

Grado en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudo da Bioloxía reproductiva de *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae), endemismo das montañas galegas

Estudio de la Biología reproductiva de *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae), endemismo de las montañas gallegas

Study on reproductive biology of *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae), endemic plant of Galician mountains.



Pedro Vázquez Álvarez

Xuño, 2017

*Tutor(es) Académico: Elvira Sahuquillo Balbuena
Ángel Vale González*

ÍNDICE

Resumo/Summary

Palabras chave/ Keywords

Autorización Tutores

1. Introducción	1
2. Obxectivos	5
3. Material e métodos	6
4. Resultados	10
5. Discusión	17
6. Conclusións / Conclusions	20
7. Agradecementos	21
8. Bibliografía	21

Resumo

Dactylorhiza cantabrica é unha orquídea tetraploide, endémica da Serra do Courel, para a que se ten suxerido unha orixe híbrida polo cruzamento de *D. insularis* e *D. sambucina*. Neste traballo fixéronse cruzamentos intra e interespecíficos e interxenéricos para coñecer a estratexia reprodutiva de *D. cantabrica*. Así mesmo, fíxose unha análise comparativa do tamaño dos froitos e da viabilidade e tamaño das sementes obtidas tras os distintos cruzamentos, co gallo de detectar a existencia de diferenzas significativas. Por último, analizouse a utilidade do test do Tetrazolio para comprobar a vitalidade das sementes e realizamos un estudo piloto para coñecer os potenciais polinizadores de *D. cantabrica*. Non se observaron diferenzas significativas na produción de sementes e froitos entre os distintos cruzamentos, polo que se plantexa a posibilidade de que na realidade esta orquídea sexa partenoxénica ó igual ca un dos seus posibles proxenitores. Apreciamos tamén que a maioría dos visitantes observados pertencían á familia *Apidae*, aínda que non se observaron polinias adheridas ós insectos.

Palabras chave: Orquídea, estratexia reprodutiva, polinización, partenoxénese

Resumen

Dactylorhiza cantabrica es una orquídea endémica de la Serra do Courel, cuyo origen híbrido se produjo, según estudios recientes, por el cruce entre dos especies próximas, *D. insularis* y *D. sambucina*. En este trabajo se realizaron cruces intra e interespecíficos, además de intergenéricos, para conocer la estrategia reproductiva que sigue esta especie. Además, se hizo un análisis comparativo del tamaño de los frutos y de la viabilidad y tamaño de las semillas obtenidas de los cruzamientos, con el objetivo de detectar la existencia de diferencias significativas. Por último, se analizó la utilidad del test del Tetrazolio para comprobar la vitalidad de las semillas y se realizó un estudio piloto para conocer los potenciales polinizadores de *D. cantabrica*. Los resultados indican que no existen diferencias en la producción de semillas y frutos entre los distintos cruces, por lo que se plantea la posibilidad de que en realidad se trate de una orquídea partenogénica al igual que uno de sus progenitores. En cuanto a sus posibles polinizadores, la mayoría de los visitantes pertenecían a la F. *Apidae*, aunque en ningún caso se observaron polinias adheridas a los insectos.

Palabras clave: Orquídeas, estrategia reprodutiva, polinización, partenogénesis

Abstract

Dactylorhiza cantabrica is an endemic orchid from Serra do Courel. This tetraploid species putatively originated through the hybridisation between two closely related species, *D. insularis* and *D. sambucina*. In this study, intra-, interspecific and intergeneric crosses were carried out in order to unravel its reproductive biology. A comparative morphometric analysis was performed on the seeds and fruits obtained after the crosses. In addition to this, an analysis of the differential viability of the seeds was conducted and the usefulness of the Tetrazolium method to assess seed viability was tested. No significant differentiation was observed in seed production after the different crosses and we suggest that this orchid might be parthenogenetic, as is one of its progenitors. A pilot study was also carried out in order to find out the potential pollinators of *D. cantabrica*. Preliminary results indicate that flowers were mostly visited by insects of the F. *Apidae*, although no insect was observed carrying pollinia.

Keywords: orchids, reproductive biology, polinization, parthenogenesis



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Departamento Bioloxía

TRABALLO DE FIN DE GRADO

Elvira Sahuquillo Balbuena e Ángel Vale González autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao “Estudo da bioloxía reproductiva de *Dactylorhiza cantabrica* Pedersen (Orchidaceae), endemismo de las montañas de Galicia”, presentado por Pedro Vázquez Álvarez para a súa defensa ante o tribunal calificador.

A Coruña, 19 de xuño de 2017

Asdo.: E. Sahuquillo Balbuena

Asdo.: Ángel Vale González

1. Introducción:

As orquídeas constitúen un dos grupos vexetais máis diversos e comprenden o 10% das plantas con flores (Govaerts et al. 2012). Diversos autores teñen sinalado á diversidade dos seus polinizadores e distintos mecanismos que promoven a polinización cruzada como cruciais nesa elevada diversidade (Cozzolino *et al.* 2006; Jersáková et al. 2006). Porén, algunhas especies parecen terse adaptado á ausencia de polinizadores efectivos e desenvolveron mecanismos que aseguran a reprodución (Tremblay et al. 2005; Liu 2006). Estas especies, minoritarias en número, teñen sido pouco estudadas ata o de agora (Liu 2006). Neste traballo preténdese coñecer diferentes aspectos relacionados coa bioloxía reprodutiva e os mecanismos de polinización da orquídea *Dactylorhiza cantabrica* Pedersen, especie endémica das montañas orientais galegas (Lugo).

Dactylorhiza cantabrica foi descrita no ano 2006 con material recollido na Serra do Courel (Pedersen 2006). Caracterízase por presentar un tallo de entre 10-35cm de altura e 4-7 follas lanceoladas con dimensións de 5-12 x 1-3cm, situadas ó longo do tallo, as inferiores a miúdo dispostas como unha mouta basal pouco definida. As brácteas florais son verdes e moi aparentes; e caracterízanse por ser tan ou máis longas que as flores. As inflorescencias son densas, con flores amarelas ou rosado-amarelas, existindo así dúas variedades cromáticas (Fig. 1). Os sépalos laterais, de 8-13 mm, dispóñense separados e dirixidos cara arriba, sendo o sépalo medio e os pétalos algo menores. Normalmente, o labelo é amarelo, trilobulado ou enteiro, lixeiramente convexo, de 7,4-11 x 11-17 mm e ten puntos vermellos. Presenta tamén un esporón de 10-14x 2-4 mm, cilíndrico curvado cara abaixo en paralelo co ovario e algo máis curto ca este último. A súa floración aínda que pode variar segundo o clima acostuma a realizarse entre finais de Abril e mediados de Maio (Cortizo & Sahuquillo 2006).



Fig. 1. Esquerda, forma rosada de *D. cantabrica*; Dereita, forma amarela de *D. cantabrica*. Pódese observar como ambas flores teñen puntos vermellos no labelo (Fotos P. Vázquez).

A orixe híbrida desta especie foi proposta por Pedersen (2006) en base a evidencias xenéticas, morfolóxicas e bioquímicas. De acordo con este autor, o tetraploide *D. cantabrica* orixínase por cruzamento entre a diploide *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó e a triploide *Dactylorhiza insularis* (Sommier) Landwehr.. As diferenzas morfolóxicas cos parentais (deixando a un lado as características citoxenéticas) radican no tamaño do esporón e das follas. En ambos casos os tamaños son intermedios en *D. cantabrica*, sendo maiores en *D. sambucina* e menores en *D. insularis*. Por outra banda, tanto *D. sambucina* como *D. cantabrica* teñen un maior número de pequenas manchas rosas no labelo, mentres que *D. insularis* só ten dúas e grandes. Ambas especies parentais solapan a súa distribución no Courel, sendo *D.sambucina* unha especie de ampla distribución en Europa e estando *D. insularis* restrinxida ó Mediterráneo occidental (Aedo & Herrero 2005)

Dactylorhiza cantabrica está fortemente ligada, dentro da Serra do Courel, a ambientes básicos; é dicir, lugares con afloramentos de rochas calizas. Trátase de zonas caracterizadas pola presenza de plantas herbáceas, onde non abundan as matogueiras (Hábitat 6210, de interese para a UE). Esta especie desenvólvese no Courel a diferentes altitudes (700-1400m) e en todas as orientacións. A disposición das bandas calizas no Courel fan que existan espazos con substrato de carácter básico arrodeados de outros tipos de rocha (Fig. 2), o que conleva a aparición de illas de vexetación que favorecen fenómenos de especiación (Brehm *et al.* 2003).



Fig 2. Nesta foto pódese observar unha tara, que é como se coñece na Serra do Courel ós afloramentos calcáreos caracterizados por unha menor densidade de fanerógamas de porte arbóreo e arbustivo. (Foto: C. Cortizo)

A distribución da especie en Galicia límítase á Serra do Courel (Fig. 3), aínda que existe unha cita de hai 30 anos na Serra dos Ancares (Cortizo & Sahuquillo 1998). Na Serra do Courel os exemplares de *D. cantabrica* atópanse principalmente nos arredores das aldeas de Noceda, Visuña, Campelo, Moreda, Órreos e Pedrafita. Na actualidade creáronse 4 microrreservas nas zonas onde esta orquídea é máis abundante (Alto do Couto, Alto da Pedra e Monte Cido e arredores de Visuña). (<http://www.custodiadoterritorio.org/microrreservas-da-serra-do-courel>).

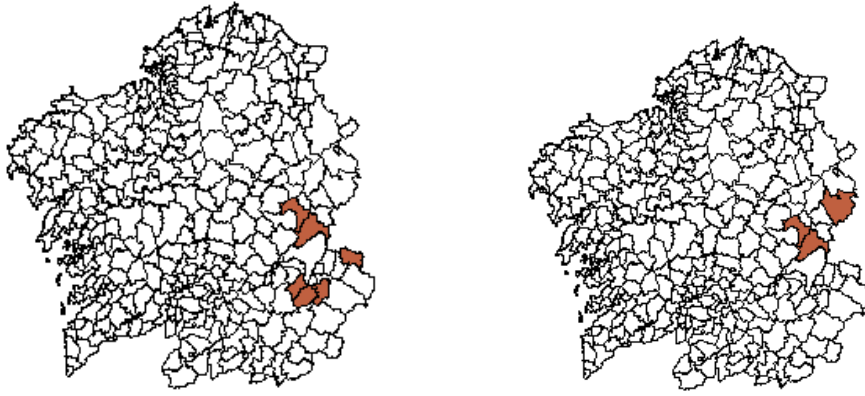


Fig. 3. Distribución en Galicia de *D. insularis* (esquerda) e *D. cantabrica* (dereita) por concellos. Fonte Cortizo & Sahuquillo, 2006

As orquídeas caracterízanse por ser un grupo de plantas cunha estrutura floral moi complexa adaptada á polinización por insectos, na que a súa relación cos polinizadores é variábel segundo a especie da que se trate (Classens & Kleynen 2016, Van der Cingel 1995). Existen dous tipos de reprodución ambos comúns na F. Orchidaceae:

i) autopolinización ou autogamia, na que a flor é polinizada polo seu propio pole, existindo un caso extremo que é a cleistogamia (as flores polinízanse antes de que a flor estea aberta).

ii) Alogamia ou polinización cruzada, na que o pole e o gameto feminino pertencen a diferentes flores, existindo diferentes tipos segundo a orixe/e ou destino. Os tipos principais son a xenogamia (a polinización realízase entre diferentes individuos), e a geitonogamia (a reprodución lévase a cabo entre distintas flores da mesma planta). Moitas orquídeas presentan mecanismos para evitar a autopolinización (Classens & Kleynen 2016). É moi importante citar que dentro das orquídeas aparece un alto grao de hibridación específica e interespecífica, o que provoca unha especiación moi elevada en períodos de tempo relativamente curtos así como unha dificultade maior de englobar moitas das especies nun tratamento taxonómico amplamente aceptado (Bateman et al. 2009, Cozzolino *et al.* 2006, Pridgeon *et al.* 2001).

As orquídeas seguen distintas estratexias para favorecer a polinización cruzada como son o ofrecemento de recompensas tanto de tipo nutricio (pole, pseudopole, aceites...), como refuxio ante condicións climáticas adversas ou outros beneficios como pode ser a camuflaxe dentro das flores (Classens & Kleynen 2016, Van der Cingel 1995). Nas orquídeas europeas é importante a estratexia do engano, pola cal os polinizadores visitan as plantas sen levar nada a cambio (Cozzolino *et al.* 2006). Os enganos poden ser por mimetismo (no que se produce un engano por imitación a outra especie, por exemplo a coloración ou por presentar esporóns e guías de mel como é o caso dalgunhas especies dos xéneros *Ochris* e

Dactylorhiza), ou por reclamo sexual, no que os machos de determinadas especies de insectos séntense atraídos pola forma das flores, que ademais emiten diversas sustancias olorosas de composición análoga ás feromonas dos insectos (Classens & Kleynen 2016, Véla et al 2007, Van der Cingel 1995). Outro mecanismo propio das orquídeas tropicais é a captura dos insectos. Estas orquídeas desenvolven unhas flores trampa que fan que os insectos escorreguen ó seu interior obrigándoos a entrar en contacto coas estruturas reprodutoras para saír. Ademais existen adaptacións fenolóxicas, como a floración temperá dada en flores que non aportan recompensas ós polinizadores e ten como obxectivo evitar competencia con outras flores realmente nutricias. Outra adaptación fenolóxica é a sincronización da floración, o que provoca un maior estímulo para os polinizadores e redunda nun maior éxito reprodutivo (Cortizo & Sahuquillo 2006).

A polinización no xénero *Dactylorhiza* e, en particular, nas especies de cor amarela, está asociada á estratexia do engano (Pridgeon *et al.* 2001). En xeral, trátase de especies que non producen néctar. A capacidade para atraer ós polinizadores ten que ver sobre todo co seu crecemento gregario, a súa rechamante cor amarela e a súa semellanza con flores nectaríferas (presenza de esporón, guías de mel no labelo; Pridgeon et al. 2001, Classens & Kleynen 2016). Para este xénero os polinizadores citados habitualmente son sobre todo himenópteros, da familia Apidae, en concreto raiñas de abellóns do xénero *Bombus*, e diferentes especies de abellas dos xéneros *Apis*, *Osmia* e *Andrena* (Van der Cingel 1995, Classens & Kleynen 2016). Nos estudos realizados en Suecia con *D. sambucina* as raiñas de abellóns formaban o 90% dos polinizadores que presentaban polinias (Van der Cingel 1995).

A zona de estudio: A Serra do Courel

Este sistema montañoso está situado no surlleste da provincia de Lugo e presenta unha orografía acusada na que as alturas varían entre os 350m, no Val do Lor, e os máis de 1630m de altitude nos picos Formigueiros e Piapáxaro. O seu río máis importante é o Lor que percorre a serra de NE a SE (Fig. 4).

O seu clima pódese definir como temperado oceánico con precipitacións abundantes e certa influencia mediterránea (Rigueiro *et al.* 2005). É importante destacar que debido a diferenza de altitudes anteriormente mencionada, existe unha gran diversidade de microclimas onde se poden atopar desde influencias mediterráneas moi marcadas, áreas temperadas e mesmo subalpinas (Rigueiro *et al.* 2005). Os ventos predominantes acostuman a ser de compoñente Norte (N,NNE,NE) ou Sur (S,SWW,SW) (Rigueiro *et al.* 2005).

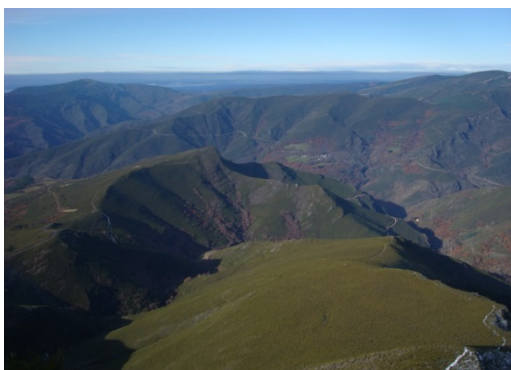


Fig. 4. Detalle dunha parte da Serra do Courel. Pódese observar o pico do Coto (1013m) no centro da foto e a aldea de Sobredo ó fondo. (Foto P. Vázquez)

A composición xeolóxica caracterízase pola presenza de pizarra mesturada con vetas calcáreas, filóns de cuarcita e minoritariamente vetas de ferro e outros minerais. A presenza destes tipos de rochas, cunha marcada diferenza de pH, xunto coas diferentes orientacións e pendentes orixina unha gran cantidade de ecosistemas nun espazo relativamente reducido e que non se pode atopar en ningunha outra parte de Galicia

Cabe destacar que as formacións vexetais naturais e seminaturais como as devesas, soutos, aciñeirais, sobreirais, pastos, uceiras, xesteiras, bosques de ribeira, biduales, están moi ben representadas na serra (Rigueiro *et al.* 2005). É importante destacar que a maior parte da serra pertence a rede Natura 2000 e está catalogada como zona de especial conservación (ZEC) pola Xunta de Galicia (DOGA nº 62, DECRETO 37/2014, de 27 de marzo).

2. Obxectivos:

- 1.-Estudar os mecanismos de reprodución de *Dactylorhiza cantabrica*.
- 2.-Avaliar a eficacia do test do Tetrazolio para cuantificar a viabilidade das sementes de orquídeas
- 3.-Coñecer os potenciais polinizadores de *Dactylorhiza cantabrica*.

3. Material e Métodos:

Podemos dividir este apartado en tres fases: a primeira na que se fan os cruzamentos, a segunda na que analizan os froitos e sementes e por último a observación de polinizadores.

Primeira fase: preparación dos cruzamentos:

Material necesario: Unha malla de poro fino, paus de 30cm , fíos de cores, pinzas, unha caixa con algún polímero adherente no interior, contafíos ou lupa, lápis e caderno de campo.

As plantas utilizadas para realizar os cruzamentos foron seleccionadas en zonas pouco visibles dende os camiños para evitar a perda de individuos manipulados por curiosos ou animais. Seleccionamos plantas que tiñan as inflorescencias con numerosas flores en bo estado. En cada individuo anotouse o número de flores, e marcamos aquelas que xa tiñan pole no estigma cun fío dunha determinada cor (considerado como polinización aberta) e as flores cleistógamas. Ademais realizáronse os cruces, asignando a cada tipo de cruzamento un fío dunha cor. Toda a información foi anotada no caderno de campo.

No caso das polinizacións manuais collemos polinias de diferentes plantas e/ou flores e gardámolas nunha caixa para colocalas despois no estigma utilizando unhas pinzas (Fig. 5). Cada flor polinizada marcábase cun fío, arredor do ovario, dunha cor concreta para cada tratamento, tomando nota da posición na inflorescencia de forma esquemática e protexendo a inflorescencia cunha malla de cor verde (Fig. 6).

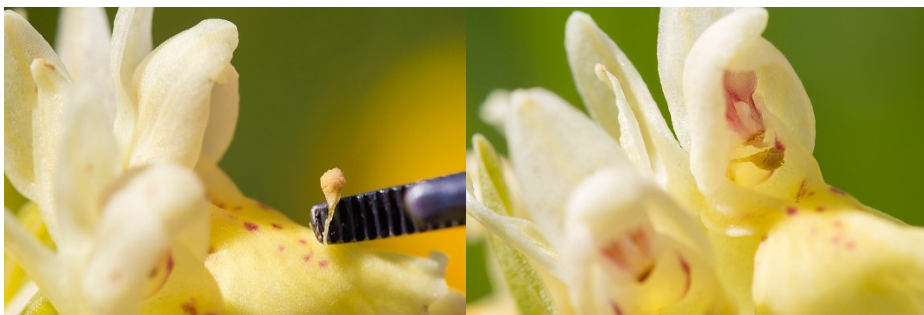


Fig. 5. Detalle dunha polinia a (esquerda) recién extraída da bursícula e polinia en contacto co estigma (dereita). (Fotos C. Cortizo)

Cruzamentos realizados:

- Cleistogamia (Cleist): Flor que se poliniza antes de que se abra co seu propio pole.
- Autogamia espontánea (AE): Flor polinizada polo seu pole sen a nosa axuda.
- Autogamia manual (AM): planta polinizada co pole da mesma flor mediada por persoas.
- Geitonogamia(GM): Polinización cruzada entre flores da mesma inflorescencia.
- Xenogamia (XM): Polinización cruzada entre diferentes plantas da mesma especie.
- DcXDi: Polinización cruzada na que se utiliza pole de *D. insularis* nunha flor de *D. cantábrica*.
- OM: Polinización cruzada con polen de *Ochris mascula* en *D. cantábrica*.
- Polinización aberta(PA): Flores que xa presentaban polen no estigma no momento de realizar os cruces.

O traballo de campo realizouse no mes de maio dos anos 2016 e 2017 e as sementes recolléronse a finais do mes de Xullo para as plantas polinizadas en 2016. Os froitos foron separados de cada individuo e gardados en sobres individuais, correctamente etiquetados co tipo de cruce realizado e a posición na inflorescencia. Os froitos procedentes do mesmo individuo, separados en sobres, gardáronse noutro sobre grande perfectamente etiquetado ate o momento do seu estudo.



Fig. 6. *D. cantabrica* cos fíos marcando as flores (esquerda) e estado da planta una vez que se realizaron os cruzamentos(dereita). As mallas impiden que calquera visitante poda alterar os tratamentos dados, á vez que protexe os froitos experimentais de posibles herbívoros (dereita). (Fotos C. Cortizo).

Segunda fase: Estudio de sementes e froitos e análises de datos

Material necesario: Papel milimetrado, lupa(OLYMPUS SZX9), cámara OLYMPUS c4040ZOOM, tubos eppendorf 1.5ml, porta- e cubreobxectos (24x32 mm), solución de sacarosa ó 10%, Solución de Tetrazolio ó 1%, micropipeta de 1ml, lanceta de punta plana, pipetas pasteur, flotador para baño termostático.

Cada froito foi fotografado sobre papel milimetrado baixo lupa binocular para tomar a medida do seu tamaño (Fig. 7). Posteriormente o froito foi aberto e todas as sementes foron introducidas nun tubo eppendorf de 1,5ml.



Fig. 7. Detalle dun froito baixo a lupa. (Foto P. Vázquez)

Para comprobar a viabilidade das sementes producidas utilizouse o método do Tetrazolio segundo o protocolo de Machado *et al.* (2009). Para elo engadiuse 1,5ml dunha solución de sacarosa ó 10% ás sementes no tubo eppendorf e deixáronse repousar 24 horas a temperatura ambiente (25°C aprox.). O día seguinte procedeuse a retirar a solución de sacarosa e engadiuse 1 ml de solución de Tetrazolio ó 1% deixando as mostras no baño termostático a 40°C durante 24 horas. Pasado este tempo retiramos o Tetrazolio e preparamos as mostras para a súa observación na lupa binocular engadindo 150µl de auga en cada tubo eppendorf. A mestura de auga e sementes foi traspasada do eppendorf a un portaobxectos utilizando una pipeta pasteur de plástico, unha lanceta de disección plana e unha micropipeta de 200 µl. A continuación cubríronse cun cubreobxectos e fixéronse con laca de uñas.

É importante citar que a manipulación das sementes é complexa debido o seu pequeno tamaño (tradicionalmente comparadas coas limaduras de ferro). Para estandarizar o protocolo e favorecer a inmersión das sementes (na sacarosa ou no Tetrazolio) inicialmente axitáronse os tubos eppendorf manualmente e centrifugáronse para que as sementes non quedasen repartidas polas paredes do tubo. Este tipo de probas non foron acaídas xa que observamos que no proceso

quedaban moitas sementes suspendidas ou perdidas (no exterior das puntas das micropipetas ou na parte superior dos tubos); ademais nos resultados non se acadou unha diferenza significativa na tinctura con respecto ó proceso de contaxe de sementes viables, que é laborioso pero eficaz.

Para facer os recontos das sementes fixéronse fotos coa lupa a 32,5 aumentos. Tiráronse de 3-5 fotos por mostra, en cuadrantes de $3 \times 3 \text{ mm}^2$, establecidos na preparación de forma semialeatoria (sempre que existira unha concentración mínima de 15 sementes por cuadrante). Para realizar o reconto usouse o software libre "ImageJ" (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). En cada cuadrante do portaobxectos contábanse o número de sementes separándoas en: tinguidas, viables (aspecto do embrión perfecto xunto coas sementes tinguidas), non viables e valeiras (Fig. 8). Ademais en cada cuadrante mediuse a lonxitude e diámetro de sementes (principalmente tinguidas e no caso de que non houbera suficientes, ou o tinte se estendera demasiado, usáronse as viables).

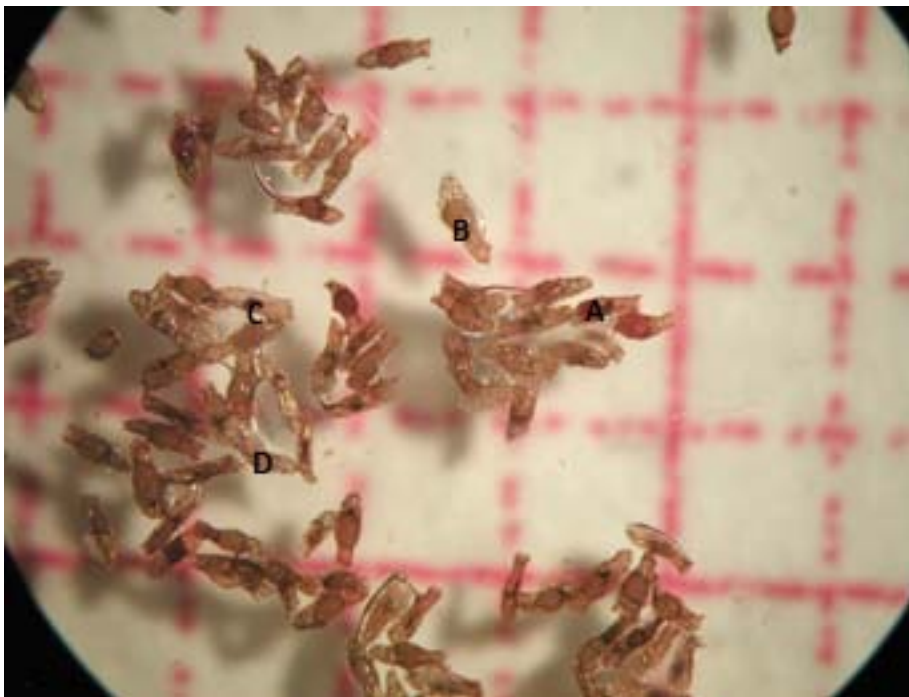


Fig. 8. Cuadrante onde aparecen sementes tinguidas (A), Viables sen tinctar (B), non viables (C) e valeiras (D). (Foto P. Vázquez)

Os datos tomados almacenáronse en bases de datos realizadas utilizando o programa Excell 2010. Para os conxuntos de datos realizouse unha análise descritiva (medias, desviacións típicas, detección de outliers, máximos e mínimos, elaboración de histogramas, etc.) e para detectar a existencia de diferenzas significativas entre tratamentos o ANOVA dunha vía utilizando o programa SPSS 17.0 ou a proba de Kruskal-Wallis naqueles casos onde os datos non se axustaban a distribución normal co programa Graphpad Prism 7. Os datos foron estandarizados utilizando a transformación arcoseno da raíz cuadrada do dato, método recomendado cando se traballa con porcentaxes (Vale 2015).

Terceira fase: observación de polinizadores.

Material necesario: Lupa ou contafíos, solución de alcohol ó 70%, botes de cristal, rede cazabolboretas, caderno de campo, lapis, cronómetro e cámara de fotos.

Para realizar este estudo piloto, escolleuse o lugar para realizar as observacións pola presenza de ó menos 15 individuos de *D.cantabrica* en bo estado de conservación e coa maioría das flores sen polinizar. As observacións realizáronse en horario de 9 a 15h da mañá, en intervalos de 30min separados por 15min de descanso, durante 3 días consecutivos do mes de maio do ano 2017. Os obxectivos plantexados foron, en primeiro lugar, determinar o momento máis acaído para realizar o estudo de polinizadores. En segundo lugar tentouse detectar posibles polinizadores que portasen as polinias

Durante as observacións anotáronse os datos facendo distinción segundo se os potenciais polinizadores voaban preto das flores, se se pousaban nunha flor ou en varias, se se introducía dentro dalgunha flor e se levaban as polinias. Unha vez que observabamos algún polinizador tentamos de fotografalo ou collelo para unha posterior identificación.

Os datos destas observacións recopiláronse nunha Táboa xerada no programa Excell versión 2010. Para a identificación utilizouse o libro: “Guía de los insectos de Europa” e tamén se contou coa colaboración da profesora María José Servia.

4. Resultados

En total estudáronse 19 individuos (10 no Alto do Couto e 9 no Alto da Pedra). Na Táboa 1 reflíctese o número de froitos totais analizados para cada tratamento, que oscilaron dende os 8 para a Cleistogamia (7 no Alto do Couto e 1 no Alto da Pedra) ata os 17 para a Autopolinización Espontánea (9 no Couto e 8 na Pedra), a Autogamia Manual (8 no Couto e 9 na Pedra) ou a Xenogamia Manual (10 no Couto e 7 na Pedra). Como o tamaño de ambas poboacións é pequeno e as

características edafoclimáticas de ambos lugares son parecidas decidimos xuntalas a hora de facer a análise estatística e poder ter un maior espazo mostral.

Táboa 1. Número total de froitos por tratamento e poboación.(códigos dos tratamentos na pax. 10)

Pop.	AE	AM	Cleist	DcxDi	GM	OM	PA	XM	TOTAL
Couto	9	8	7	0	9	7	6	10	56
Pedra	8	9	1	7	7	5	8	7	52
Total	17	17	8	7	16	12	14	17	108

Os tamaños dos froitos nos distintos tratamentos foron bastante parecidos, oscilando a media entre os 14,78mm da Polinización Aberta e os 19,52mm para o cruce entre *D. cantabrica* e *D.insularis* (Táboa 2). O tratamento que presentou maior dispersión dos datos foi a Polinización Aberta, aínda que se observaba todo o rango de tamaños común ó resto de tratamentos. En xeral, os tamaños oscilaron entre 16-18mm. O tratamento que presentou menor dispersión foi a autopolinización Espontánea (Táboa 2, Fig.9).

Táboa 2. Datos descritivos para a lonxitude dos froitos en relación con cada tratamento (mm).

Trat.	Media (mm)	Mediana (mm)	D.T. (mm)
AE	17,94	17,74	1,50
AM	16,88	16,87	1,38
cleist	17,69	17,80	3,06
DcxDi	19,52	18,94	2,03
GM	17,26	17,55	1,93
OM	18,31	19,12	2,61
PA	14,78	15,50	4,30
XM	17,12	17,00	2,61

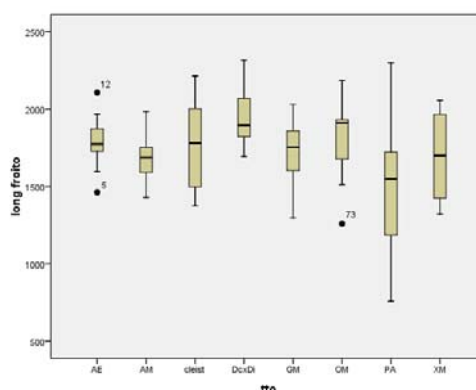


Fig. 9. Diagrama de caixas que reflicta a dispersión dos datos para cada tratamento realizado

En canto os datos atípicos, comprobouse que son medidas excepcionais en froitos anomalamente grandes ou pequenos. Os datos obtidos para cada tratamento axústanse a distribución normal.

3.1.-Análise da viabilidade das sementes

O número total de sementes analizadas no conxunto de froitos foi 10742. Na Táboa 3 indícanse os datos globais por tratamento, diferenciando entre sementes viables (as que tiñan bo aspecto xunto coas tinguidas) ,tinguidas, non viables e valeiras.

Táboa 3. Número de sementes por tratamento e poboación. (códigos dos tratamentos na pax. 10)

Trat.	AE	AM	Cleist	DcxDI	GM	OM	PA	XM	TOTAL
Total	2339	1246	1216	816	1185	1148	1614	1177	10741

O tratamento onde se obtivo un maior número de sementes foi autopolinización Espontánea (2339) sendo menor no cruzamento realizado entre *D.cantabrica* e *D.insularis*, o que coincide o menor número de froitos estudados (Táboa 3). Nos outros dous tratamentos nos que se analizou un elevado número de froitos (17 en AM e XM) o número de sementes obtido foi considerablemente menor que para a autopolinización espontánea (1246 en AM e 1177 en XM) cun número igual de froitos analizados (17).

Na Táboa 4 pódese observar que o número de sementes viables (estabelecido polo seu aspecto, tinguidas o non) é en xeral bastante elevado e similar en todos os tratamentos (entre o 62 e o 69%). Só dous casos presentaban unha maior porcentaxe, a cleistogamia (79%) e a geitonogamia (73%). A dispersión dos datos é tamén moi parecida en todos os tratamentos (Fig. 10), só no cruce interespecífico os valores presentan menor rango de variación, o que coincide co menor número de froitos estudados e de sementes recollidas. Cando se observa os datos das sementes viables pero tinguidas, sí se detecta unha maior variación na media. Os froitos producidos por cleistogamia son os que presentan unha maior porcentaxe de viabilidade (43%), namentres as cápsulas orixinadas por geitonogamia, autogamia espontánea ou cruzamento interespecífico entre *D. cantabrica* e *D. insularis* producen un 34%, 19% e 18% de sementes viables, respectivamente.

Con respecto ás sementes non viables, a cleistogamia é a que presenta unha menor porcentaxe de sementes non viables (9%), sendo a autogamia manual onde se atopa unha maior porcentaxe de sementes non viables (23%), o que non debería ser esperable dado o resultado observado na cleistogamia (Táboa 4, Fig. 10).

Táboa 4. Datos descriptivos para as sementes. Tra.=tratamento, M=media, m=mediana, D.t.= desviación típica

Trat.	VIABLES			TINGUIDAS			NON VIABLES			VALEIRAS		
	M	m	D.t.	M	m	D.t.	M	m	D.t.	M	m	D.t.
AE	0,63	0,62	0,13	0,19	0,12	0,18	0,17	0,18	0,08	0,19	0,19	0,08
AM	0,62	0,68	0,15	0,21	0,21	0,18	0,23	0,19	0,12	0,15	0,13	0,07
Cleist	0,79	0,83	0,13	0,43	0,45	0,13	0,09	0,09	0,03	0,12	0,09	0,09
DcxDi	0,63	0,63	0,10	0,18	0,18	0,13	0,20	0,15	0,09	0,17	0,18	0,07
GM	0,73	0,73	0,07	0,34	0,35	0,15	0,16	0,13	0,08	0,12	0,11	0,05
OM	0,69	0,76	0,17	0,26	0,33	0,19	0,15	0,14	0,10	0,17	0,14	0,09
PA	0,69	0,69	0,09	0,36	0,36	0,11	0,15	0,16	0,04	0,16	0,15	0,07
XM	0,66	0,67	0,14	0,24	0,25	0,17	0,20	0,16	0,15	0,14	0,13	0,05

Os valores de sementes valeiras son bastante parecidos en todos os tratamentos e non moi elevados (12-19%). As variacións na media das sementes valeiras é moito máis pequena, dende o 5% na xenogamia ate o 9% na cleistogamia ou no cruce interxenérico con *Orchis mascula* (OM). Cabe destacar que a maioría de froitos de cleistogamia proveñen dunha única planta, polo que pode que os datos non sexan representativos (Táboa 4, Fig. 10).

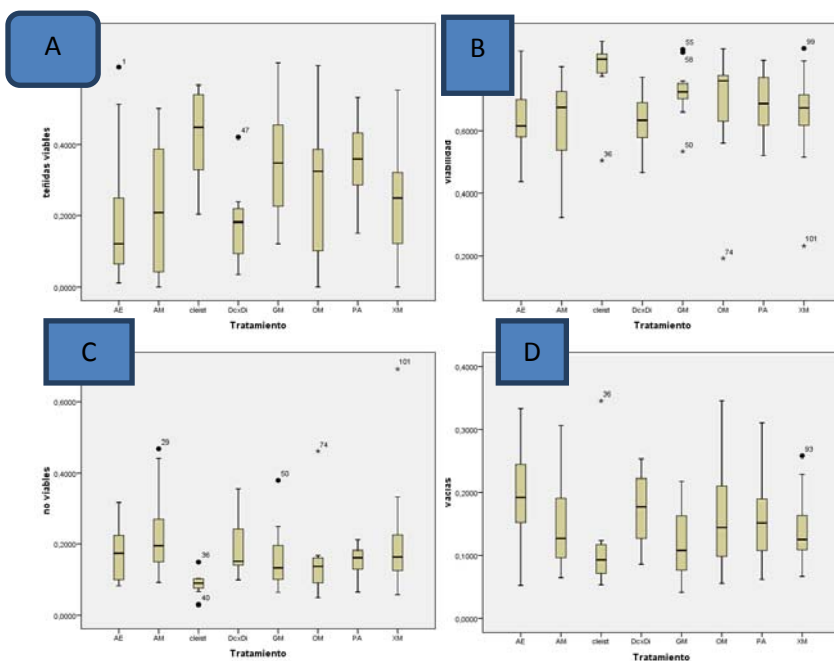


Fig. 10. Diagramas de caixas onde se reflicte a distribución dos datos para cada tratamento. A) tinguidas, B) viables, C) non viables, D) valeiras

Os datos atípicos que aparecen na Fig. 10, son datos correctos. Detectándose froitos que ou ben presentaban un número excesivo de sementes ou este era pequeno.

Debido ó efecto desigual do test do Tetrazolio, xa que moitas sementes co embrión ben desenvolvido non resultaron tinguidas, realizouse unha comparación de medias e desviacións en ambos casos (viabes e tinguidas). Na Figura 11 refléxase a comparación entre os datos estandarizados.

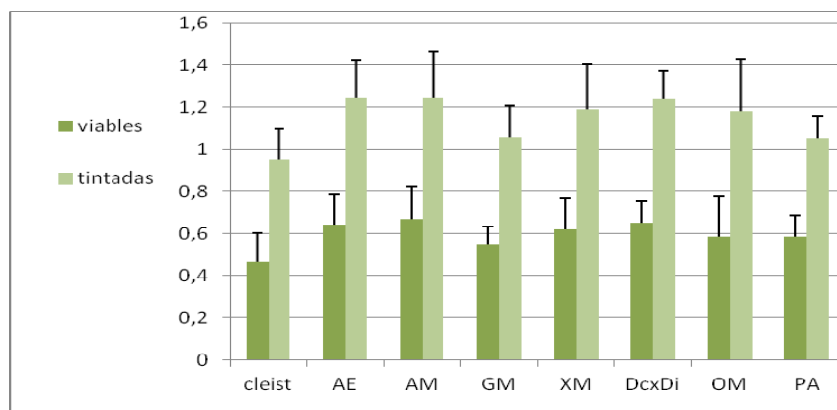


Fig. 11. Diagrama comparativo entre os valores de sementes tinguidas e viabes, cos datos estandarizados. codigos dos tratamentos na pax. 10)

Previo á realización do ANOVA comprobouse o axuste dos datos a unha distribución normal. En xeral, case todos os tratamentos se axustaban excepto os datos da cleistogamia e da xenogamia nas sementes viabes, da autogamia manual, geitonogamia, xenogamia e no cruce con *Orchis mascula* para non viabes e da cleistogamia en valeiras.

Os resultados do ANOVA indícanse na Táboa 5 e pódese observar que hai diferenzas significativas ou moi significativas para os tratamentos nas sementes viabes, tinguidas e non viabes. Sendo non significativa a diferenza observada nas sementes valeiras.

Táboa 5. Resultados do ANOVA. Diferenzas entre tratamentos significativas= *, diferenzas moi significativas= **, NS= no significativas

Sementes viabilidade	ANOVA	HOMOXENEIDADE VARIANZAS	NORMALIDAD RESIDUOS
VIABLES	*	NS	OM, XM CLEIST
TINGUIDAS	**	*	NORMALES
NO VIABLES	*	NS	OM, XM
VALEIRAS	NS	NS	CLEIST

Dados os problemas de normalidade dos residuos e nun caso de homoxenidade das varianzas, estes resultados deben ser observados con cautela. Dados estes resultados realizouse a proba de Kruskall-Wallis na que se observou que as diferenzas significativas viñan dadas pola comparación entre Cleistogamia e

algúns dos tratamentos (Cleistogamia vs AE ou AM, tanto nos datos estandarizados como non).

3.2.- Estudo tamaño sementes

Na Táboa 6 indícanse os valores do diámetro e lonxitude das sementes nos diferentes tratamentos. Podemos observar que as medias mantéñense en torno ós 0,13 mm de diámetro tendo un máximo de 0,15mm en OM e un mínimo de 0,13mm en PA. A diferenza parece mínima e pode ser debido á selección visual das sementes. O mesmo pasa na media da lonxitude que varía entre un 0,47mm de AE e un 0,43mm de XM. Ademais parece non gardar relación o largo co diámetro polo que non hai un claro aumento ou diminución de volume segundo o tratamento.

Táboa 6. Datos descritivos do tamaño das sementes nos diferentes tratamentos. Tra.=tratamento, M=media, m=mediana, D.t.= desviación típica

Tra.	Diámetro(mm)			Lonxitude(mm)		
	M.	m.	D.t.	M	m	D. t.
AE	0,138	0,138	0,024	0,470	0,469	0,049
AM	0,133	0,132	0,026	0,449	0,454	0,062
cleist	0,129	0,13	0,023	0,460	0,462	0,057
DcxDi	0,146	0,143	0,029	0,469	0,466	0,051
GM	0,131	0,1295	0,023	0,440	0,4365	0,057
OM	0,147	0,147	0,028	0,482	0,485	0,062
PA	0,128	0,128	0,025	0,462	0,461	0,052
XM	0,129	0,128	0,022	0,440	0,433	0,060

A dispersión dos datos obtidos para o diámetro e a lonxitude das sementes entre tratamentos reflíctense no diagrama de caixas e é similar en todos os casos (Fig. 12). Neste gráfico obsérvanse moitos datos atípicos o que indica unha gran variabilidade en canto a diámetros e lonxitudes das sementes. Aínda así, pese a estas diferenzas parece que non gardan relación cos tratamentos.

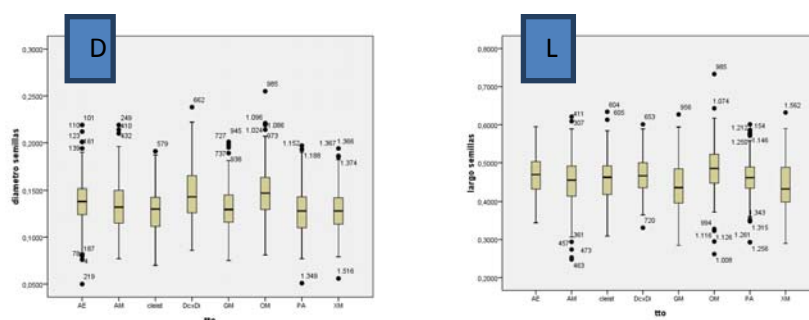


Fig.12. Diagrama de caixas que reflicte a dispersión do diámetro (D) e lonxitude (L) das sementes.

No test de normalidade puidemos observar que os datos non teñen unha distribución normal para os tratamentos AM e OM no diámetro e OM na lonxitude.

3.3.-Estudo de polinizadores.

Tras os tres días de observación os resultados obtidos indican que dentro do rango horario no que se fixo a observación (de 10:00h a 15:00h) os momentos de máxima actividade foron entre as 11:00h e as 13:00h. Durante o tempo de observación os insectos que máis visitaron as flores de *D. cantabrica* foron himenópteros pertencentes á familia das *Apidae*, concretamente o xénero *Bombus* (Fig. 13).

Ademais, observáronse unha serie de insectos e arácnidos de menor tamaño que entraban nas flores ou que se paseaban pola súa superficie, pero en ningún caso observamos animais coas polinias adheridas. Os insectos pertencían ás ordenes Hymenoptera (Formicidae, Vespidae), Heteroptera, Lepidoptera e Coleoptera (Cerambicidae, Coccinellidae) (Fig. 14)

Como se pode observar na Táboa 7, os insectos que máis interaccionaron coas flores de *D.cantabrica* foron abellóns e abellas que xeralmente visitaban unha o dúas flores, pero que rapidamente abandonaban a planta en busca doutras plantas portadoras de néctar como *Lithodora diffusa* (Lag.) I.M.Johnston (moi abundosa nese momento).

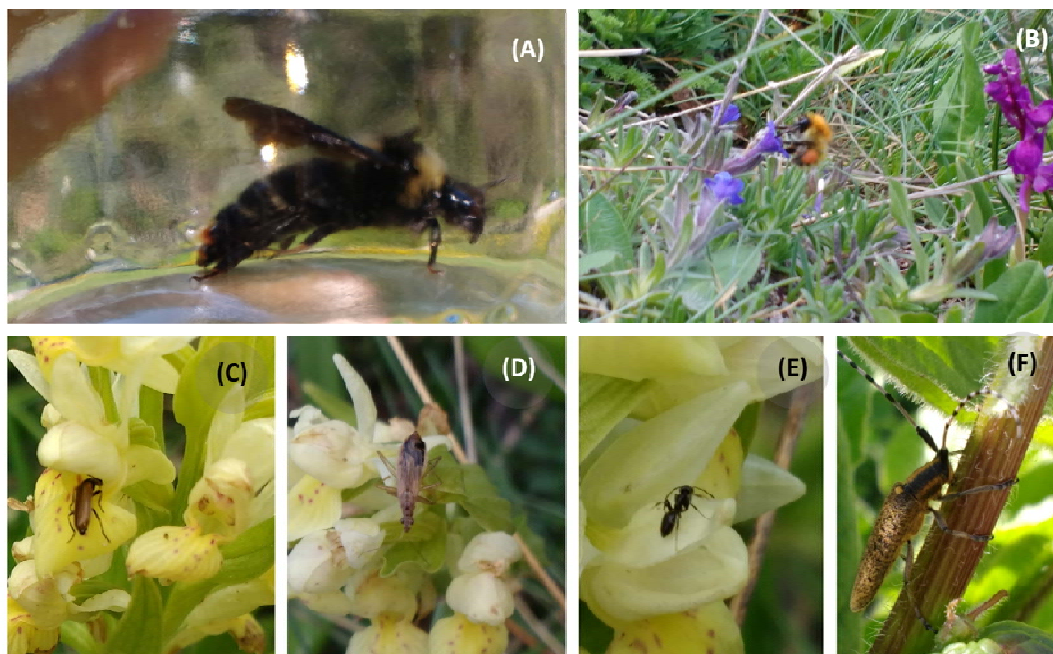


Fig.13. Imaxes dos xéneros *Apis* (A) e *Bombus* (B) e dos insectos percorrendo as flores de *D. cantabrica*: Cantaridae(C), Hebridae (D), Formicidae (E) e Cerambiceae(F)

Táboa 7. Tipo de interacción dos diferentes tipos de insectos que visitaron as plantas de *D. cantabrica*

Animais	Voando ó redor	visita 1 flor	Visita varias flores	Introdúcese na flor
Apidae (<i>Bombus</i> sp.)	*****	**	**	
Diptera (non idntif.)	**	*		
Coleoptera (non idntif.)			**	*
Lepidoptera		*		
Cerambycidae	*		*	
Heteroptera	*			
Apidae (<i>Apis</i> sp.)	**			
Formicidae			****	***
Aracnida			*	
Culicidae	*	*		*
Cepidopterae	*			
Vespidae	*			
Coccinellidae		*		
Cantaridae			*	*

5.Discusión:

Dactylorhiza cantabrica é unha planta que presenta unha distribución irregular en “pequenas illas poboacionais”, con aparentemente moi pouca dependencia dos polinizadores e sen unha estratexia clara de reprodución.

Nos resultados obtidos sobre o tamaño dos froitos púidose observar que non existían diferenzas significativas por tratamento, á vez que tras todos os cruzamentos producíronse froitos con sementes viables (Fig. 10, Táboa 4).

Os resultados deste estudo indican que non existe unha gran diferenza entre a viabilidade das sementes malia as grandes diferenzas nos tipos de cruzamento realizados. Aínda cando se levou a cabo o cruce entre especies pertencentes a xéneros diferentes, a viabilidade das sementes obtidas foi moi similar á que tivo a flor alógama ou autógena (Fig. 11). Este resultado, en principio, non sería tan sorprendente xa que é coñecido que nas orquídeas a hibridación é un fenómeno moi común tanto intra- como interxenérica (Cozzolino *et al.* 2005, Pridgeon *et al.*

2001). Ademais, por outra banda, é importante tamén sinalar que debido a que as sementes das orquídeas non presentan endosperma precisan dunha conxunción de factores para poder xerminar como a existencia de determinado pH, presenza de fungos específicos ou condicións climáticas especiais. Isto conleva unha estratexia de producir unha gran cantidade de sementes para así poder asegurar a súa perpetuación (Arditti 1992). Neste caso observamos unha maior viabilidade de sementes nas flores cleistógamas (tanto totais coma tinguidas). No resto dos cruces os valores mantíñanse cunha variación menor ou igual o 11% (Táboa 4). A viabilidade das sementes non aumentou ou diminuíu en relación coa autopolinización ou coa alogamia, sexa do tipo que sexa (xenogamia, geitonogamia ou cruce con outras especies (Táboa 4, Fig 10 e 11). Este resultado é canto menos diferente ó esperado, xa que tratándose de plantas con tantos condicionamentos para reproducirse, sería esperable que buscasen obter unha maior diversidade xenética que lles dese ó seus descendentes unha maior capacidade de sobrevivir.

Neste estudo púxose de manifesto que a efectividade do test do Tetrazolio pode ser discutible debido á elevada porcentaxe de sementes de aparencia viables pero non tinguidas observadas (Táboa 4). A interpretación destes resultados leva a pensar que moitas das sementes que aparentemente son viables realmente non o son ou que a tinción non é eficaz. Neste estudo as sementes viables tiñan unha diferenza, na maioría dos casos, por enriba do dobre das tinguidas. De todas formas parece que este método pode servir para facer contaxes rápidas de viabilidade de *D. cantabrica*, xa que a relación entre sementes tinguidas e viables mantense por tratamento, aínda que sería necesario realizar uns controis para poder coñecer cal é realmente a diferenza entre sementes viables con embrión ben desenvolvido e as “tinguidas”. As veces é difícil coñecer se algunhas sementes están tinguidas ou non, debido a que o Tetrazolio pode facer tincións “intermedias” que son difíciles de clasificar. Contrastando na bibliografía observamos que en certas especies de gramíneas fai falta pinchar ou cortar a testa da semente para que o Tetrazolio entre en contacto co embrión (Ruiz 2009). Esta podería ser unha das razóns polas que non todas as sementes aparentemente viables foron tinguidas.

En relación á lonxitude e diámetro das sementes, púidose ver como existían claramente algunhas diferenzas en canto o tamaño, pero non se observou unha relación de aumento ou diminución destes valores para as sementes cos tratamentos realizados (Fig. 12 Táboa,6).

Dados os resultados obtidos e tendo en conta as súas limitacións, as flores cleistógamas son as máis exitosas, seguidas das que presentan polinización aberta, polo tanto cabería pensar en unha estratexia reprodutiva múltiple por parte desta especie. Pero os datos obtidos no resto dos tratamentos fai pensar ca igual que un dos seus parentais (*D. insularis*, Pedersen 2006), podería tratarse dunha especie partenoxénica. Debido o planeamento do experimento non podemos ter seguridade se nas flores marcadas como Autogamia Espontánea así como as Cleistogamas existiu realmente unha reprodución sexual ou pola contra foi asexual

(partenoxénesis). Tampouco se fixeron estudos previos para a verificación do funcionamento das masas polínicas, xa que en todo momento se asumiu a existencia de reprodución sexual. A teoría da partenoxénesis podería explicar a pouca variación que existe na viabilidade das sementes nos diferentes tratamentos.

En relación ós polinizadores hai que ter en conta que este foi un experimento para poñer a punto a metodoloxía. Por unha parte o protocolo plantexado parece acaído, (aínda que só puidemos ir tres días a observar as plantas e cando a floración estaba xa un pouco avanzada). O mellor momento no que se debe realizar este experimento é cando as flores acaban de abrir, xa que neste intre obsérvase unha maior atracción de insectos polas flores novas. Outro aspecto a ter en conta é que só se fixo recoñecemento de polinizadores ate as 15:00h, e por observacións realizadas na contorna a actividade dos insectos parece ter outro pico no solpor. A maior actividade de polinizadores prodúcese entre as 11 e as 13,00h.

As observacións realizadas indican que os potenciais polinizadores probablemente pertencen á Familia *Apidae*, principalmente *Bombus*, o que coincidiría coa bibliografía existente sobre o xénero *Dactylorhiza* (Claessens & Kleyne 2016; Van der Cingel 1995). Aínda que non puidemos ver ningún insecto coas polinias adheridas, tampouco descartamos que outros pequenos organismos como formigas e arañas poidan exercer de polinizadores casuais. De todos xeitos supoñemos que sería unha porcentaxe residual, xa que o pequeno tamaño de estes impídelles dislocar ou recibir polinias sobre o seu corpo (Claessens & Kleyne 2016; Van der Cingel 1995)

O carácter endémico desta planta e a súa reducida poboación fai necesaria a toma de medidas para a súa conservación. polo tanto sería importante un mellor coñecemento da súa bioloxía. Ademais cabe destacar que, sendo unha planta de distribución tan restrinxida, as súas proteccións sexan xeneralistas (incluída nos espazos da Rede Natura, ZEC, e microrreservas de flora). É importante sinalar que a día de hoxe non presenta un grao de protección que impida que se leven a cabo tarefas como repoboacións forestais, conversión a pastizais, apertura de novas pistas, etc. que poden danar as súas poboacións. Se ben a labor das microrreservas (de carácter temporal) está a dar os seus froitos no que se refire a catalogación de especies, así como na concienciación, delimitación e mantemento destes lugares cunha biodiversidade botánica tan excepcional, estes esforzos resultan insuficientes. Ademais, hai que sinalar que, dado o seu carácter endémico e as particularidades biolóxicas detectadas, *D. cantabrica*, debería incluírse, na nosa opinión, na lista de especies protexidas de Galicia. Por último, a existencia desta especie na Serra do Courel, unida á elevada biodiversidade que abrangue (Guitián *et al.* 1995) fai necesario catalogar a Serra do Courel como parque natural e/ou dentro dalgunha outra figura de especial protección (como poden ser tamén as Reservas da Biosfera) para asegurar a súa conservación.

Para completar este traballo no futuro sería interesante realizar novos cruzamentos pero eliminando as polinias de todas as flores, incluso as que presentan o estigma con pole. Asimesmo, habería que analizar a viabilidade do pole, aumentar o número de individuos analizados en cada tratamento e verificar a viabilidade real das sementes. Tamén sería interesante coñecer máis detalles sobre a bioloxía da especie (fungos cos que micorrizan, estudo citoxenético da especie e dos parentais, condicións necesarias para o seu desenvolvemento, alelopatías, etc.). Para finalizar, será necesario completar o estudo dos polinizadores, aumentando o tempo de observación ó solpor e conseguir observar polinizadores coas polinias adheridas.

6. Conclusións:

- 1.-- Os resultados obtidos parecen apoiar que *Dactylohriza cantabrica* ben presenta unha estratexia de reprodución múltiple ou ben reproducése partenoxenicamente.
- 2.- O Test do Tetrazolio, empregado na análise da viabilidade das sementes de orquídeas, necesita ser testado na súa eficacia, se ben pode ser utilizado como orientativo.
- 3.-Os principais polinizadores semellan pertencer á familia das *Apidae* aínda que non se observaron polinias adheridas en ningún exemplar, e tampouco se descarta que outros insectos realicen unha polinización casual.

6. Conclusions:

- 1.- Our results indicate that either *D. cantabrica* may readily reproduce across ploidy lines or this species might be parthenogenetic.
- 2.-The suitability of the use of Tetrazolium to analyze the viability of orchid seeds needs to be tested before study, although it is useful to obtain exploratory results.
- 3.-Insects of the F. *Apidae* seem to be the main pollinators of *D. cantabrica*, although no insect was observed with pollinia attached. We cannot rule out that other insects also pollinate this taxon.

7. Agradecementos:

A Manuel Pimentel e Irene Lema por axudarme no laboratorio cando tiña dúbidas, a Alba López por continuar analizando as sementes, a Carlos Cortizo por cederme imaxes para este traballo e mostrarme as variedades rosadas, a Danny Rojas polos consellos a nivel de estadística e a Maria José Servia por axudarme ca identificación dos polinizadores. Sobre todo grazas a Ángel Vale e Elvira Sahuquillo por guiarme e axudarme neste traballo e inculcarme a súa paixón polas orquídeas.

8. Referencias bibliográficas

Aedo, C. & Herrero, A. 2005. *Smilacaceae-Orchidaceae*, vol. XXI. In: *Flora Iberica*. Castroviejo S. *et al.* (ed.). Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid, España.

Aguado L.O., Ferreres A. & Viñuela E. 2009. *Guía de campo de los polinizadores de España*. Ediciones Mundi-Prensa. Meres España.

Arditti, J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA.

Bournérias M.1998.*Les orchidées de France, Belgique et Luxembourg*. Parthenipe Collection. París, Francia.

Brehm A., Jesus J., Spinola H., Alves C., Vicente L. & Harris D.J.2003., Phylogeography of the Madeiran endemic lizard *Lacerta dugesii* inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*..26.(222-230).

Chinery M.1988.*Guía de los insectos de Europa*. Barcelona, España.

Claessens J. & Kleynen J. 2016. *Orchidées d'Europe. Fleur et pollinisation*. Biotope éditions. Mèze. France.

Cortizo C. & Sahuquillo E. 2006. *Guía das orquídeas de Galicia*. Baía Edicións. A Coruña, España.

Cortizo C. & Sahuquillo E. 1998. La familia Orchidaceae en Galicia (N.O. Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compostelana*. 9: 125-198.

Cozzolino A.M., Nardella A.M., Impagliazzo S., Widmer A. & Lexer C. 2006. Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones?. *Biological conservation* (P.14-23).

Delforge P. 2002 *Guía de las orquídeas de España y Europa Norte de África y Próximo*. Lynx edicions. Barcelona, España.

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**: 953-958.

Guitián F., Barral M.T., Cabaneiro A., Calvo R.M., Carballas M.T., Díaz F., García J., Gil F., Gimenez M., Guitián F., Leirós M.C., Pérez R., Silva B., Villar M.C., Sevillano I., Amigo J., Guitián J., López B., Guitián J. & López J.M. 1985. *O Caurel. Monografías de la universidad de Santiago de Compostela*. Santiago de Compostela, España.

Jersáková J., Johnson S.D., Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**: 219–235.

Liu K.W., Liu Z.J., Huang L.Q., Li L.Q., Chen L.J. & Tang G.D. 2006. Self-fertilization strategy in an orchid. *Nature*. **441**: 945.

Machado-Neto M.B., Custódio C.C., Hosomi S.T., Seaton P.T., Marks T.R. 2009. Protocolo para pruebas de Tetrazolio en semillas de orquídeas. *Darwin initiative*.

Pedersen H. 2006. Systematic and evolution of the *Dactylhoriza romana/sambucina* polyploid complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **152**: 405–434.

Pridgeon A. M., Phillip J., Crib, & Chase M. 2001. *Genera Orchidacearum. Volume 2 Orchidoideae (Part one)*. Oxford university press. Nova lork, Estados Unidos.

Rigueiro A., Ramil P., Crecente T., Rodríguez M.A., Ruiz J. & Fernandez R. 2005. *Plan de ordenación de los recursos naturais Espacio protegido Os Ancares-Courel*. Xunta de Galicia consellería de medio ambiente Dirección Xeral de Conservación da Natureza. Lugo, España.

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. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 1–54.

Ruiz M.A. 2009. El análisis del Tetrazolio en el control de calidad de semillas. *Publicación técnica, Caso de estudio: cebadilla chaqueña. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Anguil la Pampa, Argentina.

Vale Á. 2015 *Deceptive pollination reproductive success and niche evolution in the Broughtonia Alliance (Orchidaceae) a phylogenetic approach*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo.

Van der Cingel, N.A. 1995. *An atlas of orchid pollination. European orchids*. A.a. Balkema. Rotterdam.

Véla, E., Tirard, A., Renucci, M., Suehs, C.M. & Provost, E. (2009). Floral Chemical Signatures in the Genus *Ophrys* L. (Orchidaceae): A Preliminary Test of a New Tool for Taxonomy and Evolution. *Plant Molecular Biology Reporter* **25**(3):83–97.