

**Universidade da Coruña**

**Facultade de Ciencias**

TRABALLO DE FIN DE GRAO

2013

---

**Análise da diversidade xenética e conservación en  
poboacións naturais da orquídea *Spiranthes spiralis* (L.)  
Chevall no NW da Península Ibérica**

---

Por

Alberto Lema Blanco



## Guión

• <b>Introdución</b> .....	2
○ <b>Familia Orchidaceae</b> .....	2
○ <b>O xénero <i>Spiranthes</i></b> .....	3
○ <b><i>Spiranthes spiralis</i> (L.) Chevall.</b> .....	6
○ <b>Distribución</b> .....	6
○ <b>Comunidades</b> .....	7
○ <b>Morfoloxía da planta</b> .....	8
○ <b>Ciclo de vida</b> .....	10
○ <b><i>Spiranthes spiralis</i>. Estado de conservación</b> .....	11
○ <b>Situación en Galicia</b> .....	11
• <b>Material e métodos</b> .....	12
○ <b>Prospección de poboacións e recolección de mostrás</b> .....	13
○ <b>Análises moleculares</b> .....	15
○ <b>Secuenciación de ADN</b> .....	15
○ <b>Os microsátélites</b> .....	17
○ <b>Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)</b> .....	17
• <b>Resultados e discusión</b> .....	19
○ <b>Prospección de poboacións naturais</b> .....	19
○ <b>Análises moleculares</b> .....	20
○ <b>Estudo piloto de secuenciación e filoxenia</b> .....	20
○ <b>Microsátélites</b> .....	22
○ <b>AFLPs</b> .....	23
• <b>Bibliografía</b> .....	23

## **Resumo**

*Spiranthes spiralis* é unha orquídea europea con presenza no NW da Península Ibérica que diminuíu considerablemente as súas poboacións. Esta distribuída amplamente por Europa tendo unhas características propias que a clasifican como un elemento de interese para a súa preservación. En Galicia esta pouco estudada pero si a súa especie irmá *S. aestivalis*, que debido a súa situación precaria incita a realizar estudos de conservación deste taxon. Por unha banda examináronse as poboacións no campo a partir de referencias bibliográficas da especie e puxéronse a punto técnicas xenéticas (Secuencias hipervariables, microsátélites e AFLPs) para o estudo da variabilidade xenética das poboacións. A análise das poboacións no campo dou como resultado que un 19,23% das poboacións desapareceran fronte a un 31,25% en *S. aestivalis*, aparecendo 10 novas poboacións sen rexistrar. Isto reflicte a boa saúde de *S. spiralis* en Galicia aínda que se necesitan un maior coñecemento do seu comportamento. A filoxenia resultante do estudo das secuencias non ofrece ningunha variabilidade entre as poboacións, incluso ao incluír individuos de fóra de Galicia e da Península Ibérica, e só se visualizou unha pequena ao incorporar os gaps. As demais técnicas non mostraron unha resolución.

## **Introdución**

### **Familia Orchidaceae**

As orquídeas (Liliopsida; Asparagales) están encadradas dentro do grupo máis amplo e diversificado das anxiospermas. O número de especies nesta familia, segundo os distintos autores, oscila entre 15.000 e 35.000, aínda que en xeral se fala de 20.000 especies repartidas en 750-850 xéneros (Dahlgren et al., 1985). Un cuarto das especies son terrestres e o resto epífitas, das que só un 5% pode presentar ambas as dúas formas de crecemento e inclusive seren hipoxeas. Presentan unha gran diversidade de formas de vida, con especies plenamente autótrofas e especies parcial ou totalmente saprófitas e micoparasitas. A familia Orchidaceae mostra numerosas sinapomorfias na morfoloxía floral e tamén na estrutura de sementes e raíces.

As flores das orquídeas son bisexuais, zigomorfas, de ovario ínfero e presentan a estrutura típica dunha monocotiledónea; verticilos alternos formados por tres pezas florais cada un, entre as que destaca unha peza moi modificada denominada labelo. Este

tépalo acada unha gran variedade de formas e cores e a súa misión principal é a atracción dos insectos. As flores das orquídeas son sempre zoófilas, sendo polinizadas principalmente por himenópteros, lepidópteros, dípteros e coleópteros (Van der Cingel, 1995). Os verticilos fértiles da flor están tamén moi modificados, encontrándose os estames unidos ao estilo e ao estigma formando a columna ou xirostemo. Os grans de pole libéranse en dúas masas compactas denominadas polinios, que corresponden con cada saco polínico. Para evitar a autopolinización, o estigma posúe unha protuberancia de morfoloxía variable chamada rostelo.

A familia Orchidaceae divídese en varias subfamilias en base a estudos morfolóxicos e moleculares: Apostasioideae, a máis antiga segundo a súa posición filoxenética, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (Fig. 1). Na actualidade os estudos xenéticos definen claramente as tres subfamilias Apostasioideae, Cyripedioideae e Orchidoideae nun clado monofilético (Cameron et al., 1999; Fig. 1). Na Península Ibérica existen as subfamilias Cyripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae. As dúas últimas están presentes en Galicia.

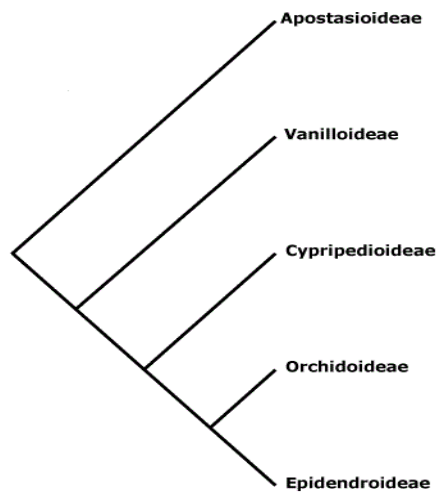


Figura 1. Filoxenia da familia Orchidaceae (Judd et al. 2008).

### **O xénero *Spiranthes***

O xénero *Spiranthes* Rich. encóntrase na subfamilia Orchidoideae e no grupo das orquídeas monandras, aquelas que posúen un único estame funcional. Concretamente a subfamilia Orchidoideae defínese por sinapomorfias como o ápice da antera agudo, talos flexibles, follas convolutas pero non plisadas e ausencia de corpos

silíceos (Judd et al. 2008). Previamente (e.g., Dressler, 1993) *Spiranthes* fora incluída na subfamilia Spiranthoideae. Esta subfamilia estaría caracterizada por un viscidio terminal, carácter presente tamén noutros grupos. Trataríase dun grupo principalmente tropical, mais con representantes en zonas frías tanto no sur coma no norte. Porén, a creación da subfamilia Spiranthoideae non está apoiada pola morfoloxía ou os estudos moleculares (Chase et al., 2001). Dentro da subfamilia Orchidoideae, *Spiranthes* incluíríase na tribo Cranichideae (Dressler, 1986). Esta tribo é principalmente americana excepto por algúns xéneros e especies de *Spiranthes*. En 1840, Lindley creou a subtribo Spiranthinae, que englobaría ao xénero *Spiranthes*. Os representantes desta subtribo teñen modos de vida principalmente terrestre e ocasionalmente epífitos. A súa distribución é principalmente americana, pero hai algúns representantes en todos os continentes menos no sur de África e no trópico. A súa polinización prodúcese fundamentalmente por abellas e abesouros (Catling, 1983).

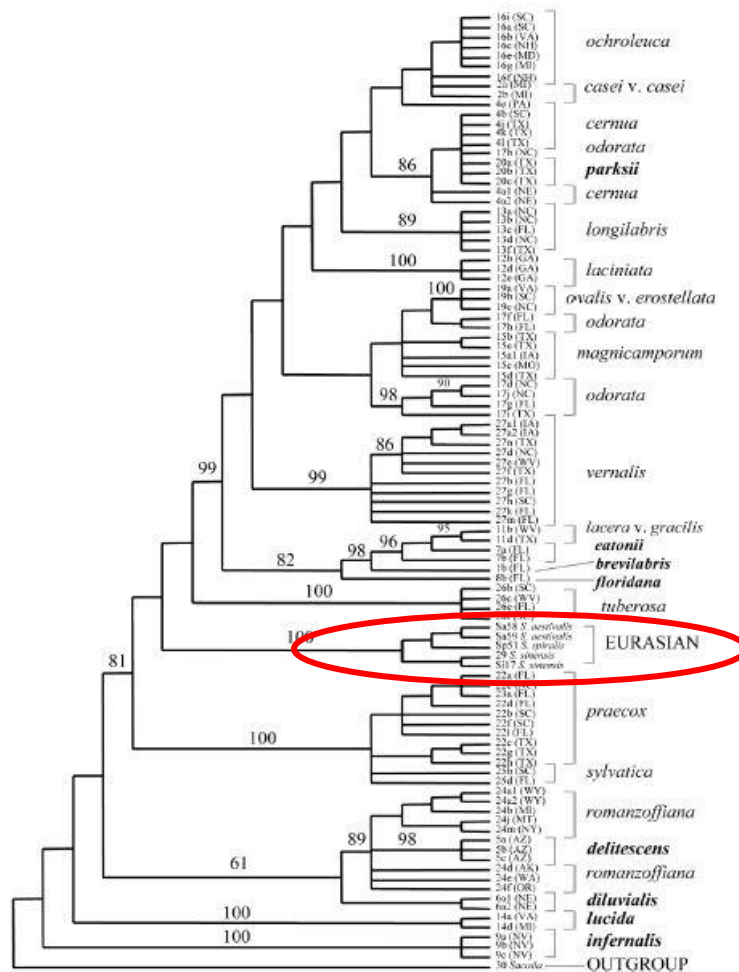


Figura 2. Filoxenia dos taxones do xénero *Spiranthes* (Dueck & Cameron, 2007). As especies europeas forman un clado monofilético marcado no texto en vermello.

O xénero *Spiranthes* está constituído por aproximadamente 40 especies (Salazar et al., 2003) das cales unicamente 4 atópanse en Eurasia (*Spiranthes aestivalis* (Poir.) Rich, *Spiranthes romanoffiana* Cham. & Schldtl., *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. e *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames.) e dúas na Península Ibérica (*S. spiralis* e *S. aestivalis*). O centro de diversificación do xénero está nas zonas mornas do N de América, se ben tamén está presente no N de América do Sur, N de África, zonas mornas de Asia, Australia e Nova Zelandia (Pridgeon et al., 2003). A delimitación das especies do xénero é controvertida debido principalmente ao seu polimorfismo morfolóxico, combinado coa hibridación e a poliploidía (Sheviak, 1982). Na filoxenia do xénero (Dueck & Cameron, 2007), as especies europeas, encóntrase (cun valor de soporte do 81%) formando un clado monofilético ven diferenciado das especies americanas (Dueck & Cameron, 2007; Fig. 2).

***Spiranthes spiralis* (L.) Chevall.**

**Sin. *Ophrys spiralis* L.**

**Sin. *Spiranthes autumnalis* (Balb.) Rich.**

### **Distribución**

A distribución xeográfica de *S. spiralis* está probablemente influenciada polo seu florecemento tardío (Agosto-Setembro), xa que nas zonas do norte, por enriba das altitudes temperadas, as neves cedas evitan o establecemento das sementes. *S. spiralis* está tamén confinada a áreas nas cales moitas das precipitacións ocorren en primavera e verán, cando as asociacións micorrícicas están activas (Tyteca 2000). A nivel europeo, *S. spiralis* está amplamente distribuída desde Inglaterra e o S de Suecia ó Norte ata Grecia, Turquía, Líbano e Israel no Leste da bacía mediterránea (Fig. 3). No referido ó suroeste de Europa, presenta poboacións dispersas na Península Ibérica, así como no norte de África (Marruecos, Alxeria e Tunez) (Aedo & Herrero, 2005).

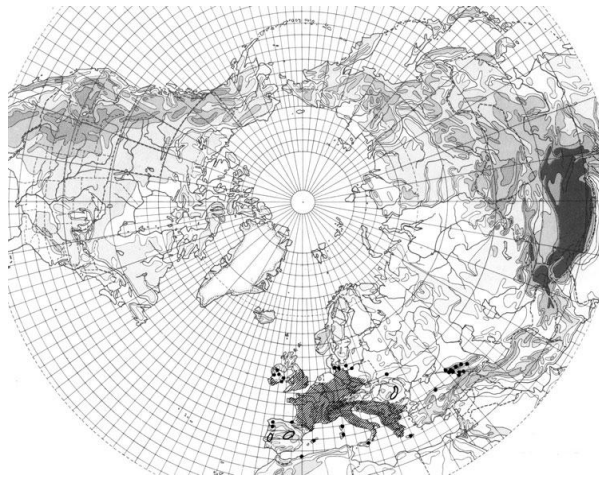


Figura 3. Distribución europea de *Spiranthes spiralis* (Jacquemyn, 2010).

Na Península Ibérica esta dispersa por case toda a súa extensión, aínda que é máis frecuente no Norte, Oeste e nas Illas Baleares (Aedo & Herrero, 2005) (Fig. 4).

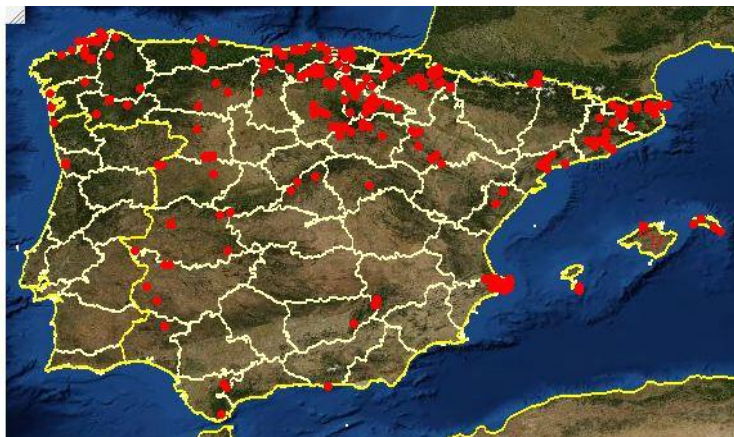


Figura 4. Mapa da distribución de *Spiranthes spiralis* na Península Ibérica (<http://www.anthos.es/>, 10/06/13).

En Galicia é un taxon bastante escaso; se ben a súa distribución non é ben coñecida (Cortizo & Sahuquillo, 2006) gran parte das citas son antigas e recentemente só se observou con certa frecuencia en zonas litorais da provincia da Coruña. É moi rara no interior (Cortizo & Sahuquillo, 2006; Fig. 5 ).

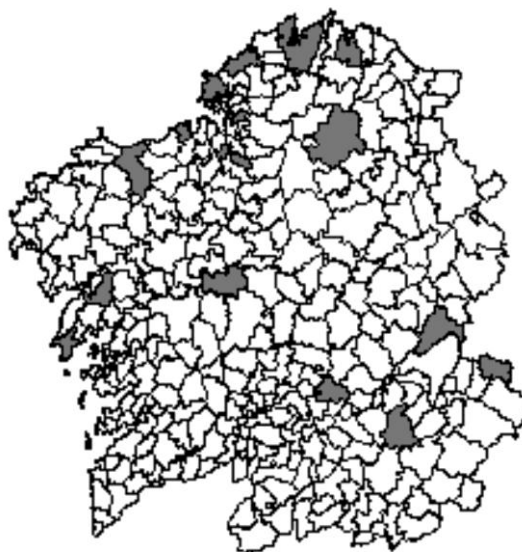


Figura 5. Mapa da distribución de *S. spiralis* en Galicia realizado por Cortizo & Sahuquillo (2006). Están marcados os concellos onde se encontra o taxon.

### **Comunidades**

*Spiranthes spiralis* habita principalmente zonas abertas e soleadas. Pasteiros ou xunqueiras de herba baixa sen árbores nin vexetación que poida crear sombra. Son herbais, pasteiros ou xunqueiras da costa e do interior. Os substratos onde se encontra



son, principalmente, solos de carácter básico ou neutro tales como solos de dunas fixadas na costa ou afloramentos calizos do interior (Jacquemyn, 2005). Nas Illas Británicas, onde a ecoloxía deste taxon é máis coñecida, son acompañantes habituais da comunidade *Festuca ovina-Avenula pratensis* (<http://jncc.defra.gov.uk/page-4259>). Son pasteiros calcáreos orixinadas polo intenso pastoreo de ovellas e coellos. En Países Baixos forma parte da vexetación dos complexos dunares pastoreados durante centos de anos, *Botrychio-Polygaletum* (Kreutz & Dekker 2000). No Centro de Europa, Ziegenspeck (1936) menciona que *S. spiralis* pódese encontrar nas comunidades de prados e pasteiros, e tamén nos bordes dos bosques e ladeiras soleadas. Máis o sur, *S. spiralis* pódese encontrar nunha gran variedade de hábitats abertos acompañadas de especies típicas mediterráneas. No NW da Península Ibérica, *S. spiralis* habita en pasteiros mesófilos (Clase *Molinio-Arrhenatheretea*); tamén en pradeiras de alta cobertura, dominadas por hemicriptófitos e caméfitos e con solos profundos de humidade estacional (Clase *Festuco-Brometea*). Nas áreas costeiras de Galicia, esta planta é acompañante nas xunqueiras de trasduna da asociación *Carici arenariae-Juncetum acuti*, pertencente á Orde *Arrhenatheretalia*.

### **Morfoloxía da planta**

Os individuos constan dunha parte aérea formada por unha roseta de follas (entre 4 e 5 follas por roseta) basais, pequenas, ovadas e elípticas e unha inflorescencia de tipo espiga con de 10 a 25 flores con disposición en espiral. A parte soterrada comprende dúas ou tres raíces tuberosas. Esta sirve como un órgano de reserva de fotosintatos que son substituídas anualmente e axudan ao crecemento das follas e a inflorescencia. A exoderme das raíces tuberosas está composta por un velamen cuberto cunha densa masa de pelos. Ao igual que moitas especies de orquídeas, *S. spiralis* posúe micorrizas xa que necesita a presenza dun fungo simbiote para poder xerminar e crecer. Unha particularidade desta planta referida á distribución das follas é que estas se atopan á beira do talo florido. Isto débese a que cando a orquídea florece, as follas dese talo anual xa desapareceron e comezan a desenvolverse as follas correspondentes ao do ano seguinte; por iso están ao seu lado no canto de rodeándoo (Cortizo & Sahuquillo, 2006; Fig. 6).



Figura 6. Inflorescencias e follas de *S. spiralis*.

As flores (Fig. 7) son de pequeno tamaño, menores a 0.5 cm de largo, de estrutura tubular que arrecenden doce parecido a *Convallaria majalis* (Wartena 1962), vainilla (Ziegenspeck 1936) ou améndoas (Bentham, Hooker & Rendle 1943). Os tépalos exteriores e dous tépalos interiores están unidos entre si formando o teito do tubo, e o largo beizo (labelo) en forma de canle constitúe a parte inferior. O labelo envólvese estreitamente arredor da columna, namentres o rostelo se proxecta cara adiante e por debaixo dela, habendo na base dúas glándulas secretoras de néctar. O estame contén dúas polinias redondeadas e de sutura ventral, cun viscidio pegañento (Mosquera, 2012). O estame descansa no lado superior da columna, tendo o viscidio na parte central, coa superficie adhesiva cara abaixo. Cando as flores se abren por primeira vez, o rostelo está situado moi preto do labelo subxacente, deixando unha pequena apertura. Esta apertura é o suficientemente ancha como para admitir a probóscide de numerosos insectos visitantes. O insecto púsase e insire a súa probóscide na estreita apertura para alcanzar o néctar acumulado no oco. A probóscide entón toca o viscidio e as polinias fican adheridas á probóscide. A polinización é eficaz e a miúdo case todas as flores na planta xeran algunha semente (Summerhayes, 1951).



Figura 7. Flores de *S. spiralis*. Pódese apreciar os 3 tépalos externos e os tres internos, nos que destaca o labelo amarelado.

Moi poucas especies de insectos observáronse polinizando a *S. spiralis*. Darwin (1877) menciona tres abesouros pertencentes a dúas especies distintas, pero non especificou cales eran. Willems & Lahtinen (1997) menciona a *Bombus pascuorum* e *Bombus lapidarius* como visitantes frecuentes das flores de *S. spiralis*. No Sur de Francia (Tenay, Département Rhône) indícase que *Apis mellifera* serve como polinizador de *S. spiralis* (Francon 2003). Así, *S. spiralis* parece estar especificamente adaptada á polinización por abellas no senso amplo (Ziegenspeck 1936; Van der Cingel 1995).

### **Ciclo de vida**

No momento da xerminación da semente, esta está densamente colonizada por fungos que forman unha micorriza (Ziegenspeck 1936). A plántula de *S. spiralis*, completamente subterránea, desenvolverase como micoparásita ao longo de 8 anos. A asociación romperase cando apareza o primeiro tubérculo radical ao final do oitavo ano. Os primeiros tubérculos radicais de *S. spiralis* serán colonizados de novo por fungos micorrícicos e a planta seguirá a ser micoparasita ata a aparición das primeiras follas no undécimo ano. A planta produce partes aéreas (follas e inflorescencias) por primeira vez en Agosto-Setembro do décimo-cuarto ano (Shefferson, 2009). A inflorescencia se

desenvolve de días a semanas antes das follas, que xa estarán plenamente maduras antes da formación do froito (Outubro-Novembro). Unha vez liberadas as sementes a inflorescencia decaerá, mais as rosetas perdurarán todo o inverno e desaparecerán na primavera seguinte. Os fotosintatos producidos neste período empregaranse na creación dunha nova raíz tuberosa (Shefferson, 2009).

### ***Spiranthes spiralis*. Estado de conservación**

Estudos de distribución histórica e actual desta especie amosan unha clara decadencia desta especie en Europa (e.g. Jacquemyn et al. 2007). Así, en Gran Bretaña e Irlanda estímase que *S. spiralis* ten desaparecido do 55% e 71% dos lugares nos que tiña presenza histórica, respectivamente (Kull & Hutchings 2006). Resultados semellantes se teñen obtido noutras áreas de Europa, como Norte de Francia, Alemaña, Bélxica e Países Baixos (Willems, 1989; Jacquemyn et al., 2007). De acordo con diversos autores (e.g. Jermyn, 1974; Brewis et al., 1996) a decadencia da especie deriva de cambios na agricultura e no uso do solo. Estes cambios terían unha dobre vertinte. Por unha banda, os prados abertos seminaturais onde esta especie habita son abandonados, o que motiva a aparición de matogueiras. Por outra banda, o aumento de fertilización derivado da agricultura intensiva rompe a interacción entre esta especie e os fungos micorrícicos. Outros procesos que afectan ás poboacións de *S. spiralis* serán as drenaxes e a urbanización. Tamén se ten observado que a diminución das poboacións desta especie é máis rápida en zonas do interior ca en zonas litorais (French et al., 1999).

Estudos realizados en Gran Bretaña e Holanda amosaron que o manexo das comunidades permite unha recuperación rápida das poboacións. Entre as prácticas levadas a cabo cómpre salientar a realización de segas en inverno que permitan o acceso das rosetas de *Spiranthes* á luz e a introdución dun uso gandeiro de pouca intensidade para evitar a formación de matogueiras (Wells 1967, 1981; Willems 1989; Jacquemyn et al. 2007).

### **Situación en Galicia**

A situación en Galicia (e no NW Ibérico en xeral) de *S. spiralis* está pouco estudada. Ata o de agora, os estudos centráronse na especie próxima *Spiranthes aestivalis* (Poiret) L.C.M. Richard, coa que comparte requirimentos ecolóxicos (Perille et al., 2001). Os resultados obtidos para *S. aestivalis* amosan unha desaparición das

poboacións, especialmente nas zonas de interior, onde estas ademais tenden a ser máis pequenas (Perille et al., 2001). A situación desta especie, xunto co observado nas poboacións europeas de *S. spiralis* xustifica a realización de estudos do estado de conservación deste último taxon.

### **Obxectivos do traballo**

O obxectivo principal deste traballo será contribuír ó estudo do estado de conservación da orquídea *S. spiralis* no NW da Península Ibérica. Esta contribución farase en dous eidos diferentes:

1.- Analizarase o estado de conservación das poboacións mediante a prospección das localidades citadas para este taxon no Herbario da Universidade de Santiago de Compostela (SANT). Así mesmo, tentarase establecer un mapa da distribución de *S. spiralis* en Galicia.

2.- Poranse a punto técnicas que permitan a análise da distribución da variabilidade xenética nas poboacións de *S. spiralis* no NW da Península Ibérica. De igual modo, realizaranse análises preliminares cunha selección de poboacións, facendo fincapé nas posibles diferenzas entre as poboacións da costa e do interior.

A análise do estado de conservación das especies require o uso de moi diversas ferramentas. O estudo da distribución histórica empregando bases de datos e Herbarios de referencia permite coñecer as tendencias existentes nas especies e poboacións. Por outra banda, as novas ferramentas moleculares permiten investigar a distribución da variabilidade xenética, o que da información sobre o illamento das poboacións, sobre a filoxeografía das especies, etc. Estes aspectos son vitais á hora de iniciar estudos de recuperación da flora.

### **Material e métodos**

A análise da conservación e a diversidade da especie *Spiranthes spiralis* no NW da Península Ibérica requiriu a realización de traballos de campo e de laboratorio. Os primeiros tiveron como obxectivo a recolección de mostras e a análise do estado de conservación do taxon en relación cos seus rexistros históricos. Os traballos de laboratorio consistiron na posta a punto de técnicas moleculares para a análise da diversidade e da estrutura xenética.

***Prospección de poboacións e recolección de mostras***

Confeccionouse un listado das poboacións galegas do taxon *S. spiralis* rexistradas no herbario da Universidade de Santiago de Compostela (SANT; Thiers, 2013). Estas localidades (Táboa 1) foron visitadas polo persoal da área de Botánica da Facultade de Ciencias entre Novembro de 2012 e Maio de 2013, examinándose en cada unha delas a presenza ou ausencia do taxon. Naquelas localidades nas que existía unha poboación da orquídea recolléronse mostras (follas da roseta basal; Figura 7) de entre 9 e 30 plantas para a súa posterior análise xenética. As mostras gardáronse en xel de sílice para a súa conservación. Non se recolleron mostras de plantas contiguas pola capacidade de *S. spiralis* de medrar vexetativamente. Como parte deste traballo, contruíuse unha base de datos das poboacións recolectadas e comparouse co rexistro histórico do Herbario SANT (Táboa 1) para analizar o estado de conservación da especie.



Figura 8. Follas basais de *S. spiralis*

**\*Diversidade e conservación de *Spiranthes spiralis*\***

<b>Nº</b>	<b>Poboación</b>	<b>Data de</b>
<b>1</b>	<b>Praia de Sarrido, Foz, Lugo</b>	<b>15/11/2012</b>
<b>2</b>	<b>A Seara, Alfoz, Lugo</b>	<b>23/03/2013</b>
<b>3</b>	<b>Areoura, Burela, Lugo</b>	<b>15/10/2012</b>
<b>4</b>	<b>Lago, San Cibrao, Lugo</b>	<b>14/11/2012</b>
5	San Roque, Viveiro, Lugo	25/10/2012
6	Monte Faro, Viveiro, Lugo	25/10/2012
7	Praia de Abrela, Viveiro, Lugo	25/10/2012
8	Area, Viveiro, Lugo	14/11/2012
9	Xilloi, Viveiro, Lugo	25/10/2012
10	Praia de Covas, Viveiro, Lugo	25/10/2012
<b>11</b>	<b>San Román, O Vicedo, Lugo</b>	<b>25/10/2012</b>
<b>12</b>	<b>Tardade, Vilaba, Lugo</b>	<b>SANT</b>
13	Monte do Cido, Folgoso do Courel,	23/03/2013
14	Espasante, Ortigueira, A Coruña	26/10/2012
15	Morouzos, Ortigueira, A Coruña	15/10/2012
16	Lago, Valdoviño, A Coruña	20/10/2012
17	Doniños, Ferrol, A Coruña	15/10/2012
18	San Xurxo, Ferrol, A Coruña	15/10/2012
19	Catabois, Ferrol, A Coruña	11/11/2012
20	Hospital Novoa Santos, Ferrol, A	31/10/2012
21	Praia de Cabanas, Cabanas, A	13/11/2012
22	Coirós, A Coruña	02/05/2013
23	Santa Cruz, Oleiros, A Coruña	13/10/2012
<b>24</b>	<b>Praia de Baldaio, Carballo, A</b>	<b>SANT</b>
<b>25</b>	<b>Santiago de Compostela, A Coruña</b>	<b>SANT</b>
<b>26</b>	<b>Lousame, A Coruña</b>	<b>SANT</b>
27	Traba, Laxe, A Coruña	29/10/2012
<b>28</b>	<b>Trece, Camariñas, A Coruña</b>	<b>29/10/2012</b>
<b>29</b>	<b>Corrubedo, Ribeira, A Coruña</b>	<b>SANT</b>
<b>30</b>	<b>Vilar de Ordelles, Esgos, Ourense</b>	<b>11/05/2013</b>
31	Guístolas, Pobra de Trives, Ourense	11/05/2013
<b>32</b>	<b>A Rúa, Ourense</b>	<b>12/05/13</b>
33	Vilardesilva, Rubiá, Ourense	28/04/2013
<b>34</b>	<b>Soutelo de Montes, Pontevedra</b>	<b>20/04/2013</b>
35	Bodaño, Oirós, Vila de Cruces,	20/04/2013
<b>36</b>	<b>Barra, Cangas do Morrazo,</b>	<b>SANT</b>
<b>37</b>	<b>Santa María de Oia, Pontevedra</b>	<b>14/05/2013</b>
38	Hontoria de la Cantera, Burgos	10/04/2013
39	Biescas, Huesca	29/03/2013

Táboa 1. Mostraxe das poboacións de *S. spiralis*. Inclúe o número de poboación, a localidade e a data de recolección. As poboacións foron recollidas polos membros da área de Botánica da Facultade de Ciencias e o biólogo Marcos Perille. En vermello, poboacións presentes no herbario SANT non atopadas. En negro, poboacións presentes herbario atopadas. En verde, novas poboacións detectadas.

### *Análises moleculares*

*Spiranthes spiralis* é unha especie diploide ( $2n=30$ ; Hollingsworth, Gornall & Bailey 1992; Castroviejo et al. 2005). A extracción de ADN das mostras de follas basais realizouse polo método de CTAB (Doyle & Doyle, 1987) e mediante o kit de extracción Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Hilden, Alemaña) seguindo as instrucións do fabricante. Neste traballo realizáronse estudos piloto para averiguar cal é a técnica máis axeitada para a análise das poboacións recolectadas. As mostras empregadas en cada análise indícanse na táboa 2.

<b>Poboacións de <i>Spiranthes spiralis</i> incluídas nos estudos piloto</b>				
<b>Nº</b>	<b>Poboación/Taxon – GB code</b>	<b>Seq.</b>	<b>Microsat.</b>	<b>AFLP</b>
9	Xilloi, Viveiro, Lugo	X		
11	San Román, O Vicedo, Lugo		X	X
15	Morouzos, Ortigueira	X		
16	Lago, Valdoviño, A Coruña	X		
19	Catabois, Ferrol, A Coruña		X	X
23	Santa Cruz, Oleiros, A Coruña	X	X	X
34	Soutelo de Montes, Pontevedra	X		
38	Hontoria de la Cantera, Burgos	X		
39	Biescas, Huesca	X		
	<i>Spiranthes spiralis</i> - FJ571305.1	X		
	<i>Spiranthes romazoffiana</i> - FJ571304.1	X		
	<i>Spiranthes romazoffiana</i> – AY363055.1	X		
	<i>Spiranthes nebulorum</i> – HE575527.1	X		
	<i>Spiranthes glabrescens</i> – HE575526.1	X		
	<i>Aulosepalum tenuiflorum</i> – AJ544474.1	X		

Táboa 2. Poboacións de *S. spiralis* elexidas para o estudo piloto de cada técnica. En verde, secuencias obtidas do GenBank. UK, Gran Bretaña

### **Secuenciación de ADN**

A secuenciación de rexións de ADN hipervariables do cloroplasto e do núcleo ten sido empregada en numerosas ocasións no estudo da variabilidade xenética inter e intraespecífica en plantas (e.g. Shaw et al., 2007). Para o noso estudo seleccionamos unha rexión cloroplástica de alta variabilidade, o espaciador interxénico *trnLF* (Taberlet



et al., 1991). A amplificación do *trnLF* levouse a cabo segundo Torrecilla et al. (2003). O volume final de PCR foron 25  $\mu$ l dos compoñentes da PCR (Táboa 2): 2,5  $\mu$ l 10 x PCR Buffer; 1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5  $\mu$ l dNTP (10 mM), 2,5  $\mu$ l BSA (1 %), 0,5  $\mu$ l Primer F y Primer R (10  $\mu$ M), 0,5 Taq polymerase (5U/  $\mu$ l) e 1  $\mu$ l DNA (50 ng/ $\mu$ l). O programa da PCR foi: un paso de desnaturalización do ADN a 95°C durante 10 min seguido de 30 ciclos compostos por unha desnaturalización de 30 segundos a 95°C, unha fase de annealing de 30 segundos a 50°C e unha extensión de 2 minutos a 72°C. Finalmente realizouse una extensión adicional de 5 minutos a 72°C. O estudo piloto de secuenciación tivo lugar en 31 individuos pertencentes a 7 poboacións (9, 15, 16, 23, 34, 38, 39; Táboa 2). Engadíronse tamén 6 secuencias obtidas de GenBank (Táboa 2). Estas corresponden a 3 especies euroasiáticas (*S. sinensis* Ames, *S. spiralis* e *S. romanzoffiana* Cham), 1 americana (*S. nebulorum* V.R.Catling) e 1 asiática (*S. glabrescens* Hashim). Como *outgroup* empregouse *Aulosepalum tenuiflorum* (Greenm.) Garay.

Tras a amplificación das mostras levouse a cabo unha purificación coa enzima ExoSap (affymetrix, Santa Clara, California, USA). A secuenciación realizouse a través da compañía Macrogen nun secuenciador 3130xl de Applied Biosystems (Foster City, California, USA). Todas as secuencias obtidas (lecturas forward and reverse de cada mostra) ensamblámolos co programa CodonCode Aligner (Codon Code Corporation, Centerville, Massachusetts, USA). A continuación fixemos un aliñamento das secuencias co algoritmo Muscle (Edgar, 2004) implementado no programa SeaView (Gouy et al., 2010). Seguidamente elaboramos un estudo filoxenético co conxunto das secuencias obtidas. Como criterio de optimización empregamos a máxima parsimonia, que establece que a árbore na que hai un menor número de cambios nucleotídicos é a máis probable. Para a análise realizáronse 1000 repeticións de busca heurística da árbore máis parsimoniosa a través do algoritmo *Tree Bisection Reconnection* (TBR). O resultado plasmouse nunha árbore consenso entre todas as igualmente parsimoniosas por medio do algoritmo *50% majority rule*. O apoio das distintas pólas da árbore mediuse utilizando o método do *bootstrap* con 1000 repeticións. As análises realizámolos por medio do programa PAUP v. 4-10b (Swofford, 2002).

## **Os microsátélites**

Os microsátélites son rexións altamente repetitivas do xenoma que se encontran en todos os organismos eucariotas. Forman bloques de menos de 150 pb (pares de bases) moi abundantes e dispersos polo xenoma, cunha unidade de repetición de 1 a 8 pb (Hillis et al., 1996). Utilízanse como marcadores codominantes para rastrexar a variabilidade dos xenomas, e empréganse moi a miúdo en análises filoxeográficas e de bioloxía da conservación. A aplicación destes marcadores depende do deseño previo de cebadores que normalmente son propios de cada especie. Porén, cebadores deseñados para unha especie poden ser utilizados en especies próximas (cross-amplification; Vila et al., 2006). Neste estudo, usamos cebadores deseñados para a especie *Spiranthes parksii* Correll (Walters, 2005), especie americana próxima a *S. spiralis* (Dueck & Cameron, 2007; Fig.2). O estudo da amplificación cruzada realizouse con tres poboacións do litoral das provincias da Coruña e Lugo (11, 19 e 23; Táboas 1 e 2). Os volumes de reacción da PCR dos distintos compoñentes móstranse na táboa Anexa.

Para a amplificación dos marcadores microsatélite utilizamos o Type-it<sup>®</sup> Microsatellite PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) seguindo as instrucións do fabricante. Os distintos primers deseñados para *S. parksii* probáronse segundo Walters (2005). Posteriormente, as condicións da PCR foron optimizadas modificando a concentración de MgCl<sub>2</sub> e ADN e a temperatura de *annealing*. Fixemos a lectura dos resultados na Unidade de Bioloxía Molecular da Universidade da Coruña nun secuenciador 3130xl de Applied Biosystems (Foster City, California, USA).

## **Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)**

Os AFLPs son marcadores moleculares dominantes utilizados para examinar fragmentos de DNA amplificados selectivamente por PCR a partir da dixestión total dun xenoma por enzimas de restrición (Vos et al. 1995). É unha técnica mixta, xa que inclúe elementos de dúas familias de “fingerprinting” (PCR e restrición). É semiespecífica porque se seleccionan os fragmentos e non require ningún tipo de coñecemento previo da secuencia polo que é moi útil a hora de tratar organismos pouco estudados ou pouco coñecidos (e.g. Pimentel et al., 2007). Esta técnica implica tres pasos: (i) a restrición do DNA xenómico; (ii) a ligazón de adaptadores oligonucleotídicos (estas dous pasos pódense realizar xuntos coñecéndose a fase como restrición-ligazón) e (iii) a amplificación selectiva de certos fragmentos de restrición con primers específicos dos adaptadores. Este último paso prodúcese en dous ciclos

cada vez máis selectivos (Fig. 9). No último ciclo de amplificación os pares de cebadores están marcados con fluoróforos para a posterior lectura dos resultados.

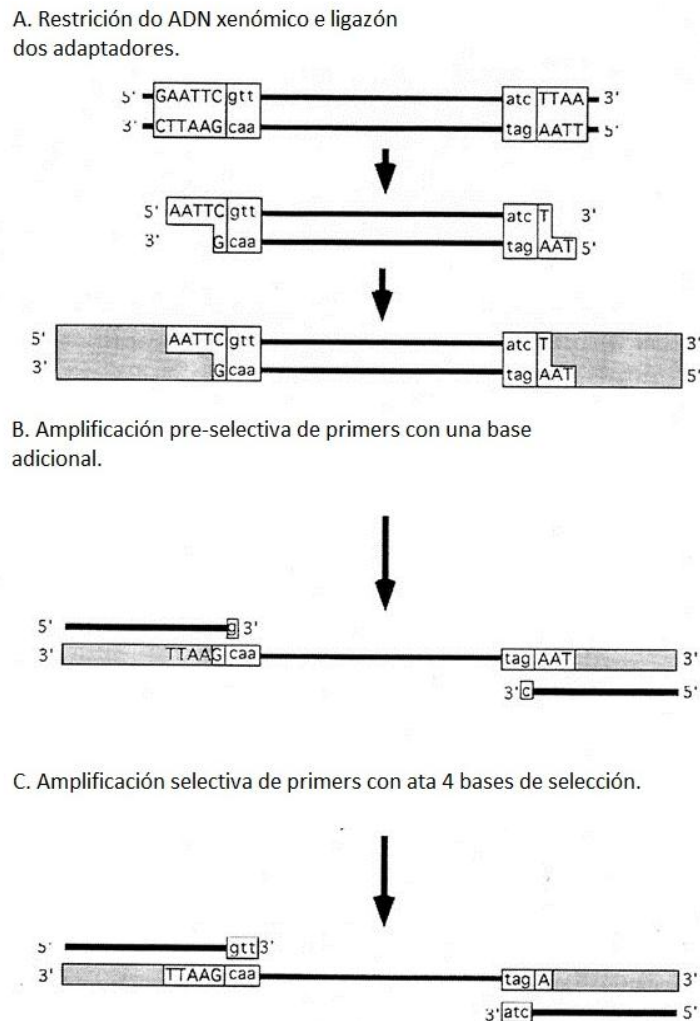


Figura 9. Esquema dos AFLPs. Mostrase os pasos básicos da técnica: Restrición-ligazón (A), Amplificación Pre-Selectiva (B) e Amplificación Selectiva (C) (Wolfe & Liston, 1998).

A amplificación dos marcadores AFLPs empregouse segundo o método de Skrede et al. (2009). Na fase de restrición-ligazón utilizamos como enzimas de restrición *MseI* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) e *EcoRI* (Roche, Basilea, Suiza). Como ligasa usamos a T4 Ligasa de TaKaRa (Otsu, Shiga, Xapón). Na fase de amplificación a súa vez usamos as enzimas Amplitaq (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) e Amplitaq Gold (Foster City, California, USA).

O estudo piloto consistiu na proba de 24 combinacións de primers. A lectura dos resultados fíxose na Unidade de Bioloxía Molecular da Universidade da Coruña nun secuenciador 3130xl de Applied Biosystems (Foster City, California, USA). Utilizamos o programa Genemapper para interpretar os perfíles obtidos (Applied Biosystems, Foster City, California). O criterio de selección das mostras a empregar no estudo piloto foi en base a súa calidade e concentración de ADN, factores limitantes no proceso (Vos et al., 1995). A calidade e a concentración medíuse mediante xeles de agarosa e espectrofotometría (NanoDrop, Wilmington, Delaware, USA). A selección final foron individuos de 3 poboacións das provincias da Coruña e Lugo (11, 19 e 23; Táboa 1 e 2)

## **Resultados e discusión**

Este traballo englobase nun estudo maior acerca do estado de conservación das orquídeas *S. spiralis* e *S. aestivalis*, que a miúdo coexisten nos mesmos hábitats en Galicia. Os resultados obtidos neste traballo están claramente diferenciados en dúas partes. Por unha banda a elaboración dos datos do estudo de prospección de poboacións naturais da especie e pola outra os resultados das probas moleculares realizadas no laboratorio.

### ***Prospección de poboacións naturais***

Os rexistros históricos de presenza de *S. spiralis* do Herbario da Universidade de Santiago de Compostela (SANT) sinalan a presenza deste taxon en 19 concellos de Galicia repartidos polas 4 provincias, especialmente nas de Lugo e A Coruña (Táboa 1). Dos concellos nos que a orquídea está presente, dez se atopan nas proximidades do litoral, namentres que os nove restantes son de interior. Os datos recollidos pola Área de Botánica da Facultade de Ciencias amosan que o 19,23% das poboacións rexistradas no Herbario SANT non foron atopadas no ano 2012/2013. Esta porcentaxe contrasta co observado en *S. aestivalis* (Perille et al., 2001), especie na que a porcentaxe de poboacións extintas ascendeu ata o 31,25%. A presenza da especie foi detectada en 10 novos concellos de Galicia das catro provincias, especialmente no litoral de Lugo. Estes resultados indican que o estado de conservación da orquídea *S. spiralis* en Galicia é bo a pesar dos cambios no uso do solo rexistrados no país nas derradeiras décadas (Rodríguez et al., 2010). Porén, cómpre ter en conta que os medios dos que se dispón na actualidade (especialmente o internet e as redes sociais) facilitan a prospección das poboacións. A extinción dalgunhas das poboacións podería explicarse polo feito de que

as poboacións desta orquídea adoitan ser non moi lonxevas (Jacquemyn, 2010). Este mesmo patrón se ten observado en orquídeas que ocupan hábitats semellantes no N de Europa como *Liparis loeselii* (L.) Rich. (Pillon et al., 2007). O marcado contraste entre o comportamento rexistrado en *S. aestivalis* e *S. spiralis* subliña a necesidade de estudos ecolóxicos no primeiro destes taxa, con vistas a determinar a causa ou causas da súa decadencia. Estes estudos deberían incluír unha análise da distribución da variabilidade xenética en ambas especies.

### *Análises moleculares*

#### **Estudo piloto de secuenciación e filoxenia**

A nosa análise filoxenética baseouse en 1191 caracteres, dos cales unicamente 48 (4%) foron parsimoniosamente informativos. O nivel de variabilidade atopado é extremadamente baixo, especialmente se temos en conta que a porcentaxe de caracteres informativos unha vez retirado o *outgroup* baixa ata o 1,3%. A variación entre as poboacións de *S. spiralis* (exceptuando os gaps) é nula, polo que a filoxenia realizárase unicamente para observar a posición da especie con respecto a outras do xénero. O resultado da filoxenia baseada en máxima parsimonia represéntase na Figura 10.

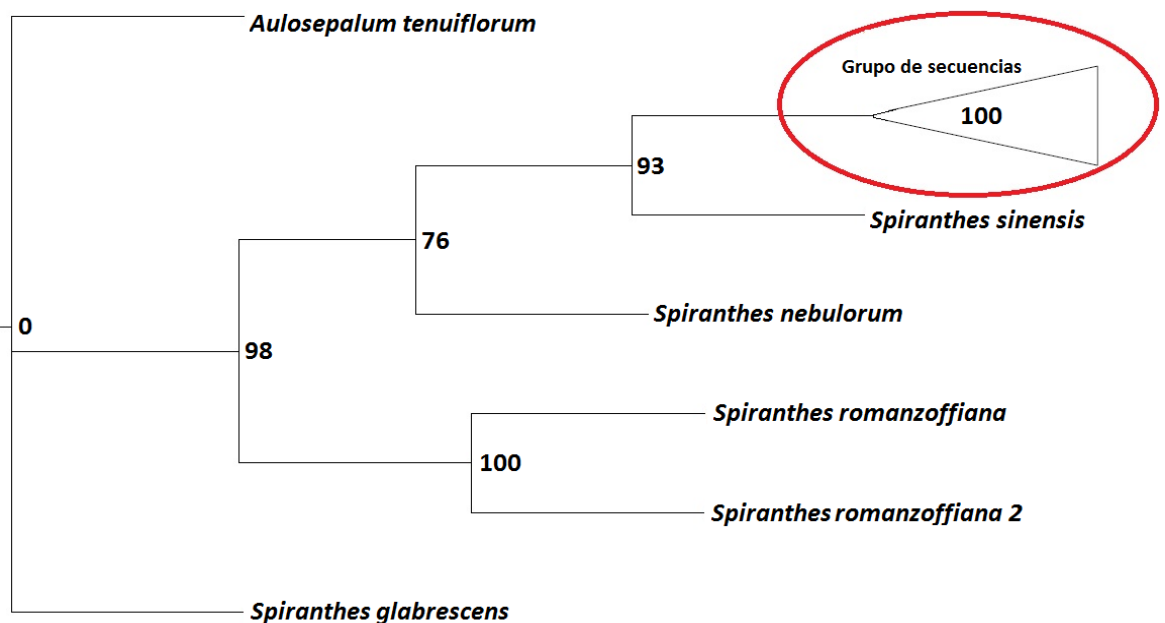


Figura 10. Árbore máis parsimoniosa da análise filoxenética do xénero *Spiranthes* baseada no espaciador interxénico *trnl-trnF*. Os gaps foron eliminados da análise.

Na árbore vese unha diverxencia clara entre o *outgroup* (máis a especie Asiática *S. glabrescens*) e un *ingroup* constituído polas restantes especies de *Spiranthes* cun valor de apoio do 98%. Dentro deste clado fórmanse dous grupos, un que inclúe a *Spiranthes romanzoffiana* e outro que comprende as restantes especies, tanto europeas como americanas e asiáticas. Finalmente, a especie americana *S. nebulorum* é basal a un clado Euroasiático moderadamente apoiado (80%) composto por *S. sinensis* e *S. spiralis*. A árbore non ofrece ningunha resolución dentro do clado de *S. spiralis*, nin tan sequera no caso das poboacións máis alonxadas tales como as de Burgos, Huesca e mesmo Inglaterra (secuencia obtida do GenBank). Cando na análise se inclúen os gaps obsérvase unha mínima diferenza entre as poboacións, pola presenza dunha inserción de arredor de 20 pares de bases na metade dos individuos da poboación 34, do interior da provincia de Pontevedra (Fig. 11). Se ben estes individuos constitúen un haplotipo diferente, este resultado é limitado demais para obtermos conclusións ben fundamentadas.

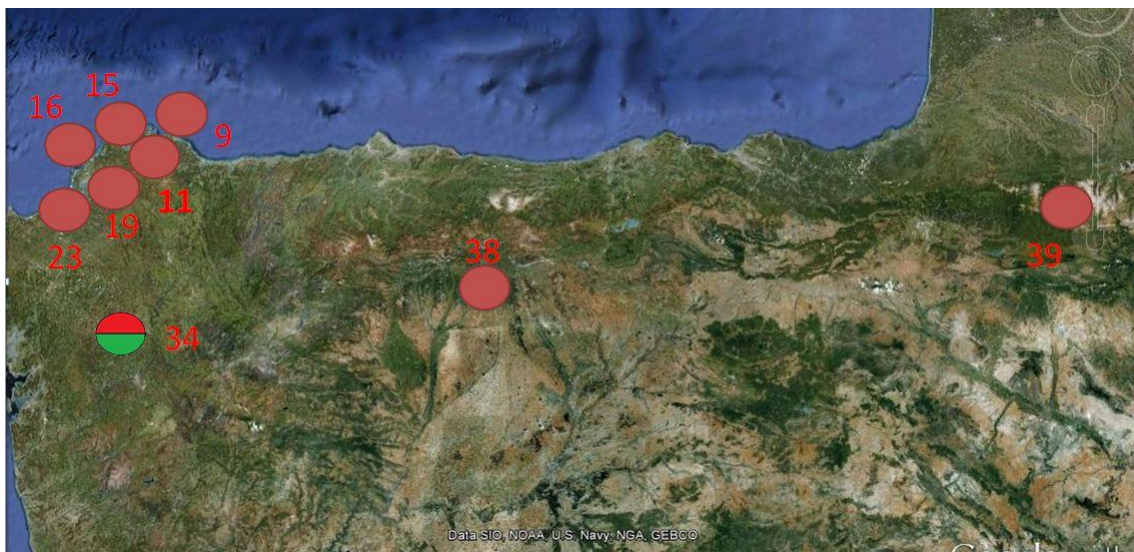


Figura 11. Mapa do NW ibérico que mostra as poboacións empregadas no estudo piloto de secuenciación. Os círculos vermellos sinalan o haplotipo dominante, e o círculo verde-vermello representa a poboación 34 (Soutelo de Montes, Pontevedra).

Ante a problemática de haber moi pouca variación entre as secuencias, incluso despois de engadir poboacións de fóra de Galicia (Huesca e Burgos e Gran Bretaña; 37, 38 e GenBank, Táboas 1 e 2), decidiuse empregar outras técnicas non baseadas directamente na secuenciación e que ofrezan numerosos marcadores hipervariables procedentes de todo o xenoma, mais especialmente do nuclear.

### Microsatélites

Dos dez pares de primers deseñados por Walters (2005) (Táboa 3) para a especie americana *S. parksii*, unicamente 5 eran útiles para amplificar rexións microsatélites na especie europea *S. spiralis* (Táboa 3). Se ben as amplificacións cruzadas (entre especies) a miúdo son problemáticas (Vila, 2006), a baixa variabilidade observada no estudo filoxenético converteu este resultado en sorprendente. As amplificacións cos microsatélites desenvolvidos para *S. parksii* funcionaron en algúns casos, mentres que noutros non produciron amplificación nas nosas poboacións de *S. spiralis* (Táboa 3).

Locus	Secuencia do primer	Motivo de repetición	T. Amplicón
sp3-A	F- AATGACTGATGACAGTCGAAG	(CTT) <sub>7</sub>	64
	R- GCTATGCCATCACTCACGTG		
sp8-D2	F- CATTATCGTCGGTCACCGTT	(CT) <sub>14</sub>	92
	R-CATGAGCCTAGCGCGATCTT		
sp3-9A	F-	(CT) <sub>25</sub> (GA)(A)	192
	R-AACCCTTGTAGGATTTTCATTGG		
sp2-11H	F	(GA) <sub>25</sub>	222
	R-		
sp2-12C	F- TCTCCGTAGATATCACACTCG	(GA) <sub>14</sub> (A) <sub>7</sub>	139
	R-		
sp3-11B	F- TTCTCTCAATCCCATAGCTGG	(CT) (CTT)	305
	R- TTCTCGGTGTTTCATCATCTCG		
sp3-3A	F- AT GCA ATA CAT AGC AGC CGC	(GA) <sub>9</sub> (GAA) <sub>2</sub> (GA) <sub>3</sub>	261
	R- GCTGTATAAGATTTTCGGTCTCC		
sp4-9C	F- AGAATGTCCACAGTAACAGCG	(CT) <sub>18</sub> (T) <sub>9</sub>	173
	R-		
sp4-1A	F- TGGGAATGACTCATCACAGTCG	(GAA) <sub>9</sub>	71
	R- TGCCACGCCATCACTCACG		
sp4-5E	F- AGGTGGAATTCTGTCACTG	(GAA) <sub>7</sub>	97
	R- CAACTCGAACTGATCTTCTGG		

Táboa 3. Primers utilizados para os marcadores microsatélites (Walters, 2005). En verde, primers que produciron amplificación en *S. spiralis*.

A análise dos primers que si deron amplificación (Táboa 3) amosou que unicamente un deles (Sp3-3A) mostraba polimorfismo entre as poboacións analizadas, namentres que os restantes marcadores eran monomórficos para todas as poboacións do estudo piloto. Se ben isto pode deberse ó baixo número de poboacións e de individuos por poboación incluídos na análise, estes resultados leváronos a descartar a técnica dos

microsatélites neste proxecto. A aplicación desta técnica requiriría xenerar novos primers específicos para *S. spiralis*, proceso longo e costoso. No marco deste traballo, decidiuse probar unha técnica inespecífica de menor custe e tamén válida na análise da diversidade xenética.

### **AFLPs**

A técnica dos AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) ten como desvantaxe fronte ós microsatélites e á secuenciación tratarse duns marcadores dominantes, que non van permitir a diferenciación entre o homocigoto e o heterocigoto (Vos et al., 1995). Porén, os AFLP teñen a vantaxe de ser marcadores hipervariables inespecíficos, non requiren un coñecemento previo da secuencia. Estes marcadores non serán válidos para a estima directa do fluxo xénico entre as poboacións de *S. spiralis*, mais si se poderán empregar no estudo da distribución da diversidade xenética entre e dentro das poboacións. Este parámetro terá gran importancia na conservación das especies (Rao & Hodking, 2002). No estudo piloto realizado analizáronse 24 posibles combinacións de primers aleatorios con vistas ó seu emprego no estudo extensivo. O traballo realizado permitiu seleccionar as combinacións de primers que amosaban un maior grao de variabilidade nas poboacións analizadas (11, 19, 23), todas elas procedentes do litoral da Coruña e Lugo. A combinación que ofrecía unha maior variabilidade foi a ECO-ACC e MSE-ACG. Esta combinación xenerou 105 marcadores, dos cales 14 foron variables. A segunda combinación máis variable foi a ECO-CCA e MSE-CCT, que xenerou 96 marcadores dos cales 9 foron variables nas poboacións analizadas.

### **Bibliografía**

- Aedo, C. & Herrero, H. (Eds.) (2005). Flora iberica, vol. 21,. Smilacaceae-Orchidaceae. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Brewis, A., Bowman, P. & Rose, F. (1996). Flora of Hampshire. Harley Books, Colchester, Essex, UK.
- Cameron, K. M., M. W. Chase, W. M. Whitten, P. J. Kores, D. C. Jarrell, V. A. Albert, T. Yukawa, H. G. Hills, and D. H. Goldman. (1999). A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 86: 208–224.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G. & Paiva, J., eds (2005) Flora Iberica, Vol. 21: Smilacaceae-Orchidaceae. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, Spain.
- Catling, P.M. (1983). Pollination of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, 61: 1080-1093.
- Cortizo, C. & Sahuquillo, E. (2006). Guía das orquídeas de Galicia, Baía Verde.



- Dahlgren, R., Clifford, H. T. & Yeo, P. F. (1985) The Families of the Monocotyledons. *Heidelberg: Springer Verlag*.
- Darwin, C. (1877). The Various Contrivances by Which British and Foreign Orchids are Fertilized by Insects. *John Murray*, London, UK.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Dressler, R L. (1994). Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge : University Press.
- Dueck, L.A., Cameron, K.M. (2007). Sequencing re-defines *Spiranthes* relationships, with implications for rare and endangered taxa. *Lankesteriana* 7: 190–195.
- Francon, L. (2003) Observations effectuées sur une colonie de *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. dans le département du Rhône. *L'Orchidophile*, 157: 161–166.
- French, C.N., Murphy, R.J. & Atkinson, M.G.C. (1999). Flora of Cornwall: Atlas of the Flowering Plants and Ferns of Cornwall. Wheal Seton Press, Camborne, UK.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27: 221–224.
- Jacquemyn, H. & Hutchings, Michael J. (2010). Biological Flora of the British Isles: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. *Journal of Ecology*, 98, 1253–1267.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Hermy, M. & Willems, J.H. (2005). Does nectar reward affect rarity and extinction probabilities of orchid species? An assessment using historical records from Belgium and the Netherlands. *Biological Conservation*, 121: 257–263.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Hermy, M. & Willems, J.H. (2007) Long-term dynamics and population viability in one of the last populations of the endangered *Spiranthes spiralis* (Orchidaceae) in the Netherlands. *Biological Conservation*, 134: 14–21.
- Jermyn, S.T. (1974). Flora of Essex. Essex Naturalists. Trust, Colchester, UK.
- Kreutz, C.A.J. & Dekker, H. (2000). De Orchideeën van Nederland – Ecologie, Verspreiding, Bedreiging, Beheer. Uitgave Kreutz and Seckel, Landgraaf & Raalte, The Netherlands.
- Kull, T. & Hutchings, M.J. (2006). A comparative analysis of decline in the distribution ranges of orchid species in Estonia and the United Kingdom. *Biological Conservation*, 129: 31–39.
- Lindley, J. (1830–1840). The genera and species of orchidaceous plants. Ridgways, London, UK.
- Mosquera, H.R., (2012). Análisis palinológico y anatómico del pistilo en la familia Orchidaceae. Memoria Tesis Doctoral, Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, Universidad de León.
- Perille, M., Pimentel, M., Romero, D. (2001). A familia Orchidaceae na valoración do estado de conservación de hábitats incluídos na proposta galega de Rede Europea Natura 2000. Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.
- Pillon, Y., Qamaruz-Zaman, F., Fay, M. F., Hendoux, F. & Piquot, Y. (2006). Genetic diversity and ecological differentiation in the endangered fen orchid (*Liparis loeselii*). *Conserv Genet.*, 8:177–184.
- Pimentel, M., Estévez, G. & Sahuquillo, E. (2007). European sweet vernal grasses (*Anthoxanthum*: Poaceae, Pooideae, Aveneae): A morphometric taxonomical approach. *Systematic botany*, 32(1): 43-59.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N., eds (2003) Genera Orchidacearum, Vol. 3: Orchidoideae (Part Two) Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Rao, V.R. & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1-19.
- Rodríguez, P., Rego, L., Fernández, V. (2010). Análisis de la evolución de usos del suelo en Galicia. *Spanish Journal of Rural Development*, 1: 186-204.
- Salazar, G. A., Chase, M. W., Soto Arenas M. A. & Ingrouille, M. (2003). Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *Am. J. Bot.* 90: 777-795.
- Shefferson, R.P. (2009). The evolutionary ecology of vegetative dormancy in mature herbaceous perennial plants. *Journal of Ecology*, 97: 1000–1009.
- Sheviak, C.J. (1982). Biosystematic study of the *Spiranthes cernua* complex. Bulletin 448, New York State Museum. University of the State of New York, The State Education Department, Albany, NY.
- Summerhayes, V.S. (1951). Wild Orchids of Britain. Collins, London, UK.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thiers, B. (2013). Herbariorum: A global directory of public Herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden Virtual Herbarium*.
- Torrecilla, P., López-Rodríguez, J.A., Catalán, P., (2003). Phylogenetic relationships of *Vulpia* and related genera (Poaceae, Poaceae) based on analysis of ITS and *trnL-F* sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.*
- Tyteca, D. (2000) The orchid flora of Portugal: addendum n.3. Remarks on *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and three new taxa to the Portuguese flora. *Journal Europäischer Orchideen*, 32: 291–347.
- Van der Cingel, N. A. (1995) An atlas of orchid pollination—European orchids. Rotterdam: Balkema.
- Vila, M., Cassel Lundhagen, A., Thuman, K. A., Stone, J.R. & Björklund, M. (2006). A new conservation unit in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae) as revealed by nuclear and mitochondrial markers. *Annales Zoologici Fennici*, 43: 72-79.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407-4414.
- Walters, C. (2005). Genetic relationships among *Spiranthes parksii* and congeneric species. (MSc thesis). College Station (TX): Texas A&M University.
- Wartena, J.G.R. (1962). De Herfstschroeforchis. *De Levende Natuur*, 65: 253–256.
- Wells, T.C.E. (1967). Changes in a population of *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. at Knocking Hoe National Nature Reserve, Bedfordshire, 1962-1965. *Journal of Ecology*, 55: 83–99.
- Wells, T.C.E. (1981). Population ecology of terrestrial orchids. The Biological Aspects of Rare Plant Conservation (ed. H. Synge), pp. 281–295. Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Willems, J.H. (1989). Population dynamics of *Spiranthes spiralis* in South-Limburg, The Netherlands. *Memoires de la Société Royale de Botanique de Belgique*, 11: 115–121.
- Willems, J.H. & Lahtinen, M.L. (1997). Impact of pollination and resource limitation on seed production in a border population of *Spiranthes spiralis*. *Acta Botanica Neerlandica*, 46: 365–375.
- Wolfe, A.D. & A. Liston (1998). Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. In: Plant Molecular Systematics II, Soltis, D.E., P.S. Soltis and J.J. Doyle (Eds.). *Kluwer Publisher, Boston*, pp: 43-86.