

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

GRADO EN BIOLOGÍA

MEMORIA DE TRABAJO DE FIN DE GRADO

Estudo do mecanismo de reprodución en *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae)

Estudio del mecanismo de reprodución en *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae)

Study of breeding system of *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae)



Eva Pardo Otero

Junio, 2019

Director Académico: Elvira Sahuquillo

Codirector: Graciela Estévez

ÍNDICE

Resumen/Summary

Palabras clave/Keywords

Autorización de las Directoras

1. Introducción	1
1.1. Origen y morfología de <i>Dactylorhiza cantabrica</i> Pedersen	2
1.2. Distribución. Sierra del Caurel	4
2. Objetivos	4
3. Material y métodos	5
3.1. Material	5
3.2. Métodos	5
3.2.1. Obtención de los datos	6
3.2.2. Prueba de viabilidad de las semillas: test del Tetrazolio (Custódio et al, 2016).	6
a. Primera fase: Sacarosa	7
b. Segunda fase: Tetrazolio	7
i. Puesta a punto del proceso	7
c. Tercera fase: Visualización de las muestras	8
3.3. Tratamiento estadístico	9
4. Resultados	10
4.1. Análisis estadístico para los frutos	11
4.2. Análisis estadístico de la viabilidad de las semillas	13
4.3. Comparación entre datos de distintos años	15
5. Discusión	18
6. Conclusiones	21
7. Bibliografía	22

Resumen

Dactylorhiza cantabrica Pedersen es una orquídea endémica de la Serra do Caurel (Lugo, Galicia), que vive principalmente en los pastizales desarrollados sobre afloramientos calizos en esa sierra (Hábitat 6210). Este estudio se planteó con el objetivo de aportar más información sobre la biología reproductiva de este endemismo, que presenta reducidas y dispersas poblaciones en las montañas del Caurel. Para ello se realizaron cinco tratamientos de polinización: autogamia manual, geitonogamia manual, xenogamia manual, polinización abierta y, así mismo se practicó un cruce con una especie con la que comparte periodo de floración, *Orchis mascula* L. El análisis de datos consistió en comparar el tamaño de los frutos, el número de semillas que incluían y la viabilidad de las mismas, determinada por el Test del Tetrazolio. El tratamiento estadístico se realizó utilizando el programa RStudio. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes y sugieren que *D. cantabrica* presenta o bien un mecanismo de polinización inespecífico o se trata de una especie apomíctica. Además, resaltan la importancia de adaptar el protocolo del test de Tetrazolio a las características de la especie que se está analizando y utilizar un control del funcionamiento del test.

Palabras clave: orquídea, polinización, estrategia reproductiva, Tetrazolio

Resumo

Dactylorhiza cantabrica Pedersen é unha orquídea endémica da Serra do Caurel (Lugo, Galicia), que vive principalmente nos pasteiros desenvolto sobre afloramientos calizos (Hábitat 6210). Este estudo deseñouse co obxectivo de achegar máis información sobre a bioloxía reprodutiva deste endemismo, que presenta reducidas e dispersas poboacións nas montañas do Caurel. Para iso realizáronse cinco tratamentos de polinización: autogamia manual, xeitonogamia manual, xenogamia manual, polinización aberta e, ademais, practicouse un cruzamento cunha especie coa que comparte período de floración, *Orchis mascula* L. A análise de datos consistiu en comparar o tamaño dos froitos, o número de sementes que incluían e a viabilidade das mesmas, determinada polo Test do Tetrazolio. O tratamento estatístico realizouse utilizando o programa RStudio. Os resultados obtidos non foron concluíntes e suxiren que *D. cantabrica* presenta ou ben un mecanismo de polinización

inespecífico ou se trata dunha especie apomíctica. Ademais, resaltan a importancia de adaptar o protocolo do test de Tetrazolio ás características da especie que se está a analizar e utilizar un control do seu funcionamento.

Palabras clave: orquídea, polinización, estratexia reprodutiva, Tetrazolio

Abstract

Dactylorhiza cantabrica Pedersen is an endemic, mountain orchid of Serra do Caurel (Lugo, Galicia), which mostly grows in grasslands developed on limestone outcrops (Habitat 6210). This study aims at providing more information on the reproductive biology of this endemism, which has small and dispersed populations. Five pollination treatments were carried out: manual autogamy, manual geitonogamy, manual xenogamy, open pollination and, interspecific crosses with a species with which it shares flowering period, *Orchis mascula* L. Data analysis was conducted in Rstudio and it consisted in comparing the size of the fruits, the number of seeds that they included and the viability of the seeds as determined by the Tetrazolium Test. The results were not conclusive and they suggest that *D. cantabrica* presents either a nonspecific pollination mechanism or it is apomictic. In addition, the results highlight the importance of adapting the protocol of the Tetrazolium test to the characteristics of the species being analyzed, and to use a control of its functioning.

Keywords: orchid, pollination, reproductive strategy, Tetrazolium



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dna. Elvira Cecilia Sahuquillo Balbuena, profesora titular do Departamento de Bioloxía da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña, e Dna. María Graciela Estévez Pérez, do Departamento de Estatística e Investigación Operativa da Universidade da Coruña, autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao ***“Estudo do mecanismo de reprodución en *Dactylorhiza cantabrica* (Orchidaceae).”*** presentado pola alumna **Eva Pardo Otero**, para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña a 20 de Xuño do 2019

Asinado: Elvira Cecilia Sahuquillo Balbuena

Asinado: Graciela Estévez Pérez

1. Introducción

Las orquídeas presentan una gran eficiencia de estrategias reproductivas y vegetativas que las han llevado a ser una de las familias más diversas y a tener una amplia distribución (Tremblay & Ackerman 2001; Tremblay *et al.* 2005; Dressler 1993). Destacan por tener numerosas estrategias en sus diversos mecanismos de polinización, siendo mayoritariamente alógamas y puntualmente autógamas (Claessens & Kleynen 2016). Además, es la familia más rica en especies que presentan polinización por engaño, ya que un tercio de ellas no ofrece recompensas florales (Dafni, 1984).

Entre los métodos más extendidos se encuentra el engaño sexual, propio del género *Ophrys* (Véla *et al.* 2019) y el engaño alimenticio, muy extendido entre los géneros *Orchis* y *Dactylorhiza* (Van der Cingel, 2005). La estructura y el color de las flores son algunos de los factores que determinan las relaciones entre las orquídeas y sus polinizadores, aunque también es importante el momento de la floración y la relación con otras plantas que sí ofrecen recompensa (Claessens & Kleynen, 2016).

En el género *Dactylorhiza* las flores presentan un labelo extendido, que actúa de plataforma de aterrizaje; tépalos laterales abiertos, que facilitan el acceso a la flor y una entrada amplia al espolón, donde debería situarse el néctar (Figura.1). Además, presentan en el labelo pequeñas máculas que actúan de guías hacia el espolón, formadas por minúsculas papilas, más abundantes en la entrada del mismo. Esta superficie papilosa podría servir de guía táctil para los insectos según Vöth (1983).

A pesar de los mecanismos desarrollados por este tipo de flores para que se produzca la polinización, el aprendizaje de los polinizadores de evitar estos fraudes florales, conlleva la baja producción de frutos, por lo que diferentes rasgos se pueden ver favorecidos para aumentar las visitas a la flor (Ackerman 1986; Tremblay *et al.* 2005). Un ejemplo de las estrategias que se favorecen puede ser la alta densidad y cercanía de los individuos en una población. También presentar un despliegue floral precoz, sincronizado y duradero, producido con los recursos que podrían haber sido asignados a la recompensa floral (Jersáková *et al.* 2006).

Se desconoce el origen y el porqué del mantenimiento de esta forma de polinización por engaño. Una de las justificaciones más aceptadas es que para compensar el coste de la baja producción de frutos, la variabilidad genética se vería mejorada al promover la polinización cruzada (Johnson *et al.* 2004; Tremblay *et al.* 2005; Jersáková *et al.* 2006).

1.1. Origen y morfología de *Dactylorhiza cantabrica* Pedersen

La especie *Dactylorhiza cantabrica* (Figura. 1 y 2) fue descrita en 2006, por el investigador noruego Henrik Pedersen, basándose en evidencias genéticas, bioquímicas y morfológicas. Este autor propuso un origen híbrido a partir del cruce entre el diploide, *Dactylorhiza sambucina* L. (n=20) y el tetraploide, *Dactylorhiza insularis* Sommier (n=60) (Pedersen, 2006). *D. cantabrica* sería, por lo tanto, un alotetraploide (2n=80). Se presupone que ambos parentales convivían en la Sierra do Caurel, pero en la actualidad el híbrido ha desplazado a *D. sambucina*, especie con la que fue confundida inicialmente.



Figura. 1: foto donde se muestra la morfología de la flor de *D. cantabrica*



Figura.2: tonalidades rosáceas de la inflorescencia de *Dactylorhiza cantabrica*.

Pedersen (2006) también puso de manifiesto que *Dactylorhiza cantabrica* presenta características morfológicas intermedias con sus posibles progenitores. Las principales diferencias se encontraron en la longitud del labelo (8,7-11,4 mm) y del espolón (9,7-11,0 mm), además de en la anchura y longitud de las hojas. *D. sambucina* presenta espolones más

largos y estrechos y *D. insularis* más pequeños. El espolón de *D. cantabrica* es cilíndrico y se dispone paralelo al ovario, curvado hacia abajo. Su labelo, ligeramente convexo, puede ser entero o trilobulado con numerosas y pequeñas máculas de color rosado. La disposición y el número de estas máculas supone una clara diferencia entre las tres especies. En *D. cantabrica* se extienden desde la base del labelo hasta su extremo apical, en *D. sambucina* las manchas solo llegan hasta la parte media del labelo y son más pequeñas y *D. insularis* sólo tiene 2 o 4 máculas grandes (Ruiz de Gopegui *et al.* 2018). En cuanto a las hojas, las de *D. cantabrica* son más anchas, erguidas y amplexicaules comparadas con las de *D. sambucina* (Cortizo & Sahuquillo, 2006)

Las brácteas florales de *D. cantabrica* son verdes y a veces más largas que las propias flores. Las inflorescencias son densas y existen dos variedades cromáticas (tonalidades rosadas y amarillas, Figura.2). En general, son de color amarillo, pero se han encontrado algunos individuos rosados o bicolor, en una población de la Sierra do Caurel (Figura.3). En *D. sambucina* existen también dos variedades, una amarilla más típica y otra de color rojizo, ampliamente extendida por la Cordillera Cantábrica. En *D. cantabrica* los tépalos internos son del mismo tamaño que el tépalo externo superior, siendo más grandes los tépalos laterales externos (8-13mm). Aparte de estas características florales, tiene un tallo de 10-13cm de altura, a lo largo del cual se disponen hojas lanceoladas (5-12 x 1-3cm). La época de floración suele ser entre finales de abril y mediados de mayo, aunque puede variar según las condiciones climáticas primaverales (Cortizo & Sahuquillo 2006).



Figura. 3: *Izquierda:* fotografía sacada en la Sierra del Caurel donde se pueden observar las bandas calizas. *Derecha:* hábitat de *D. cantabrica* (envueltas en una malla verde para el trabajo de campo, en la foto) que comparte con *Orchis mascula*.

1.2. Distribución. Sierra del Caurel

Aunque su distribución estaba restringida a la Sierra del Caurel, recientemente se ha citado esta especie en el tercio norte de la provincia de Palencia y en las zonas adyacentes de Cantabria y de las provincias de Burgos y León (Benito 2017; Ruiz de Gopegui *et al.* 2018).

La Sierra del Caurel forma parte de las Zonas de Especial Protección dos Valores Naturales (ZEDEVN) y de los Lugares de Importancia Comunitaria (LIC), de la Red Natura 2000. Además, la Asociación Galega de Custodia do Territorio promovió la creación de cuatro microrreservas para la conservación de las poblaciones de orquídeas allí encontradas; son las microrreservas de Afloramiento de Visuña, Alto da Pedra, Alto do Couto y Monte Cido (<https://www.custodiadoterritorio.org/microrreservas-da-Sierra-do-Caurel>).

Los hábitats de *D. cantabrica* son pastizales naturales y semi-naturales desarrollados sobre sustratos calcáreos formados por la alteración de matorrales y formaciones forestales (Hábitat 6210). Su rango de altitud varía entre 900 y 1800 m (Ruiz de Gopegui *et al.* 2018). Estos hábitats son típicos de la Sierra del Caurel.

Al contrario que el resto del territorio gallego, esta zona presenta afloramientos calizos ricos en carbonatos (Figura.3), dando lugar a suelos con pH básico. Estas condiciones edáficas unidas a las climáticas existentes favorece el crecimiento de gran parte de las especies de orquídeas (25-30 especies citadas en la sierra) (Reinoso, 2017). Las microrreservas, antes mencionadas, están asentadas en dichos afloramientos, que funcionan como islas de vegetación favoreciendo fenómenos de especiación (Figura 3).

2. Objetivos

El principal objetivo planteado en este estudio es aportar información sobre el mecanismo de polinización de *Dactylorhiza cantabrica*, determinar su éxito reproductivo y contrastar los resultados con los datos existentes.

3. Material y métodos

3.1. Material

El material utilizado para realizar este estudio fueron los frutos recogidos en una población de *Dactylorhiza cantabrica*, situada en la microrreserva orquidológica do Alto do Couto, en la Sierra del Caurel. Se recogieron un total de 138 frutos procedentes de 18 individuos.

Los frutos provienen de los siguientes tratamientos de polinización realizados en mayo-junio del 2017:

- Autogamia manual (AM): se induce la polinización con el polen de la misma flor.
- Geitonogamia (GM): la flor se poliniza con el polen de otra flor de la misma planta.
- Xenogamia (XM): la flor se poliniza con el polen de una flor de otra planta.
- Cruce intergenérico: *Orchis mascula* L. x *Dactylorhiza cantabrica* (OM). Se hizo una polinización cruzada entre estas dos especies que coinciden en el momento de floración.
- Polinización abierta (PA): no se aplicó ningún tratamiento. El polen ya se encontraba en el estigma de las flores.

Los frutos recogidos se guardaron en sobres etiquetados según el individuo, el tratamiento y el número de flor donde fue aplicado.

3.2. Métodos

En los frutos se midió la longitud (mm) y para las semillas se hizo un recuento aproximado de la cantidad de semillas presentes en cada fruto. Posteriormente, se valoró su viabilidad utilizando el método del Tetrazolio (Custódio *et al.* 2016). Los datos obtenidos se guardaron en una tabla Excel y posteriormente se analizaron mediante el programa RStudio v 1.1.463 (2016).

3.2.1. Obtención de los datos

Tanto las medidas de los frutos como los recuentos de semillas se obtuvieron a partir de fotos tomadas sobre papel milimetrado, con la cámara OLYMPUS c4040ZOOM acoplada a la lupa binocular Olympus SZX9.

Se tomó una foto a cada fruto y con el programa de software libre ImageJ (<http://wsr.imagej.net/distros/>) se obtuvieron las medidas de longitud (mm), previamente calibrada la escala de medida.

En cuanto a las semillas, del contenido de cada fruto se realizó una preparación para microscopio de la que se tomaron tres fotos, siempre en la misma diagonal, abarcando cada una un cuadrante de 5x5mm. Dentro de cada fruto se estableció una categorización de la abundancia de semillas: 1=pocas, 2=medio, 3=muchas y 4= muy abundante. El recuento de semillas según su reacción al Tetrazolio se realizó en cada cuadrante, distinguiendo 5 tipos de semillas: hinchadas, no hinchadas, vacías, rotas (no hinchadas e hinchadas) (Figura.4).

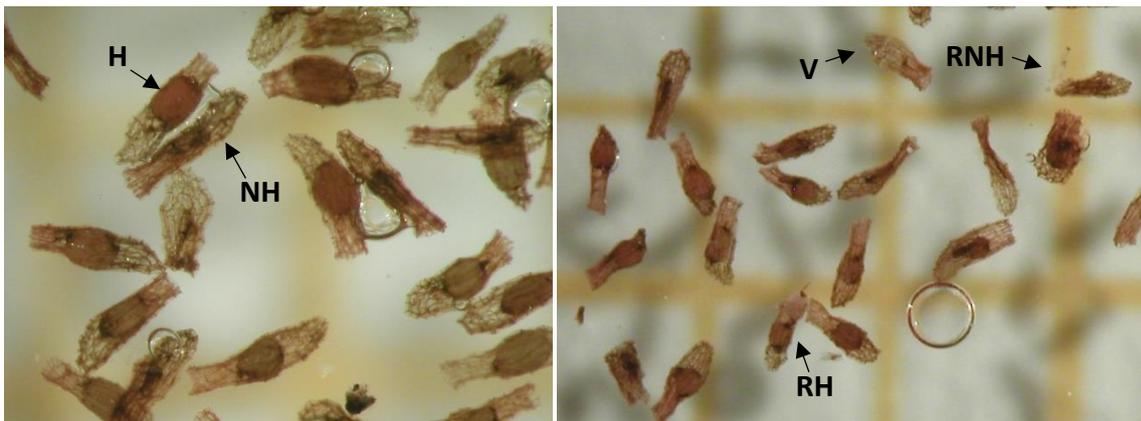


Figura. 4: ejemplos de los tipos de semillas diferenciadas en las muestras: hinchadas (H), no hinchadas (NH), vacías (V), rotas no hinchadas (RNH) y rotas hinchadas (RH). Contraste de semillas con una tinción intermedia y sin tinción (foto izquierda).

3.2.2. Prueba de viabilidad de las semillas: test del Tetrazolio (Custódio et al, 2016).

Las semillas procedentes de cada fruto se pasaron a tubos eppendorf de 1,5 ml, uno por fruto. Al ser semillas muy pequeñas y de fácil dispersión, su manejo era complicado, por lo que fue necesario un tratamiento cuidadoso para perder la mínima cantidad posible de muestra. Debido a que las muestras analizadas llevaban año y medio guardadas en seco y no se conocía

su capacidad de germinación, para tener un control del funcionamiento del Tetrazolio, se aplicó el mismo tratamiento a semillas de *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae), recogidas en agosto de 2018, polinizadas de forma natural, que presentaron frutos bien desarrollados, y de *Medicago sativa* L. (Fabaceae), planta cultivada, con viabilidad asegurada (Figura.5).

El protocolo seguido de Custódio *et al.* (2016) incluye varias fases. La primera consiste en una inmersión de las semillas en una disolución de azúcar para activarlas y la segunda, en provocar la reacción con el Tetrazolio.

a. Primera fase: Sacarosa

El primer paso fue añadir 1,5ml de una solución de sacarosa al 10% a cada tubo eppendorf con las semillas e incubar a temperatura ambiente durante 24 horas. Con la sacarosa se produce una activación metabólica de los embriones, los cuales se hinchan y se mejora la posterior visualización de semillas viables o no viables (Hosomi *et al.* 2012).

b. Segunda fase: Tetrazolio

En esta fase, se retiró la sacarosa de cada tubo eppendorf, en series de 100µl, con una micropipeta para evitar succionar las semillas en el proceso y para perder la menor cantidad posible de las mismas. Luego se rellenó de nuevo el eppendorf con una solución de Tetrazolio al 1%. Los tubos eppendorf con las semillas y el Tetrazolio se colocaron en un flotador en el baño termostático a 40°C durante 24h.

i. Puesta a punto del proceso

Al calentar las semillas se produce una reacción por la acción de las enzimas deshidrogenasas de los tejidos vivos que reduce el Tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifenilTetrazolio) dando lugar a un compuesto insoluble y rojo, denominado formazán (França Neto 1999). De esta manera las semillas viables quedan teñidas y las no viables con su color original. Se ha demostrado en varios estudios que la prueba de viabilidad del Tetrazolio es un método válido para evaluar la calidad de las semillas (Hosomi *et al.* 2012; Salazar & Gélvez 2015; Custódio *et al.* 2016). Sin embargo, en este estudio hubo dificultades para conseguir una tinción clara de las semillas,

tanto en *Dactylorhiza cantabrica* como en *Gymnadenia conopsea*. Después de las 24h del baño termostático se podía apreciar un color más intenso de las semillas en su conjunto, dentro de los tubos, pero bajo la lupa, al dispersar las semillas, sólo se observaban unas pocas tinciones de un color rojo muy apagado (Figura.4). Para solucionarlo se prestó especial atención al pH de la solución tampón, que se recomendaba que estuviese entre 6,5 – 7,5, calibrándose a pH=7,06. Tras sucesivas pruebas se pudo comprobar que era muy importante la temperatura del Tetrazolio, ya que sólo cuando se añadía frío (4°C) se conseguía una tinción completa, aunque únicamente funcionó en las especies control (Figura.5). Por lo tanto, durante este proceso de manipulación de las semillas tras la sacarosa, el Tetrazolio se guardó en frío en una cubeta con hielo.



Figura. 5: ejemplos de semillas viables teñidas por el Tetrazolio y no viables del color original. Izquierda: *Gymnadenia conopsea*. Derecha.: *Medicago sativa*.

c. Tercera fase: Visualización de las muestras

Transcurridas las 24 horas de inmersión en Tetrazolio, se retiraron los tubos eppendorf del baño termostático y se extrajo el Tetrazolio de la misma forma que la sacarosa. El siguiente paso fue extender las semillas en portaobjetos con agua destilada, con la ayuda de una lanceta de punta plana. Para recuperar la máxima cantidad de semillas se añadieron 100µl de agua destilada al tubo eppendorf. Una vez extendidas se colocó un cubreobjetos de 40x60mm, se sellaron y se fotografiaron las preparaciones bajo lupa binocular Olympus SZX9.

3.3. Tratamiento estadístico

Para comparar los distintos tratamientos de polinización, en primer lugar, se aplicó el test ANOVA de una vía a la variable respuesta longitud del fruto y total de semillas y la prueba de Kruskal–Wallis a la abundancia de semillas, por ser esta una variable categórica. Se omitió el análisis de la posición de la flor, al tener un número muy bajo de muestras para comparar. En todos aquellos casos en los que fue necesario estudiar la normalidad de los datos se aplicaron los test de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors y de Shapiro-Wilks.

En segundo lugar, y también con el propósito de comparar los tratamientos de polinización practicados, se calculó el porcentaje de semillas hinchadas, no hinchadas, vacías y rotas en cada uno de los tres cuadrantes fotografiados por fruto. Tras realizar un análisis exploratorio previo de estos porcentajes para cada uno de los tratamientos, se decidió buscar alguna transformación de los mismos que aproximase su distribución a la Normal y redujese el efecto de los datos atípicos. Aunque la transformación $\arcsin(\sqrt{x})$ es una de las más recomendadas para utilizar en datos de proporciones, ésta no fue efectiva en nuestro caso al haber datos atípicos muy extremos. Tras probar diferentes opciones resultaron más adecuadas: la transformación x^2 para las proporciones de semillas *hinchadas* y \sqrt{x} para el resto de variables (no hinchadas, vacías y rotas). Puesto que para cada una de las unidades experimentales se disponía de tres medidas de proporciones para cada tipo de semilla, cada una asociada a un cuadrante, se optó por realizar un ANOVA de Medidas Repetidas (AMR) que permitiese estudiar no sólo el efecto del tratamiento de polinización, sino también el efecto del cuadrante (Kuehl, 2001). Para la comprobación de la hipótesis de esfericidad se aplicó el test de Mauchly, cuya hipótesis nula es que sí existe esfericidad, y en caso de violación de esta condición se aplicaron las correcciones de Greenhouse-Geisser y la de Huynh-Feldt. El análisis de medidas repetidas se efectuó con las funciones `ezANOVA()` y `ezPlot()` del paquete `ez` de R.

Para dar mayor apoyo a los datos obtenidos con las semillas de *D. cantabrica*, se compararon los resultados obtenidos en este estudio, con los de Vázquez (2017), sobre frutos recogidos en el año 2016. En ese estudio se consiguió la tinción de las semillas y se utilizaron individuos de dos poblaciones (Alto do Couto y Alto da Pedra), además de incluir tres tratamientos más:

- Cleistogamia (cleist): la flor se autopoliniza antes de abrirse.
- Autogamia espontánea (AE): la flor se autopoliniza una vez abierta.

- *D. cantabrica* x *D. insularis* (DcxDi): se provocó una polinización cruzada entre esas dos especies, una de ellas considerada posible parental.

Con estos datos se realizaron dos análisis. En primer lugar, se aplicaron modelos ANOVA para comparar la proporción de semillas teñidas en los 8 tratamientos considerados. El segundo consistió en realizar una comparación descriptiva de la proporción de semillas teñidas e hinchadas del 2016 con la proporción de semillas hinchadas del 2017.

4. Resultados

El número de frutos recogidos se repartió entre los diferentes mecanismos de polinización de la siguiente manera: 12 autogamia manual (AM), 13 geitonogamia (GM), 12 xenogamia (XM), 15 cruce intergenérico (OM) y 25 de polinización abierta (PA) (Tabla1). Como el número de frutos resultado de la polinización abierta era muy superior al del resto de tratamientos, de los 81 frutos de polinización abierta recogidos sólo se analizaron 25. También resultaron abortados varios frutos de diferentes tratamientos (2 de AM, 2 de GM y 2 de XM).

Tabla 1: Tipos de mecanismos de polinización y frutos (n=77) distinguiendo nº de individuo, posición de la flor y tratamiento. Entre paréntesis, y en color rojo, los frutos abortados.

		Posición flor															Totales
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Individuo	1	PA		XM		OM	PA						PA				5
	2			PA			PA	OM					XM		(GM)	(AM)	4
	3			PA	AM				GM	XM	OM						5
	4			PA					XM	GM	OM	AM					5
	5								PA	AM	XM	GM	OM				5
	6	PA			GM		OM			GM	AM						5
	7				PA					OM	XM	AM	GM				5
	8			PA		PA		XM	AM			PA	OM	GM			7
	9										XM	OM	AM	GM			4
	10	PA	PA	OM	GM	XM	AM	PA	PA								8
	11	AM		XM	OM	GM			PA								5
	12	PA	PA	OM	GM	XM		AM									6
	13						OM			(XM)	(AM)				(GM)		1
	14	GM	AM	OM	XM	PA											5
	15		PA	GM		PA	PA		OM		AM	PA					7

En general, partimos de un reparto de muestras por individuo equitativo (alrededor de 5 frutos), con la excepción de dos individuos, el número 10 que presenta ocho frutos y el número 13 con tan sólo uno (Tabla 1). Cuando aparecen números mayores de 5 se deben a la repetición de tratamientos de polinización en el mismo individuo, fundamentalmente de polinización abierta (PA). Por otro lado, en más de la mitad de los individuos se consigue una representación completa de los tratamientos, no siendo posible en los individuos 1, 2 y sobre todo el 13. En total, hay entre 12 y 15 muestras por tratamiento, salvo en polinización abierta (PA) para la que se utilizaron 25 frutos (Tabla 2).

Tabla 2: Número de tratamientos por individuo y muestras por tratamientos

	Individuos															n
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
AM	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	12
GM	0	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	13
OM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
PA	3	2	1	1	1	1	1	3	0	4	1	2	0	1	4	25
XM	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	12
n	5	4	5	5	5	5	5	7	4	8	5	6	1	5	7	77

4.1. Análisis estadístico para los frutos

La longitud media de los frutos estimada, con independencia del tratamiento, se sitúa alrededor de 16mm. Los valores medios muestrales más pequeños se corresponden con el tratamiento de autogamia manual (AM) con 15.43mm y los más elevados con polinización abierta (PA) con 16.64mm. Los valores individuales más elevados aparecen en el cruce con *Orchis mascula* (OM), encontrándose frutos de hasta 20,75mm y los más bajos en geitonogamia (GM) con 11.13mm. Se encontraron dos valores atípicos uno en geitonogamia con 22,19mm, en el individuo 14 y otro en polinización abierta (PA) de 11.37mm en el individuo 1 (Figura. 6).

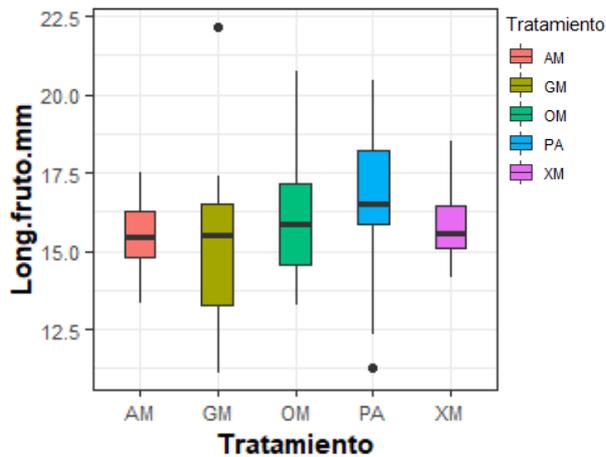


Figura. 6: Diagrama de cajas para la longitud del fruto donde se refleja la mediana y los datos atípicos para cada tratamiento.

No se encontraron diferencias significativas para la longitud del fruto en función del tratamiento (Tabla 3) y tampoco para la abundancia de semillas (Tabla 4). Sin embargo, el coeficiente de correlación para abundancia y longitud del fruto sugiere la existencia de una correlación positiva entre ambas variables ($cor = 0.52$; $p\text{-valor} = 0.000001644$).

ANOVA I (long.fruto~Trat)					
	g.l	sum sq	mean sq	f value	Pr(>F)
Trat.	4	20,15	5,117	1,06	0,383
Res.	72	347,7	4,83		

Tabla 3: Resultados del ANOVA de una vía para tamaño de fruto.

K-W (abundancia~Trat)			
	χ^2	g.l.	p-valor
Trat.	6,38	4	0.1724

Tabla 4: Resultados de la prueba de Krustal Wallis para abundancia y tratamientos.

En la Figura. 7 podemos observar que la longitud del fruto se correlaciona con la abundancia de semillas, medida como una estima visual (ver material y metodos) y del recuento final de semillas (Tabla 5). A tamaños mayores es de esperar que nos encontremos más semillas, aunque se observan varios datos atípicos, en niveles medios de abundancia de semillas. Se deben a frutos pequeños que dieron una cantidad alta de semillas y viceversa. También hay otros que pueden ser debidos a fallos en la asignación de los niveles de abundancia o bien, a la pérdida de muestra durante la preparación modificando entonces el total representativo de la misma.

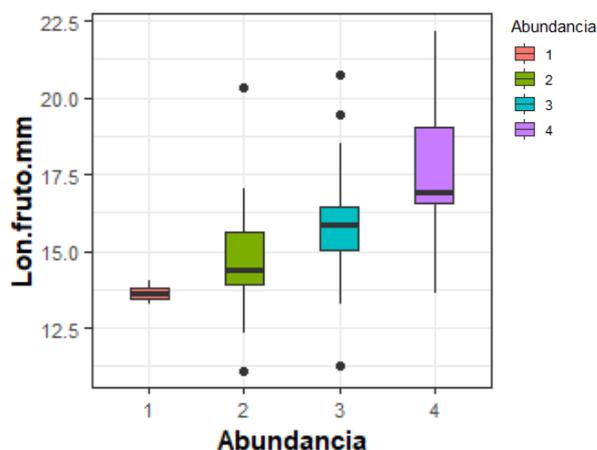


Tabla 5: medias (m) y desviaciones típicas (d.t.) de los valores de longitud de fruto y totales de semillas, según la abundancia.

Abun.	long.fruto		totales	
	m	d.t.	m	d.t.
1	13,64	0,54	84,5	13,43
2	14,76	1,96	170,95	57,64
3	15,91	1,87	284,35	93,26
4	17,54	1,98	386,12	87,88

Figura.7: diagramas de cajas para la longitud del fruto según la abundancia.

4.2. Análisis estadístico de la viabilidad de las semillas

El Anova mixto de Medidas Repetidas (AMR), que pretendía valorar el efecto del tratamiento y del cuadrante, no detectó diferencias significativas, para ningún tipo de semilla (H, NH, V, RNH y RH), ni para los cuadrantes ni para tratamientos, por lo que se asume que los datos de cada cuadrante para cada individuo se pueden promediar. En todos los casos se alcanzaron p-valores muy altos tanto para el efecto del cuadrante como del tratamiento y la interacción entre ambos. (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis de Medidas Repetidas que compara la proporción de semillas hinchadas entre cuadrantes y teniendo en cuenta el tratamiento.

	Cuadrante	Tratamiento	Cuadrante:Tratamiento
g.l.	2	4	8
Sum sq	0,0014	0,0915	0,0161
valor F	0,2707	0,9231	0,661
p-valor	0,7631	0,4554	0,7249

Las pruebas de esfericidad y normalidad también condujeron a resultados no significativos en cada una de las variables analizadas. En el caso de los porcentajes de semillas hinchadas los p-valores fueron 0,75 y 0,08, respectivamente.

En las muestras analizadas la mayor proporción fue de semillas hinchadas, seguidas de no hinchadas, rotas hinchadas, rotas no hinchadas y vacías. Este patrón se repite para todos los tratamientos (Tabla 6). Aunque las proporciones son muy semejantes entre los tratamientos para polinización abierta (PA) las semillas hinchadas presentan un valor ligeramente superior. Así mismo, los datos más altos para las semillas rotas (hinchadas y no hinchadas) aparecen en xenogamia (XM) y geitonogamia (GM).

Tabla 6: Medias (m) y desviaciones típicas (d.t.) para los distintos tipos de semillas en función de los tratamientos de polinización y de su número (n).

n	Trat.	H		NH		V		RNH		RH	
		m	d.t.								
12	AM	0,417	0,108	0,35	0,161	0,015	0,017	0,064	0,03	0,153	0,062
13	GM	0,388	0,077	0,322	0,099	0,018	0,014	0,083	0,045	0,188	0,087
15	OM	0,433	0,134	0,326	0,103	0,015	0,015	0,103	0,094	0,122	0,076
25	PA	0,438	0,143	0,329	0,13	0,023	0,03	0,098	0,077	0,112	0,094
12	XM	0,405	0,113	0,318	0,083	0,021	0,022	0,115	0,123	0,14	0,084
Total		0,42	0,121	0,329	0,117	0,019	0,022	0,094	0,08	0,137	0,086

Como se puede observar en la Figura. 8, se encontraron datos atípicos para las semillas hinchadas, al igual que para el resto de los tipos, aunque no se muestra el gráfico. Estos valores atípicos presentaban proporciones muy bajas con respecto a la media, como es el caso del individuo 13 del cruce con *Orchis mascula* (OM) y del individuo 1 con polinización abierta (PA). En estos individuos la media es 0.064 y 0.046 respectivamente. Es destacable que el individuo 13 en cambio tiene los niveles más altos para las semillas rotas, hinchadas y no hinchadas.

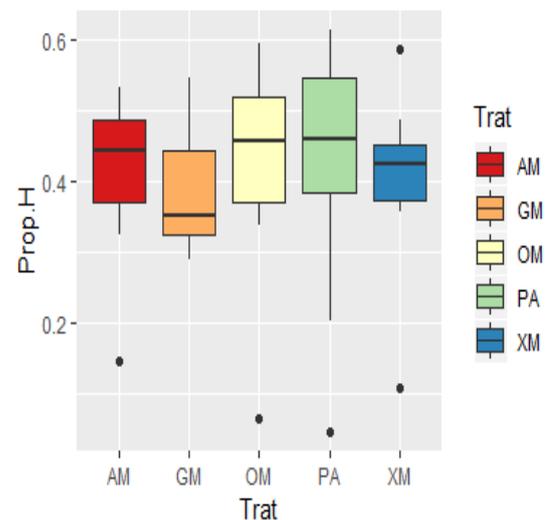


Figura.8: diagramas de cajas para semillas hinchadas según los tratamientos.

Dada la diferencia entre el número total de semillas observado entre los diferentes tratamientos, donde OM tiene la media más alta de semillas totales (299,13) y GM la más baja (233,61) (Tabla 8), se realizó un ANOVA I pero no se detectó significación en la variación de estos valores (Tabla 9).

Tablas 8 y 9: Izquierda: Medias (m) y desviaciones típicas (d.t.) de los totales de semillas según los tratamientos. Derecha.: Resultados de la prueba Anova de una vía de totales y tratamientos.

Trat.	Totales	
	m	d.t.
AM	277.41	116.58
GM	233.61	115.08
OM	299.13	114.66
PA	294.24	132.95
XM	292.58	109.16

Trat.	ANOVA I (totales~tratamientos)				
	g.l	sum sq	mean sq	f value	Pr(>F)
Trat.	4	39030	9757	0.67	0.615
Res.	72	1047859	14554		

4.3. Comparación entre datos de distintos años

Para contrastar nuestros los resultados con los obtenidos en el trabajo de Vázquez (2017) así como para completar su tratamiento estadístico, se realizaron los siguientes análisis. se realizó una comparación con los datos procedentes del trabajo de Vázquez (2017) y para completar su tratamiento estadístico. En primer lugar, se procedió a analizar si había diferencias significativas para las semillas teñidas en los diferentes tratamientos. El análisis exploratorio permitió detectar que las proporciones de semillas teñidas eras muy diferentes entre los tratamientos (Figura .9). Por ejemplo, en cleistogamia se observaba el valor más alto (0.253) y en el cruce interespecífico de DcxDi el valor más bajo (0.097) (Tabla 10).

Tabla 10: Medias (m) y desviaciones típicas (d.t.) de semillas teñidas según los tratamientos

Trat.	Prop. Teñidas		
	m	d.t.	n
AE	0.103	0.086	17
AM	0.105	0.096	17
Cleist	0.253	0.069	8
DcxDi	0.097	0.062	7
GM	0.185	0.078	16
OM	0.145	0.102	13
PA	0.196	0.055	14
XM	0.136	0.087	17

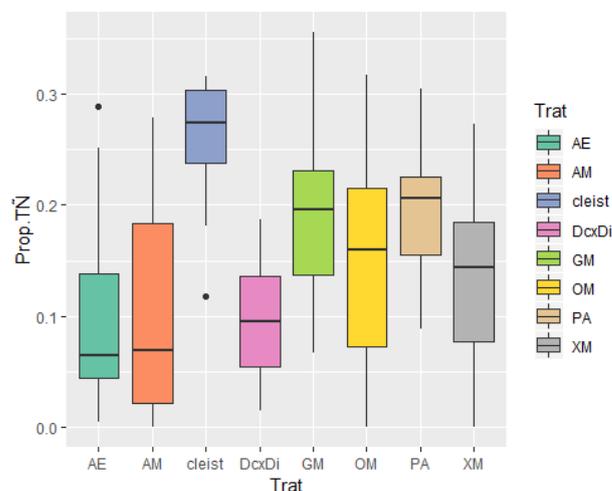


Figura. 9: Diagramas de caja para la proporción de semillas teñidas en función de los tratamientos.

Como resultado, en la prueba Anova I esas diferencias resultaron significativas (Tabla 11). Las pruebas de comparación múltiple realizadas por el método de Scheffe permiten establecer que la cleistogamia es la responsable de las diferencias, en relación con autogamia espontánea (AE) y autogamia manual (AM).

Tabla 11: Resultados de la prueba Anova de una vía de semillas teñidas y tratamientos.

		ANOVA I (Prop.TÑ~tratamientos)				
		g.l	sum sq	mean sq	f value	Pr(>F)
Trat.		7	0.229	0.033	4.719	0.000129***
Res.		101	0.702	0.007		

Tabla 12: Resultados de las comparaciones múltiples, por el método de Scheffe, para las semillas teñidas en función de los tratamientos.

		Comparaciones múltiples			
		Diff	Lower	Upper	P.valor
Cleist -AE		-0.15	-0.287	-0.013	0.0192
Cleist-AM.		-0.14	-0.285	-0.011	0.0229

Para finalizar, se hizo una comparación descriptiva entre las semillas hinchadas de los dos años (2016-2017) y con las teñidas del 2016, de la población de Alto do Couto (Tabla 13, Figura. 10). Los datos del cruce interespecífico de *D. cantabrica* x *D. insularis* (DcxDi) pertenecen a individuos de la población de Alto da Pedra, ya que no se realizó este tratamiento para Alto do Couto.

Tabla 13: Porcentajes de las semillas hinchadas del 2017 y 2016 y de las semillas teñidas del 2016, según los diferentes tratamientos.

%	Hinchadas 2017	Hinchadas 2016	Teñidas 2016	n 2017	n 2016
PA	43,83	51,46	18,84	25	6
AM	41,68	56,98	16,42	12	8
GM	38,85	56,56	23,19	13	9
XM	40,51	54,70	16,74	12	10
OM	43,35	57,67	19,45	15	8
Cleist	-	60,49	27,27	-	7
DcxDi*	-	56,77	9,69	-	7
AE	-	54,67	8,35	-	9

Para todos los tratamientos hubo mayor mayor porcentaje de semillas hinchadas en el año 2016. El porcentaje más alto de semillas hinchadas se corresponde con cleistogamia (Cleist) en el 2016 y con polinización abierta (PA) en el 2017. Es destacable el irregular comportamiento según los años, así GM resulta ser uno de los tratamientos con más semillas hinchadas en el año 2016 (56.29%) y con el menor número en 2016 (38.85%). Además es el tratamiento con uno de los mayores porcentajes de semillas teñidas (23.19%), es decir, viables en el año 2016. El porcentaje más alto es de 27.27% en cleistogamia. Ese dato contrasta con los porcentajes más bajos que se corresponden con autogamia espontánea (8.35%) y con el cruce interespecífico con *D. insularis* (9.69%), aunque este último pertenece a otra población. Para valorar estas diferencias hay que tener en cuenta que no se analizó el mismo número de tratamientos en los dos años. En 2017 se estudiaron más muestras para todos los tratamientos, siendo PA el más analizado con 25. En cambio, en 2016 sólo se analizaron 6 muestras de PA (Tabla 13 y Figura.10).

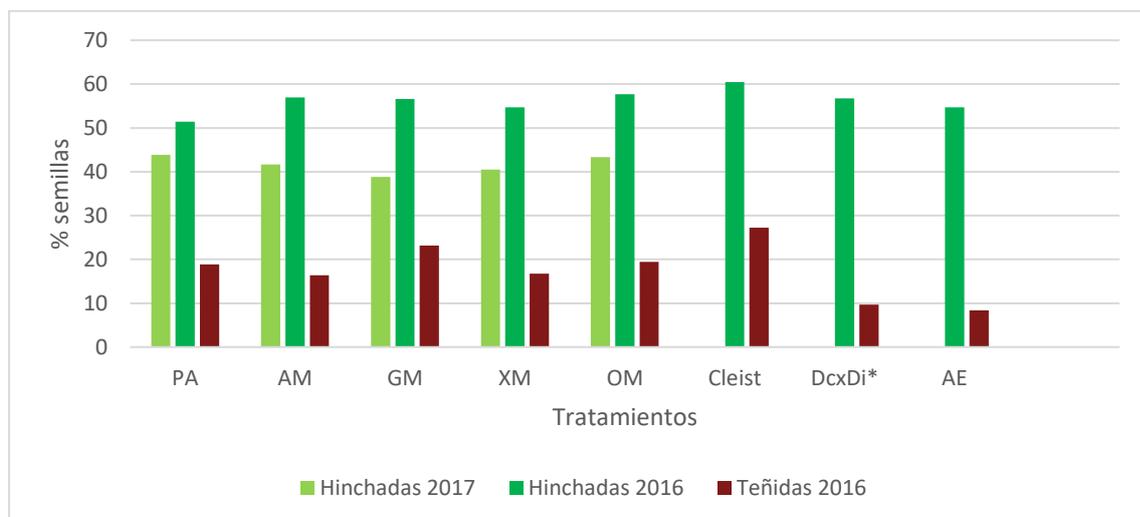


Figura. 10: Porcentaje de semillas frente a los distintos tratamientos, distinguiendo entre las hinchadas de 2016 y 2017 y las teñidas de 2017 (población Alto do Couto). *DcxDi (población Alto da Pedra).

5. Discusión

Uno de los aspectos más representativos de las orquídeas es su gran diversidad ecológica, resultado de sus diferentes adaptaciones para lograr las mejores estrategias vegetativas y reproductivas. Gran parte de esas adaptaciones están asociadas a mecanismos de polinización, lo que hace que su interacción con los insectos polinizadores sea compleja y a veces muy específica (Darwin 1877, Van der Cingel 1995). Sin ir más lejos, un tercio de las orquídeas utiliza el mecanismo de polinización por engaño, ya que carecen de recompensa floral (Smithson 2009). Este método está considerado carácter ancestral dentro de la familia. Además, esta forma de polinización favorece la creación de barreras reproductivas siendo también responsable de su diversificación (Pimentel et al 2012). Esta estrategia la presentan el 43,6 % de las especies de orquídeas gallegas, incluidas las del género *Dactylorhiza* en el que está muy bien representada la polinización por engaño alimenticio, por mimetismo (Sahuquillo & Cortizo 2008). En este trabajo se estudian los mecanismos de polinización de *D. cantabrica*, ya que todavía se desconoce cuál es su estrategia reproductiva y es endémica de la Sierra del Caurel.

La morfología floral de *Dactylorhiza* presenta diversas adaptaciones que facilitan el acceso y la detección de los polinizadores. Además de tener un amplio acceso al espolón, un labelo extendido o pequeñas máculas como guías de néctar, también se evidenciaron otros factores de atracción, por ejemplo, en *D. sambucina*. En esta orquídea se detectó una fuerte absorción de la radiación UV para mejorar la localización por las abejas, excepto en los márgenes de entrada al espolón donde esta radiación se refleja, señalando así el acceso al néctar (Kropf & Renner 2005). Todas estas características muestran que son especies entomófilas, por lo que se asume la alogamia (Claessens & Kleynen 2016). En el género *Dactylorhiza* los principales polinizadores pertenecen al orden Hymenoptera (Apidae y Halictidae). Para *D. cantabrica* se observaron abejorros (F. Apidae), hormigas (F. Formicidae) y coleópteros (Ord. Coleoptera) visitando las flores, pero en ningún caso con las polinias adheridas (Vázquez 2017).

Los tratamientos de polinización analizados para *D. cantabrica* fueron geitonogamia (GM), xenogamia (XM), autogamia manual (AM) y polinización abierta (PA). También se analizó un cruce con *Orchis mascula*, especie con la que comparte hábitat y tiempo de floración. Los

resultados no fueron concluyentes al no existir diferencias significativas entre esos tratamientos.

Para el estudio de los tamaños de los frutos no se valoró su posición en la inflorescencia, por lo que los resultados podrían estar influidos por ello (Claessen & Kleyne 2016). Se observa que para la polinización abierta y para el cruce intergenérico se alcanzan mayores tamaños. En cambio, existe una tendencia hacia frutos más pequeños cuando se cruzan flores de la misma inflorescencia (geitonogamia). Estas tendencias fueron muy leves y no resultaron significativas en los análisis. Por lo tanto, el tamaño del fruto no parece estar condicionado por el mecanismo de polinización.

Lo que sí parece correlacionarse con los tamaños de los frutos es la abundancia de semillas. Los frutos más grandes tienden a contener más cantidad de semillas. Este hecho también ha sido apoyado por Duarte *et al.* (2017).

En cuanto a la viabilidad de las semillas, en todos los tratamientos el promedio mayor era el de semillas hinchadas, aunque no hubo diferencias entre los mismos para las proporciones de cada tipo de semilla. Esta semejanza resulta sorprendente teniendo en cuenta la gran diferencia entre los tratamientos, siendo algunos de polinización autógena y otros alógena. Pone de manifiesto la gran plasticidad de *D. cantabrica* para los mecanismos de polinización que puede utilizar, ya que tanto con la polinización abierta como con la autopolinización se obtienen proporciones semejantes para todos los tipos de semillas. A pesar de no existir diferencias significativas, los valores más altos para las semillas hinchadas fueron de polinización abierta y del cruce intergenérico, lo cual podría estar dentro de lo esperado ya que la hibridación es algo común en las orquídeas (Pridgeon *et al.* 2001). Los valores más altos para semillas rotas fueron de geitonogamia y xenogamia, lo cual no debería ocurrir en el caso de la xenogamia, al tratarse de alogamia, aunque puede estar relacionado con la manipulación de las semillas. Estos resultados coinciden con los de Vázquez (2017) por lo que la hipótesis de la plasticidad de *D. cantabrica* estaría más argumentada.

Un análisis detallado de sus resultados puso de manifiesto otro escenario, al detectarse diferencias significativas en cuanto a semillas teñidas entre tratamientos. La cleistogamia fue

el tratamiento con mayor número de semillas teñidas, contrastando con la autogamia espontánea y la manual como los tratamientos con menor número.

Por lo tanto, los resultados podrían suponer dos hipótesis para el método de reproducción de *D. cantabrica*.

Atendiendo a la supuesta semejanza de tratamientos de polinización, la especie podría ser apomíctica, produciendo semillas independientemente de la situación. Esta idea fue tan sólo mencionada por Hagerup (1947) pero en general no tuvo aceptación. Para poder confirmarla habría que aislar las flores y eliminar sus polinias al realizar nuevos experimentos de polinización.

Por otra parte, el hecho de que el tratamiento de cleistogamia sea el más exitoso en cuanto a semillas teñidas, es decir, viables, indicaría que la autogamia es el método de reproducción de esta especie, algo que puede contrastar con su morfología floral, adaptada a la entomofilia y por el resultado obtenido en otros mecanismos que reflejarían autogamia (autogamia manual y espontánea). Esta posibilidad es considerada como excepcional en el género *Dactylorhiza* (Groll 1965, Claessens & Kleyne 2016), donde sólo ha sido mencionada en algunos casos como consecuencia de efectos ambientales o climáticos puntuales (Mertens 1926, Nilsson 1980).

Finalmente, a la hora de interpretar los resultados de este trabajo hay que tener en cuenta que se analizaron semillas almacenadas durante dos años desde su recogida en el campo. Se guardaron en sobres cerrados a temperatura ambiente, sin realizar un control riguroso de las condiciones de su almacenamiento. Los parámetros más importantes para conseguir longevidad en las semillas es la temperatura y la humedad relativa. Sin embargo, el rango adecuado de dichos parámetros para mantener la viabilidad de las semillas no está claro (R. Hay *et al.* 2010). Es necesario, dado los problemas de conservación para las orquídeas, realizar investigaciones que profundicen en el correcto almacenamiento de las semillas para mejorar su conservación *ex situ*.

6. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, comparando con los datos previos existentes, el mecanismo de polinización de *D. cantabrica* parece ser inespecífico, variando desde la autogamia estricta (cleistogamia) hasta la alogamia, sin poder descartar la existencia de un origen partenocárpico de los frutos. Serán necesarios nuevos experimentos en los que se aislen las flores a las que previamente se han eliminado las polinias, para anular o confirmar esa hipótesis.

Antes de aplicar el Test del Tetrazolio es necesario poner a punto el protocolo ajustándolo a las características de la especie que se está analizando. Hay que prestar especial atención al pH de la solución y a la temperatura de la solución de Tetrazolio, debiéndose mantener este en frío hasta el momento de añadirlo a las semillas. También es importante utilizar una especie que actúe de control positivo.

La diferencia observada entre el porcentaje de semillas hinchadas (germinadas) y teñidas (viables) es muy elevada, pudiendo deberse a las características biológicas de las orquídeas que necesitan, en su mayoría, un hongo micorrízico para desarrollarse, al protocolo desarrollado y a la propia conservación de las semillas. Los datos bibliográficos indican, en general, una elevada tasa de viabilidad en semillas de orquídeas terrestres.

7. Bibliografía

Ackerman J.D., (1986). Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1: 108-113

Ayuso B. (2017). Estudio de las Orquídeas Silvestres del Sistema Ibérico.- Tesis Doctoral programadoctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva. Univ. de Valencia. Departamento de Botánica. 694 pag.

Claessens J. & Kleynen J. (2016). *Orchidées d'Europe: fleur et pollinisation*. Biotope Ed. Mèze. France. 448pag.

Cortizo C. & Sahuquillo E. (2006). Guía das orquídeas de Galicia. Baía Edicións. A Coruña, España. 169 pag.

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

Custódio C. C., Marks T. R., Pritchard H. W., Hosomi S. T. & Machado-Neto N. B. (2016). Improved tetrazolium viability testing in Orchid seeds with a thick carapace (*Dactylorhiza fuchsii*) Or dark seed coat (*Vanda curvifolia*). *Seed Science and Technology*, 44(1):1-12. DOI: 10.15258/sst.2016.44.1.17

Dafni A. (1984). Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15:258-278

Darwin, Ch. (1877). *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects*. London. 344 pag.

Duarte, E.R. (2017). Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). *Caldasia*, 39(2):388-399. DOI: <https://doi.org/10.15446/caldasia.v39n2.62184>

França-Neto J.B. (1999). Teste de tetrazólio para determinação do vigor de sementes. In: Krzyzanowski FC.; Vieira RD.; França Neto JB. *Vigor de Sementes: Conceitos e Testes*. Associação Brasileira de tecnologia de sementes, Comitê de vigor de sementes. ABRATES, Londrina. 60 Pag.

Groll, M. (1965). Fruchtansatz, Bestäubung und Merkmalanalyse bei diploiden und polyploiden Sippen von *Dactylorhiza (Orchis) maculata* und *Gymnadenia conopsea*. *Österr. Bot. Z.* 112(5): 657-700

Hagerup, O. (1947). The spontaneous formation of haploid, polyploidy and aneuploid embryos in some *Orchis*. *Meddel. Kongl. Dansk Vidensk. Selsk. Biol.* 20(9):1-22

Hosomi S. T., Custódio C. C., Seaton P. T., Marks T. R. & Machado-Neto N. B. (2012). Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds

following storage. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 48(1)127-136. doi:10.1007/s11627-011-9404-1

Jersáková J. & Johnson S.D. (2006). Lack of floral nectar reduces self-pollination in a flypollinated orchid. *Oecologia*, 147(1): 60-68. DOI: 10.1007/s00442-005-0254-6

Johnson S.D., Peter C.I. & Agren J. (2004). The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Proceedings of Biological Sciences*, 271:803-809

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

Robert O. Kuehl (2001). *Diseño de experimentos: principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones* (2ª ed.). THOMSON.

RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Salazar S. & Gélvez J. (2015). Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests. *Revista Ciencias Universidad Del Valle*, 19(2), 59–69.

Sahuquillo, E. & Cortizo, C. (2008). Las orquídeas de Galicia y su polinización. *Quercus*, 274:38-43

Tremblay R.L. & Ackerman J.D. (2001). Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society*, , 72: 47-62

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):1-54. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x

Van der Cingel, N.A. (1995). An atlas of orchid pollination. *European orchids*. A.a. Balkema. Rotterdam. 175 pag.