



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

EFFECTOS DE LA HERBIVORÍA SOBRE EL ÉXITO REPRODUCTIVO DE *Anacamptis longicornu* (Poir.) R.M. BATEMAN, PRIDGEON & M.W. CHASE, UNA ORQUÍDEA CON ENGAÑO ALIMENTARIO DEL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL

María Isabel Pizá Morell

Grado de Biología

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-20

EFFECTOS DE LA HERBIVORÍA SOBRE EL ÉXITO REPRODUCTIVO DE *Anacamptis longicornu* (Poir.) R.M BATEMAN, PRIDGEON & M.W. CHASE, UNA ORQUÍDEA CON ENGAÑO ALIMENTARIO DEL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL

María Isabel Pizá Morell

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Anacamptis longicornu, éxito reproductivo, biometría, cuajado del fruto, depredación, exclusión, remoción de las polinias, visibilidad

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Joana Cursach

Nombre Tutor/Tutora (si procede) Joana Cursach

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Biodiversidad y distribución de las orquídeas	2
Mecanismos de polinización	2
Depredación, exclusión y éxito reproductivo	3
Objetivos	4
Material y métodos	4
Especie de estudio	4
Zona de estudio	5
Exclusión de herbívoros	6
Características biométricas	6
Evaluación del éxito reproductivo	6
Análisis de la producción total y viabilidad de las semillas por fruto	6
Depredación y éxito reproductivo	6
Funcionalidad de las flores: cuajado del fruto y remoción de los polinios	7
Análisis estadístico	7
Resultados	7
Características biométricas	7
Evaluación del grado de depredación frente al éxito reproductivo en cada localidad	8
Exclusión y éxito reproductivo	9
Discusión	10
Características biométricas y éxito reproductivo	10
Evaluación de la depredación y la exclusión frente al éxito reproductivo en cada localidad.....	10
Conclusiones	12
Agradecimientos	12
Bibliografía	13
Anexo fotográfico	19

RESUMEN

La gran variedad de estrategias que utilizan las orquídeas para atraer a los polinizadores trasciende a la imaginación del ser humano. Muchas orquídeas han recurrido a la polinización por engaño, donde se seduce al polinizador sin ofrecer recompensa. Por otra parte, la orquídea debe hacer un balance entre atraer al polinizador e intentar ser evitada por los herbívoros. Los herbívoros vertebrados depredan los tallos florales disminuyendo la supervivencia de la especie. Por lo tanto, el éxito de este tipo de reproducción depende en gran medida de la visita de los polinizadores y del grado de depredación. En este trabajo estudiamos las variables que afectan al éxito reproductivo de *Anacamptis longicornu* (Poir.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase, una orquídea con engaño alimentario del Mediterráneo Occidental, en dos localidades de Mallorca. Se evaluó el éxito reproductivo en relación al análisis métrico, al grado de depredación de individuos Control y al grado de exclusión de vertebrados (EV) o exclusión total (ET) mediante el uso de jaulas de exclusión. Las variables que definen el éxito reproductivo son el cuajado de fruto y la remoción de polinios. No se encontró ninguna relación entre las características biométricas y el éxito reproductivo. No se encontraron diferencias en la depredación entre localidades y se mostró que las jaulas de exclusión redujeron drásticamente el grado de depredación. El tratamiento de ET resultó ser el de menor éxito reproductivo en ambas localidades, demostrando que la supervivencia de *A. longicornu* depende en mayor medida de la limitación de polinizadores frente al ataque de depredadores. Finalmente, podemos concluir que el tratamiento de EV resulta ser de gran utilidad para asegurar la supervivencia de la especie en condiciones de dudosa densidad poblacional.

ABSTRACT

The wide variety of strategies that orchids use to attract pollinators is beyond the human imagination. Many orchids have resorted to pollination by deception, where the pollinator is seduced without offering any reward. On the other hand, the orchid has to strike a balance between attracting the pollinator and trying to be avoided by the herbivores. Vertebrate herbivores prey on the flower stems, diminishing the survival of the species. Therefore, the success of this type of reproduction depends largely on the visit of pollinators and the degree of predation. In this paper we study the variables affecting the reproductive success of *Anacamptis longicornu* (Poir.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase, a food-deception orchid from the Western Mediterranean, in two locations in Mallorca. Reproductive success was evaluated in relation to metric analysis, the degree of predation of control individuals and the degree of vertebrate exclusion (VE) or total exclusion (TE) by using exclusion cages. The variables that define reproductive success are fruit set and pollinator removal. No relationship was found between biometric characteristics and reproductive success. No differences in predation were found between localities and exclusion cages were shown to drastically reduce predation rates. The treatment of ET proved to be the one with the lowest reproductive success in both localities, showing that the survival of *A. longicornu* depends more on the limitation of pollinators against predator attack. Finally, we can conclude that the treatment of VE is very useful to ensure the survival of the species in conditions of doubtful population density.

INTRODUCCIÓN

Biodiversidad y distribución de las orquídeas

La familia *Ochidaceae* es la segunda familia más abundante del reino vegetal (Jersákova et al., 2006), alcanzando unas 25000 especies de orquídeas en todo el mundo (Jonasson, 2015). La clasificación filogenética de *Orchidaceae* reconoce cinco subfamilias: *Apostasioideae* (con 2 géneros), *Cypripedioideae* (1 género), *Epidendroideade* (16 géneros), *Orchidoideae* (4 géneros) y *Vanilloideae* (2 géneros) (Chase, 2015).

La morfología de las orquídeas es muy diversa, pero generalmente sus flores son complejas y vistosas para atraer a los insectos polinizadores. Estas plantas terrestres tienen las hojas planas y las flores se caracterizan por presentar ginostemo, una formación a modo de columna que aparece como una prolongación del eje floral y lleva en su parte superior las anteras, separadas por el rostelo (estigma estéril) y la superficie estigmática receptiva. Además, el androceo generalmente consta de un solo estambre en forma de polinios, esto es, una masa compacta que forma el polen de cada teca. Las semillas de las orquídeas tienen la particularidad de tener un embrión sin cotiledón, puesto que es substituido por el protocormo, asociado con un hongo que las nutre durante la primera fase de su ciclo vital (Jonasson, 2015). El tamaño de las orquídeas también es muy variable, abarca el rango de especies de tamaño milimétrico – como algunas especies de los géneros *Platysele* y *Bulbophyllum*-, hasta el excepcional caso de *Sobralia altissima*, que puede llegar a medir más de trece metros (Sedano et al., 2015).

Se pueden encontrar especies de orquídeas distribuidas por todo el planeta, excepto en los polos o altitudes superiores a los 4500 metros. Un 76% de las orquídeas son epífitas, las cuales son propias de bosques tropicales húmedos, secos o semi desérticos, abarcando altitudes desde el nivel del mar hasta los 4000 m s.n.m, (Estevez, 2005). Sin embargo, las orquídeas mediterráneas son terrícolas y se caracterizan por ser plantas herbáceas con un tubérculo radical, algunas poseen pseudobulbo, con un ciclo de crecimiento en invierno y de latencia en verano (Blondel et al., 2010). En la península Ibérica existe una gran riqueza de la familia *Orchidaceae* debido a la facilidad que tienen estas plantas para adaptarse al clima mediterráneo; en Extremadura se encuentran una suma de 157 taxones y nothotaxones (Pardo, 2009) y tan sólo en las Islas Baleares existen unas 40 especies de orquídeas silvestres (del Prete et al., 1991).

La subfamilia *Orchidoideae* tiene 200 géneros. El género *Anacamptis* forma parte de esta gran subfamilia y habita en matorrales, pastizales, claros de bosques y dunas. Se encuentra dispersa en el Sur de Europa -Península Ibérica, Sur de Francia, Italia, Península Balcánica, y principales islas mediterráneas-, Oeste de Asia – Chipre y costas mediterráneas de Turquía- y Norte de África (alcanza desde Marruecos hasta Túnez y Ciernaica) (del Prete et al., 1991).

Mecanismos de polinización

La reproducción sexual por polinización otorga al individuo y a la especie una gran ventaja de recombinación genética. Así pues, la gran diversidad de morfologías florales y las diversas estrategias reproductivas promueven la polinización cruzada en orquídeas (Singer, 2009). Los mecanismos de polinización de las orquídeas se han estudiado ampliamente (Van der Cingel, 2001; van der Pijl y Dodson, 1966). La reproducción sexual de las orquídeas es predominantemente dependiente de los polinizadores (Neiland & Wilcok, 1998). Las plantas emplean diversas señales visuales y químicas para atraer a los polinizadores, que en su mayoría son los insectos (Grajales-Conesa, 2011), haciendo uso de la forma, el color, la estructura y textura, el néctar y los aromas florales para su defensa y reproducción (Raguso, 2004; Niemeyer y Teillier, 2007; Pacini et al., 2008).

Un 65% de las especies de esta familia ofrecen recompensa a los polinizadores que las visitan (Llabrés, 2015). El néctar ha constituido la recompensa floral más extendida para atraer a los polinizadores (Neiland & Wilcok, 1998). Sin embargo, las orquídeas han desarrollado diversos mecanismos de polinización por engaño y se estima que hasta un tercio de las especies de orquídeas son polinizadas por engaño (Tremblay et al., 2005, Case and Bradford, 2009). Existe el engaño sexual, como es el caso de *Ophrys muscifera* Huds., cuyas flores mimetizan a las

hembras de ciertos Hymenoptera (Ayasse, 2006; Pouyanne, 1917; Singer et al., 2006), o el caso de dos especies simpátricas de *Stelis* (*Pleurothallidinae*, Orchidaceae) que emiten fragancias similares a las hembras de los polinizadores (Albores-Ortiz, 2006). Otro tipo de engaño consiste en el mimetismo, donde la estructura floral de la planta imita un lugar de cría o un refugio (Jersáková et al., 2006). Finalmente, también existe el engaño alimentario, en el cual las plantas exhiben los espolones que no segregan néctar. Numerosos trabajos apoyan la hipótesis que la polinización por engaño favorece la polinización cruzada (Capó et al. 2019, De Jong et al. 1993; Johnson y Nilsson 1999; Jersakova et al. 2006). Gaskett (2011) confirma que esta estrategia por engaño es la más evolucionada, resultado de un anterior mecanismo de polinización en que ambas partes -insecto y planta- salían beneficiados. Esta evolución se ha considerado paradójica ya que varios estudios demuestran que las orquídeas que utilizan estrategias de polinización por engaño tienen el cuajado del fruto extremadamente bajo en comparación con sus congéneres que ofrecen recompensa (Gill, 1989; Neiland & Wilcock, 1998; Larson & Barrett, 2000). Por otra parte, las orquídeas que engañan a sus polinizadores poseen una forma floral similar a la de especies que ofrecen recompensa (Dafni, 1983; Hagsater et al., 2005) y la co-ocurrencia con especies que ofrecen recompensas con un color floral similar puede ser una llave ecológica para incrementar las visitas de los polinizadores al imitador (Gigord et al., 2002; Gumbert & Kunze, 2001).

Depredación, exclusión y éxito reproductivo

El hecho de que el polen se encuentre agregado en forma de polinios conlleva a que sea removido en su totalidad. La tasa de remoción de polinios es un parámetro fácil de medir para evaluar el comportamiento masculino de la planta (Nilsson, 1992). Son pocos los estudios que han evaluado el comportamiento masculino como un componente del éxito reproductivo (Nilsson 1992; Parra-Tabla et al. 2000; Tremblay y Ackerman 2007, Capó et al, 2019), ya que, generalmente, la eficacia biológica de las plantas ha sido ampliamente investigada en términos de comportamiento femenino, medido mayormente como el cuajado del fruto.

Las orquídeas con polinización por engaño suelen producir sólo la mitad de frutos que aquellas que no usan este tipo de polinización (Johnson & Bond, 1997; Neiland & Wilcock, 1998; Tremblay et al., 2004; Jersáková et al., 2006). Sin embargo, la variación de los rasgos florales es más común en las especies con polinización por engaño que en las que recompensan con el néctar (Ackerman et al., 2011). La producción de néctar supone un gran gasto energético para la planta, que se ve obligada a reducir o rehusar otras estructuras. Las plantas que utilizan engaño alimentario no necesitan sacrificar otras estructuras, permitiéndose un crecimiento mayor o incluso mayor número de flores. Las especies con polinización por engaño cuentan con varios factores que influyen en el rendimiento reproductivo, incluidos la altura de la planta, el tamaño de la inflorescencia y el número de flores (Henneresse et al. 2017; Scopece et al. 2017). Así, el aumento del tamaño de la exhibición floral aumenta la atracción y las visitas de los polinizadores (Peakall, 1989; Burd, 1995; Aragón & Ackerman, 2004; Grindeland et al., 2005; Li et al., 2011; Sletvold & Ågren, 2011).

Por otra parte, las plantas con tallos florales más altos también son más visibles para los herbívoros. Estos depredadores pueden afectar a las plantas al eliminar la biomasa, alterando las interacciones competitivas y el medio ambiente abiótico (Mulder & Ruess, 1998) y a la reproducción sexual de futuras generaciones (Whigham, 1990), por lo tanto, el éxito reproductivo de las orquídeas puede verse comprometido por fenómenos de depredación de varas florales (Fontúrbel, 2002).

Además, varios autores han demostrado que la herbivoría de ciertas partes de la planta pueden inducir cambios en su arquitectura y en algunos atributos florales (tiempo de floración, tamaño floral, producción y calidad del néctar) relacionados con el atractivo para los polinizadores (Strauss, 1997, Juenger & Bergelson, 2000, Elle & Hare, 2002, Strauss & Murch, 2004), pudiendo perder el máximo natural de polinizadores en cuanto a número de visitas (Juenger & Bergelson, 1997) y disminuir la duración de éstas (Strauss et al., 1996).

En la naturaleza debe haber una selección positiva sobre los individuos que simultáneamente desarrollen caracteres que optimicen la polinización y reduzcan la herbivoría (Herrera et al.,

2002). En el estudio de Capó et al. (2019) -cuya especie de estudio coincide con la de este trabajo, *Anacamptis longicornu* (Poir.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase-, se observó que el uso de jaulas en el tratamiento de exclusión total, no solo se excluyeron a los herbívoros, sino que con el tiempo también a los polinizadores, disminuyendo de forma significativa los parámetros de éxito reproductivo, tanto masculinos como femeninos. Así pues, se debe tener en cuenta el tamaño de exclusión de la red, para que las orquídeas puedan lidiar con esta relación de mutualismo y antagonismo, con la finalidad de encontrar un balance equilibrado y que garantice su éxito reproductivo.

Objetivos

Para la realización de este trabajo se utilizaron las jaulas de exclusión instaladas en el trabajo de Capó et al. (2019), pero en este caso, el estudio se amplía a una segunda localidad. Los objetivos de este trabajo son i) evaluar si existe correlación entre las características biométricas y el éxito reproductivo; ii) evaluar la exclusión de herbívoros vertebrados (especialmente conejos y tortugas) y la exclusión total (incluye, además, invertebrados y pequeños vertebrados) sobre el éxito reproductivo de *A. longicornu*; iii) evaluar si dichos efectos se mantienen en las dos localidades de estudio. El éxito reproductivo se evaluó en términos de la aptitud femenina (cuajado del fruto y viabilidad de las semillas) y la aptitud física masculina (tasa de remoción de las polinias). La hipótesis del trabajo es que los distintos grados de exclusión afectan al éxito reproductivo de las orquídeas, siendo menor el éxito reproductivo en el tratamiento de exclusión total de herbívoros dado que también se reduce la llegada de los polinizadores. Por otra parte, se espera que estas tendencias se observen en las dos localidades de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especie de estudio

La clasificación de *Anacamptis longicornu* (Poir.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase ha sido muy discutida a lo largo del tiempo. En un principio se incluyó en el género *Orchis*, bajo el nombre de *Orchis longicornu* Poiret (Poiret, 1789). Posteriormente, se cambió al género *Anacamptis*, adoptando el nombre de *A. longicornu* (Bateman, 1997). Además, esta especie presenta un parecido morfológico con la especie *Orchis moiro* L. (Linnaeus, 1775) pese a que se localice en diferentes regiones (Corrias et al., 1991). *Anacamptis longicornu* es una especie mediterránea que se distribuye por las principales islas continentales (Sicilia, Cerdeña, Córcega y Baleares) y el norte de África (Zitari et al., 2011). En Baleares hay varias poblaciones de esta especie en Mallorca y Menorca.

La especie de estudio es un geófito cuya época de floración corresponde a los meses de febrero, marzo y abril, y la época de fructificación tiene lugar entre abril, mayo y junio; el resto del año permanece bajo tierra (Capó, 2014). Tiene entre 5 y 7 hojas basales, en roseta, y la inflorescencia puede llegar a tener hasta veinte flores (Capó, 2014) de 6 a 9 milímetros (Vázquez et al., 2015). El color de las flores es variable entre individuos; los hay con las flores completamente blancas hasta el color de un rosa vino, aunque generalmente, las flores son de color rosado blanquecino, a excepción de los lóbulos laterales que son púrpuras (Fotografía 1; véase Anexo). La forma del espolón, cilíndrico y ligeramente arqueado hacia arriba, fue de inspiración para su nombre vulgar en catalán, "abellera banyuda".

Zona de estudio

La zona de estudio corresponde con el típico hábitat de *A. longicornu*, es decir, comunidades de *Oleo-ceratonion*, donde convive con otras especies de matorral mediterráneo, como son *Cistus monspeliensis* L., *Pistacia lentiscus* L., *Cneorum tricoccon* L., o *Rosmarinus officinalis* L. (Llorens et al., 2007).

El estudio se llevó a cabo en dos localidades bien distantes de la isla de Mallorca (Figura 2). La primera población de estudio corresponde con la finca de Son Doblons (Santa Margarita)

(39°41'N, 3°11'E). La zona de estudio es llana, de campo agrícola abandonado (cultivo de almendro de seco), que ha evolucionado hacia un prado con matorrales dispersos y ausencia de estructura arbórea. Además, cabe destacar que esta área sufrió un incendio en el año 2015 y todavía se encuentra en parcial recuperación. La segunda localidad corresponde a la finca Son Mut Nou (Llucmajor) (39°27'N, 2°49'E). La vegetación de esta zona podría describirse como una garriga de matorral de 0,5-2 m de altura, con predominio de *Olea europaea* var. *sylvestris* y *Cistus* spp.



Figura 2. Mapa de la isla de Mallorca donde se sitúan las dos localidades de estudio: (1) Son Doblons (Santa Margarita), (2) Son Mut Nou (Llucmajor). Imagen obtenida por IDEIB visor.

Exclusión de herbívoros

Los principales vertebrados herbívoros en las zonas de estudio son conejos, liebres y tortugas. De hecho, se detectaron heces pertenecientes a conejos y liebres en ambas localidades, además de avistamientos de caracoles y tortugas. Los distintos herbívoros tienen preferencia a la hora de alimentarse, escogiendo la parte de la planta más tierna y accesible según las capacidades de cada especie. Los herbívoros mamíferos son menos abundantes que los invertebrados, pero afectan negativamente a mayor área de la planta (Gowda, 2014). En el campo se observa que los insectos fitófagos se alimentan de las flores ya que tienen la facilidad de volar hasta el ápice de la inflorescencia. Por otra parte, los herbívoros vertebrados se alimentan de toda la vara floral de la planta (Fotografía 2 y 3; véase Anexo). Para poder evaluar estas diferencias en el grado de herbivoría sobre el éxito reproductivo de la especie, el trabajo experimental se llevó a cabo durante el período de floración y fructificación de *A. longicornu*. Todo el trabajo de campo se desarrolló entre los meses de febrero y abril de 2018.

Para clasificar los distintos tipos de herbívoros se usaron tres tratamientos: un tratamiento de exclusión total (ET), un tratamiento de exclusión de vertebrados (EV) y un tratamiento control. Para los tratamientos de exclusión de herbívoros se utilizaron jaulas de 1 m de altura y 1 m² de superficie (Fotografía 4). En cada localidad, para el tratamiento ET se utilizaron 5 jaulas de malla fina con redes electrosoldadas de 13×13 mm² de diámetro, que no permiten el paso de ningún tipo de animal, mientras que en el tratamiento EV se utilizaron 5 jaulas con alambre de red de 10×12 cm² de dimensión de malla hexagonal (Faast y Facelli, 2009), para asegurar la entrada

exclusiva de insectos (Capó et al., 2019). Finalmente, los individuos control se localizaron en el exterior, sin jaula, en condiciones de polinización abierta.

Características biométricas

El análisis biométrico tuvo lugar en Son Doblons, donde se tomaron datos de 100 individuos Control. En las salidas del mes de febrero y marzo se midieron los parámetros de longitud del tallo (cm) (medida a partir de la base del tallo florecido hasta la primera flor de la inflorescencia), longitud de la inflorescencia (cm) (medida a partir de la flor basal hasta el ápice) y número de flores de la inflorescencia. La longitud del individuo (cm) se conoce mediante el sumatorio de la longitud del tallo y la longitud de la inflorescencia.

Evaluación del éxito reproductivo

Funcionalidad de las flores: cuajado del fruto y remoción de los polinios

En el laboratorio se examinaron las muestras de flores procedentes de los tres tratamientos bajo la lupa para conocer la *funcionalidad de la flor* y el *número de polinios exportados*. La flor puede actuar como femenina (si la flor ha fructificado), masculina (si sus polinios han sido exportados), o ambos. Además, cada flor posee dos polinios, normalmente el insecto exporta ambos polinios tras su visita, pero hay casos en que puede llevarse sólo un polinio.

Las variables que se evaluaron fueron *número de flores por inflorescencia*, *número de frutos por inflorescencia*, *cuajado del fruto*, *número de polinios exportados*, *número de polinios totales* y *producción total de semillas por fruto*, siguiendo los mismos criterios de evaluación que en el estudio de Capó et al. (2019).

Conociendo el *número de flores* y el *número de frutos* en cada inflorescencia, se calculó el *cuajado del fruto* de todos los individuos para cada tratamiento:

$$\text{Cuajado del fruto} = \frac{\text{número frutos}}{\text{número flores}}$$

$$\text{Ratio remoción polinios} = \frac{\text{número polinios exportados}}{\text{número polinios totales}}$$

Análisis de la producción total de semillas y viabilidad de las semillas por fruto

Para calcular la *producción total de semillas* por cada fruto, se escogieron al azar 15 frutos procedentes de 15 individuos control de cada localidad. Las muestras de frutos permanecieron conservadas en placas de Petri a temperatura ambiente hasta el día del análisis en el laboratorio (Fotografía 5; véase Anexo). A la hora de comenzar el análisis, se realizó previamente una muestra homogénea de las semillas. Para ello, en una placa de Petri se abrió el fruto y se extrajeron todas las semillas, con la ayuda de agua destilada proveniente de una probeta de 50 ml, pinzas y bisturí. Pipeteando el contenido se pasó la mezcla a un vaso de plástico de laboratorio. Se añadió 1 ml de Tween para romper la tensión superficial del agua y se realizó el vacío con la máquina millipore durante 15 min. Se centrifugó la muestra homogénea en el agitador magnético con la ayuda de un imán y se pipeteó 1 ml de mezcla, que se depositó en un portaobjetos. Para cada muestra se realizaron 5 pseudo réplicas de 1 ml. Se dejaron secar los portaobjetos durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó el recuento de todas las semillas por cada fruto. Se obtuvo una media de las pseudoréplicas y se realizó un factor de conversión según el volumen total utilizado para cada muestra. Finalmente, se calculó la media de las réplicas para conocer la producción total de las semillas por fruto en cada localidad.

Para conocer la *viabilidad de las semillas* en cada fruto (también conocido como porcentaje de *embrión positivo* de cada fruto), es decir, el porcentaje de semillas que tienen embrión respecto

al total de semillas formadas, se seleccionaron al azar, entre todos los tratamientos, 25 frutos de cada localidad. Para abrir el fruto se utilizaron el bisturí y las pinzas, posteriormente, se depositaron todas las semillas en una placa de Petri y se esparcieron de forma homogénea. De cada muestra se seleccionaron 5 pseudoréplicas- es decir, 5 zonas distintas de la placa- y con la ayuda de un contador, se realizó el recuento de la cantidad de semillas con embrión y la cantidad de semillas sin embrión, y con estos datos se calculó el porcentaje de semillas viables de cada fruto (Suetsugu *et al.*, 2015).

$$\text{Viabilidad semillas (\%)} = \frac{\text{número de semillas con embrión}}{\text{número total de semillas}} \times 100$$

Depredación y éxito reproductivo

En la localidad de Son Mut Nou y Son Doblons se evaluaron 5 zonas y 4 zonas de individuos control, respectivamente. A partir de la media de cada población, se estimó *la depredación (%)* y el *número de semillas viables perdidas* en cada localidad ocasionada por la depredación por parte de herbívoros. Con los datos obtenidos anteriormente se realizaron los siguientes cálculos para cada localidad:

$$\text{Estimación frutos depredados} = \text{número tallos depredados} \times \bar{x} \text{ número frutos por individuo}$$

$$\text{Estimación semillas perdidas} = \text{estimación frutos depredados} \times \bar{x} \text{ producción total de semillas por fruto}$$

$$\text{Semillas viables perdidas} = \bar{x} \text{ viabilidad semillas} \times \text{estimación semillas perdidas}$$

Análisis estadístico

Todos los tests estadísticos se realizaron mediante el programa R versión 3.2.5 (R Core Team, 2018). Para evaluar la influencia de las características biométricas sobre el éxito reproductivo en los individuos control, se realizó un test de correlación entre las variables longitud individuo (cm), longitud inflorescencia (cm), número de flores, cuajado del fruto y remoción de las polinias. Debido a la falta de normalidad, se realizó un test no paramétrico de Spearman.

Para evaluar el grado de depredación en el tratamiento control sobre el éxito reproductivo en cada localidad, se realizó un análisis estadístico GLM con una estructura de error binomial para las variables cuajado fruto y remoción polinias, y quasibinomial para la variable depredación. En los tres casos se aplicó la función de enlace logit. La variable explicativa fue localidad y las variables respuesta fueron cuajado fruto, remoción polinias y depredación. Como los resultados para la variable depredación fueron marginales se realizó, debido a la falta de normalidad, un test no paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney. Para observar diferencias entre localidades en el número de semillas viables perdidas, se aplicó el test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Para evaluar el efecto de los tratamientos de exclusión de herbívoros sobre el éxito reproductivo se realizó un análisis GLM aplicando una estructura de error binomial y función de enlace logit. Las variables explicativas fueron tratamiento, localidad y la interacción tratamiento: localidad. Las variables respuesta fueron cuajado fruto y remoción de polinios.

RESULTADOS

Características biométricas

Las correlaciones entre los parámetros biométricos y el éxito reproductivo se muestran en la Tabla 1. Las variables más correlacionadas fueron longitud del individuo vs. longitud de la

inflorescencia ($q\frac{1}{4}$ 0.78, $p < 0.001$) y longitud de la inflorescencia vs. número de flores ($q\frac{1}{4}$ 0.79, $p < 0.001$). Por otra parte, existe una correlación marginalmente significativa entre la longitud del individuo con el cuajado del fruto ($q\frac{1}{4}$ 0.17, $p\text{-valor} = 0.084$) y la remoción de polinios ($q\frac{1}{4}$ 0.17, $p\text{-valor} = 0.097$) y entre la longitud de la inflorescencia y el cuajado de fruto ($p\text{-valor} = 0.017$). También se encontró una correlación significativa positiva entre los parámetros del éxito reproductivo ($q\frac{1}{4}$ 0.63, $p < 0.001$).

	Longitud individuo	Longitud inflorescencia	Número flores	Cuajado fruto	Remoción polinios
Longitud individuo		0.78	0.60	0.17	0.17
Longitud inflorescencia	<0.001		0.79	0.24	0.14
Número flores	<0.001	<0.001		0.121	0.00
Cuajado fruto	0.084	0.017	0.232		0.63
Remoción polinios	0.097	0.174	0.895	<0.001	

Tabla 1. Correlación de parámetros biométricos e indicadores de éxito reproductivo en *Anacamptis longicornu* en la localidad de Son Doblons. Los coeficientes de correlación de rango de Spearman se indican por encima de la diagonal, y los p valores se muestran por debajo de la diagonal. Todos los parámetros estudiados se introdujeron en la misma matriz.

Evaluación del grado de depredación frente al éxito reproductivo en cada localidad

Tras estudiar diferentes parámetros en el tratamiento control (Figura 1), se encontraron diferencias significativas entre localidades para las variables cuajado del fruto ($p\text{-valor} < 0.001$) y remoción de polinios ($p\text{-valor} = 0.0169$). Ambas variables resultaron ser mayores en la localidad de Son Doblons ($37.9\% \pm 1.55$, $38.6\% \pm 1.1$, respectivamente). Por otra parte, tras realizar el test de Wilcoxon-Mann-Whitney, se reveló que no existían diferencias significativas en la depredación entre localidades ($p\text{-valor} = 0.73$). En la localidad de Son Mut Nou el grupo control fue depredado en un 33.9% (± 12.05 , $n = 5$) mientras que en la localidad de Son Doblons el grupo control fue depredado en un 32.95% (± 16.18 , $n = 4$).

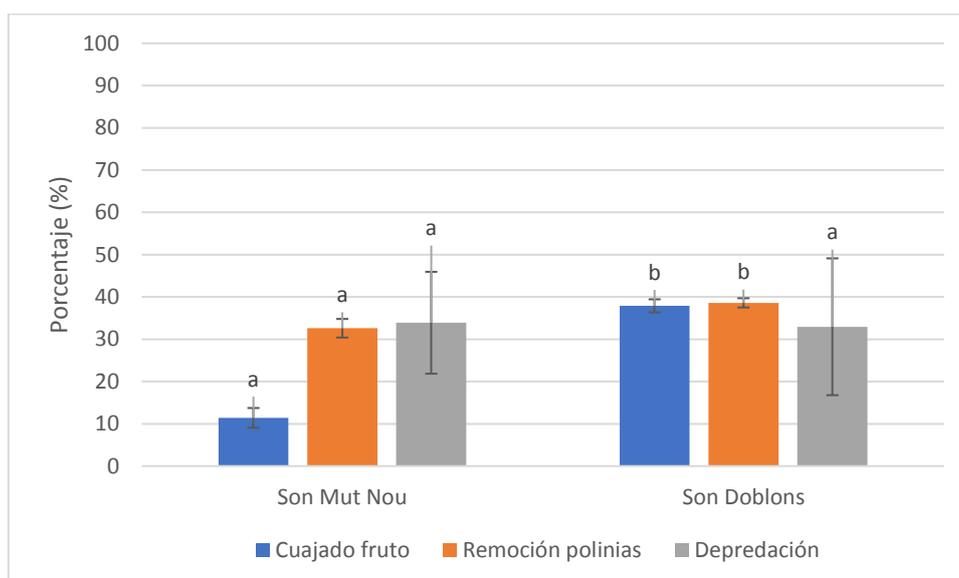


Figura 1. Éxito reproductivo de los individuos control en las dos localidades de estudio. Las variables de cuajado fruto (columnas azules), remoción polinias (columnas naranjas) y depredación (columnas grises) se compararon entre las localidades Son Mut Nou y Son Doblons. Las barras de error indican el error estándar. Las letras indican diferencias entre localidades para cada parámetro según el análisis post hoc de Tukey para las variables cuajado fruto y remoción polinias, mientras que para la variable depredación se muestran los resultados del análisis Wilcoxon-Mann-Whitney.

Se revelaron diferencias significativas entre las medias de semillas viables perdidas en ambas localidades (p -valor = 0.034), siendo la media de semillas viables perdidas mayor en la localidad de Son Doblons (6689381 ± 3693109) frente a la localidad de Son Mut Nou (168152 ± 150167.1).

Exclusión y éxito reproductivo

Respecto a los resultados del porcentaje de cuajado del fruto (Figura 2), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de EV (p -valor = 0.515) ni de ET (p -valor = 0.563) en ambas localidades, siendo el porcentaje de cuajado de fruto mayor para el tratamiento de EV ($31.23\% \pm 1.84$ para la localidad de Son Mut Nou y $26.78\% \pm 1.8$ para la localidad de Son Doblons). En cambio, el porcentaje de cuajado de fruto fue menor en el tratamiento de ET en ambas localidades ($8.22\% \pm 1.61$ para la localidad de Son Mut Nou y $11.87\% \pm 1.3$ para la localidad de Son Doblons). El tratamiento con mayor porcentaje de cuajado de fruto fue el Control de la localidad de Son Doblons ($37.95\% \pm 1.55$), el cual no obtuvo diferencias significativas con el tratamiento de EV de Son Mut Nou (p -valor = 0.066).

En cuanto a los porcentajes de remoción de los polinios (Figura 2), no se observaron diferencias entre en ambas localidades en el tratamiento de ET (p -valor = 0.674) ni en el Control (p -valor = 0.168). El porcentaje menor de remoción de polinios fue en el tratamiento de ET de la localidad de Son Doblons ($24.1\% \pm 1.14$), mientras que el tratamiento con mayor porcentaje de remoción de polinios se encontró en la localidad de Son Mut Nou para el tratamiento de EV ($44.1\% \pm 1.28$), superando los resultados del tratamiento Control de ambas localidades ($32.6\% \pm 2.2$ para la localidad de Son Mut Nou y $38.6\% \pm 1.1$ para la localidad de Son Doblons).

Finalmente, en cuanto la depredación, se observaron los siguientes resultados: en la localidad de Son Mut Nou, la depredación fue del $0.8\% \pm .0374$ para el tratamiento EV y $0.245\% \pm 0.245$ para el tratamiento ET; para la localidad de Son Doblons, la depredación observada fue del $1\% \pm 0.316$ para el tratamiento EV y $0.6\% \pm 0.4$ para el tratamiento ET. Además, no se observaron diferencias entre ambas localidades en el tratamiento EV (p -valor = 0.694) ni en el tratamiento ET (p -valor = 0.811). Además, tampoco se observaron diferencias entre estos dos tratamientos (p -valor = 0.871), pero ambos tratamientos, tanto el de EV como el de ET, sí que difieren del tratamiento Control (p -valor < 0.001 en ambos casos) (Figura 2).

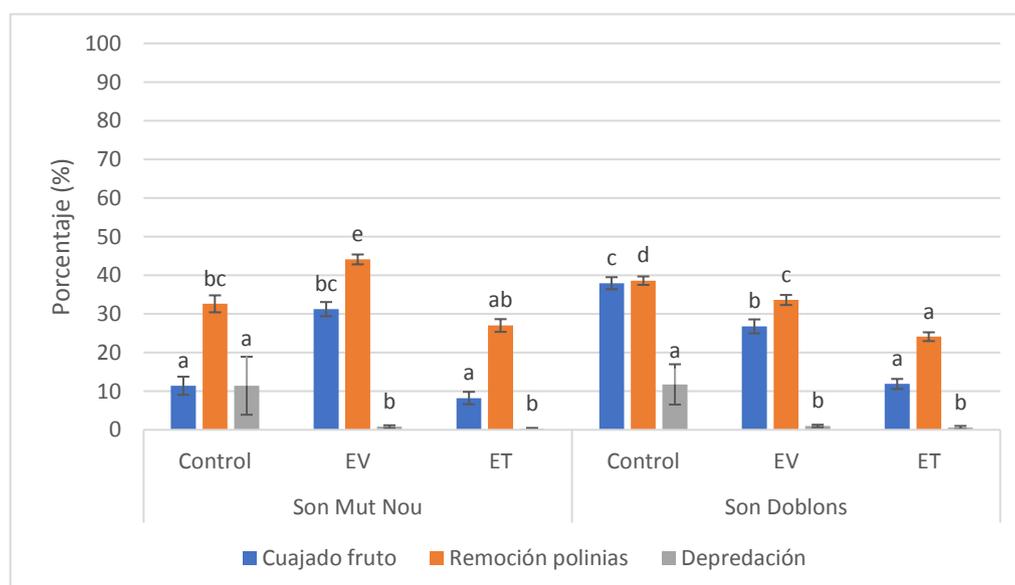


Figura 2. Resultado del porcentaje del cuajado del fruto, remoción de polinios y depredación para cada tratamiento (Control, EV y ET) en la localidad de Son Mut Nou y Son Doblons. Las barras de error indican el error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos y localidades para cada variable de estudio. Para el estudio del cuajado de fruto, remoción de polinios y depredación en la localidad de Son Mut Nou, en todos los tratamientos $n = 5$; mientras que en la localidad de Son Doblons, $n = 5$ en los tratamientos de EV y ET y $n = 4$ en el tratamiento control.

Finalmente, se observaron diferencias significativas entre todas las interacciones entre las variables explicativas del análisis GLM de exclusión, es decir, que para las medidas de cuajado de fruto y de remoción de polinias hubo diferencias entre tratamientos, entre localidades y entre la interacción tratamiento y localidad (en todos los casos, p-valor < 0.001).

DISCUSIÓN

Características biométricas y éxito reproductivo

En este estudio se observó una correlación entre algunas características biométricas con el éxito reproductivo. En otros estudios sobre *Ancamptis morio* L. también se confirmó una correlación del éxito reproductivo con la altura del espolón (Zitari et al., 2011) y con el brillo y contraste floral (Sletvold et al., 2016). Los resultados observados en este trabajo van en línea con los resultados del estudio de Capó et al. (2019), ya que se mostró que el tamaño de la inflorescencia - característica relacionada con el atractivo para el polinizador- está correlacionado con el cuajado de fruto (Totland, 2001); también se mostró una correlación entre la altura del individuo con el éxito reproductivo. En otros estudios sobre orquídeas también se observa que la altura de la planta afecta al éxito reproductivo a través del atractivo para los polinizadores de orquídeas (O'Connel & Johnston, 1998, Aragón & Acherkman, 2004), sin embargo, hay trabajos donde no se han observado estas relaciones (Handel & Peakall, 1993; Jacquemyn & Brys, 2010; Calvo, 1990). Esta variedad e incongruencia de resultados sugieren que la selección de los polinizadores sobre el tamaño de la inflorescencia y la altura de la planta a través de la producción de frutos es débil, probablemente por la limitación del bajo nivel de visitas (Calvo, 1990; Jacquemyn & Brys, 2010).

Evaluación de la depredación y la exclusión frente al éxito reproductivo en cada localidad

En los tratamientos de EV y ET no hubo diferencias en la depredación entre localidades (p-valor = 0.73), mientras que en el tratamiento control se observa una mayor depredación. Podemos confirmar que el grado de depredación disminuye drásticamente con el uso de jaulas de exclusión (Sigcha et al., 2018; Herrera, 2000; Capó et al., 2019). En cuanto a las tasas de depredación de los individuos control en la localidad de Son Mut Nou (33.9% ± 12.05), se puede observar una variedad temporal con respecto a los resultados de Capó et al. (2019), donde se pudo apreciar un aumento de la depredación (57.44% ± 7.13). En el estudio de Capó et al. (2019) se observó que el intensivo ataque del conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758)) originario de la cuenca mediterránea (Jaksic & Soriguer, 1981), de los caracoles (*Helix aspersa* (Müller, 1774), *Allognathus balearicus* (Rossmässler, 1838)) y de las tortugas (*Testudo hermanni* (Gmelin, 1789)) fueron la causa de la herbivoría de las varas florales de muchas orquídeas. Una depredación elevada por parte de los herbívoros puede indicar carencia o escasez de depredadores, o bien, una baja abundancia de los recursos alimentarios de la zona (Jones, 2000).

La cantidad de semillas viables perdidas se midió a partir de la relación entre la cantidad de semillas viables y la tasa de depredación de cada localidad. La cantidad de semillas viables perdidas fue mucho mayor en la localidad de Son Doblons. La pérdida de superficie foliar debido a la depredación se traduce en una estrecha disminución de la producción de semillas (Mothershead & Marquis, 2000). Sin embargo, estos resultados no pueden explicarse mediante una mayor tasa de depredación entre localidades, ya que no se observaron diferencias en la depredación. En el estudio de Capó et al. (2019) se observó que la autopolinización reduce la viabilidad de las semillas, pese a que los resultados en el cuajado de fruto con respecto a la polinización cruzada fueron similares, de hecho, en el trabajo de Ackerman & Montalvo (1990), el conjunto de semillas perdidas aumentó cuanto mayor fuera el cuajado de fruto. Estos resultados indican que la aptitud femenina está estrechamente relacionada con la fertilización cruzada, típico de orquídeas que utilizan estrategias de engaño (Jersakova et al., 2006). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las estrategias de engaño favorecen la reproducción mediante polinización cruzada (De Jong et al., 1993; Johnson & Nilsson, 1999).

Se observó una alta variación espacial en el éxito reproductivo, también registrado en otras especies (Conner et al., 2003; Borràs, 2018). Sin embargo, llama la atención el resultado tan bajo del cuajado de fruto en la localidad de Son Mut Nou para el tratamiento control, que puede explicarse por las condiciones del hábitat. Cabe destacar que la localidad de Son Mut Nou se trata de una zona de ocasional pastoreo donde el hábitat se encuentra fraccionado por caminos de tierra y áreas de cultivo. La fragmentación del hábitat puede provocar una disminución del cuajado de los frutos en las poblaciones de plantas silvestres (Cunningham, 2000). Además, la densidad poblacional de la localidad de Son Mut Nou fue mucho menor que en la localidad de Son Doblons (observación personal). Este hecho también podría ser explicado por el tipo de hábitat, conclusión que se refuerza en el trabajo de Parra-Sánchez (2013), donde se evidenció una disminución del tamaño poblacional de orquídeas en zonas con cobertura de pasturas. Existen otros factores que pueden explicar esta diferencia entre localidades, como la composición de la fauna polinizadora entre poblaciones (Capó et al., 2019), la competencia de dicha fauna debido a la variabilidad florística (Johnson et al., 2003), la heterogeneidad espacial del hábitat (Gargano et al., 2017) o incluso también pueden afectar los factores meteorológicos. Además, en todos los tratamientos en ambas localidades, la tasa de remoción de polinos fue superior al cuajado de fruto. Estos resultados están en línea con los resultados de Capó et al. (2019). también se observaron altos niveles de remoción de polinos en otros estudios sobre orquídeas con reproducción por engaño (Scopece et al., 2017; Pellegrino et al., 2005). El hecho de que la mayor proporción de las flores actúen como masculinas, pero no como femeninas, puede deberse a que extraer los polinios sea más fácil que dejarlos puestos sobre el estigma (Cozzolino et al., 2005). Las orquídeas con sistemas de reproducción por decepción sacrifican una mayor formación de frutos con tal de recibir más cantidad de visitas de polinizadores, los cuales viajan largas distancias; de esta forma, potenciando la aptitud masculina de las flores, se aseguran la variabilidad genética de la descendencia y una mejor calidad de los frutos (Borràs, 2018). Estos resultados refuerzan la conclusión de que el éxito reproductivo en especies que utilizan estrategias de engaño alimentario depende en gran medida por la limitación de la interacción de polinizadores (O'Connell & Johnston, 1998; Neiland y Wilcock 1998; Tremblay 2005). En la literatura no se muestran datos de polinizadores para *A. longicornu*, sin embargo, en el trabajo de Capó et al. (2019) se registró una visita de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) con un polinio adherido. También se han registrado otros himenópteros para el género *Anacamptis*, como *Bombus* sp., *Episyrphus balteatus* y *Sphaerophoria scripta*, además de arácnidos, coleópteros y lepidópteros, como *Colias* sp., *Zygaena* sp., *Ochlodes venatus* (Pardo, 2009), algunos de los cuales fueron vistos en ambas localidades.

El tratamiento con menor éxito reproductivo se observó en el de ET. Esto se explica porque el diámetro de malla del tratamiento de ET no sólo evita la depredación, sino que también limita la polinización. En el trabajo de Sanguinetti (2016) también se comprueba que las especies engañosas dependen de polinizadores para fructificar. Por otra parte, los resultados de cuajado de fruto y remoción de polinios en el tratamiento EV siempre fueron más elevados que en el tratamiento ET, estos resultados también se observaron en el trabajo de Valdivia & Simonetti (2018). Por lo tanto, las medidas de exclusión óptimas dependerán de las dimensiones de la jaula y las medidas de la malla (Faast & Facelli, 2009).

Actualmente, debido a las perturbaciones en el hábitat natural, entre otros factores, cada vez es más probable que las plantas se enfrenten a la presión selectiva relacionada con los mutualistas (agentes polinizadores) y antagonistas (herbívoros) (Fontúrbel & Murúa, 2014; Valiente-Banuet et al., 2015). El uso de jaulas de exclusión para la depredación se ha realizado en otros estudios donde el ataque de los herbívoros y la baja regeneración natural ejercen una gran presión en la supervivencia de la especie (Jones, 2000). Los resultados del éxito reproductivo de los individuos control de Son Doblons, indican que en zonas donde la supervivencia de la especie no se ve amenazada por el tipo de hábitat, el uso de jaulas de exclusión limita más el éxito reproductivo que no una fuerte depredación. Por otra parte, en zonas donde existe fragmentación del hábitat, como es el caso de Son Mut Nou, un elevado grado de depredación (tratamiento Control) y una fuerte limitación al acceso de polinizadores (tratamiento ET) afectan prácticamente en igual medida a la disminución del cuajado de fruto y remoción de polinios, siendo el tratamiento EV el más eficaz para asegurar el éxito reproductivo de la especie.

CONCLUSIONES

A partir de la recolección de datos tratados en este trabajo, podemos concluir los siguientes puntos:

1. La aptitud reproductiva está relacionada con características biométricas como la altura de la planta y el tamaño de la inflorescencia.
2. Debido a que *A. longicornu* es una especie que utiliza un mecanismo engañoso de reproducción, el cuajado de fruto es generalmente bajo y la limitación del polen es elevada.
3. Debido a que la reproducción de *A. longicornu* es fuertemente dependiente de polinizadores, el uso de jaulas de exclusión total reduce la capacidad de éxito reproductivo de esta especie en todos los casos. Sin embargo, en poblaciones que se puedan ver amenazadas por factores como la fragmentación del hábitat, el uso de jaulas de exclusión de vertebrados es la mejor alternativa para asegurar el éxito reproductivo de la especie

Sin embargo, el estudio sobre el éxito reproductivo de *A. longicornu* no debe cesar, ya que los parámetros relacionados con la supervivencia de esta especie son muy amplios y dependen, en gran medida, de las variaciones espacio – temporales. Cabe destacar también, la importancia de identificar los vectores polinizadores para esta especie, que ayudará enormemente a comprender el estudio del éxito reproductivo de esta orquídea.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la realización de este trabajo, en primer lugar, a mi guía y tutora, la Dra. Joana Cursach Seguí, por sus consejos, ayudas, orientación y dedicación durante todo el estudio. También quiero agradecerle al pionero en el estudio de poblaciones de *A. longicornu* en Mallorca, Miquel Capó, ya que, sin sus estudios previos este trabajo jamás podría haberse realizado. Además de sus aportaciones también quiero agradecerle su ayuda y experiencia en este campo, así como al Dr. Juan Rita, por su apoyo durante el proyecto. Un agradecimiento especial a Joshua Borrás Iulen, compañero, científico y apasionado de la botánica, cuyos conocimientos informáticos han reflejado el sentido de este trabajo. Finalmente, también quisiera agradecer a mi familia, a Guillermo Borrás Bustos y a Joan Pons Perpinyà por todo su apoyo, confianza y ayuda.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, J. D., Morales, M., & Tremblay, R. (2011). Darwin's orchids: their variation, plasticity, and natural selection. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 11(3), 179-184.
- Ackerman J. D., Montalvo A. M. (1990). Short- and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology*, (71), 263–272.
- Albores-Ortiz, O., & Sosa, V. (2006). Polinización de dos especies simpátricas de Stelis (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta botánica mexicana*, (74), 155-168.
- Alomar, G. (1994). *Petita Guía de les Orquídes de les Balears*. Govern Balear, Conselleria d'Agricultura y Pesca. Palma de Mallorca. 85 pp.
- Aragón, S., & Ackerman, J. D. (2004). Does flower color variation matter in deception pollinated *Psychilis monensis* (Orchidaceae)? *Oecologia*, 138(3), 405-413.
- Ayasse, M. (2006). Floral scent and pollinator attraction in sexually deceptive orchids. In *Biology of floral scent* (pp. 233-256). CRC Press.
- Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J. Y., & Boeuf, G. (2010). *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press.
- Borràs Riera, J. I. (2018). Análisis de los parámetros que afectan al éxito reproductivo de *Ophrys balearica* P. Delforge.
- Burd, M. (1995). Pollinator behavioural responses to reward size in *Lobelia deckenii*: no escape from pollen limitation of seed set. *Journal of Ecology*, 865-872.
- Calvo R. N. (1990). Inflorescence size and fruit distribution among individuals of three orchid species. *Am J Bot* (77), 1378–1381.
- Capó, M. (2014) Estudi de la biologia reproductiva de *Orchis longicornu* Poir. a les Illes Balears. Trabajo Fin de Grado. Universitat de les Illes Balears, 32 pp.
- Capó, M., Cursach, J., & Rita, J. (2019). Disentangling the pollination system of the food-deceptive orchid *Anacamptis longicornu* (Orchidaceae): from breeding system to spatio-temporal variation in reproductive success. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-10.
- Case, M. A., & Bradford, Z. R. (2009). Enhancing the trap of lady's slippers: a new technique for discovering pollinators yields new data from *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160(1), 1-10.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*, 177(2), 151-174.
- Conner, J. K., Rice, A. M., Stewart, C., & Morgan, M. T. (2003). Patterns and mechanisms of selection on a family-diagnostic trait: evidence from experimental manipulation and lifetime fitness selection gradients. *Evolution*, 57(3), 480-486.
- Corrias, B., Rossi, W., Arduino, P., Cianchi, R., & Bullini, L. (1991). *Orchis longicornu* Poiret in Sardinia: genetic, morphological and chorological data. *Webbia*, 45(1), 71-101.
- Cozzolino, S., Schiestl, F. P., Müller, A., De Castro, O., Nardella, A. M., & Widmer, A. (2005). Evidence for pollinator sharing in Mediterranean nectar-mimic orchids: absence of pre-mating barriers?. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1569), 1271-1278.

Cunningham, S. A. (2000). Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1448), 1149-1152.

Cursach, J., Moragues, E., & Rita, J. (2013). Herbivory and plant competition effects on the population dynamics of *Naufraga balearica*, a threatened narrow endemic species of the Balearic Islands. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(2), 508-517.

Dafni, A. (1983). Pollination of *Orchis caspia*--a nectarless plant which deceives the pollinators of nectariferous species from other plant families. *The Journal of Ecology*, 467-474.

De Jong, T. J., Waser, N. M., & Klinkhamer, P. G. (1993). Geitonogamy: the neglected side of selfing. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(9), 321-325.

Del Prete, C., Mazzola, P., & Miceli, P. (1991). Karyological differentiation and speciation in *C. Mediterranean Anacamptis* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 174(3-4), 115-123.

Elle, E., & Hare, J. D. (2002). Environmentally induced variation in floral traits affects the mating system in *Datura wrightii*. *Functional Ecology*, 79-88.

Equipo central R. R: Un lenguaje y un entorno para la computación estadística. Fundación R para la Computación Estadística, Viena, Austria. 2018. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.

Estevez, M., & Rosa, E. (2005). Inventario de orquídeas epifitas del bosque latifoliado maduro de la Montaña de Linaca, El Paraiso, Honduras.

Faast, R., & Facelli, J. M. (2009). Grazing orchids: impact of florivory on two species of *Caladenia* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany*, 57(4), 361-372.

Fontúrbel, F. (2002). Rol de la coevolución planta-insecto en la evolución de las flores cíclicas en las angiospermas. *Ciencia Abierta*, 17(11).

Fontúrbel, F. E., & Murúa, M. M. (2014). Microevolutionary effects of habitat fragmentation on plant-animal interactions. *Advances in Ecology*, 2014.

Gargano, D., Fenu, G., & Bernardo, L. (2017). Local shifts in floral biotic interactions in habitat edges and their effect on quantity and quality of plant offspring. *AoB Plants*, 9(4).

Gaskett, A. C. (2011). Orchid pollination by sexual deception: pollinator perspectives. *Biological Reviews*, 86(1), 33-75.

Gigord, L. D., Macnair, M. R., Stritesky, M., & Smithson, A. (2002). The potential for floral mimicry in rewardless orchids: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1498), 1389-1395.

Gill D.E. (1989) Fruiting failure, pollinator inefficiency, and speciation in orchids. *Otte D, Endler JA (eds) Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland*, pp 458-481.

Gomez, J. M. (2002). Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista chilena de historia natural*, 75(1), 105-115.

Gowda, J., & de Paz, S. (2014). Herbívoros: actores clave. *Ecología e historia natural de la Patagonia Andina: un cuarto de siglo de investigación en biogeografía, ecología y conservación* (E. Raffaele, M. de Torres Curth, CL Morales & T. Kitzberger, eds.). *Fundación de Historia Natural Félix de Azara, Buenos Aires*.

Grajales-Conesa, J., Meléndez-Ramírez, V., & Cruz-López, L. (2011). Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1356-1367.

- Grindeland, J. M., Sletvold, N., & Ims, R. A. (2005). Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Functional Ecology*, *19*(3), 383-390.
- Gumbert, A., & Kunze, J. (2001). Colour similarity to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. *Biological Journal of the Linnean Society*, *72*(3), 419-433.
- Hágsater, E. (2005). *Orchids of Mexico*. Productos Farmacéuticos, SA de CV.
- Handel, S. N., & Peakall, R. (1993). Thynnine wasps discriminate among heights when seeking mates: tests with a sexually deceptive orchid. *Oecologia*, *95*(2), 241-245.
- Henneresse, T., Wesselingh, R. A., & Tyteca, D. (2017). Effects of floral display, conspecific density and rewarding species on fruit set in the deceptive orchid *Orchis militaris* (Orchidaceae). *Plant Ecology and Evolution*, *150*(3), 279-292.
- Herrera, C. M. (2000). Measuring the effects of pollinators and herbivores: evidence for non-additivity in a perennial herb. *Ecology*, *81*(8), 2170-2176.
- Herrera, C. M., Medrano, M., Rey, P. J., Sánchez-Lafuente, A. M., García, M. B., Guitián, J., & Manzaneda, A. J. (2002). Interaction of pollinators and herbivores on plant fitness suggests a pathway for correlated evolution of mutualism-and antagonism-related traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(26), 16823-16828.
- Jacquemyn, H., & Brys, R. (2010). Temporal and spatial variation in flower and fruit production in a food-deceptive orchid: a five-year study. *Plant Biology*, *12*(1), 145-153.
- Jaksic, F. M., & Soriguer, R. C. (1981). Predation upon the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Mediterranean habitats of Chile and Spain: a comparative analysis. *The Journal of Animal Ecology*, 269-281.
- Jersáková, J., Johnson, S. D., & Kindlmann, P. (2006). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological reviews*, *81*(2), 219-235.
- Johnson, S. D., & Bond, W. J. (1997). Evidence for widespread pollen limitation of fruiting success in Cape wildflowers. *Oecologia*, *109*(4), 530-534.
- Johnson, S. D., & Nilsson, L. A. (1999). Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. *Ecology*, *80*(8), 2607-2619.
- Johnson, S. D., Peter, C. I., Nilsson, L. A., & Ågren, J. (2003). Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology*, *84*(11), 2919-2927.
- Jonasson, S. (2015). Las orquídeas: engañosas joyas de nuestra flora. *GOVERN DE LES ILLES BALEARS. Conselleria d'Agricultura Medi Ambient i Territori, ed. Llibre Verd de Protecció d'Espècies a les Balears. Palma de Mallorca: Servei de Reprografia Digital*.
- Jones Román, G. (2000). Early regeneration of two large-seed species in fragmented forests of North Zone of Costa Rica.
- Juenger, T., & Bergelson, J. (1997). Pollen and resource limitation of compensation to herbivory in scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Ecology*, *78*(6), 1684-1695.
- Larson, B. M., & Barrett, S. C. (2000). A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological journal of the Linnean Society*, *69*(4), 503-520.
- Li, P., Huang, B. Q., Pemberton, R. W., Luo, Y. B., & Cheng, J. (2011). Floral display influences male and female reproductive success of the deceptive orchid *Phaius delavayi*. *Plant systematics and evolution*, *296*(1-2), 21-27.

- Llabrés, G. (2015). Estudi de la Biologia Reproductiva de l'Orquídia *Anacamptis coriophora*. *Trabajo de Fin de Grado*. Universitat de les Illes Balears, 29 pp.
- Llorens, L., Vives, L. G., & Tébar, F. J. (2007). *La vegetació de l'illa de Mallorca: bases per a la interpretació i gestió d'hàbitats*. Associació Jardí Botànic de Palma.
- Mothershead, K., & Marquis, R. J. (2000). Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant–pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology*, 81(1), 30-40.
- Mulder, C. P., & Ruess, R. W. (1998). Effects of herbivory on arrowgrass: interactions between geese, neighboring plants, and abiotic factors. *Ecological Monographs*, 68(2), 275-293.
- Neiland, M. R. M., & Wilcock, C. C. (1998). Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany*, 85(12), 1657-1671.
- Niemeyer, H., & Teillier, S. (2007). Aromas de la flora nativa de Chile. Gobierno de Chile. Fundación para la innovación agraria. Ministerio de agricultura. 448 p
- Nilsson, L. A. (1992). Orchid pollination biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 7(8), 255-259.
- O'Connell, L. M., & Johnston, M. O. (1998). Male and female pollination success in a deceptive orchid, a selection study. *Ecology*, 79(4), 1246-1260.
- Pacini, E., Viegi, L., & Franchi, G. (2008). Types, evolution and significance of plant–animal interactions. *Rendiconti Lincei* 19:75–101.
- Pardo, F. M. V. (2009). Revisión de la familia Orchidaceae en Extremadura (España). *Folia Botanica Extremadurensis*, (3), 7-365.
- Parra-Sánchez, E. A. (2013). Efecto de los patrones del paisaje sobre la diversidad de orquídeas de bosques nublados del Valle del Cauca. *Departamento de Biología*.
- Parra-Tabla, V., Vargas, C. F., Magaña-Rueda, S., & Navarro, J. (2000). Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindey (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs agricultural field. *Biological Conservation*, 94(3), 335-340.
- Peakall, R. (1989). The unique pollination of *Leporella fimbriata* (Orchidaceae): pollination by pseudocopulating male ants (*Myrmecia urens*, Formicidae). *Plant Systematics and Evolution*, 167(3-4), 137-148.
- Pellegrino, G., Bellusci, F., & Musacchio, A. (2005). Evidence of post-pollination barriers among three colour morphs of the deceptive orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Sexual plant reproduction*, 18(4), 179-185.
- Pouyanne, A. (1917). La fécondation des Ophrys par les insectes. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, 8(1), 6-7.
- Raguso, R. A. (2004). Why are some floral nectars scented?. *Ecology*, 85(6), 1486-1494.
- Sanguinetti, A. (2016). Estudios taxonómicos y de estrategias reproductivas en orquídeas de la subtribu *Chloraeinae* Pfitzer con énfasis en especies de distribución oriental (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Sedano, C. G., Manzo, G. A., Roldán, H. R., & Castellanos, J. A. (2015). Propagación in vitro de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 451-456.
- Scopece, G., Juillet, N., Lexer, C., & Cozzolino, S. (2017). Fluctuating selection across years and phenotypic variation in food-deceptive orchids. *PeerJ*, 5, e3704.

- Sigcha, F., Pallavicini, Y., Camino, M. J., & Martínez-Ruiz, C. (2018). Effects of short-term grazing exclusion on vegetation and soil in early succession of a Subhumid Mediterranean reclaimed coal mine. *Plant and Soil*, 426(1-2), 197-209.
- Singer, R. B., Marsaioli, A. J., Flach, A., & Reis, M. G. (2006). The ecology and chemistry of pollination in Brazilian orchids: recent advances. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, 4, 569-582.
- Singer, R. B. (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta biológica colombiana*, 14, 337-349.
- Sletvold, N., & Ågren, J. (2011). Nonadditive effects of floral display and spur length on reproductive success in a deceptive orchid. *Ecology*, 92(12), 2167-2174.
- Sletvold, N., Trunschke, J., Smit, M., Verbeek, J., & Ågren, J. (2016). Strong pollinator-mediated selection for increased flower brightness and contrast in a deceptive orchid. *Evolution*, 70(3), 716-724.
- Strauss, S. Y. (1997). Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. *Ecology*, 78(6), 1640-1645.
- Strauss, S. Y., Conner, J. K., & Rush, S. L. (1996). Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant fitness. *The American Naturalist*, 147(6), 1098-1107.
- Strauss, S. Y., & Murch, P. (2004). Towards an understanding of the mechanisms of tolerance: compensating for herbivore damage by enhancing a mutualism. *Ecological Entomology*, 29(2), 234-239.
- Suetsugu, K., Naito, R. S., Fukushima, S., Kawakita, A., & Kato, M. (2015). Pollination system and the effect of inflorescence size on fruit set in the deceptive orchid *Cephalanthera falcata*. *Journal of plant research*, 128(4), 585-594.
- Totland, O. (2001). Environment-dependent pollen limitation and selection on floral traits in an alpine species. *Ecology*, 82(8), 2233-2244.
- Tremblay, R. L. (2005). Larger is better: the effect of floral display on reproductive success in two populations of *Caladenia (Stegostyla) gracilis* R. Br. *Muelleria*, 22, 77-85.
- Tremblay, R. L., & Ackerman, J. D. (2007). Floral color patterns in a tropical orchid: Are they associated with reproductive success?. *Plant Species Biology*, 22(2), 95-105.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K., & Calvo, R. N. (2004). 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.
- Valdivia, C. E., & Simonetti, J. A. (2018). Los efectos aditivos de polinizadores y herbívoros sobre la enredadera *Bomarea salsilla* (Alstroemeriaceae) permanecen espacialmente consistentes en un bosque fragmentado. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(4), 1100-1106.
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M. A., Alcántara, J. M., Arroyo, J., Cocucci, A., Galetti, M., & Medel, R. (2015). Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29(3), 299-307.
- Van der Cingel, N. A. (2001). Atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia. Rotterdam: A. A. Balkema Publishers
- Van der Pijl, L., & Dodson, C. H. (1966). Orchid flowers, their pollination and evolution Florida.

Vázquez, F. M., Blanco, J., García, D., Márquez, F., & Guerra, M. J. (2015). Review of *Anacamptis* sect. *Morianthus* taxa from SW Iberian Peninsula. *Journal Europäischer Orchideen*, 47(2-4), 2-4.

Whigham, D. F. (1990). The effect of experimental defoliation on the growth and reproduction of a woodland orchid, *Tipularia discolor*. *Canadian Journal of Botany*, 68(8), 1812-1816.

Winkler, M., Hülber, K., Mehlreter, K., Franco, J. G., & Hietz, P. (2005). Herbivory in epiphytic bromeliads, orchids and ferns in a Mexican montane forest. *Journal of Tropical Ecology*, 147-154.

Zitari, A., Tranchida-Lombardo, V., Cafasso, D., Helal, A. N., Scopece, G., & Cozzolino, S. (2011). The disjointed distribution of *Anacamptis longicornu* in the West-Mediterranean: the role of vicariance versus long-distance seed dispersal. *Taxon*, 60(4), 1041-1049.

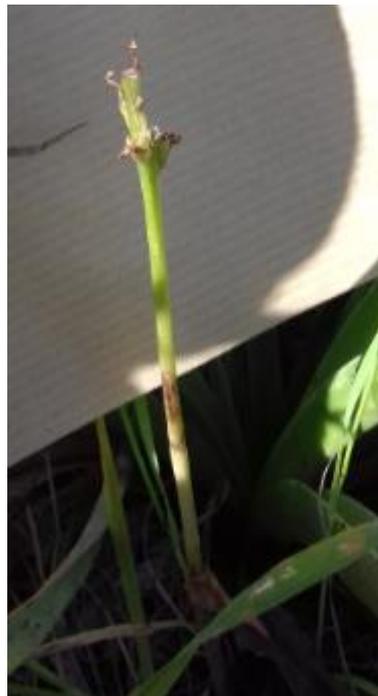
ANEXO FOTOGRÁFICO



Fotografía 1. Ejemplares de *Anacamptis longicornu* donde puede apreciarse el color y de las flores y su arquitectura.



Fotografía 2. Individuos Control de *Anacamptis longicornu* con el tallo depredado por herbívoros vertebrados. En el interior del círculo rojo puede apreciarse la inflorescencia en el suelo.



Fotografía 3. Primer plano de un individuo Control con el tallo depredado por el ataque de herbívoros vertebrados.



Fotografía 4. Disposición de algunas de las parcelas para los tratamientos de exclusión de herbívoros vertebrados y exclusión total en la localidad de Son Doblons.



Fotografía 5. Fruto de *Anacamptis longicornu* con sus semillas en una placa de Petri.