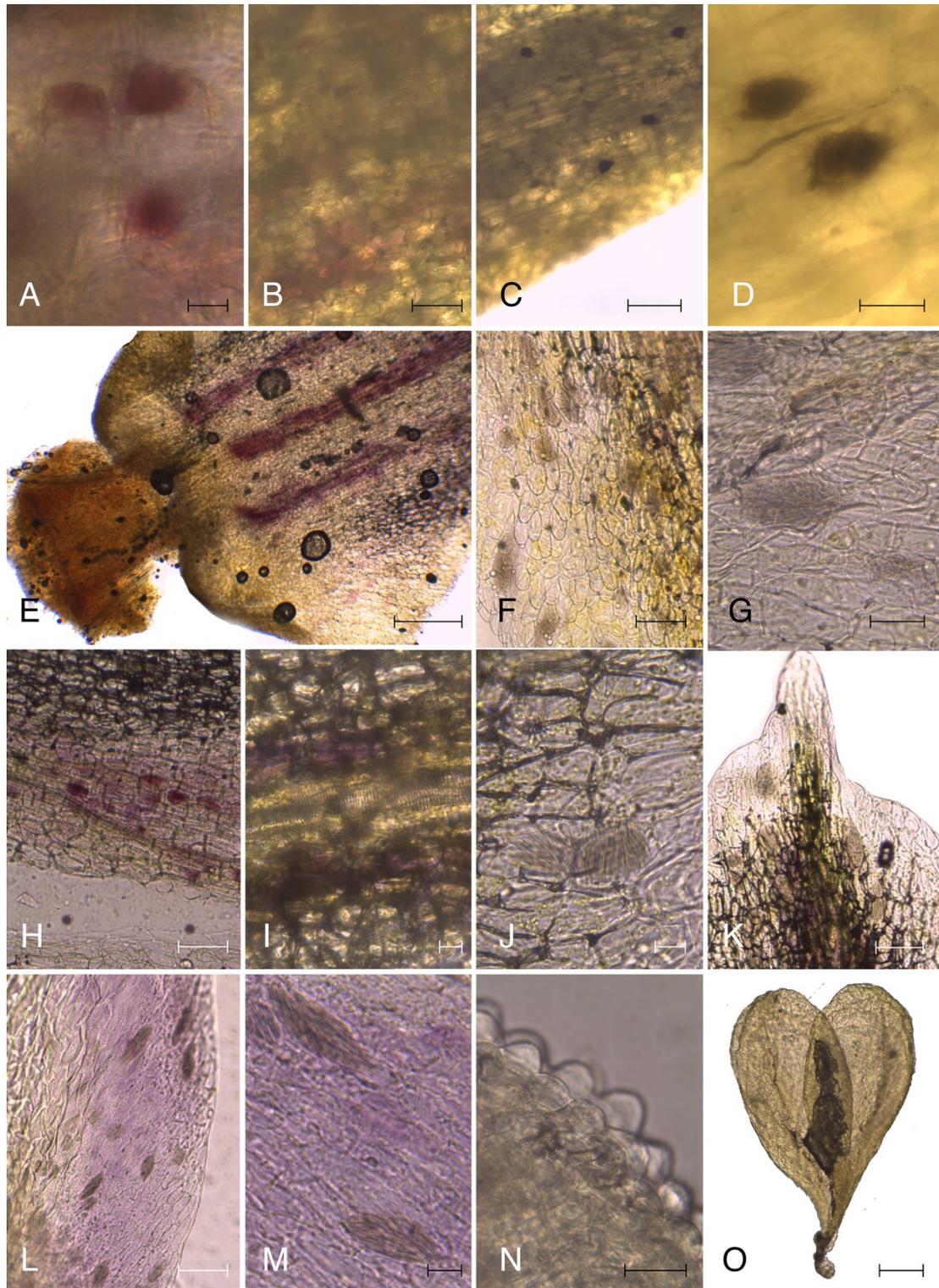


FIGURA 11. Pigmentación natural de los sépalos (A–D), labelo (E–G), pétalos (H–K) y columna (L–O) de *Masdevallia striatella*. **A.** Venas sepalinas. **B.** Cola sepalina, superficie adaxial. **C–D.** Detalle las colas sepalinas, superficie abaxial. **E.** Base del labelo. **F.** Callo del ápice del labelo, cerca del margen. **G.** Contenidos celulares no identificados en el ápice del labelo. **H–I.** Vena del pétalo. **J.** Rafidios en el margen del pétalo. **K.** Ápice del pétalo. **L–M.** Coloración morada y rafidios en el margen de la columna. **N.** Detalle del margen de la antera. **O.** Polinario. Escalas = 20 μm (A, I, J, L, M), 50 μm (D, G, N), 100 μm (B, F, H, K), 200 μm (C, O), 500 μm (E).

SÉPALOS. El patrón de coloración de los sépalos consiste en una matriz blancuzca con venas moradas y colas sepalinas de color verde-amarillento que contrastan con la venación morada de la superficie adaxial (Fig. 11B) y los puntos oscuros de la superficie abaxial (Fig. 11C–D), además de presentar un color amarillo más claro en la base de los sépalos. Hay presencia de diferentes glándulas en el haz (superficie adaxial) y el envés (superficie abaxial) de los sépalos (Fig. 12–14). En la superficie adaxial predominan los tricomas unicelulares no glandulares con forma de papilas cónicas, cuyo ápice puede ser agudo u obtuso (Fig. 12B, 4D). Estas reaccionan positivamente a las tinciones con NR+ y CBB+ (12E–F), lo que sugiere que son células vivas con actividad metabólica y contenido proteico, siendo frecuente la acumulación de secreciones alrededor (Fig. 12D). Las vesículas con forma de domo son menos abundantes que las papilas cónicas (Fig. 12B), pero están presentes desde la base del sépalo donde es frecuente observarlas colapsadas (Fig. 12A,C), es decir, como si estallaran dejando una huella redonda y secreciones alrededor conformadas por proteínas CBB+ y cuerpos lipofílicos SBB+ (Fig. 12G–H). Tanto las papilas como los domos son abundantes en la porción fusionada de los sépalos, pero se diluyen distalmente hasta desaparecer en la sección estrecha donde se diferencia la cola sepalina (porción apical libre) (Fig. 14A).

La superficie abaxial de los sépalos, por otra parte, se caracteriza por la presencia de unas estructuras que se pueden apreciar a simple vista como puntos negros en las flores (Fig. 11C–D). Mediante imágenes de MEB se evidencia su estructura tridimensional, su posición sobre una clara depresión de la epidermis y la presencia de secreciones que forman una matriz reticular extensa alrededor (Fig. 13A–C). Los cortes histológicos permiten describirlos como tricomas glandulares con un tallo estrecho de 1–2 células y una cabeza globular compleja (Fig. 13F–H). La densa tinción NR+ en tejido fresco (Fig. 13D) y la textura granular de la cabeza observada en los cortes histológicos sugieren que ésta es multicelular, conformada por células pequeñas densamente agrupadas. Estas glándulas reaccionan CBB+, lo que sugiere que son ricas en proteínas. La reacción PAS+ puede ser reflejo de que las células están secretando polisacáridos mucilaginosos que sufrieron deshidratación durante el procesamiento para MEB, o puede deberse a que las células de la cabeza globular son muy pequeñas y tienen una alta proporción de pared celular a citoplasma.

En la porción donde comienza a diferenciarse la cola sepalina (Fig. 14A) aparecen estomas en ambas superficies, siendo más abundantes en el envés. Están conformados por un ostiolo, dos células oclusivas y 5–6 células subsidiarias. Las células oclusivas están llenas de cuerpos PAS+ con un claro espacio aéreo intercelular subyacente y células del parénquima que presentan estos cuerpos PAS+ más grandes (Fig. 14F–G). Las células oclusivas también reaccionan SBB+ lo que indica que tienen una cutícula gruesa y presencia de ceras.

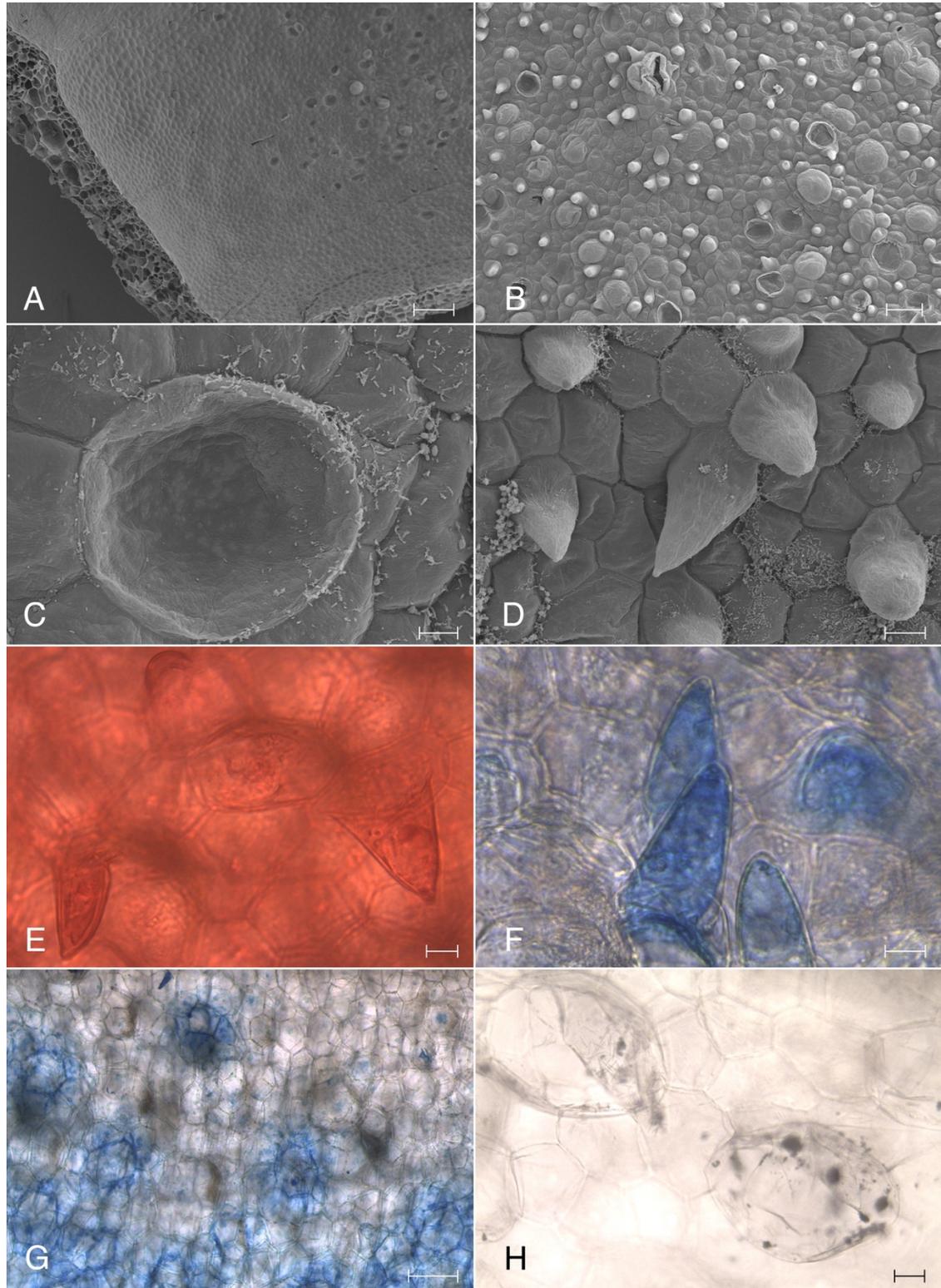


FIGURA 12. Sépalos de *Masdevallia striatella* con vesículas en forma de domo (A–C, G–H) y papilas unicelulares cónicas (B, D–F) en el indumento adaxial. A–B. Distribución y proporción basal (A) y media (B) de las vesículas y papilas. C–D. Detalle de las glándulas y sus secreciones. E–F. Tinciones en tejido fresco con Rojo Neutro (E), Coomassie Brilliant Blue (F–G) y Sudan Black B (H). Escalas = 10 μm (C), 20 μm (D, E, F, H), 100 μm (B, G), 200 μm (A).

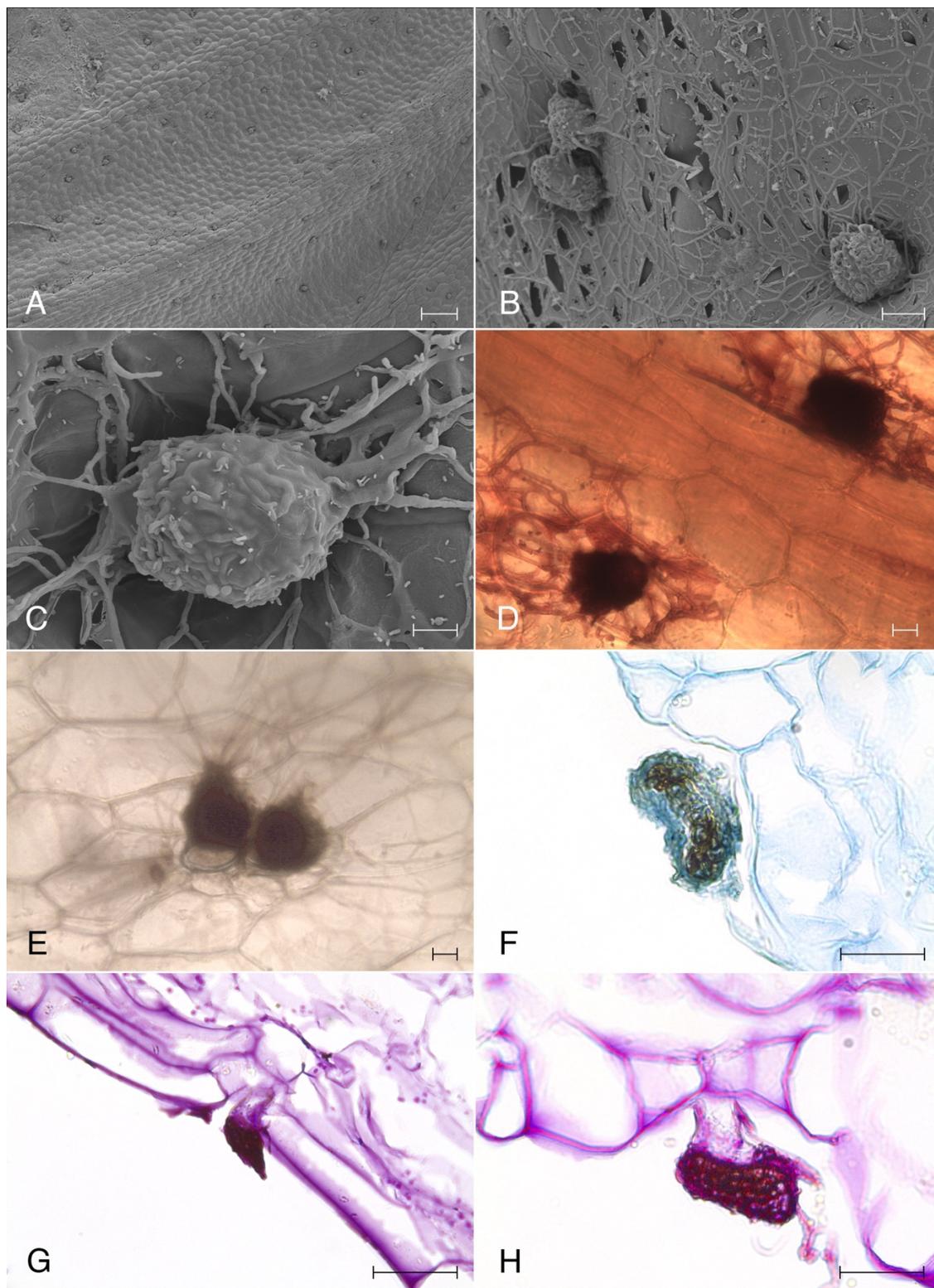


FIGURA 13. Sépalos de *Masdevallia striatella* con tricomas glandulares multicelulares pedunculados en el indumento abaxial. A. Distribución de las glándulas. B–C. Detalle de la morfología de las glándulas y las secreciones. D–E. Tinciones en tejido fresco con Rojo Neutro (D) y Sudán Black B (E). F–H. Tinciones en tejido parafinado con Coomassie Brilliant Blue (F) y Ácido Peryódico-Schiff (G–H). Escalas = 10 μm (C), 20 μm (D, E, F, G, H), 30 μm (B), 300 μm (A).

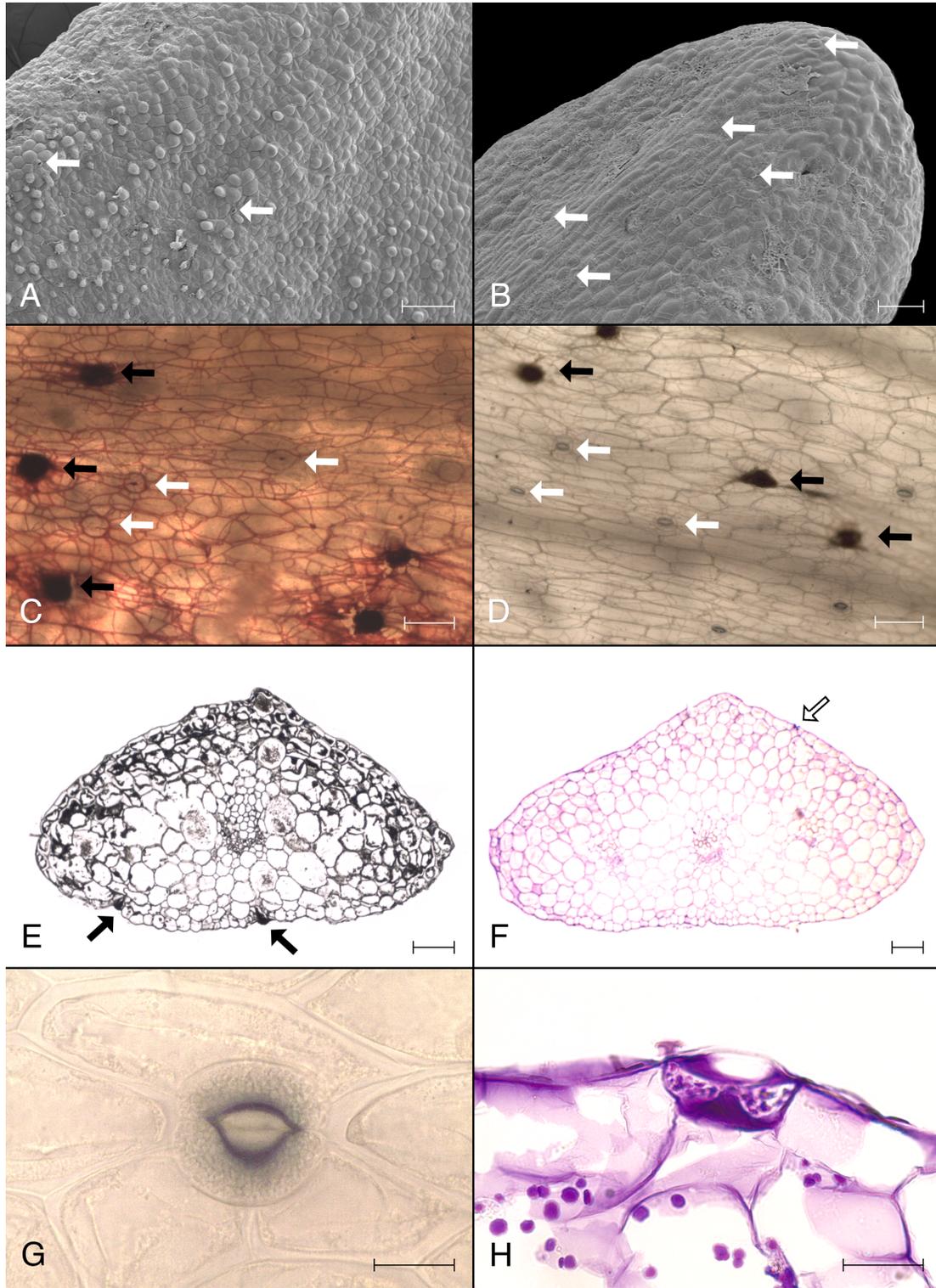


FIGURA 14. Cola sepalina de *Masdevallia striatella* documentada con Microscopía Electrónica de Barrido (A–B) y Microscopía de Luz (C–H). A. Superficie adaxial, mostrando la porción estrecha donde se diferencia la cola sepalina, se disminuye la proporción de las papilas y aparecen estomas (flechas blancas). B–D. Superficie abaxial, mostrando la proporción de tricomas glandulares multicelulares pedunculados (flechas negras) y los estomas (flechas blancas). E–F. Corte transversal, superficie adaxial arriba. Tinciones: Rojo Neutro (C), Sudán Black B (D, G), Coomassie Brilliant Blue (E), Ácido Peryódico-Schiff (F, H). Escalas = 20 μm (G, H), 100 μm (B, C, D, E, F), 200 μm (A).

PÉTALOS. La coloración de los pétalos es predominantemente blanca con una sola vena central de color morado junto con algunas secciones de color amarillo más claro en las venas y el ápice de los pétalos (Fig. 11I–L). La presencia de rafidios es abundante en los márgenes de los pétalos (Fig. 11K–L) y también hay células con un contenido de color café no identificado (Fig. 11G–H). La epidermis de los pétalos consiste en una matriz celular ordenada y uniforme, con células casi geométricas de 5–7 aristas (Fig. 15D–E). En la superficie abaxial cercana al ápice se encontraron estomas que reaccionan SBB+ (Fig. 15C, 8G–H), indicativo de la presencia de una cutícula gruesa y de ceras. En tejido fresco se notaron además otro tipo de glándulas tipo coléteres de dos células, una basal, redonda y cóncava, y otra oblonga por encima. Estas reaccionan SBB+ y CBB-, indicativo de la presencia de sustancias lipofílicas y la ausencia de proteínas, respectivamente (Fig. 16C–F).

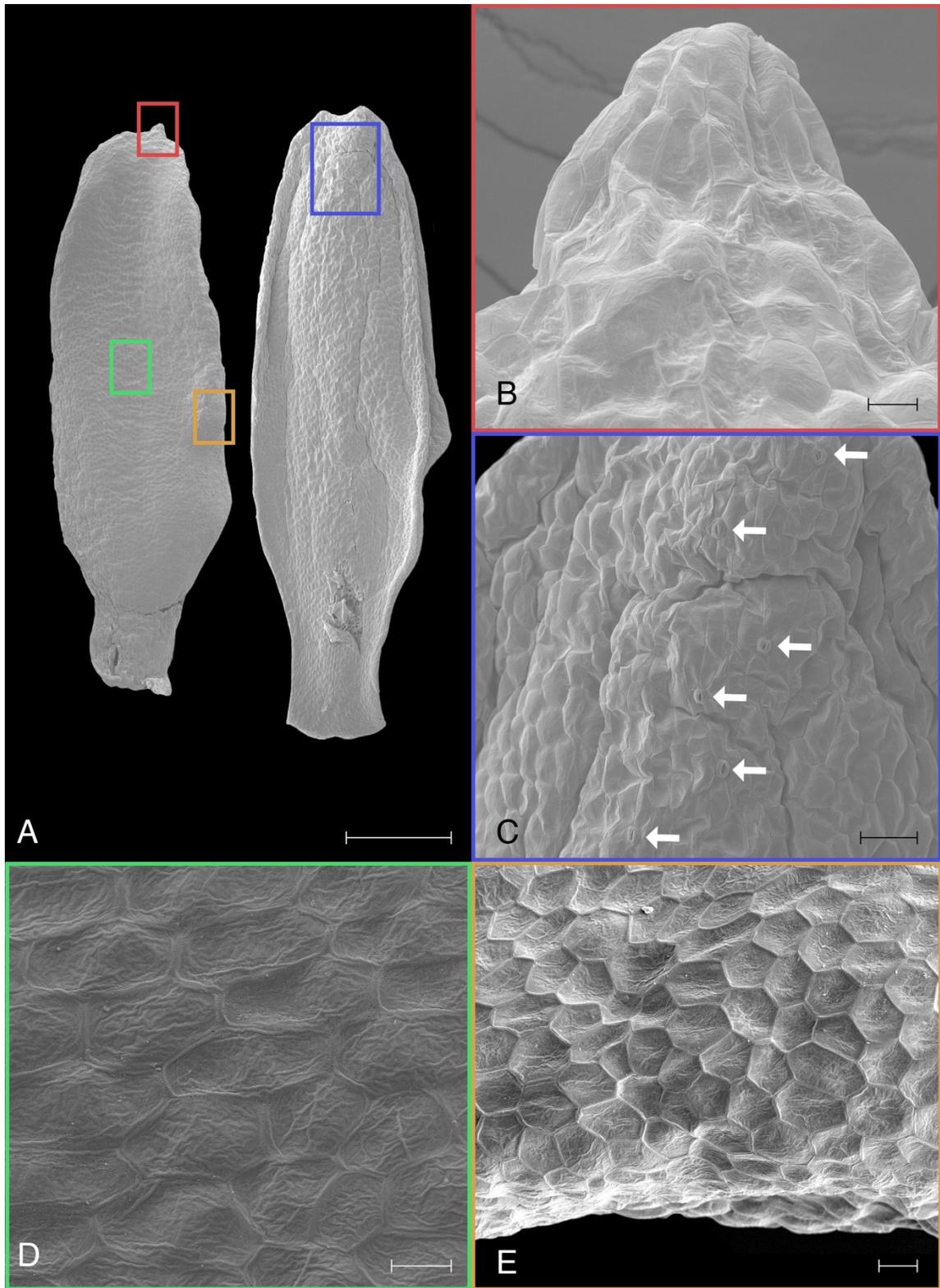


FIGURA 15. Pétalos de *Masdevallia striatella* documentados con Microscopía Electrónica de Barrido. A. Superficie adaxial y abaxial, respectivamente. B. Detalle del ápice. C. Estomas (flechas blancas) presentes en la superficie abaxial cerca del ápice. D–E. Estructura celular ordenada y geométrica de las células. Escalas = 20 μm (B), 30 μm (D, E), 100 μm (C), 1 mm (A).

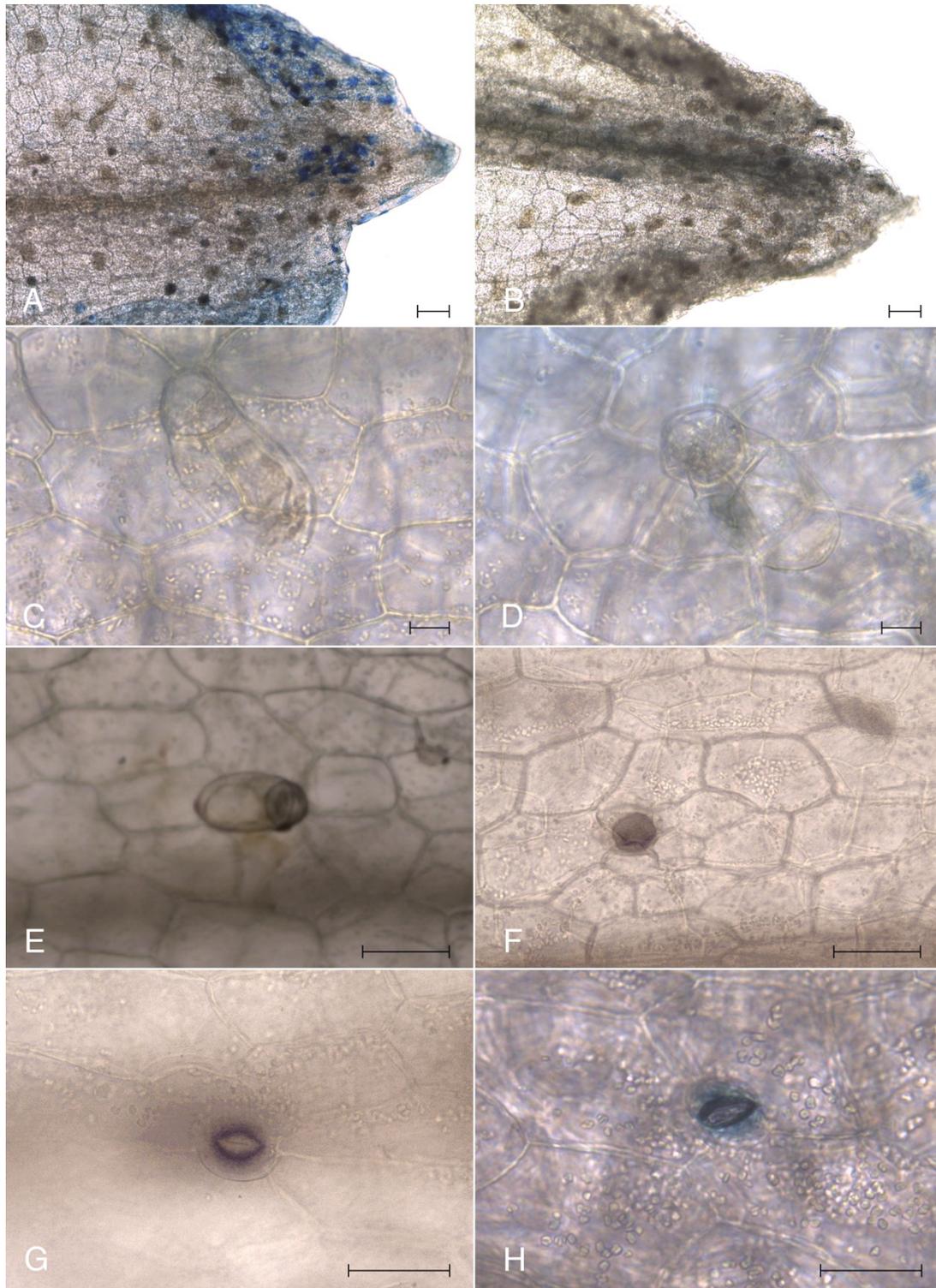


FIGURA 16. Pétalos de *Masdevallia striatella* teñidos con Coomassie Brilliant Blue (A, C–D, F) y Sudan Black B (B, E, G, H) para Microscopía de Luz. **A–B.** Ápice, CBB+ indicativo de la presencia de proteínas (A) y SBB– indicativo de la ausencia de cuerpos lipofílicos (B). **C–E.** Tricomas de dos células encontrados en la base de la superficie adaxial, CBB– indicativo de la ausencia de proteínas (C–D) y SBB+ indicativo de la presencia de cuerpos lipofílicos (E). **F.** Detalle de la célula basal de un tricoma de dos células, visto desde la superficie abaxial y célula con contenido grisáceo no identificado. **G–H.** Estomas de la superficie abaxial SBB+. Escalas = 20 μm (C, D), 50 μm (E, F, G, H), 100 μm (A, B).

LABELO. El labelo presenta mayores acumulaciones de pigmentación morada que lo hace más oscuro que los sépalos (Fig. 1E), además de presentar un color amarillo intenso distribuido en las cavidades basales (Fig. 11E, 15) y callo del ápice (Fig. 11G, 15), y al igual que los pétalos, presenta células con un contenido de color café no identificado (Fig. 11G–H). La porción basal del labelo (Fig. 9–10) se caracteriza por la presencia de dos cavidades cóncavas pronunciadas en la que se observan pequeñas vesículas epidérmicas sésiles (Fig. 17A–B). En la porción central de la lámina aparece un conjunto de células epidérmicas alargadas y semiaplanadas cuyo extremo apical sobresale formando una papila cónica (Fig. 17C–E). Están distribuidas solo en el centro de la lámina, no en los márgenes, desapareciendo a la altura de los pliegues marginales (Fig. 17A). En esta porción central se produce un exudado tipo gotículas líquidas transparentes y con sabor dulce (Fig. 1E, 15). La tinción CBB+ muestra la presencia de núcleos bien definidos en las células parenquimáticas subyacentes (Fig. 18C). Por otra parte, el ápice del labelo se caracteriza por la presencia de un callo de color amarillo (Fig. 15, 17A,G, 18A) conformado por células papilares con forma de dedo, densamente agrupadas, y CBB+, lo que indica que son ricas en proteínas, incluyendo el tejido parenquimático subyacente (Fig. 18E–F). La tinción con PAS+ únicamente demarca la pared celular en las células del labelo, sin evidencia de la secreción de polisacáridos o mucílagos (Fig. 18D,G).

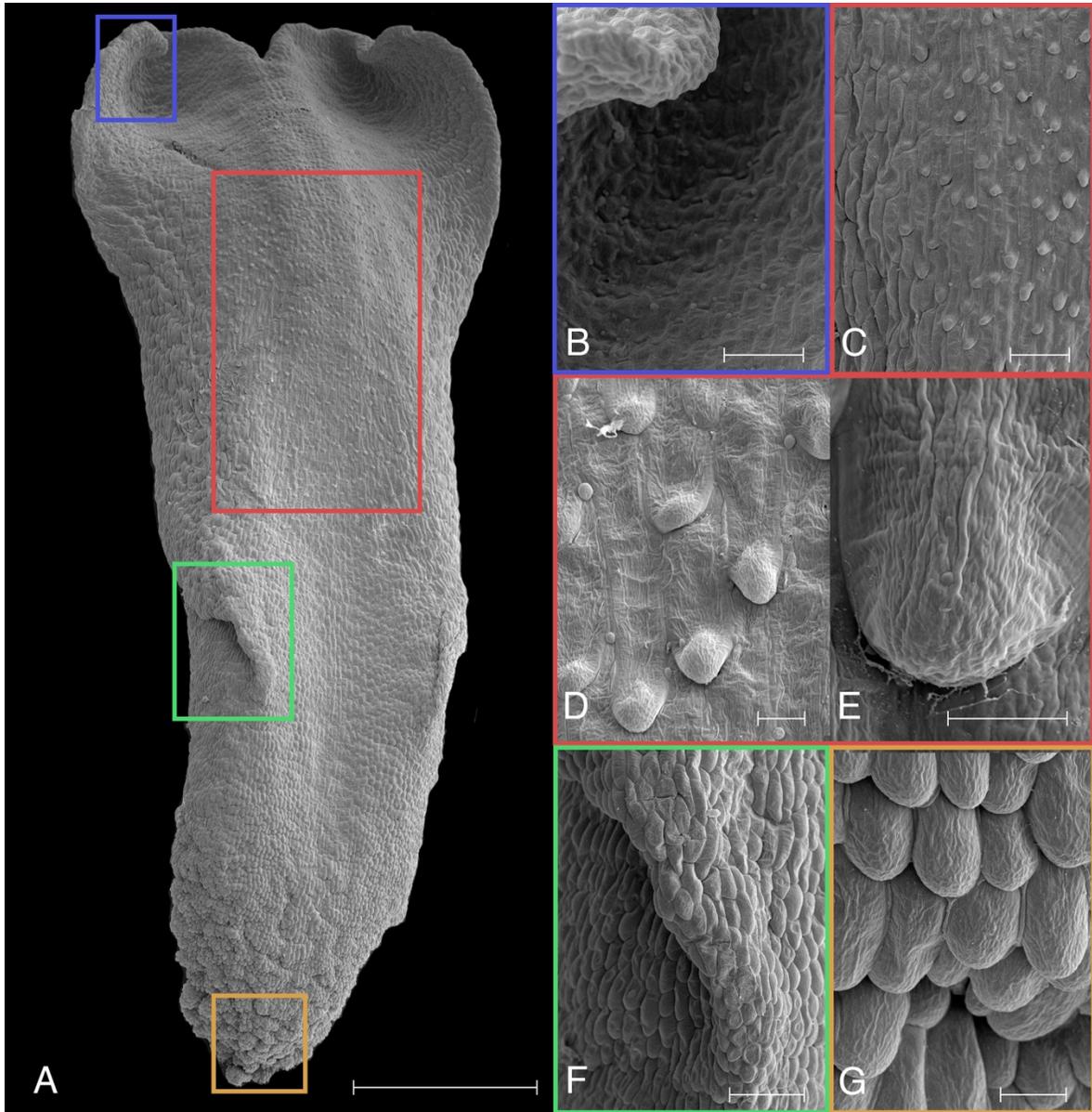


FIGURA 17. Labelo de *Masdevallia striatella* documentado con Microscopía Electrónica de Barrido. **A.** Superficie adaxial (base arriba, ápice abajo). **B.** Detalle de los lóbulos basales. **C.** Nectario del tipo papilar unicelular en la porción central de la lámina. **D–E.** Detalle de las papilas secretoras de néctar. **F.** Detalle del pliegue marginal. **G.** Detalle del callo del ápice con papilas en forma de dedo densamente agrupadas. Escalas = 10 μm (E), 20 μm (D, G), 100 μm (B, C, F), 1 mm (A).

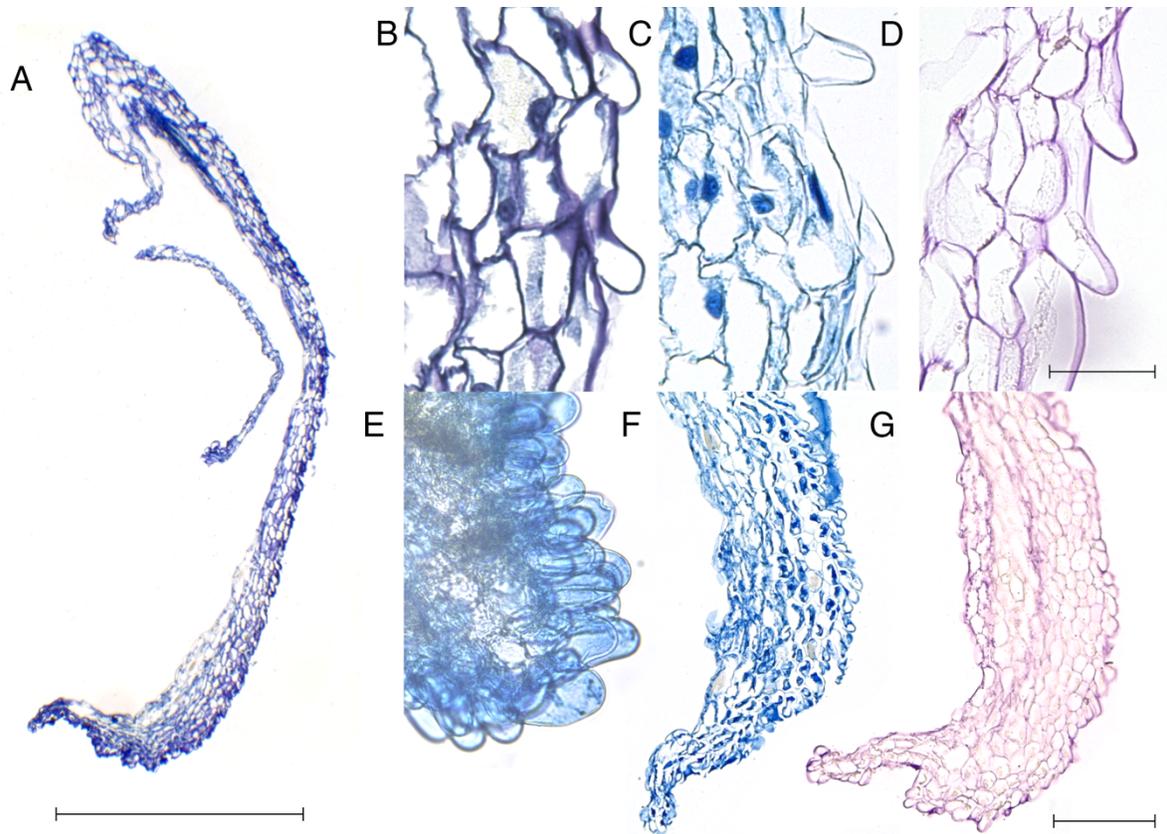


FIGURA 18. Labelo de *Masdevallia striatella* teñido con Azul de Toluidina TBO (A–B), Coomassie Brilliant Blue CBB (C, E–F) y Ácido Peryódico-Schiff PAS (D, G) para Microscopía de Luz. A. Vista completa del labelo (base arriba, ápice abajo). B–D. Nectario. E–G. Callo del ápice. Todas las imágenes orientadas con la superficie adaxial hacia el lado derecho. Escalas = 50 µm (B, C, D), 200 µm (F, G), 1 mm (A).

COLUMNA Y OVARIO. La columna es predominantemente blanca con el margen morado, es gruesa y arqueada, con una base prolongada a la que se une el labelo articulado. La presencia de rafidios es abundante en los márgenes de la columna (Fig. 11L–M). El margen apical es irregular, algo dentado (Fig. 19A) y el rostelo es prominente similar a una lengua ancha con un patrón ordenado de células entrelazadas longitudinalmente en forma de laminillas (Fig. 19B), el cual tiñe completamente de azul oscuro con SBB+ (Fig. 19G), confirmando la presencia de sustancias lipofílicas en el viscario. La antera es incumbente con dos polinios obovados conectados por caudículas granulares elásticas que no contienen sustancias lipofílicas, pero sí proteínas (Fig. 19C–F). En los márgenes de la columna es frecuente observar la presencia de rafidios y las células tienen un núcleo bien definido (Fig. 19H). En el ovario se encontraron unos tricomas glandulares similares a los presentes en el envés de los sépalos. Aunque no se documentaron adecuadamente con MEB, los cortes histológicos muestran los tricomas tanto en la pared externa como en las invaginaciones del ovario y tiñen PAS+ (Fig. 19I–K).

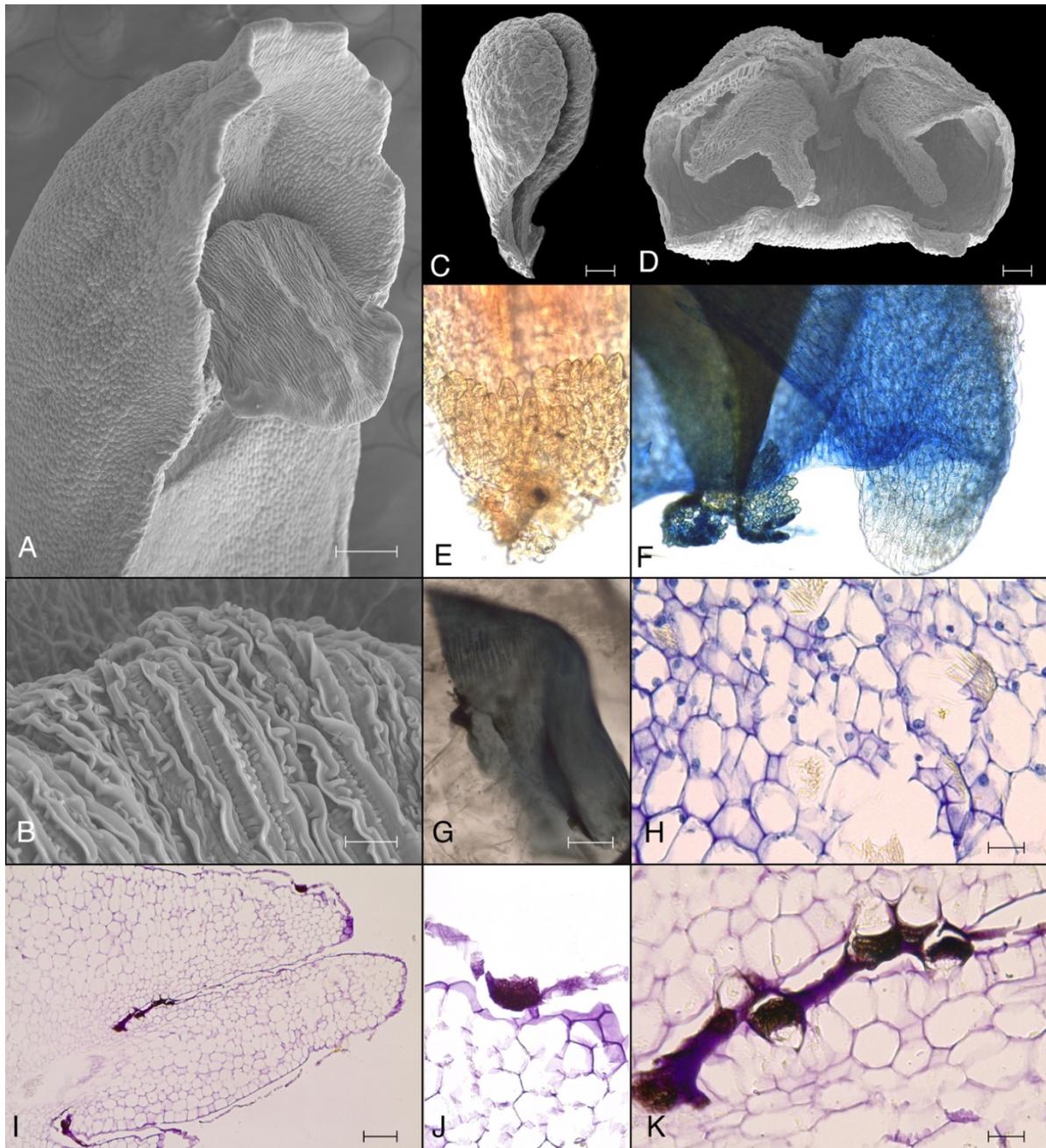


FIGURA 19. Morfoanatomía de la columna (A–H) y el ovario (I–K) de *Masdevallia striatella* documentada con Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía de Luz. Tinciones: Sudán IV (SIV), Coomassie Brilliant Blue (CBB), Sudán Black B (SBB), Azul de Toluidina (TBO) y Ácido Peryódico-Schiff (PAS). **A.** Ápice de la columna. **B.** Detalle del rostelo. **C.** Polinario. **D.** Capa de la antera. **E.** Detalle de la caudícula SIV– (ausencia de lípidos). **F.** Detalle de la antera CBB+ (presencia de proteínas). **G.** Rostelo SBB+ (presencia de lípidos) **H.** Células con núcleo bien definido y presencia de rafidios en el margen de la columna. **I–K.** Ovario, con detalle de los tricomas glandulares multicelulares pedunculados PAS+ en la pared externa (J) e invaginaciones (K). Escalas = 20 μm (B, H, K), 100 μm (C, D, G, I), 200 μm (A).

Caracterización de gotículas secretadas en el labelo.— Dos de los cuatro extractos analizados resultaron positivos para la presencia de azúcares simples en el labelo de *Masdevallia striatella* (Cuadro 5). Los extractos donde no hubo detección de azúcares fueron los que incluyeron menor cantidad de labelos por muestra ($n < 4$). En los dos extractos positivos se detectó la presencia de glucosa y fructosa, siendo la glucosa la de mayor concentración (20.25–28.50 mg/100 mL por labelo). No se detectó presencia de sacarosa en ninguna de las muestras (Cuadro 5).

CUADRO 5. Detección de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) en cuatro extractos de *Masdevallia striatella* aplicando un volumen de inyección de 20 μ L. ND = no detectable (< 30 mg/100 mL).

Extracto ID	No. labelos	Azúcar	Concentración (mg/100 mL)
MS1	6	Fructosa	81 \pm 11
		Glucosa	171 \pm 27
		Sacarosa	ND
MS2	1	Fructosa	ND
		Glucosa	ND
		Sacarosa	ND
MS3	4	Fructosa	33.6 \pm 4.7
		Glucosa	81 \pm 13
		Sacarosa	ND
MS4	3	Fructosa	ND
		Glucosa	ND
		Sacarosa	ND

Sistema e indicadores de éxito reproductivo.— Se manipularon 148 flores de *Masdevallia striatella*, de las cuales 50 produjeron frutos y 95 no produjeron frutos. Sólo tres de las flores marcadas se perdieron sin lograr determinar si se formó el fruto. Las flores abortaron en un promedio de 46 días, pero sin manipulación y sin visitación floral, la antesis puede extenderse en promedio 62 días. Los frutos llegan al punto de maduración e incluso a sus primeros estadios de abscisión en un promedio de 118 días desde la fecha de manipulación de las flores (Fig. 20).



FIGURA 20. Diferentes frutos (cápsulas) de *Masdevallia striatella* mostrando la secuencia de maduración y dispersión de semillas de los frutos. Nótese el cambio de coloración en el último estadio cuando ya se han liberado las semillas. No a la misma escala.

El número de réplicas y la producción de frutos por tratamiento se resume en el Cuadro 6. Hubo formación de frutos a partir de los tratamientos AUTm, C y EXO, con un éxito reproductivo mayor al 80% en los tratamientos EXO y AUTm, y menor al 20% en C (polinización natural) (Fig. 21), con un índice de auto-compatibilidad de 0,82. No hubo formación de frutos por AUTa (Fig. 21), por lo que se descarta que ocurra autopolinización de manera autónoma, indicativo de una dependencia de los vectores polinizadores para que ocurra. Tampoco hubo formación de frutos en el tratamiento APO (Fig. 21), por lo que se confirma que la formación de frutos en esta especie sólo es posible mediante la unión de gametos. Aparte de estos experimentos de cruzamiento, el *fruit set* natural en 16 plantas monitoreadas durante 2022 fue en promedio $6.6 \pm 13.4\%$.

CUADRO 6. Resultados de los tratamientos de polinización controlada aplicados en *Masdevallia striatella* (Pleurothallidinae), Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. Se presentan la proporción promedio (\bar{X}), desviación estándar (DE), error estándar (EE) y número de réplicas (N) para los tratamientos de polinización aplicados. APO = Apomixis. AUTa = Autopolinización autónoma. C = Control (polinización natural). EXO = Exocruzamiento. AUTm = Autopolinización manual.

Tratamiento	\bar{X}	DE	EE	N
APO	0	0	0	25
AUTa	0	0	0	34
C	0.18	0.55	0.1	28
EXO	0.79	0.42	0.07	33
AUTm	0.82	0.39	0.07	28

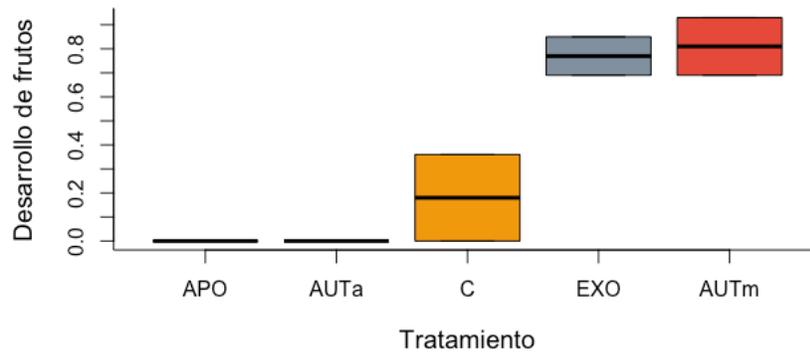


FIGURA 21. Proporción de frutos de *Masdevallia striatella* (Pleurothallidinae) desarrollados según el tratamiento de polinización aplicado en la Reserva Biológica Bosque de Paz, Costa Rica. APO = Apomixis. AUTa = Autopolinización autónoma. C = Control (polinización natural). EXO = Exocruzamiento. AUTm = Autopolinización manual.

Se colectaron siete frutos producidos por EXO y siete frutos producidos por AUTm, de los cuales abrieron y se colectaron las semillas de seis y cinco, respectivamente. No se colectaron frutos maduros producidos por polinización natural. El peso fresco promedio de los frutos fue de 0.13 g y de cada uno se tomó una muestra promedio de 0.0024 g de semillas para la evaluación de la viabilidad con Tz (Fig. 22). La proporción de semillas viables no sigue una distribución normal ($W = 0.78048$, $p = 0.00521$). La viabilidad de las semillas fue en promedio $60 \pm 37\%$ en AUTm y $73 \pm 34\%$ en EXO, sin diferencias significativas de la viabilidad de las semillas entre estos tratamientos ($W=13$, $p=0.79$). Sin embargo, hay una mayor variación (rango intercuartílico) en la germinación de semillas provenientes de AUTm (Fig. 23).

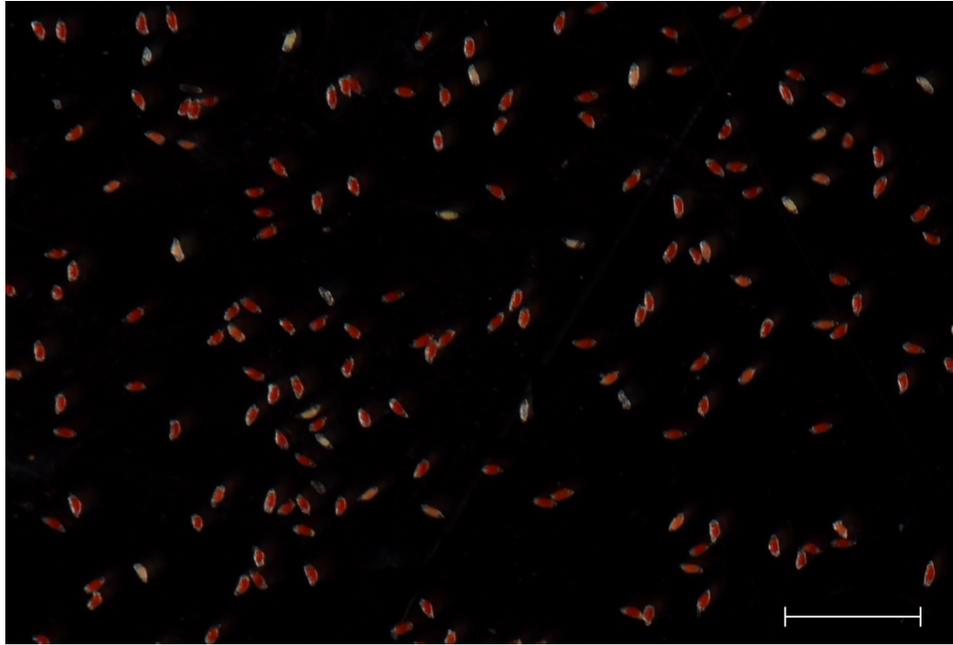


FIGURA 22. Semillas de *Masdevallia striatella* producidas por alogamia y teñidas con Tetrazolio. Las teñidas de rojo consideradas viables, las no teñidas o levemente teñidas de rosado se consideraron no viables. Escala = 1 mm.

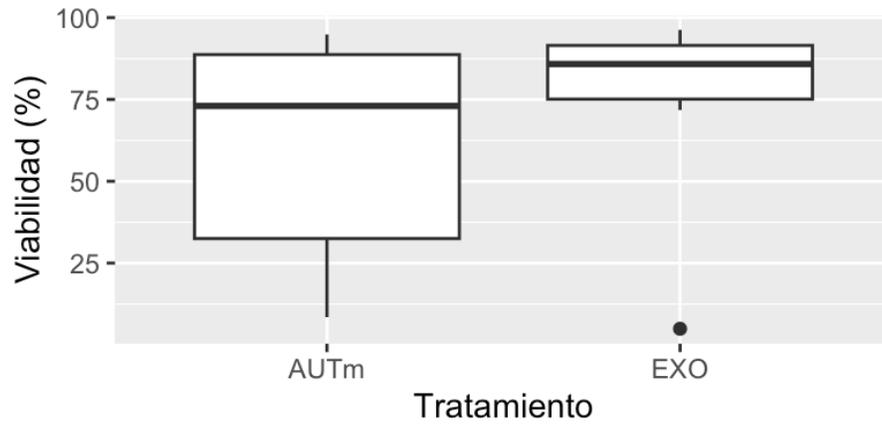


FIGURA 23. Porcentaje de viabilidad de semillas de *Masdevallia striatella* en frutos producidos por polinización cruzada (EXO) y autopolinización manual (AUTm). Se muestra la mediana (línea horizontal), el rango intercuatílico (caja) y los valores mínimo y máximo (bigotes).

VII. DISCUSIÓN

Polinizadores efectivos y potenciales.— Este estudio confirma por primera vez la efectividad de al menos tres especies de moscas de la familia Lauxaniidae (Diptera) en la remoción y deposición de polinarios de *M. striatella*. Lauxaniidae es una familia de moscas que comprende casi 200 géneros y subgéneros existentes, y más de 2100 especies válidas en todo el mundo, excepto en la Antártida (Gaimari & Silva 2020). Se estima que existen unas 500 especies de este género en Costa Rica, siendo una de las 15 familias de Diptera más abundantes en Centroamérica (Brown *et al.* 2009) y de las cuales aún hay muchas especies sin describir (Gaimari & Silva 2020). Son moscas acaliptradas de cuerpo robusto que miden entre 2–5 mm de longitud, con coloraciones variables que con frecuencia presentan manchas, puntos o franjas oscuras. El conocimiento sobre esta familia se centra en estudios sobre su taxonomía, morfología y papel ecológico de los estadios inmaduros y adultos de algunas especies conocidas (Brown *et al.* 2010, Gaimari & Silva 2020, McAlpine & Wood 1989, Semelbauer & Kozánek 2014). Las larvas se desarrollan en la hojarasca, boñigas, materia en descomposición, nidos de aves y otros lugares, donde posiblemente se alimentan de microorganismos como bacterias y hongos, hábitos por los que se infiere que desempeñan un papel importante como descomponedores (Broadhead 1989, Zumbado 2006), aunque también se han reportado algunas larvas fitófagas (Miller 1977). Los adultos frecuentan la vegetación baja en hábitats húmedos y semisombreados (McAlpine & Wood 1989). En muchas especies de varios géneros, las moscas adultas tienen labios modificados que les permiten alimentarse de hongos filoplanos, mientras otras se alimentan de sustancias líquidas (Broadhead 1984).

Entre las moscas polinizadoras de Lauxaniidae se identificaron dos especies de *Poecilominettia*, una especie de *Xenochaetina*, además de una especie de un género indeterminado considerada en este estudio como un polinizador potencial. *Poecilominettia* tiene 74 especies, con más de la mitad conocidas o descritas de Barro Colorado en Panamá, donde todas las especies coexistentes se alimentan de hongos filoplanos (Broadhead 1989). *Xenochaetina* está representado por 15 especies en la región Neotropical, con sólo dos especies (*X. flavipennis* y *X. pallida*) descritas de América Central y del Sur (Brown *et al.* 2010). En ambos géneros hay muchas especies cercanamente relacionadas aún no descritas (Broadhead 1989). Existe un limitado número de especies secuenciadas genéticamente de Lauxaniidae con las cuales comparar las secuencias genéticas generadas para este estudio. Para *Poecilominettia*, la referencia se limitada a una sola especie, *P. puncticeps*, mientras que no hay secuencias de referencia para *Xenochaetina* (NCBI 2023). El análisis de similitud genética arrojó

miembros de la familia Sphaeroceridae, incluyendo la subfamilia Limosininae y el género *Rachispoda* Lioy, el más diverso de la familia (Brown *et al.* 2010). Sphaeroceridae está relacionada filogenéticamente con Lauxaniidae, Agromyzidae, Chloropidae y Drosophilidae (Lambkin *et al.* 2013).

Se han registrado moscas Lauxaniidae visitando flores en especies de Apocynaceae (*Cynanchum*), Celastraceae, Dipterocarpaceae, Euphorbiaceae (*Croton*), Hamamelidaceae (*Disanthus cercidifolius*), Phyllanthaceae y Rutaceae (*Metrodorea*) (Mochizuki & Kawakita 2018, citas en Pelotas 2010), así como en los conos de *Gnetum cuspidatum* Blume (Gnetaceae, Kato *et al.* 1995), aunque en ninguno de estos se confirma su rol como polinizadores efectivos. Las lianas de *Gnetum cuspidatum* tienen estróbilos caulinares cerca del sotobosque que huelen a hongo y tienen néctar (Kato *et al.* 1995). Los reportes existentes en Orchidaceae se limitan a visitas ocasionales de moscas Lauxaniidae en especies de Pleurothallidinae como *Dracula erythrochaete* (Gil-Amaya 2022), *D. lafleurii* (Endara *et al.* 2010), *Specklinia spectabilis* (Karremans *et al.* 2015), y *Corybas cheesemanii* de la tribu Diurideae (Kelly *et al.* 2013). Sin embargo, los polinizadores efectivos de estas especies pertenecen a la familia Drosophilidae, con varias especies de moscas micófilas del género de *Zygothrica* que polinizan *Dracula* (Endara *et al.* 2010, Gil-Amaya 2022) y varias especies cercanamente emparentadas de *Drosophila* que polinizan las especies del complejo de *Specklinia endotrachys*, en el que se incluye *S. spectabilis* (Karremans *et al.* 2015b). En el estudio de *Corybas cheesemanii*, Lauxaniidae fue de las familias de dípteros más abundantes en los tratamientos y las flores, pero son muy grandes para ingresar por la abertura de las flores, y más aún, ninguno de los dípteros se vio cargando polinarios (Kelly *et al.* 2013).

Aparte de los lauxánidos, al menos cinco especies de *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) visitan *M. striatella*. Drosophilidae es sin duda una familia importante en la polinización de especies de *Masdevallia*, con diferentes especies de *Drosophila* que polinizan *M. bicolor*, *M. calura*, *M. demissa*, *M. floribunda*, *M. fonsecae* y *M. infracta* (Cuervo Martínez 2012, Karremans & Díaz-Morales 2019) y al menos dos especies de *Zygothrica* que polinizan *M. floribunda* y *M. tuerckheimii* (Lipinska *et al.* 2019). De hecho, tres especies de *Drosophila* que visitan *M. striatella* están cercanamente emparentadas con especies polinizadoras de *M. calura* y *Diodonopsis erinacea* (Fig. 10). Aunque ninguna *Drosophila* se observó cargando polinarios de *M. striatella*, no se descartan como polinizadores potenciales por su comportamiento similar al de los lauxánidos, pero es probable que existan aspectos morfométricos por los que no remueven polinarios efectivamente.

Morfológicamente, los miembros de Drosophilidae pueden confundirse con los lauxánidos más pequeños y amarillentos, diferenciándose únicamente por la ausencia de vibrisas y la cara esclerotizada y cóncava en el medio (*vs.* la presencia de vibrisas y la cara menos esclerotizada y más membranosa en Drosophilidae) (Zumbado 2006). Lauxaniidae y Drosophilidae también pueden confundirse con Agromyzidae, Chloropidae, Ephydridae y Sciomyzidae, entre otros, siendo requerida una observación detallada para identificarlos correctamente (Zumbado 2006). Esto refleja la necesidad de estudiar detalladamente los visitantes florales para evitar confundir familias morfológicamente similares y así conocer la verdadera diversidad de polinizadores en *Masdevallia*, y más allá, Pleurothallidinae.

Otros visitantes florales.— Según su interacción con las flores, el resto de visitantes florales podrían ser categorizados como depredadores de flores (i.e. florívoros como las babosas y larvas de lepidópteros), depredadores de los polinizadores o antipolinizadores (i.e. arañas) o ladrones de néctar (i.e. mosquitos y abejones). La mayoría de estos aprovechan los recursos que la orquídea ofrece, sin dejar como retribución la polinización. Estas interacciones son antagonistas para la planta, ya que provocan la disminución los recursos disponibles para los polinizadores efectivos. Sin embargo, desde el punto de vista de estos visitantes, esta especie de orquídea representa una fuente de tejidos nutritivos con contenido de proteínas, lípidos, polisacáridos, además de néctar. Para lograr una compensación entre las interacciones positivas y negativas, es posible que haya adaptaciones relacionadas con la biología floral, la fenología, la longevidad de las flores y el tiempo de emisión de la fragancia y su composición química (Nunes *et al.* 2016).

Micromorfología e histología del perianto.— La gran diversidad de glándulas encontradas en el perianto de *M. striatella* puede significar diversos sitios de liberación de volátiles en las flores, tal cual ha sido reportado en otras especies de Orchidaceae (Bogarín *et al.* 2018, Gil-Amaya 2022, Vogel 1990). Se encontró una concentración de estomas en ambas superficies de las colas sepalinas, más abundante en la región abaxial, con acumulación de ceras (Fig. 14D, G) y polisacáridos (Fig. 14F,H) en sus células guarda, además de claros espacios aéreos subepidérmicos (cámaras subestomáticas, Fig. 14H). Los estomas en las flores de otros Pleurothallidinae se han relacionado con la liberación de compuestos volátiles (e.g. *Acianthera*, de Melo *et al.* 2010) y la secreción de néctar (e.g. complejo de *Specklinia endotrachys*, Karremans *et al.* 2015b) a través de los poros estomáticos. En *Dracula erythrochaete*, los estomas en ambas superficies de las colas sepalinas cumplen una función osmofórica evidenciada por una densa tinción NR+ y la acumulación de polisacáridos y lípidos en sus células guarda (Gil-Amaya 2022). Al contrario de *D. erythrochaete*, los estomas de *M. striatella* no presen-

taron una reacción NR+ evidente. La tinción NR+ se ha empleado para localizar regiones con actividad secretora u osmofórica, así como la presencia de almidón en estructuras epidérmicas ha sido considerada una fuente de energía y carbono para la síntesis de sustancias volátiles (Vogel 1990). Las sustancias lipofílicas que contienen aceites esenciales, ácidos grasos y triglicéridos también se liberan a través de los osmóforos (Dudareva & Pichersky 2006, Vogel 1990). Aunque no se descarta, es necesario recopilar mayor evidencia para confirmar el papel osmofórico de los estomas de las colas sepalinas de *M. striatella*. También podrían representar una señal visual para su avistamiento por parte de las moscas, como se ha sugerido anteriormente para *Masdevallia* (van der Cingel 2001, Vogel 1990) y se ha comprobado en *Dracula* (Gil-Amaya 2022). Más aún, dada su coloración verdosa (en la población estudiada), la presencia de células de tipo mesófilo bajo la superficie epidérmica (Fig. 14E–F) y la presencia de cloroplastos en las células oclusivas de sus estomas (Fig. 14G), existe la posibilidad de que las colas sepalinas de *M. striatella* tengan capacidad fotosintética. La fotosíntesis extrafoliar es considerada una estrategia importante para la adquisición de carbono adicional en plantas (Aschan & Pfanz 2003, Henry *et al.* 2020) y ha sido evaluada sólo en unas pocas especies de Orchidaceae (Antflinger & Wendel 1997, Dueker & Arditti 1968). Las estructuras reproductivas podrían obtener hasta el 60% de su requerimiento total de carbono a partir de su propia fijación de CO₂ (Aschan & Pfanz 2003), lo cual representaría una fuente local de energía y azúcares para el soporte de la larga antesis observada en *M. striatella*. Se requieren estudios fisiológicos para probar esta hipótesis.

El perianto de *Masdevallia striatella* además incluye una variedad de tricomas papilares y glandulares en los sépalos, los pétalos y el labelo. En los sépalos, los tricomas glandulares de la superficie abaxial y las papilas de la superficie adaxial también muestran una densa reacción NR+, acumulación de almidón, proteínas y lípidos indicativos de actividad osmofórica. Tricomas glandulares con diversas morfologías, pero similares en su distribución, se han documentado en especies de *Acianthera*, *Anathallis*, *Echinosepala*, *Octomeria*, *Phloeophila*, *Specklinia* y *Zootrophion* (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014, Karremans *et al.* 2015a,b). Estos fueron categorizados como coléteres por Cardoso-Gustavson *et al.* (2014) y propuestos como una sinapomorfía de la subtribu Pleurothallidinae por Arévalo-Rodrigues *et al.* (2022). Entre sus posibles funciones se incluyen la protección contra microorganismos, la prevención de la herbivoría y la lubricación de los tejidos meristemáticos (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014, Arévalo-Rodrigues *et al.* 2022). También se ha propuesto que tienen actividad osmofórica (Arévalo-Rodrigues *et al.* 2022), lo es apoyado por este estudio con *M. striatella* dada la densa reacción NR+ de estos tricomas glandulares y la acumulación de polisacáridos y proteínas en su cabeza globular (Fig. 13–14). Una de las características más evidentes de estas estructuras

es la presencia de una serie de proyecciones similares a hilos recubriendo la cabeza del tricoma (sección glandular) y extendiéndose sobre la epidermis de *M. striatella* (Fig. 13A–C). Hilos similares en glándulas presentes en los frutos de *Acianthera fenestrata* (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase y *Anathallis obovata* (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase se han considerado secreciones mucilaginosas que pueden actuar como un medio para la penetración de hifas fúngicas que promuevan la germinación de las semillas (Cardoso-Gustavson *et al.* 2014). Sin embargo, la penetración de hifas no ha sido aún documentada ni hay pruebas sobre la invasión de hongos micorrícicos en semillas de orquídeas antes de la apertura del fruto (M. Fernández comm. pers. 2023). Es posible que dicha formación reticulada se deba al proceso de deshidratación que sufrieron las muestras para MEB. Se requieren análisis fisicoquímicos para determinar la composición de estos hilos en los tricomas de *M. striatella* y su función en las diferentes áreas donde se distribuyen (sépalos, paredes externas e invaginaciones del ovario y frutos). En los pétalos hay tricomas glandulares de dos células parecidos en morfología a coléteres documentados en *Dracula* (Gil-Amaya *et al.* 2022), pero no se logró recopilar imágenes histológicas que permitan una interpretación fundamentada de su posible rol.

Las papilas cónicas y con forma de domo distribuidas a lo largo de la lámina de los sépalos de *M. striatella* también reaccionaron NR+ y tienen contenidos proteicos y lipídicos (Fig. 12). Estas podrían ser responsables de una atracción química de cercano alcance para la atracción de las moscas hacia la superficie adaxial de los sépalos, junto con la señalización visual que ejerce la venación de los sépalos. Por otra parte el callo apical del labelo se conforma de papilas con forma de dedo densamente agrupadas (Fig. 17A,G) con gran acumulación de proteínas (Fig. 18E–F). Esta también se considera un área secretora responsable del posicionamiento del insecto sobre el labelo, de la mano con la coloración amarilla del callo como señalización visual. El surco aplanado central que se extiende a través de la lámina del labelo donde se concentran las tres venas se considera una guía de néctar hacia las papilas unicelulares alargadas y semi-aplanadas de la porción central basal de la lámina. Allí, la acumulación de un exudado azucarado compuesto de glucosa y fructosa sugiere que existe un nectario del tipo papilar unicelular. Se han descrito papilas con función osmofórica en varias especies de *Acianthera* (de Melo *et al.* 2010), mientras que la presencia de nectarios sobre el labelo ha sido reportada en otras especies de Pleurothallidinae, particularmente en los géneros *Acianthera*, *Anathallis*, *Octomeria* y *Stelis* (Arévalo-Rodrigues *et al.* 2022, Borba & Semir 1998, 2001, Dressler 1993, van der Pijl & Dodson 1966). También se han reportado la secreción de néctar en los sépalos y labelos de especies de *Bulbophyllum* (Stpiczyńska *et al.* 2018), género de la subtribu Dendrobiinae también polinizado por moscas y que muestra grandes convergencias con Pleurothallidinae. Papilas longitu-

dinalmente alargadas idénticas a las encontradas en el labelo de *M. striatella* se han reportado cubriendo casi toda la superficie del labelo en *M. infracta*, categorizadas por los autores como osmóforos, aunque con evidencia limitada (Arévalo-Rodrigues *et al.* 2022). A través de los procedimientos histológicos aplicados en el presente estudio, se puede descartar la presencia de proteínas, polisacáridos insolubles y lípidos en el interior de estas papilas, pero no se logró probar la presencia de azúcares, por lo que no se pueden descartar otras posibles funciones para estas estructuras.

Finalmente, los pétalos son estructuras pequeñas pero complejas que tienen una organización celular ordenada y bastante geométrica que podría estar proporcionando estabilidad mecánica. Las grandes cantidades de rafidios en los márgenes de los pétalos también se han relacionado con una alta estabilidad estructural, sin embargo, se les ha atribuido típicamente una función de defensa contra la florivoría. Dicha estabilidad podría ser responsable de mantener a los polinizadores alineados mientras están en el interior de la flor, entre el labelo y la columna. La presencia de estomas también se evidenció en el envés de los pétalos de *M. striatella* (Fig. 16G–H), similar a lo que se ha documentado en el envés de los pétalos de *Myoxanthus hirsuticaulis* (Karremans & Vieira Uribe 2020), pero se requiere mayor evidencia antes de proponer una posible función para los estomas de los pétalos.

Mecanismo y síndrome de polinización.— *Masdevallia striatella* sigue un mecanismo de polinización ‘masdevalliforme’ (Karremans & Díaz-Morales 2019). Para que ocurra polinización, las moscas son atraídas a larga distancia a través de olores emitidos por osmóforos, mientras que para el aterrizaje en las flores probablemente intervienen también señales visuales. El indumento heterótrico de *M. striatella* presenta varias zonas con actividad secretora y patrones de coloración con guías de néctar (i.e. las venas moradas del perianto). Una vez que las moscas aterrizan en las flores, el comportamiento alimenticio de extender la probóscide repetidamente sobre el tejido de los sépalos y el labelo, así como las moscas excretando un líquido amarillento similar a orina, es evidente. Oportunamente, las moscas deben posarse sobre el labelo articulado y móvil, siendo el callo papiloso del ápice –de color amarillo y rico en proteínas– un estímulo visual y químico para atraer a las moscas hacia esta porción de la flor. Las venas moradas en el surco central liso del labelo funcionan como guías de néctar que conducen a los insectos hacia la porción donde el néctar se acumula. Las cavidades cóncavas en la base del labelo podrían estar acumulando el néctar y ser un atrayente visual de color amarillo brillante que mantienen la atención de las moscas. Allí permanecen extendiendo la probóscide sobre el néctar mientras su escutelo está en contacto directo con la columna (Fig. 6). Una vez consumida la reserva de néctar, las moscas retroceden para salir de la flor y el escutelo se llena del viscario pegajoso del rostelo al que luego se adhieren las caudículas del polinario, dándose la remoción. Durante la deposición del polinario, la liberación de las moscas resulta más complicada porque

la columna pegajosa actúa como una trampa a la que las moscas quedan atrapadas por un periodo de tiempo más largo. Algunas logran zafarse al sostenerse del labelo móvil, otras no lo logran y mueren atrapadas. Este tipo de “trampa” es generalizado en el mecanismo ‘Masdevalliforme’ (Karremans & Díaz-Morales 2019) y puede apreciarse también en videos de eventos de polinización en *Dracula* y *Specklinia* (Karremans 2023).

El perfil aromático de *M. striatella* es del tipo fermentado, con la presencia de ácido butírico y ácido isovalérico (Kaiser 1993) que son ácidos grasos de cadena corta (AGCC) o ácidos grasos volátiles (AGV) comúnmente producidos a partir de procesos de fermentación que lleva a cabo la microbiota del colon en mamíferos (García Peris & Velasco Gimeno 2007, Summers & Kimby 2023). El ácido butírico es uno de los AGCC lineales producidos mediante la fermentación sacarolítica de polisacáridos complejos en el colon (García Peris & Velasco Gimeno 2007, Summers & Kimby 2023) y son aprovechados por el epitelio intestinal como substrato energético para mantener su integridad y función (Vergara & González Sánchez 2017). Se generan en el metabolismo del piruvato por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof (García Peris & Velasco Gimeno 2007). Poseen varios efectos beneficiosos locales y sistémicos, como favorecer la motilidad del colon, el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la regulación de la presión arterial, así como propiedades antiinflamatorias (Summers & Kimby 2023). Al contrario, el ácido isovalérico es uno de los AGCC ramificados que se producen mediante fermentación proteolítica que produce derivados nitrogenados como aminas, amonio y compuestos fenólicos que se consideran nocivos para el intestino (García Peris & Velasco Gimeno 2007). Curiosamente, hay muchas similitudes relevantes entre los intestinos de los mamíferos y las moscas *Drosophila* como modelo (Martorell *et al.* 2014), con vías de señalización muy conservadas en lo que respecta al desarrollo, la regeneración y la enfermedad intestinal (Zhai *et al.* 2022). No cabe duda de que *M. striatella* explota la respuesta innata de los visitantes y polinizadores a este tipo de AGV, pero la razón específica por la que las moscas son atraídas por estos es una incógnita y se requerirá de experimentos futuros para tratar de responderla. De vuelta a las flores, según el tipo de fermentación que los produce, se hipotetiza que el ácido butírico se libera en el nectario del labelo de *M. striatella* donde hay glucosa y fructosa. Esto apoyaría la doble función (osmofórica y nectarífera) de esta región del labelo y podría relacionarse con la necesidad de captar productos fisiológicamente beneficiosos para las moscas. El ácido isovalérico podría liberarse en las porciones donde hay glándulas ricas en proteínas y cuerpos lipofílicos (e.g. las papilas con forma de domo en la base del labelo).

Las moscas, en términos generales, tienen quimiosensores de largo alcance (situados en las antenas) que son abundantes y receptivos a muchos olores florales, además de receptores gustativos

(quimiosensores de contacto, en las piezas bucales y en las patas) que están muy sintonizados con la detección de sacarosa y/o glucosa (Willmer 2011). Se sabe que muchos lauxánidos se alimentan de hifas fúngicas, un material alimenticio autorregenerador que se dispersa uniformemente en el espacio y el tiempo, mientras otros se alimentan de sustancias líquidas (Broadhead 1984, 1989). Este estudio suma al conocimiento de la historia natural de las especies de *Poecilominettia* y *Xenochaetina*, con la documentación de machos y hembras que activamente se alimentan de los recursos florales (néctar, proteínas y lípidos) de *M. striatella* y son efectivos en la transferencia del polinario. Las hembras y machos de *Drosophila* que visitan las flores también se benefician del néctar, pero en este estudio no fueron efectivos en la remoción y deposición de polinarios.

Si bien hay moscas de ambos sexos de Lauxaniidae y Drosophilidae visitando las flores de *M. striatella*, no ocurre la agregación de estas y no hay evidencia de comportamientos sociales de cortejo ni de cópula en las flores, contrario a lo que se ha observado en otras especies relacionadas. Por ejemplo, en las flores de *M. floribunda*, *M. tuerckheimii* y su híbrido *M. floribunda* × *tuerckheimii*, se congregan moscas polinizadoras de ambos sexos de al menos dos especies de *Zygothrica*, con la posibilidad de que ocasionalmente copulen en las flores (Lipinska *et al.* 2019). En *Dracula erythrochaete*, que imita hongos agaricales para la atracción de varias especies de *Zygothrica* micófilas, también ocurre la congregación de individuos de ambos sexos de varias especies y ocasionalmente se dan los comportamientos de cortejo y de cópula (4% del tiempo que interactúan libres en las flores) (Gil Amaya 2022). En *Specklinia* hay feromonas de agregación que atraen a hembras y machos de varias especies de *Drosophila* que ocasionalmente copulan en las flores (Karremans *et al.* 2015b). Además de que las moscas se observaron solitarias en las flores de *M. striatella*, tampoco se observaron hembras dípteras ovipositando. El único evento de este tipo que fue documentado fue el de una hembra de *Xenochaetina* sp. que depositó un huevo sobre el labelo mientras estaba atrapada en la columna y era devorada por hormigas (Fig. 8); sin embargo, este fue un evento aislado y se considera una respuesta innata de supervivencia ante un evento de depredación. Sumado a esto, no hubo evidencia de la puesta de huevos por parte de hembras de *Poecilominettia*, por lo que no hay engaño por sitio de oviposición que actúe sobre los lauxánidos. En los sépalos y el labelo de *M. striatella* ocasionalmente se encontraron huevos morfológicamente similares a los huevos de *Drosophila* ilustrados en la literatura (Horne-Badovinac 2020, Pyrowolakis *et al.* 2017). Elegir dónde poner los huevos es un comportamiento complejo que depende de múltiples modalidades sensoriales (Dweck *et al.* 2013). Un estudio en *Drosophila* sugiere que existe una preferencia ancestral por olores de frutos cítricos para la puesta de los huevos, que se deriva de la necesidad de escapar del parasitismo de avispas endoparasitoides (Dweck *et al.* 2013). En *Dracula erythrochaete* se encontraron avispas visitando las flores,

lo que se consideró un factor que evita que las hembras de *Zygothrica* ovipositen en estas flores (Gil-Amaya 2022). Las avispas son probablemente los visitantes no dípteros más comunes de las flores de Pleurothallidinae (Karremans & Díaz Morales 2019), pero no visitan *M. striatella* a pesar de la presencia de néctar en el labelo. La ausencia de avispas como visitantes florales de *M. striatella* podría ser una de las razones por las cuales ocasionalmente las *Drosophila* ovipositan, pero es necesario investigar si los componentes del perfil aromático de *M. striatella* son efectivos para repeler a estas avispas endoparasitoides.

En resumen, este estudio no proporciona evidencia para apoyar la hipótesis de que la polinización en *M. striatella* está ocurriendo mediante una vía de engaño por sitio de oviposición que actúe sobre los polinizadores efectivos. Tampoco sugiere ser un engaño alimenticio porque las flores de *M. striatella* ofrecen productos metabólicos de valor, es decir, de los cuales las moscas pueden obtener energía y mejorar su *fitness*. El néctar es la recompensa más buscada por las moscas, muchas de las cuales dependen de la energía que proporciona para volar y, a menudo, tiene otros beneficios nutricionales, como el contenido de aminoácidos, proteínas, lípidos y vitaminas (Zumbado 2006, Woodcock *et al.* 2014). Además, las sustancias proteínicas y lipídicas del perianto pueden considerarse recompensas que los polinizadores pueden recolectar con sus probóscides, representando un sistema mutualista entre las flores y las moscas. Más aún, la presencia de colores blanco, crema, o verde-amarillento en las flores, la apertura de las flores durante el día, la presencia de guías de néctar y la producción de néctar expuesto a alta concentración y bajo volumen se relacionan con la miofilia (Willmer 2011). A pesar de que el aroma de las flores de *M. striatella* pueda resultar algo (no muy) desagradable para el olfato humano, se considera que esta especie tiene más características asociadas a la miofilia que a la sapromiofilia, siendo la primera especie de *Masdevallia* en la que la polinización por recompensa es evidenciada. Esto es contrario a lo que se ha propuesto anteriormente para el género (Ackerman 2023) y es necesario investigar si otras especies de *Masdevallia* ofrecen néctar como recompensa.

Sistema reproductivo.— *Masdevallia striatella* resultó ser altamente auto-compatible en la población de estudio; sin embargo, no hay mecanismos que promuevan la autofecundación de manera autónoma. La autofecundación puede reducir la diversidad genética de las poblaciones y aumentar la tasa de extinción de las especies, razón por la cual algunas de ellas han desarrollado mecanismos para evitar la autopolinización y promover la polinización cruzada (i.e. la auto-incompatibilidad) (Zang *et al.* 2021). A pesar de esto, en la familia Orchidaceae predomina la auto-compatibilidad y existen mecanismos que promueven la autopolinización, por ejemplo, cuando el polinario se cae o se desintegra al final de una antesis larga en donde no ha ocurrido polinización (van der Pijl & Dodson 1969)

o por la capacidad del estípite de doblarse permitiendo a los polinios superar la barrera del rostelo y alcanzar el estigma (Ke-Wei *et al.* 2006). Según la más reciente revisión sobre las estrategias reproductivas en Orchidaceae, la auto-compatibilidad en la subtribu Pleurothallidinae está presente en al menos 44 especies de *Acianthera*, *Dracula*, *Echinosepala*, *Lepanthes*, *Lepanthopsis*, *Masdevallia*, *Muscarella*, *Octomeria*, *Pabstiella*, *Platystele*, *Pleurothallis*, *Pleurothallopsis*, *Restrepia*, *Specklinia*, *Stelis* y *Zootrophion*, así como en un género de la subtribu hermana de Pleurothallidinae, Dilomilidinae (Ackerman *et al.* 2023), mientras que otras especies son auto-incompatibles (Ackerman *et al.* 2023, Borba *et al.* 2001b). Los reportes de auto-compatibilidad en *Masdevallia* incluyen *M. infracta* (Borba *et al.* 2011), así como *M. coccinea* y *M. ignea* en las que la autofecundación tampoco ocurre de manera autónoma (Cuervo Martínez 2012). *Masdevallia striatella* representa entonces el cuarto caso confirmado de auto-compatibilidad en el género.

La autogamia se ha considerado una estrategia de aseguramiento reproductivo ante la limitación de polinizadores en Orchidaceae (Darwin 1862, Cozzolino & Widmer 2005). Sin embargo, no hay mecanismos de autofecundación autónomos en *M. striatella* y más bien hay algunos mecanismos que podrían estar promoviendo la polinización cruzada: el rostelo es prominente, separando físicamente la antera del polinario (i.e. hercogamia), mientras que el polinario es bastante compacto y no sufre deformaciones o cambios de posición durante la antesis. A la remoción del polinario junto con la capa de la antera se le conoce como retención de la antera, el cual es un mecanismo que se ha observado en otras especies de Pleurothallidinae y que se ha relacionado con evitar la geitonogamia y promover la polinización cruzada (Pansarin *et al.* 2016). Sin embargo, se requieren más observaciones para determinar el tiempo promedio que la antera permanece sobre el polinario adherido al cuerpo de las moscas, y más aún, determinar si este mecanismo es efectivo cuando las moscas se desplazan entre diferentes flores de una misma planta. Dado el comportamiento de las moscas polinizadoras, que entran y salen de las flores en una misma visita y pueden visitar varias flores de un mismo parche, se hipotetiza que la auto-compatibilidad en *M. striatella* promueve la geitonogamia. En otras poblaciones de la misma especie, la floración ocurre masivamente y las plantas forman clones (i.e. Cerros de la Carpintera), lo que también podría propiciar la geitonogamia (Cascante-Marin comm. pers. 2023).

Por otro lado, la polinización natural de *M. striatella* fue baja (16–18%). Un bajo éxito reproductivo se ha visto en otras especies que ofrecen néctar (e.g. las especies del complejo *Specklinia endotrachys*, donde menos del 10% de las flores desarrollan fruto en la naturaleza, Karremans *et al.* 2015). Es posible que la abundancia de los polinizadores sea baja o haya competencia con otras especies. Sin embargo, esto puede compensarse con la producción masiva de flores que ofrecen néctar,

la geitonogamia y un número grande de semillas por fruto que son altamente viables tanto por alogamia como por autogamia. Al ser una especie de amplia distribución ecológica y altitudinal (Oses Salas 2017), se espera que tener una estrategia reproductiva flexible le permita a *M. striatella* beneficiarse de una composición de visitantes florales variable entre diferentes poblaciones y comunidades. Existen estudios ecológicos y evolutivos que demuestran que las interacciones entre plantas y polinizadores o antagonistas varían en tiempo y espacio según los patrones geográficos (Thompson 2005, Thompson & Fernández 2006). A partir del presente estudio, se considera que *M. striatella* es una especie modelo idónea para profundizar en las interacciones y adaptaciones evolutivas del género.

VIII. CONCLUSIONES

Masdevallia striatella es una especie miofíllica que tiene osmóforos para la atracción a larga distancia, señales visuales como guías de néctar y néctar como recompensa. Esto es contrario a la polinización por engaño que se ha generalizado en el género (Ackerman *et al.* 2023). Los polinizadores efectivos pertenecen al menos a tres especies en los géneros *Xenochaetina* y *Poecilomilettia* de la familia Lauxaniidae (Diptera), lo que amplía el conocimiento sobre los polinizadores en Pleurothallidinae y también aporta al conocimiento sobre la historia natural de este grupo de moscas. Un estudio taxonómico preciso y oportuno de estas especies es esencial para conocer la verdadera diversidad de especies polinizadoras de *Masdevallia*, y así entender mejor la evolución de los sistemas de polinización y las variaciones morfológicas en Pleurothallidinae.

Este estudio también aporta al conocimiento de la diversidad de glándulas y componentes de la biología floral en *Masdevallia*, con varias superficies del perianto que muestran actividad secretora y contenidos que varían entre proteínas, lípidos, polisacáridos insolubles y azúcares simples. Por otra parte, se plantea la hipótesis de que los estomas de los sépalos y pétalos pueden llevar a cabo fotosíntesis extrafoliar como estrategia para la adquisición de carbono adicional para los tejidos reproductivos y la producción de los volátiles. La relación entre el ácido butírico y el ácido isovalérico con las moscas polinizadoras es una incógnita cuya investigación futura podría dilucidar datos interesantes sobre la fisiología de estas moscas. Aunque se desconocen los polinizadores efectivos de otras especies con estos mismos componentes volátiles en sus perfiles aromáticos (*M. caesia*, *M. elephanticeps* y *M. tridens sensu* Kaiser 1993), se hipotetiza que su mecanismo de polinización es semejante al de *M. striatella*.

Finalmente, *M. striatella* es altamente auto-compatible pero incapaz de autofecundarse autónomamente y existen mecanismos que posiblemente evitan la autopolinización (i.e. la presencia de un rostelo prominente y la retención de la antera). Además, *Masdevallia striatella* produce frutos en un plazo relativamente corto, sin diferencias entre la viabilidad de las semillas según su origen (i.e. alogamia o autogamia). Por lo anterior, se propone *M. striatella* como especie modelo para futuros estudios ecológicos, evolutivos y geográficos. Adicionalmente, se plantea la necesidad de explorar el sistema reproductivo de más especies de *Masdevallia*, cubriendo diferentes clados para comprender mejor la evolución de estas estrategias reproductivas en este género hiperdiverso y determinar si están relacionadas con las altas tasas de diversificación.

IX. LITERATURA CITADA

- Ackerman, J. D. (1986). Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1, 108–113.
- Ackerman, J. D. (1986). Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1, 108–113.
- Ackerman, J. D., Phillips, R. D., Tremblay, R. L., Karremans, A., Reiter, N., Peter, C. I., Bogarín, D., Pérez-Escobar, O. A. & Liu, H. (2023). Beyond the various contrivances by which orchids are pollinated: global patterns in orchid pollination biology. *Botanical Journal of the Linnean Society*, XX, 1–30.
- Aguiar, J. M. R. B. V., Pansarin, L. M., Ackerman, J. D., Pansarin, E. R. (2011). Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 27(1), 86–95.
- Albores Ortiz, O. & Sosa, V. (2006). Polinización de dos especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 74, 155–168.
- Arévalo-Rodrigues, G., Cardoso-Gustavson, P. & Barros, F. (2022). Floral gland diversity in Pleurothallidinae (Epidendroideae–Orchidaceae). *Flora*, 297, 152179.
- Barbosa, A. R., de Melo, M. C. & Borba, E. L. (2009). Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution*, 283, 1–8.
- Blanco, M. A. & Barboza, G. (2005). Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany*, 95, 763–772.
- Bogarín, D., Fernandez, M., Borkent, A., Heemskerk, A., Pupulin, F., Ramírez, S., Smets, E., & Gravendeel, B. (2018). Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186, 510–543.

- Bogarín, D., Oses, L. & Smith, C. M. (2017). *Masdevallia luerorum* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), a new species from Costa Rica. *Lankesteriana*, 17(2), 235–244.
- Bogarín, D., Pupulin, F., Smets, E., & Gravendeel, B. (2016). Evolutionary diversification and historical biogeography of the Orchidaceae in Central America with emphasis on Costa Rica and Panama. Proceedings of the V Scientific Conference on Andean Orchids, Cali, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. *Lankesteriana*, 16, 189–200.
- Bohman, B., Flematti, G. R., Barrow, R. A., Pichersky, E. & Peakall, R. (2016). Pollination by sexual deception — it takes chemistry to work. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, 37–46.
- Borba E. L. & Semir J. (1998). Wind-assisted y pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian campos rupestres. *Lindleyana*, 13, 203–218.
- Borba, E. L. & Semir, J. (2001). Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*, 88, 75–88.
- Borba, E. L., Barbosa, A. R., de Melo, M. C., Loureiro Gontijo, S., & de Oliveira, H. O. (2011). Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): Evolutionary and systematics applications. *Lankesteriana*, 11(3), 207–221.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N. & Semir, J. (2001a). Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, 88(3), 419–428.
- Borba, E. L., Semir, J. & Shepherd, G. J. (2001b). Self-incompatibility, Inbreeding Depression and Crossing Potential in Five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species. *Annals of Botany*, 88, 89–99.
- Breitkopf, H., Onstein, R. E., Cafasso, D., Schlüter, P. M. & Cozzolino, S. (2014). Multiple shifts to different pollinators fuelled rapid diversification in sexually deceptive *Ophrys* orchids. *New Phytologist*, 207(2), 377–389.
- Broadhead, E. C. (1984). Adaptations for fungal grazing in lauxaniid flies. *Journal of Natural History*, 18, 639-649.

- Broadhead, E. C. (1989). The species of *Poecilominettia*, *Homoeominettia* and *Floriminettia* (Diptera: Lauxaniidae) in Panama. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 58(2), 185–226.
- Brown, B.V., Borkent, A., Cumming, J. M., Wood, D. M., Woodley, N. E. & Zumbado, M. A. (Eds). (2009). *Manual of Central American Diptera: Volume 1*. Ottawa, Ontario, Canada: NRC Research Press. 714 pp.
- Brown, B.V., Borkent, A., Cumming, J. M., Wood, D. M., Woodley, N. E. & Zumbado, M. A. (Eds). (2010). *Manual of Central American Diptera: Volume 2*. Ottawa, Ontario, Canada: NRC Research Press. 728 pp.
- Chase, M. W. (2005). *Classification of Orchidaceae in the age of DNA data*. Kew: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L. & Freudenstein, J. V. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. pp. 69–89 in K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett & P.J. Cribb (eds), *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications.
- Cozzolino, S. & Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 487–494.
- Cuervo Martínez, M. A. (2012). Biología reproductiva de *Masdevallia coccinea* y *Masdevallia ignea* en condiciones de semicultivo en Guasca Cundinamarca. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Darwin, C. R. (1862). *The various contrivances by which orchids are fertilised by insects*. London: John Murray.
- de Melo, M. C., Borba, E. I., & Paiva, E. A. S. (2010). Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution*, 286, 141–151.

- de Melo, M. C., Goulart Taucce, P. P. & Borba, E. L. (2011). Reproductive biology and isolation mechanisms in rupic species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 293, 161–176.
- Dodson, C. H. (1962). The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *American Orchid Society Bulletin*, 31, 525–534.
- Dressler, R. L. (1968). Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 15, 143–183.
- Dressler, R. L. (1981). *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R. L. (1993). *Phylogeny and classification of the Orchid Family*. Portland: Dioscorides Press.
- Dressler, R. L. & Salazar, G. A. (1991). Viscarium, a term for the glue-bearing area of the rostellum. *Orchid Research Newsletter*, 17, 11–12.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMCEvolutionary Biology*, 7, 214.
- Dueker, J. & Arditti, J. (1968). Photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation by green *Cymbidium* (Orchidaceae) flowers. *Plant Physiology*, 43, 130–132.
- Duque-Buitrago, C. A., Alzate-Quintero, N. F. & Otero, J. T. (2014). Nocturnal pollination by fungus gnats of the colombian endemic species, *Pleurothallis marthae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Lankesteriana*, 13(3), 407–417.
- Dweck, H. K. M., Ebrahim, S. A. M., Kromann, S., Bown, D., Hillbur, Y., Sachse, S., Hansson, B. S. & Stensmyr, M. C. (2013). Olfactory Preference for Egg Laying on Citrus Substrates in *Drosophila*. *Current Biology*, 23, 2472–2480.
- Endara, L., Grimaldi, D. A. & Roy, B. A. (2010). Lord of the flies: pollination of *Dracula* orchids. *Lankesteriana*, 10(1), 1–11.

- Fan, X.-L., Barrett, S.C. H., Lin, H., Chen, L.-L., Zhou, X. & Gao, J.-Y. (2012). Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. *Annals of Botany*, 110(5), 953–958.
- Flach, A., Dondon, R. C., Singer, R. B., Koehler, S., Amaral, M. C. E. & Marsaioli, J. (2004). The chemistry of pollination in selected Brazilian maxillariinae orchids: floral rewards and fragrance. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1045–1056.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- García Peris, P. & Velasco Gimeno, C. (2007). Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, 22(Supl. 2), 20–25.
- Gerlach, D. (1969). *Botanische Mikrotechnik: eine Einführung*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme.
- Gerritsen, M. E. & Parsons, R. (2005). *Masdevallias: gems of the orchid world*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Gigord, L. D. B., Macnair, M. R., Stritesky, M. & Smithson, A. (2002). The potential for floral mimicry in rewardless orchids: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 269, 1389–1395.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., Iles, W. J. D., Clements, M. A., Arroyo, M. T. K., Leebens-Mack, J., Endara, L., Kriebell, R., Neubig, K. M., Whitten, W. M., Williams, N. H. & Cameron, K. M. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20151553.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A. & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 14812–14817.

- Henry, R. J., Furtado, A. & Rangan, P. (2020). Pathways of photosynthesis in non-leaf tissues. *Biology*, 9, 438. doi:10.3390/biology9120438
- Horne-Badovinac, S. (2020). The *Drosophila* micropyle as a system to study how epithelia build complex extracellular structures. *Philosophical Transactions Royal Society B*, 375, 20190561.
- Jersáková, J. Johnson, S. D. & Kindlmann, P. (2006). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biology Review*, 81, 219–235.
- Kaiser, R. (1993). *The scent of orchids: olfactory and chemical investigations*. The Netherlands, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27, 137.
- Karremans, A. P. (2023). *Demystifying Orchid Pollination. Stories of sex, lies and obsession*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Karremans, A. P. & Díaz-Morales, M. (2019). The Pleurothallidinae: extremely high speciation driven by pollinator adaptation. In: A. M. Pridgeon & A. R. Arosemena (Eds.), *Proceedings of the 22nd World Orchid Conference, vol. 1* (pp. 363–388). Guayaquil, Ecuador: Asociación Ecuatoriana de Orquideología.
- Karremans, A. P. & Vieira-Urbe, S. (2020). *Pleurothallids Neotropical Jewels - Volume I*. Quito, Ecuador: Imprenta Mariscal.
- Karremans, A. P., Bogarín, D., Pupulin, F., Luer, C. A., & Gravendeel, B. (2015a). The glandulous *Specklinia*: morphological convergence versus phylogenetic divergence. *Phytotaxa*, 218, 101–127.
- Karremans, A. P., Pupulin, F., Grimaldi, D., Beentjes, K. K., Butot, R., Fazzi, G. E., Kaspers, K., Kruizinga, J., Roessingh, P., Smets, E. F., & Gravendeel, B. (2015b). Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophila*: the first reported case of a deceptive syndrome employing aggregation pheromones in Orchidaceae. *Annals of Botany*, 2015, 1–19.

- Kato, M., Inoue, T. & Nagamitsu, T. (1995). Pollination biology of *Gnetum* (Gnetaceae) in a lowland mixed dipterocarp forest in Sarawak. *American Journal of Botany*, 82(7), 862–868.
- Ke-Wei, L., Zhong-Jian, L., LaiQiang, H., Li-Qiang, L., Li-Jun, C., Guang-Da, T. (2006). Self-fertilization strategy in an orchid. *Nature*, 441(2), 945.
- Kelly, M. M., Toft, R. J. & Gaskett, A. C. (2013). Pollination and insect visitors to the putatively brood-site deceptive endemic spurred helmet orchid *Corybas cheesemanii*. *New Zealand Journal of Botany*, 51(3), 155–167.
- Lambkin, C. L., Sinclair, B. J., Pape, T., Courtney, G. W., Skevington, J., Meier, R. Yeates, D. K., Blagoderov, V. & Wiegmann, B. M. (2013). The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Systematic Entomology*, 38, 164–179.
- Lipinska, M. M., Archila Morales, F. L., Giřka, W., Beuk, P. L.T. & Szlachetko, D. L. (2019). First report on effective pollination of *Masdevallia floribunda*, *M. tuerckheimii* and their hybrid (Orchidaceae-Pleurothallidinae) by *Zygothrica* fruit flies (Diptera-Drosophilidae) in Guatemala. *Phyton*, 59(1–2), 27–33.
- Luer, C. A. (1986). *Icones Pleurothallidarum*. II. Systematics of *Masdevallia* (Orchidaceae). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 16, 1–81.
- Luer, C. A. (2006). *Icones Pleurothallidarum*. XXVIII. A reconsideration of *Masdevallia*, Systematics of *Specklinia* and vegetatively similar taxa. (Orchidaceae). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 105, 1–20.
- McAlpine, J. F. & Wood, D. M. (1989). *Manual of Nearctic Diptera*. Vol. 3. Ottawa, Ontario: Biosystematics Research Centre (formerly Institute).
- Meisel, J. E., Kaufmann, R. S. & Pupulin, F. (2014). *Orchids of Tropical America. An introduction and guide*. Ithaca and London: Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press.
- Millner, H. J. & Baldwin, T. C. (2016). Floral micromorphology of the genus *Restrepia* (Orchidaceae) and the potential consequences for pollination. *Flora*, 225, 10–19.

- Mochizuki, K. & Kawakita, A. (2018). Pollination by fungus gnats and associated floral characteristics in five families of the Japanese flora. *Annals of Botany*, 121(4), 651–663.
- NCBI. (2023). National Center for Biotechnology Information. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed 20 April 2023]
- Neubig, K. M., Carlisward, B. S., Whitten, W. M. & Williams, N. H. (2015). Nectary structure and nectar in *Sobralia* and *Elleanthus* (Sobralieae: Orchidaceae). *Lankesteriana*, 15(2), 113–127.
- Nunes, C. E. P., Amorim, F. W., Mayer, J. L. S., & Sazima, M. (2015). Pollination ecology of two species of *Elleanthus* (Orchidaceae): novel mechanisms and underlying adaptations to hummingbird pollination. *Plant Biology*, 18, 15–25.
- Nunes, C. E. P., Peñaflor, M. F. G. V., Bento, J. M. S., Salvador, M. J., Sazima, M. (2016). The dilemma of being a fragrant flower: the major floral volatile attracts pollinators and florivores in the euglossinepollinated orchid *Dichaea pendula*. *Oecologia*, 182, 933–946.
- Nunes, C. E. P., Gerlach, G., Bandeira, K. D. O., Gobbo-Neto, L., Pansarin, E. R. & Sazima, M. (2017). Two orchids, one scent? Floral volatiles of *Catasetum cernuum* and *Gongora bufonia* suggest convergent evolution to a unique pollination niche. *Flora*, 232, 207–216.
- Oses Salas, L. (2017). Filogenia molecular de las especies de *Masdevallia* Ruiz & Pav. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) de Costa Rica. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica.
- Pansarin, E. R., Pansarin, L. M., Martucci, M. E. P. & Gobbo-Neto, L. (2016). Self-compatibility and specialisation in a fly-pollinated *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidiinae). *Australian Journal of Botany*, 64(4), 359–367.
- Pansarin, L. M., de Moraes Castro, M. & Sazima, M. (2009). Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159, 408–415.
- Pansarin, L. M., Pansarin, E. R., Gerlach, G. & Sazima, M. (2018). The Natural History of *Cirrhaea* and the Pollination System of Stanhopeinae (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 179(6), 436–449.

- Pansarin, L. M., Pansarin, E. R. & Sazima, M. (2008). Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism. *Australian Journal of Botany*, 56, 363–367.
- Pérez-Escobar, O. A., Chomicki, G., Condamine, F. L., Karremans, A. P., Bogarín, D., Matzke, N. J., Silvestro, D. & Antonelli, A. (2017). Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot. *New Phytologist*, 215, 891–905.
- Pires, J. C., Maureira, I. J., Givnish, T. J., Systma, K. J., Seberg, O., Peterson, G., Davis, J. I., Stevenson, D. W., Rudall, P. J., Fay, M. F. & Chase, M. W. (2006). Phylogeny, Genome Size, and Chromosome Evolution of Asparagales. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22(1), 287–304.
- Pyrowolakis, G., Veikkolainen, V., Yakoby, N. & Shvartsman, S. Y. (2017). Gene regulation during *Drosophila* eggshell patterning. *PNAS*, 114(23), 5808–5813.
- Pouyanne, A. (1917). La fécondation des. Ophrys par les insectes. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, 8, 6–7.
- Pridgeon, A. M. (2005). Pleurothallidinae. In A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, & F. N. Rasmussen, *Genera Orchidacearum. Volume 4. Epidendroideae (part one)* (pp. 319–422). Oxford: Oxford University Press.
- Pridgeon, A. M. & Stern, W. L. (1983). Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 70, 1233–1243.
- Pridgeon, A. M. & Stern, W. L. (1985). Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 146, 115–123.
- 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.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A. (1996). *The natural history of pollination*. Portland, Oregon: Timber Press.

- Pupulin, F. & collaborators. (2020). *Vanishing Beauty. Native Costa Rican Orchids. Vol. 2. Lacaena–Pteroglossa*. Germany: Koeltz Botanical Books.
- Reichenbach, H. G. (1886). *Masdevallia striatella*. *The Gardeners' Chronicle, new series*, 26(656), 103.
- Semelbauer, M. & Kozánek, M. (2014). The immatures of lauxaniid flies (Diptera: Lauxaniidae) and their taxonomical implications. *Zootaxa*, 3780 (3), 401–454.
- Singer, R. B. (2002). The pollination mechanism in *Trigonidium obtusum* Lindl. (Orchidaceae: Maxillariinae): sexual mimicry and trap-flowers. *Annals of Botany*, 89, 157–163.
- Singer, R. B., Marsaioli, A. J., Flach, A. & Reis, M. G. (2005). The Ecology and Chemistry of Pollination in Brazilian Orchids: Recent Advances. *Plant Biotechnology*, 570–583.
- Shrestha, M., Dyer, A. G., Dorin, A., Ren, Z.-X. & Burd, M. (2020). Rewardlessness in orchids: how frequent and how rewardless? *Plant Biology*, 22, 555–561.
- Steiner, K. E., Whitehead, V. B. & Johnson, S. D. (1994). Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. *American Journal of Botany*, 81, 185–194.
- Stpiczyńska, M., Davies, K. L., Zych, M. & Plachno, B. J. (2018). Labellar secretory structures and pollinator food-rewards in representatives of Old World *Bulbophyllum* Thouars. *Flora*, 240, 98–115.
- Summers, S. C. & Quimby, J. M. (2023). El eje intestino-riñón en el gato. *Royal Canin*, edición 33.1. Disponible en <https://vetfocus.royalcanin.com/es/cientifico/el-eje-intestino-rinon-en-el-gato> [Accesado el 3 de julio de 2023].
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. & Calvo, R. N. (2005). Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 84, 1–54.
- van der Cingel, N. A. (1995). *An atlas of orchid pollination: European orchids*. Rotterdam: A. A. Balkema.

- van der Cingel, N. A. (2001). *An Atlas of Orchid Pollination: America, Africa, Asia and Australia*. Rotterdam: CRC Press.
- van der Pijl, L. & Dodson, C. H. (1966). *Orchid flowers: their pollination and evolution*. USA: University of Miami Press.
- Vergara, D. M. & González Sánchez, M. E. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, 34(Supl. 4), 58–61.
- Vogel, S. (1962). Die Duftdrüsen der Orchideen. *Akademie der Wissenschaften und der Literatur: Abhandlungen der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse*, 10, 603–763.
- Vogel, S. (1966). Parfümsammelnde Bienen als Bestäuber von Orchidaceen und Gloxinia. *Plant Systematics and Evolution*, 113, 302–361
- Vogel, S. (1990). *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington, DC: Smithsonian Institution Libraries, and The National Science Foundation.
- Wickham, H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40(1), 1–29. <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag.
- Williams, N. H. & Dodson, C. H. (1972). Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evolution*, 26, 84–95.
- Willmer, P. (2011). Pollination by flies. In P. Willmer (Ed.), *Pollination and Floral Ecology* (pp. 304–321). Princeton and Oxford: Princeton University Press.
- Zumbado, M. A. (2006). *Dípteros de Costa Rica y la América tropical*. Heredia, Costa Rica: Editorial INBio, Instituto Nacional de Biodiversidad.

