

## *Ophrys* (Orchidaceae: Orchidinae) della Sardegna: nuovi aggiornamenti sugli impollinatori

### *Ophrys* (Orchidaceae: Orchidinae) of Sardinia: new updates on pollinators

M. LUSSU, S. SAU, M. S. PUTZOLU, A. COGONI, V. RODI, A. DE AGOSTINI, A. CAREDDA, P. CORTIS

#### RIASSUNTO

La Sardegna è la seconda isola più grande del Mediterraneo e con 347 specie di piante registrate come endemiche è riconosciuta a livello mondiale come un hotspot di biodiversità. All'interno delle Orchidaceae, il genere *Ophrys* è studiato come modello di biologia evolutiva grazie alla sua peculiare relazione con gli impollinatori. In questo articolo analizziamo nove specie di *Ophrys*: *O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. speculum*, *O. sphogodes* subsp. *praecox* appartenente al gruppo *Euophrys* e *O. funerea*, *O. sicula* al gruppo *Pseudophrys*, e i loro relativi impollinatori. Inoltre, confrontiamo le specie di insetti già registrate come impollinatori con il nostro set di dati per fornire un elenco aggiornato di impollinatori.

#### ABSTRACT

Sardinia is the second larger island of the Mediterranean sea and with 347 plant species recorded as endemic it is globally recognized as an hotspot of biodiversity. Within the Orchidaceae, the genus *Ophrys* is studied as a model of evolutionary biology due to its peculiar relation with pollinators. In this paper we analyze nine species of *Ophrys*: *O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. speculum*, *O. sphogodes* subsp. *praecox* belonging to the group *Euophrys* and *O. funerea*, *O. sicula* to the group *Pseudophrys*, and their relative pollinators. In addition, we compare insects species already recorded as pollinators with our dataset to give an update list of pollinators.

**Parole chiave:** *Ophrys*, Sardegna, pseudocopulazione, impollinatori, orchidee

**Keywords:** *Ophrys*, Sardinia, pseudocopulation, pollinators, orchids

#### INTRODUZIONE

Le orchidee hanno colonizzato tutte le terre ad eccezione dei poli. La maggior parte di esse cresce nelle foreste tropicali e oltre l'80% di queste sono epifite. Tutte le orchidee degli ecosistemi temperati sono essenzialmente terrestri (Pridgeon et al., 2001-2014; Chase et al., 2003). All'interno del regno vegetale, le orchidee sono sicuramente la famiglia più riconoscibile. Infatti esibiscono una

#### INTRODUCTION

With the exception of the poles, orchids have colonized all lands. Most of them grow in tropical forests and over 80% of those are epiphytes. However all temperate orchids are essentially terrestrial (Pridgeon et al., 2001-2014; Chase et al. 2003). Orchidaceae are probably the most recognizable family within the plant kingdom due to their fascinating and peculiar flowers. These plants exhibit an

straordinaria diversità floreale caratterizzata da molteplici adattamenti a diversi impollinatori. All'interno di questa famiglia, le specie strettamente correlate spesso condividono gli stessi impollinatori, ma differiscono dal posizionamento dei pollinia sulla parte del corpo dell'impollinatore. I fiori variano per colore, disegno, forma e odore che da soli o in combinazione possono fungere da segnali per l'attrazione degli impollinatori (Wilmer, 2011). La percezione degli impollinatori e il comportamento associato giocano un ruolo principale nella selezione dei tratti floreali perché determinano l'efficacia dei segnali e quindi un efficace trasporto delle masse polliniche (Schiestl & Johnson, 2013). Nelle piante, l'evoluzione dell'isolamento riproduttivo è organizzata tipicamente da una combinazione di meccanismi pre e post-zygotici che influenzano il flusso genico (Scopece *et al.*, 2007). L'alta specificità tra pianta e impollinatore è considerata un meccanismo chiave per mantenere i confini delle specie in molte orchidee (Gill, 1989; Tremblay *et al.*, 2005). L'impollinazione delle orchidee è principalmente affidata dagli insetti e sulla base della strategia adottata selezionando una o più specie di impollinatori, le orchidee possono essere divise in quelle che offrono una ricompensa (spesso nettare) e quelle che ingannano gli impollinatori. Un terzo di tutte le orchidee non offre alcuna ricompensa e quindi attrae gli impollinatori attraverso strategie basate sull'inganno (Tremblay *et al.*, 2005).

Generalmente queste strategie dividono le orchidee nel cibo e ingannano il sesso. Ad esempio, i generi *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Neotinea* e *Orchis s.s.* attirano e ingannano gli impollinatori imitando altre piante nettariifere (Dafni, 1986). Queste orchidee enfatizzano parti di fiori, come gli speroni, che in molte specie contengono una ricompensa, spesso nettare, quindi hanno una impollinazione meno specializzata (Cozzolino *et al.*, 2005). Al contrario, un'impollinazione specifica è tipica del genere *Ophrys*: per ingannare il suo impollinatore questa strategia implica segnali visivi, tattili ma anche stimoli olfattivi per imitare la femmina, in questo modo il maschio cerca di accoppiarsi con il fiore. All'interno

extraordinary floral diversity with many adaptations to different pollinators. Closely related species sometimes share same pollinators but differ from the placement of pollinia on the pollinator's body part. Moreover, they also show an extreme convergence and divergence among crossable taxa. Floral displays vary in color, pattern, shape and scent which alone or in combination can act as signals for attraction of pollinators (Wilmer, 2011). Pollinator perception and its associated behavior plays a main role in selective environments for floral traits because it determines the effectiveness of the signals, and thus an effective transport of pollen-masses (Schiestl & Johnson, 2013). In plants, the evolution of reproductive isolation is achieved typically by a combination of pre and post-zygotic mechanisms that influences the gene flow (Scopece *et al.*, 2007). The high specificity between plant and pollinator is considered a key mechanism for maintaining species boundaries in many orchids (Gill, 1989; Tremblay *et al.* 2005). The pollination of orchids is mainly mediated by insects and on the base of the strategy adopted by selecting one or more species of pollinators, orchids can be divided into those who offer a reward (often nectar) and those who deceive pollinators. One-third of all orchids offer no reward and thus attracts pollinators through deceptive strategies (Tremblay *et al.*, 2005). Generally these strategies divide orchids in food and sexual deceptive. For instance, the genera *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Neotinea* and *Orchis s.s.* attract and deceive pollinators miming other nectariferous plants (Dafni, 1986). They emphasize parts of flowers, such as spur, which contain the reward, often nectar, so they are generally less species-specific (Cozzolino *et al.* 2005). In contrast a highly specific pollination is typical of the genus *Ophrys*: to deceive its pollinator this strategy involves visual, tactile but moreover odor cues to imitate female so the male try to mate with the flower. Within the sex-deceptive orchids, the monophyletic genus of *Ophrys* has a distribution from the Canaries to Caspian sea and from Scandinavia to the northern Maghreb. *Ophrys* has radiated throughout the Mediterranean region (Paulus

delle orchidee sex-deceptive, il genere monofiletico di *Ophrys* ha una distribuzione dalle Canarie al Mar Caspio e dalla Scandinavia al Maghreb settentrionale. Questo genere si è diversificato in tutta la regione mediterranea (Paulus & Gack, 1990; Delforge, 2006) ed è filogeneticamente correlato con i generi *Orchis*, *Serapias* e *Himantoglossum* ma non forma ibridi intergenetici (Delforge, 2006).

La grande diversità morfologica florale esibita dalle orchidee del genere *Ophrys* e un'alta variabilità intraspecifica dei tratti fiorali (Paulus, 2006) hanno ostacolato il raggiungimento di un consenso sulla tassonomia in questo genere, con il numero di specie che varia enormemente tra 19 e 250 specie, a seconda di l'autore (Delforge, 2005). L'impollinazione degli insetti è il principale fattore di speciazione in questo genere e tutte le specie sono potenzialmente interfertili, quindi gli ibridi non sono rari in natura. La relazione orchidea/impollinatore è spesso specie-specifica: ogni specie di *Ophrys* attrae un numero molto limitato di impollinatori, in molti casi solo una o due specie e questa è la principale barriera pre-zigotica tra le specie. L'impollinazione è mediata spesso da api maschili solitarie. I fiori di queste orchidee imitano la morfologia e il profumo degli insetti femminili e così i maschi tendono a copulare con i fiori in un processo noto come pseudocopulazione (Scopece, 2007).

In questa strategia riproduttiva il labello svolge un ruolo chiave, in quanto produce i composti chimici tra cui alcani e alcheni che sono simili ai feromoni femminili delle specie di insetti impollinatrici. Durante la pseudocopulazione, le strutture tattili del labello fanno assumere agli insetti una posizione cefalica o addominale. Nel primo caso, l'insetto si posiziona con la testa nella cavità stigmatica e questo contatto fa aderire i retinacoli alla testa (*Euophrys*). Nel secondo caso, l'insetto si posiziona sul labello con l'addome rivolto verso la colonna, quindi, cercando di accoppiarsi con il fiore, le masse polliniche vengono adese all'addome (*Pseudophrys*) (Delforge, 2006). La Sardegna è la seconda isola più grande del bacino del Mediterraneo ed è classificata come uno dei 34 più importanti "hotspot di biodiversità" al mondo (Mittermeier et al., 2004). La flora sarda è composta da 2.295 specie (Conti et al., 2005)

& Gack, 1990; Delforge, 2006) and it is closely related with the genera *Orchis*, *Serapias* and *Himantoglossum* but it does not form intergenetic hybrids (Delforge, 2006). The great morphological floral diversity exhibited by *O.* and a high intraspecific variation of floral traits (Paulus, 2006) have hindered the reaching of a consensus on the taxonomy in this genus, with the number of species varying enormously between 19 and 250 species, depending on the author (Delforge, 2005). Insect pollination is the main factor of speciation in this genus and all species are potentially interfertile so hybrids are not rare in nature. The orchid/pollinator relation is often specie-specific, each species of *Ophrys* attracts a very limited number of pollinators, in many cases just one or two species and this is the main pre-zygotic barrier between species. Pollination is mediated often by solitary male bees. Flowers of these orchids mimic the morphology and the scent of female insects and so males tend to copulate with the flowers in a process known as pseudocopulation (Scopece, 2007). In this strategy the labellum plays a key role, it secretes chemical compounds including alkanes and alkenes which are similar to the female sex pheromone of the pollinating species. During the pseudocopulation, tactile structures of the labellum make the pollinators assume a cephalic or abdominal position. In the former the insect engages its head in the stigmatic cavity and this contact makes the retinacles glued to its head (*Euophrys*). In the latter insect position on the labellum has the abdomen facing the column so, trying to mate with the flower, the pollinia are glued to its abdomen (*Pseudophrys*) (Delforge, 2006). Sardinia is the second larger island in the Mediterranean basin and it is classified as one of the 34 most important 'biodiversity hotspot' in the world (Mittermeier et al., 2004). The Sardinian flora consists of 2.295 species (Conti et al., 2005) of which 347 are endemics (Bacchetta et al., 2012), 60 species are *Orchidaceae* and 20 species are currently ascribed in the genus *Ophrys*. The aim of this work is to provide an updated list of pollinators for nine species of the genus *Ophrys*: *O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. funerea*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. sicula*, *O.*

di cui 347 endemici (Bacchetta *et al.*, 2012), 60 specie sono Orchidaceae e 20 specie sono attualmente ascritte al genere *Ophrys*. Lo scopo di questo lavoro è di fornire una lista aggiornata di impollinatori di nove specie del genere *Ophrys*: *O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. funerea*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. sicula*, *O. speculum* e *O. sphogodes* subsp. *praecox*. Per ogni specie analizziamo gli impollinatori precedentemente riportati nella letteratura (Delforge 2006; Casha, 2015) e li confrontiamo con i nostri dati raccolti durante le due successive stagioni di fioritura (2014 e 2015).

## MATERIALI E METODI

Le osservazioni sono state effettuate tra le 11:00 e le 13:00 (ora locale) in due stagioni primaverili successive negli anni 2014 e 2015. Gli impollinatori studiati sono stati osservati nel loro tentativo di copulazione per circa 10 secondi su fiori di nove diverse specie appartenenti al genere *Ophrys* (*O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. funerea*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. sicula*, *O. speculum* e *O. sphogodes* subsp. *praecox*). L'indagine è stata eseguita sui fiori nella loro fase iniziale di fioritura. Sono state scattate cinque foto per ognuna delle pseudocopulazioni osservate. Gli impollinatori studiati sono stati catturati prima della fine della loro attività pseudocopulatoria, conservati in provette da microcentrifuga (Eppendorf, volume da 1,5 ml), soppressi mediante congelamento, spillati e preparati per l'identificazione.

## Sito di studio

In sintesi la struttura geologica della Sardegna è costituita, in ordine stratigrafico, dal "Basamento Ercinico", che è rappresentato da rocce scistose variamente metamorfosate e ripiegate durante l'orogenesi ercinica. La loro origine è sedimentaria (meta arenarie, meta scisti, meta calcari etc.). L'età di queste rocce, in base al contenuto paleontologico e dei dati radiometrici, varia dal Cambriano inferiore al Basso Carbonifero. Questi metamorfiti risultano tardivamente e successivamente intrusi da rocce granitoidi pleistoceniche del periodo Permio-Carbonifero, appartenenti al

*speculum* and *O. sphogodes* subsp. *praecox*. For each species we compare the previously reported pollinators (Delforge, 2006; Casha, 2015) and we compare them with our identifications during two subsequent blooming seasons (2014 and 2015).

## MATERIALS AND METHODS

Observations took place between 11:00 and 13:00 a.m. (local time) on two subsequent spring seasons in the years 2014 and 2015. The pollinators studied have been observed in their attempt to copulation for about 10 seconds on flowers of nine different species of the genus *Ophrys* (*O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. funerea*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. sicula*, *O. speculum* and *O. sphogodes* subsp. *praecox*). Investigation was performed on flowers in their early stage of blooming. Five pictures have been taken for each of the pseudocopulations observed. The pollinators studied were caught before the end of their pseudocopulatory activity, stored in a microcentrifuge tubes (Eppendorf, 1.5 mL volume) sacrificed by freezing, set on an insect pin and prepared for identification.

## Site of study

The geological structure of Sardinia is synthetically constituted, in the stratigraphic order, by the "Hercynian Basement", which is represented by schistose rocks variously metamorphosed and refolded during the Hercynian Orogenesis. Their origin is sedimentary (metasandstones, metashales, metalimestones, metadolomites, etc.). The age of these rocks, based on the paleontological contents and the radiometric data, varies from Lower Cambrian to Lower Carboniferous. These metamorphites results tardily and later intruded by pleitonic granitoid rocks of Permo-Carboniferous age, belonging to the wide Sardinian-Corsican batholith (Domusnovas) (Carmignani *et al.*, 2001). Thick marine carbonatic sediments (dolomites, limestones), from Triassic to Cretaceous in age, lies discordant ("Hercynian unconformity") on the Paleozoic Basement erode during the Permo-Triassic period ("post-Hercynian peneplain") (Galtelli and Laconi). A very thick

batolite Sardo-Corso (Domusnovas).

Gli spessi sedimenti carbonatici marini (dolomiti, calcari), dal Triassico al Cretaceo, si trovano discordanti nel basamento Paleozoico eroso durante il periodo Permio-Triassico ("pianura post-Ercinica") (Galtelli e Laconi). Una grande successione Cenozoica costituita dai sedimenti marini e continentali (conglomerati e arenarie), da calcari dal Pliocene all'Eocene, poggia più frequentemente sulla sequenza del Mesozoico, direttamente sul basamento del Paleozoico.

Le vulcaniti da acide a basiche (Rioliti, Andesiti e basalti) dei cicli vulcanici dell'Oligocene-Miocene e Pliocene-Pleistocene sono associate ai sopra citati sedimenti.

Infine, i detriti prevalentemente continentali (alluvionali, eolici o lacustri etc.) depositati dall'antico al recente Quaternario (conglomerati, pietre a grana, siltiti e argilla), generalmente di piccolo spessore, coprono le precedenti formazioni geologiche.

### Materiali vegetali

Nove specie del genere *Ophrys* sono state selezionate per questo studio. Come suggerito in Delforge (2006), considerando la posizione dell'insetto durante la pseudocolazione, sette specie appartengono al gruppo *Euophrys*: *O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. speculum*, *O. sphogodes* subsp. *praecox*; e due al gruppo *Pseudophrys*: *O. funerea*, *O. sicula*.

*Ophrys bombyliflora* Link

*Ophrys bombyliflora* è un'orchidea piccola e sottile, alta 5-35 cm, con 1-5 piccoli fiori verdastri. I sepali sono di colore verde brillante o raramente biancastri. I petali sono villosi e triangolari, molto più piccoli dei sepali, verdastri con la base più scura. Il labello ha tre lobi alla base, ha una forma ovale, arrotondato con il lobo centrale globoso marrone scuro con uno specchio grigiastro blu scuro a forma di H, peli submarginali corti e verdastri; lobi laterali conici e villosi; appendice triangolare, glabra, verde e fortemente piegata sotto il labbro. *O. bombyliflora* si presenta in tutta l'isola a volte in popolazioni grandi e dense a causa della sua moltiplicazione vegetativa. Fiorisce da marzo a maggio a seconda dell'altitudine. *O.*

Cenozoic succession constituted by continental and marine sediments (conglomerates, sandstones, clays), marles and limestones, of Eocene to Pliocene age, rests on the Mesozoic sequence or more frequently, directly on the Paleozoic Basement. Acid to basic volcanites (rhyolites, andesites, basalts) of Oligocene-Miocene and Pliocene-Pleistocene volcanic cycles are associated to the above-mentioned sediments (Cagliari and Usini). Finally, detritic, prevalently continental (alluvional, aeolian, lacustric etc) deposits of the ancient and recent Quaternary (conglomerates, grainstones, silt, clay) generally of little thickness, discontinuously cover all the previous geological formations (Carmignani *et al.*, 2001).

### Plant materials

Nine species of the genus *Ophrys* were selected for this study. As suggested in Delforge (2006), considering the position of the insect during the pseudocopulation five species belong to the group *Euophrys*: *O. bombyliflora*, *O. chestermanii*, *O. morisii*, *O. normanii*, *O. panattensis*, *O. speculum*, *O. sphogodes* subsp. *praecox*; and two to the group *Pseudophrys*: *O. funerea*, *O. sicula*.

*Ophrys bombyliflora* Link

*Ophrys bombyliflora* is a small and slim orchid, tall 5-35 cm, with 1-5 small greenish flower. Sepals are oval bright green or rarely whitish. Petals are triangular villosous, much smaller than sepals, greenish with the base darker. Lip three lobed at the base, globally oval rounded Central lobe globular dark brown with a dark blue greyish speculum H shaped, short and greenish submarginal hairs; lateral lobes conical and villosous; appendance triangular, hairless, green and strongly folded below lip. *O. bombyliflora* occurs in all the island sometimes in big and dense populations due to its vegetative multiplication. It blooms from March to May depending on the altitude. *O. bombyliflora* grows in sun and semi-shade, alkaline substrate up to 900 m asl.

*Ophrys chestermanii* (J. J. Wood) Gözl & H.R. Reinhard

*Ophrys chestermanii*, tall 10-40 cm, has 2-8 big flowers. Sepals are lanceolate curved forwards from white to pink with green central nervature. Petals narrowly triangular, shorter

*bombyliflora* cresce in posizione assolate o semi-ombrose, substrato alcalino fino a 900 m slm. *Ophrys chestermanii* (J. J. Wood) Gözl & H.R. Reinhard

*Ophrys chestermanii*, alta 10-40 cm, ha 2-8 fiori grandi. Sepali sono lanceolati curvi in avanti di colore che va dal bianco al rosa con nervatura centrale verde. Petali strettamente triangolari, più corti dei sepali, villosi, colorati come sepali. Il labello è nero, intero trapezoidale o quadrangolare, villosa con peli marginali marrone-violacei marginali più lunghi e densi, due gibbe laterali, coniche e piccole, lo specchio ben definito a forma di H, grigiastro. Appendice prominente, gialla, a volte lobata e curva verso l'alto. La stagione della fioritura va da aprile a maggio. *O. chestermanii* è endemica della Sardegna, è molto rara o rara e cresce in ombra fino a 700 m di altitudine.

*Ophrys funerea* Viviani

*Ophrys funerea* è un'orchidea alta 10-20 cm; 2-5 fiori molto piccoli. Sepali verde-oliva a volte più chiari con margini riflessi, sepali laterali che si sviluppano ovali o lanceolati, sepali centrali ellittici. Petali verde oliva ob-allungati, più corti e più scuri dei sepali. Labello a tre lobi, orizzontali o pendenti, una peluria vellutata corta, densa e di color bianco caratterizza la superficie del labello i cui margini piegati sotto. I lobi laterali arrotondati e scarsamente segnati, lobo mediano meno allungato; specchio allungato profondamente diviso in due parti blu-grigiastre. *O. funerea* è una specie molto rara, probabilmente un edemismo dalla Sardegna e dalla Corsica, fiorisce da marzo ad aprile. Cresce in ombra o in posizione semi-ombra su substrato calcareo fino a 900 m slm.

*Ophrys morisii* (Martelli) Soó

*Ophrys morisii* è una specie alta (15-50 cm), con 3-10 fiori. Sepali ob-lanceolati curvati in avanti di colore estremamente variabile dal biancastro al rosa con nervature centrali verdi. Petali strettamente triangolari, più corti dei sepali, villosi, sempre più colorati dei sepali, margini ondulati. Labello intero o delicatamente trilobato, trapezoidale, a volte molto convesso trasversalmente, marrone scuro, villosa con margine di peli grigi e più lunghi. Specchio estremamente complesso e vario che forma chiaramente un disegno grigio

than sepals, villosous, coloured as sepals. Lip is black, entire trapezoid or quadrangular, villosous with longer and dense marginal brown-purpleish hairs, two lateral, conical and small swellings, speculum well define greyish H shaped. Appendage prominent, yellow, sometimes lobed and curve upwards. The blooming season goes from April to May. *O. chestermanii* is endemic of Sardinia, it is very rare or rare and grows in shade position up to 700 m asl.

*Ophrys funerea* Viviani

*Ophrys funerea* is an orchid tall 10-20 cm; 2-5 very small flowers. Sepals green-olive sometimes lighter with margins reflexed, lateral sepals spreading oval or lanceolate, central sepal elliptic. Petals olive-green ob-elongated, shorter and darker than sepals. Lip three-lobed, horizontal or pendent, short, dense and white hairs occur in the surface, margins folded below, lateral lobes rounded and poorly marked, median lobe less elongated; speculum elongated deeply divided in two blue-greyish parts. *O. funerea* is a very rare species, probably an edemism from Sardinia and Corse, it blooms from March to April. It grows in shade or semi-shade position on calcareous substrate up to 900 m asl.

*Ophrys morisii* (Martelli) Soó

*Ophrys morisii* is a tall (15-50 cm) species, with 3-10 flowers. Sepals oval-lanceolate curved forwards from whitish to pink with green central nervature. Petals narrowly triangular, shorter than sepals, villosous, always more colored than sepals, margins undulate. Lip entire or softly three-lobed, trapezoid, sometime very convex transversally, dark brown, villosous with margin of grey and longer hairs. Speculum extremely complex and varied clearly forming an H or X glossy grey with white margin, appendage triangular or three toothed, greenish or yellow directed downwards or upwards. *O. morisii* is a quite common orchid, it blooms from early March to May. It grows in full sun or mid-shade and does not prefer any particular substrate.

*Ophrys normanii* J.J. Wood

*Ophrys normanii* is a 15-50 cm tall orchid with a very dense inflorescence. Flowers are very large normally in number from 2 to seven, sepals rounded from pinkish to violet

lucido a forma di H o X con margine bianco. Il labello ha una appendice triangolare o tre denti, verdastro o giallo diretta verso il basso o verso l'alto. *O. morisii* è un'orchidea abbastanza comune, fiorisce dai primi di marzo a maggio. Cresce in pieno sole o mezz'ombra e non preferisce alcun particolare substrato.

*Ophrys normanii* J.J. Wood

*Ophrys normanii* è un'orchidea alta 15-50 cm con un'infiorescenza molto densa. I fiori sono molto grandi, normalmente in numero da 2 a sette, i sepali arrotondati da rosa a viola a volte verdastri, i petali sempre più scuri dei sepali con la base marrone-nerastra, più piccola dei sepali, triangolare con margini ondulati. Labello trapezoidale, villosa, convesso trasversalmente, centro marrone scuro o bordi nerastri o verdastro-giallastro, peloso; peli verdognoli o gialli, molto lunghi soprattutto nel margine, specchio molto ridotto, bluastro o grigio lucido, appendice triangolare, eretto vicino al globulare. *O. normanii* è una specie ibridogena (*O. neglecta* x *O. chestermanii*) endemica della Sardegna, cresce in pieno sole in posizioni semi-ombreggiate su substrati alcalini o acidi fino a 400 m slm. La sua fenologia è intermedia tra *O. neglecta* e *O. chestermanii*.

*Ophrys panattensis* Scrugli, Pessei & Cogoni

*Ophrys panattensis* è un'orchidea di 20-50 cm di altezza e molto variabile. Infiorescenza lassa con 6-12 fiori grandi, sepali allungati da biancastri a violacei, ovali-lanceolati, margini ricurvi, sepali laterali diretti verso il basso, sepali dorsali diretti in avanti, curvi ed eretti; petali dello stesso colore dei sepali o più scuri, allungati, ciliati, i margini sono lineari a ondulati. A causa della struttura del labello, questa specie è variabile. Labello pendente, a volte molto convesso longitudinalmente, generalmente di colore bruno-rossastro con margini più chiari e pelosi e peli più lunghi e più scuri vicino alla base, se presenti, due gonfiori laterali sono distinti e verdastri, specchio molto variabile a forma di H o X a volte il disegno è ridotto a due linee, di colore grigio lucido spesso con margini bianchi, appendice triangolare, a tre denti, molto eretta, marrone-giallastra. *O. panattensis* è un'orchidea

sometimes greenish, petals always darker than sepals with the base brown-blackish, smaller than sepals, triangular with undulated margins. Lip trapezoid, villosous, convex transversally, center dark brown or blackish edges greenish-yellowish, hairy; hairs greenish or yellow, very long especially in the margin, speculum very reduced, blueish or glossy grey, appendance triangular, erect close to globular. *O. normanii* is a hybridogenous species (*O. neglecta* x *O. chestermanii*) endemic of Sardinia, it grows in full sun to semi-shade positions on alkaline to acid substrates up to 400 m asl. Its phenology is intermediate between *O. neglecta* and *O. chestermanii*.

*Ophrys panattensis* Scrugli, Pessei & Cogoni

*Ophrys panattensis* is a 20-50 cm tall and very variable orchid. Inflorescence lax with 6-12 large flowers, sepals elongated from whitish to violet, oval-lanceolate, margins recurved, lateral sepals directed downwards, dorsal sepals directed forwards, curved and erected; petals of the same color of the sepals or darker, elongated, ciliate, margins linear to undulate. Due to lip's structure this species is variable. Lip pendent, sometimes very convex longitudinally, generally brown-reddish colored with clearer and hairy margins and hairs longer and darker close to the base, if present, two lateral swellings are distinct and greenish, speculum very variable forming an H or X sometimes very reduced to two lines, color glossy grey often with white margins, appendance triangular, three-toothed, very erect, brown-yellowish. *O. panattensis* is an endemic orchid of Sardinia especially from the northwest, local but sometimes very abundant. *O. panattensis* blooms from April to May, it grows in full sun or mid-shade mostly on alkaline substrate up to 800 m asl.

*Ophrys sicula* Tineo

*Ophrys sicula* is a small orchid tall 10-20 cm, 3-8 small and yellow flowers. Sepals green-yellow with margins reflexed, lateral sepals asymmetrical and concave, central sepal oboval, bent over column; petals oblong, darker and shorter than sepals with margins undulate. Lip three-lobed horizontal to pendent with long and dense hairs, central part brown-reddish, big yellow borders, margins folded upwards, lateral lobes rounded, wide,

endemica della Sardegna soprattutto dal nord-ovest, locale ma a volte molto abbondante. *O. panattensis* fiorisce da aprile a maggio, cresce in pieno sole o mezz'ombra principalmente su substrato alcalino fino a 800 m slm.

*Ophrys sicula* Tineo

*Ophrys sicula* è una piccola orchidea alta 10-20 cm, 3-8 piccoli e fiori gialli. Sepali di colore verde-giallo con margini riflessi, sepali laterali asimmetrici e concavi, curvati sulla colonna; petali oblunghi, più scuri e più corti dei sepali con margini ondulati. Labello a tre lobi orizzontali a pendenti con peli lunghi e folti, parte centrale marrone-rossastra, grandi bordi gialli, margini piegati verso l'alto, lobi laterali arrotondati, ampio, giallo, lobo centrale giallo chiaramente diviso in due; specchio bilobato, blu-grigiastro. In Sardegna questa specie è rara, la sua stagione di fioritura copre il periodo tra marzo e inizio maggio. *O. sicula* cresce in pieno sole o mezz'ombra su substrato alcalino fino a 1000 m slm.

*Ophrys speculum* Link (nom. cons. prop.)

*Ophrys speculum* alto 5-25 cm con 2-8 fiori grandi. Sepali verde oliva, sepali laterali ovali-oblungi, orizzontali, concavi, con un segno marrone scuro-rossastro sulla nervatura centrale, sepali centrali con riflessi marginali, totalmente piegati sulla colonna. Petali marrone scuro, chiaramente villosi, lanceolati con apici piegati all'indietro. Labello a tre lobi con un ampio margine di peli lunghi e castani; lobi laterali piatti, lanceolati da ovali marrone scuro a neri alla base, lobo mediano obcordato, convesso con un margine giallo-arancio, ampio specchio blu che occupa la parte centrale; appendice assente. *O. speculum* è un'orchidea molto comune che fiorisce da febbraio a maggio. Cresce in pieno sole fino a 1000 m di altitudine.

*Ophrys sphegodes* Milles subsp. *praecox* Corrias

*Ophrys sphegodes* subsp. *praecox* alto 15-50 cm con 2-5 fiori. Sepali da bianchi a verde chiaro; sepali laterali triangolari, oblungi, leggermente concavi con una vena longitudinale verde; sepali centrali concavi, eretti o chiaramente piegati in avanti. Petali leggermente più corti dei sepali ma dello stesso colore, oblungi o lanceolati con margini ondulati. Labello intero o a tre lobi da

yellow, central lobe yellow clearly divided in two; speculum bilobed, blue-greyish. In Sardinia this species is rare, its blooming season covers the period between March and early May. *O. sicula* grows in full sun or mid-shade on alkaline substrate up to 1000 m asl.

*Ophrys speculum* Link (nom. cons. prop.)

*Ophrys speculum* tall 5-25 cm with 2-8 large flowers. Sepals olive-green, lateral sepals oval-oblong, horizontally, concave, with a dark brown-reddish mark on the central nervature, central sepals with margin reflexed, totally bent on column. Petals dark brown, clearly villosous, lanceolate with apexes folded backwards. Lip three lobed carrying a wide margin of long and brown hairs; lateral lobes flat, lanceolate to oval dark-brown to black at the base, median lobe obcordate, convex with a yellow-orange margin, wide blue speculum that occupies the central part; appendage absent. *O. speculum* is a very common orchid which blooms from February to May. It grows in full sun up to 1000 m asl.

*Ophrys sphegodes* Milles subsp. *praecox* Corrias

*Ophrys sphegodes* subsp. *praecox* tall 15-50 cm with 2-5 flowers. Sepals white to light green; lateral sepals triangular, oblong, slightly concave with a longitudinal green vein; central sepals concave, erected or clearly bent forward. Petals slightly shorter than sepals but of the same color, oblong or lanceolate with undulate margins. Lip entire or three lobed from dark brown to brown-reddish villosous with a very dense, long and paler hairs in its margin; speculum simple forming a grey-blueish H. Appendage very small and prominent. *O. sphegodes* subsp. *praecox* grows usually in the north east of Sardinia in full sun or semi-shade up to 750 m asl. Its blooming season goes from January to late March.

## RESULTS AND CONCLUSION

In accordance with the previous studies on the pollination of the genus *Ophrys* (Rakosy *et al.*, 2012), our research confirms that these orchids have the tendency to attract males of solitary bees (Table). Males of the genera *Andrena*, *Anthophora*, *Bombus*, *Colletes*, *Dasyscolia*, *Osmia* and *Rhodanthium* built their nest on the ground and they emerge from the winter rest before females. *Ophrys* exploits this short



marrone scuro a villosità marrone-rossiccia con peli molto densi, lunghi e più chiari sul margine; specchio semplice di colore grigio-bluastro. Appendice molto piccola e prominente. *O. sphagodes* subsp. *praecox* cresce di solito nel nord est della Sardegna in pieno sole o semi-ombra fino a 750 m s.l.m. La sua stagione di fioritura va da gennaio a fine marzo.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

In accordo con gli studi precedenti sull'impollinazione del genere *Ophrys* (Rakosy *et al.*, 2012), la nostra ricerca conferma che queste orchidee hanno la tendenza ad attirare i maschi di api solitarie (Tabella). I maschi dei generi *Andrena*, *Anthophora*, *Bombus*, *Colletes*, *Dasyscolia*, *Osmia* e *Rhodanthidium* costruirono il loro nido sul terreno e emergono dal riposo invernale prima delle femmine. Le specie del genere *Ophrys* sfruttano questo breve periodo di tempo per ingannare i maschi. Una volta ingannati, le api maschi solitarie volano in volo stazionario per alcuni secondi e poi cercano di accoppiarsi con il fiore dell'orchidea (pseudocopula) (Rakosy *et al.*, 2012).

*Ophrys bombyliflora* è impollinata dal genere *Eucera* (Apidae), Delforge (2006) descrive *Eucera algira*, *E. gracilipes*, *E. nigrescens* subsp. *continentis*, *E. orientalis* ed *E. vulpes* come impollinatori predominanti di questa orchidea. Nel nostro studio abbiamo anche trovato maschi di *Eucera longicornis* come impollinatori come suggerito in Casha (2015) (Fig.1). *Bombus vestalis* (Apidae) è il principale impollinatore di *Ophrys chestermanii* e *Ophrys normanii* (Delforge, 2006; Gögler *et al.*, 2015). Per *O. chestermanii* abbiamo anche registrato maschi di *Andrena nigroaenea* (Andrenidae), *Colletes* sp. (Colletidae), *Osmia ferruginea* e *Rhodanthidium sticticum* (Megachilidae) come impollinatori putativi. Per *O. normanii* confermiamo *Bombus vestalis* come impollinatore.

In accordo con Delforge, nel 2006 abbiamo trovato maschi di *Andrena wilkella* (Andrenidae) come impollinatori di *Ophrys funerea* (Fig.2). *Andrena pilipes* è anche registrato come impollinatore di questa orchidea (Devillers *et al.*, 2000).

periodo di tempo per ingannare i maschi. Una volta ingannati, le api maschi solitarie volano in volo stazionario per alcuni secondi e poi cercano di accoppiarsi con il fiore dell'orchidea (pseudocopula) (Rakosy *et al.*, 2012).

*Ophrys bombyliflora* è impollinata dal genere *Eucera* (Apidae), Delforge (2006) descrive *Eucera algira*, *E. gracilipes*, *E. nigrescens* subsp. *continentis*, *E. orientalis* ed *E. vulpes* come impollinatori predominanti di questa orchidea. In our study we also found males of *Eucera longicornis* as pollinators as suggested in Casha (2015) (Fig.1).



Fig. 1 - *Ophrys sicula* with *Andrena taraxaci*  
(Photo, V. Rodi)

*Bombus vestalis* (Apidae) is the main pollinator of *Ophrys chestermanii* and *Ophrys normanii* (Delforge, 2006; Gögler *et al.*, 2015). For *O. chestermanii* we also recorded males of *Andrena nigroaenea* (Andrenidae), *Colletes* sp. (Colletidae), *Osmia ferruginea* and *Rhodanthidium sticticum* (Megachilidae) as putative pollinators. For *O. normanii* we confirm *Bombus vestalis* as pollinator.

In accordance with Delforge, 2006 we found males of *Andrena wilkella* (Andrenidae) as pollinators of *Ophrys funerea* (Fig. 2). *Andrena pilipes* is also recorded as pollinators of this orchid (Devillers *et al.*, 2000).

*Ophrys morisii* is pollinated by males of *Andrena*

*Ophrys morisii* è impollinata da maschi di *Andrena sichelii* (Delforge, 2006). Il nostro studio conferma il precedente impollinatore, inoltre abbiamo anche osservato *Andrena bicolor* come visitatore. In campo i maschi di questa specie volare per pochi secondi davanti al fiore, atterrando sul fiore senza portare via alcun pollinio.

A Galtelli abbiamo registrato *Ophrys panattensis* impollinato dai maschi di *Osmia rufa* in congruenza con quanto già riportato in Delforge (2006).

Confermiamo *Dasycolia ciliata* (Scoliidae) come impollinatore di *Ophrys speculum*. Abbiamo anche osservato i maschi di *Andrena bicolor*, *Colletes succinctus* e *Rhodanthidium sticticum* visitando fiori diversi senza pseudocopula.

In Delforge (2006) *Andrena thoracica* e forse *Andrena nigroaenea* sono registrati come impollinatori di *Ophrys sphogodes* subsp. *praecox*. Abbiamo trovato tre femmine e due maschi di *Andrena nigroaenea*, spieghiamo la presenza di due femmine occasionali forse confuse dall'intensa attività di ricerca del nettare.

*Andrena hesperia*, *A. merula* e *A. taraxaci* sono descritti come impollinatori di *Ophrys sicula* (Delforge, 2006). Nel nostro studio abbiamo catturato due maschi di *A. nigroolivacea* e un maschio di *A. nigroaenea*.

Come approccio generale all'impollinazione del genere *Ophrys*, lo scopo di questo studio era di fornire un elenco nuovo e aggiornato sugli impollinatori di nove specie in diverse stazioni dell'isola di Sardegna. Le nostre osservazioni hanno confermato i dati bibliografici e forniscono anche alcune informazioni aggiuntive sul comportamento etologico di impollinatori putativi o occasionali che spiegano la presenza non rara di ibridi. Ad eccezione dello *Ophrys speculum*, che è l'unica impollinata da un vespa, tutti i taxa inclusi in questo studio sono impollinati da api solitarie che confermano la tendenza dell'intero genere. Poiché la diversità all'interno del genere *Ophrys* si è evoluta come conseguenza della disponibilità di *Andrena* come potenziali impollinatori, questo genere può essere confermato come l'impollinatore cruciale di questo genere anche in Sardegna. Cinque specie sono impollinate da *Andrena*, in particolare *O. chestermanii*, *O. morisii*, *O. sphogodes* subsp. *praecox*, *O. funerea* e *O. sicula*.

*sichelii* (Delforge, 2006). Our study confirms the previous pollinator, in addition we also observed *Andrena bicolor* as visitor. In field we observed males of this species flying for few seconds in front of the flower, landing on the flower without carry any pollinia away.

In Galtelli we recorded *Ophrys panattensis* pollinated by males of *Osmia rufa* in congruence with what already reported in Delforge (2006).

We confirm *Dasycolia ciliata* (Scoliidae) as the pollinator of *Ophrys speculum*. We also observed males of *Andrena bicolor*, *Colletes succinctus* and *Rhodanthidium sticticum* visiting different flowers without pseudocopulate with.

In Delforge (2006) *Andrena thoracica* and perhaps *Andrena nigroaenea* are recorded as pollinator of *Ophrys sphogodes* subsp. *praecox*. We found three females and two males of *Andrena nigroaenea*, we explain the presence of two females as occasional perhaps confused by the intense activity of nectar search.

*Andrena hesperia*, *A. merula* and *A. taraxaci* are described as pollinator of *Ophrys sicula* (Delforge, 2006). In our study we captured two males of *A. nigroolivacea* and a male of *A. nigroaenea*.

As a general approach to *Ophrys* pollination, the aim of this study was to give a new and updated list of pollinators on nine *Ophrys* species in several stations in the island of Sardinia. Our observations have confirmed bibliographic data and they also give some additional information on ethological behavior of putative or occasional pollinators explaining the not rare presence of hybrids. Except of *Ophrys speculum* which is the only wasp pollinated, all the taxa included in this study are pollinated by solitary bees confirming the tendency of the entire genus. As *Ophrys* diversity has evolved as a consequence of *Andrena* availability as potential pollinators this genus can be confirmed as the crucial pollinator of the genus *Ophrys* even in Sardinia. Five species are pollinated by *Andrena*, in particular *O. chestermanii*, *O. morisii*, *O. sphogodes* subsp. *praecox*, *O. funerea* and *O. sicula*. Entrust pollination to different species of the same genus represents a significant pre-zygotic barrier especially in sympatric situations, for

Affidare l'impollinazione a diverse specie dello stesso genere rappresenta una barriera pre-zi-gotica significativa soprattutto in situazioni simpatiche, ad esempio *O. sicula*, *O. funerea* e *O. morisii* che crescono spesso in condizioni di simpatria e sono tutte impollinate da diverse specie di *Andrena*. Abbiamo anche osservato che in molti casi diverse specie di insetti sono attratte dal fiore, ma pochi (o solo uno) sono gli efficaci impollinatori. Per esempio in *O. speculum* abbiamo registrato maschi di *Colletes succinctus*, *Rhodanthidium sticticum* e *Andrena bicolor* volare per pochi secondi vicino al fiore, atter-rando sul fiore e poi volando via.

Questo comportamento supporta fortemente l'ipotesi che i segnali visivi e tattili possano giocare solo un ruolo secondario nell'inganno degli insetti come ampiamente supportato da Paulus (2006) e Vereecken (Vereecken, 2009; Vereecken & Schiestl, 2009; Vereecken & McNeil, 2010; Vereecken *et al.*, 2011) ma l'interazione tra segnali olfattivi, visivi e tattili è necessaria per attirare il giusto impollinatore e massimizzare così il successo dell'impollinazione. Tuttavia, ulteriori indagini in particolare con tecniche molecolari, analisi chimiche si rivelano necessarie per comprendere meglio i meccanismi riproduttivi delle specie di *Ophrys*. Una grande limitazione del nostro studio è il numero relativamente basso di impollinatori trovato, tuttavia tale numero è congruente con il basso tasso di impollinazione delle orchidee e specialmente del genere *Ophrys* come riportato in Bateman *et al.* 2011. In questo contesto è richiesto un aumento dell'etologia entomologica per comprendere appieno l'ecologia e l'evoluzione di *Ophrys*.

instance *O. sicula*, *O. funerea* and *O. morisii* grow often in condition of simpatry and are all pollinated by different species of *Andrena*. We also observed that in many cases different insect species are attracted by the flower but few (or just one) are the effective pollinators. For instance in *O. speculum* we recorded males of *Colletes succinctus*, *Rhodanthidium sticticum* and *Andrena bicolor* fly for few seconds close to the flower, landing on the flower and then fly away. This behavior strongly supports the hypothesis that visual and tactile signals may play only a secondary role in the deception of insects as largely supported by Paulus (2006) and Vereecken (Vereecken, 2009; Vereecken & Schiestl, 2009; Vereecken & McNeil, 2010; Vereecken *et al.*, 2011) but the interaction between olfactory, visual and tactile signals is necessary to attract the right pollinator and so maximize the success of pollination. However, further investigations especially with molecular techniques, chemical analyses prove to be necessary to better understand the reproductive mechanisms of *Ophrys* species. A great limitation of our study is the relatively low number of pollinators found, but this is congruent with the low pollination rate of orchids and especially of the genus *Ophrys* as reported in Bateman *et al.* (2011). In this context an increase in entomologic ethology is required in order to fully understand ecology and evolution of *Ophrys*.

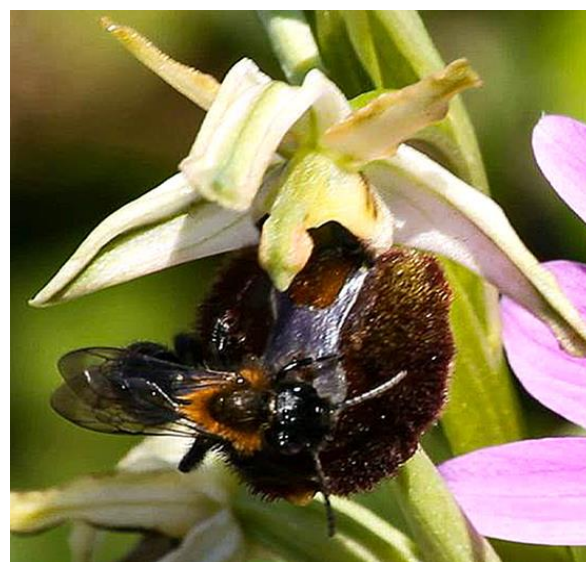


Fig. 2 - *Ophrys sphogodes* subsp. *praecox* with *Andrena thoracica* (Photo, V. Rodi)

Orchid specie	Identified Pollinator	Previous reports
Euophrys group		
<i>Ophrys bombyliflora</i>	<i>Eucera longicornis</i> (L.)	<i>Eucera algira</i> BRULLÉ
		<i>Eucera elongatula</i> VACHAL
		<i>Eucera gracilipes</i> PÉREZ
		<i>Eucera grisea</i> FABRICIUS
		<i>Eucera longicornis</i> (L.)
		<i>Eucera nigrescens</i> subsp. <i>continentis</i> PÉREZ
		<i>Eucera notata</i> LEPELETIER
		<i>Eucera oraniensis</i> LEPELETIER
		<i>Eucera orientalis</i> FRIESE
		<i>Eucera parnassia</i> PÉREZ
		<i>Eucera vulpes</i> BRULLÉ
<i>Ophrys chestermanii</i>	<i>Andrena nigroaenea</i> KIRBY	<i>Bombus vestalis</i> GEOFFROY
	<i>Rhodanthidium sticticum</i> FABRICIUS	
	<i>Colletes</i> sp.	
	<i>Osmia ferruginea</i> LATREILLE	
<i>Ophrys morisii</i>	<i>Anthophora sicelii</i> RADOSZKOWSKI	<i>Anthophora sicelii</i> RADOSZKOWSKI
	<i>Andrena bicolor</i> FABRICIUS	
<i>Ophrys normanii</i>	<i>Bombus vestalis</i> GEOFFROY	<i>Bombus vestalis</i> GEOFFROY
<i>Ophrys panattensis</i>	<i>Osmia rufa</i> PANZER	<i>Osmia rufa</i> PANZER
<i>Ophrys speculum</i>	<i>Colletes succinctus</i> (L.)	<i>Dasycolia ciliata</i> FABRICIUS
	<i>Rhodanthidium sticticum</i> FABRICIUS	
	<i>Andrena bicolor</i> FABRICIUS	
<i>Ophrys sphegodes</i> subsp. <i>praecox</i>	<i>Andrena nigroaenea</i> KIRBY	<i>Andrena thoracica</i> FABRICIUS
		<i>Andrena nigroaenea</i> KIRBY
Pseudophrys group		
<i>Ophrys funereal</i>	<i>Andrena wilkella</i> KIRBY	<i>Andrena pilipes</i> FABRICIUS
<i>Ophrys sicula</i>	<i>Andrena nigroolivacea</i> DOURS	<i>Andrena hesperia</i> SMITH
	<i>Andrena nigroaenea</i> KIRBY	<i>Andrena taraxaci</i> GIRAUD

Tabella - Confronto tra gli impollinatori trovati e gli impollinatori registrati in bibliografia.

Table - Comparison of pollinators found and pollinators recorded in bibliography.

## BIBLIOGRAFIA REFERENCES

- BACCHETTA G., FENU G., MATTANA E., 2012, A checklist of the exclusive vascular flora of Sardinia with priority rankings for conservation, *Annales del Jardín Botánico de Madrid* Vol. 69(1): 81-89 enero-junio 2012 ISSN: 0211-1322 doi: 10.3989/ajbm.2289.
- BATEMAN R.M., BRADSHAW E., DEVEY D. S., GLOVER B.J., MALMGREN S., SRAMKÓ G., THOMAS M.M., RUDALL P.J., 2011, Species arguments: clarifying competing concepts of species delimitation in the pseudo-copulatory orchid genus *Ophrys*, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165, 336–347.
- CASHA A., 2015, *Flora of the Maltese Islands*, ISBN: 9781326341862.
- CHASE M.W., CAMERON K.M., BARRETT R.L., FREUDENSTEIN J.V., 2003, DNA data and *Orchidaceae* systematics: a new phylogenetic classification. In *Orchid conservation* (eds K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett, P.J. Cribb), pp. 69-89. Kota Kinabalu, Malaysia: Natural History Publications.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A. & BLASI C. (eds.), 2005. *An annotated checklist of the Italian vascular flora*. Palombi Editori. Roma.
- DELFORGE P., 2005. *Guide des orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient*. Paris: Delachaux et Niestlé.
- DELFORGE P., 2006, *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. A&C Black, London.
- DEVILLERS P. & DEVILLERS-TERSCHUREN J., 2000: Notes phylogénétiques sur quelques *Ophrys* du complexe d'*Ophrys fusca* s.l. en Méditerranée centrale. – *Natural. Belges* 81,3 (Orchid. 13): 322.
- GILL D.E., 1989, Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. In: Otte D, Gögler J., Stökl J., Cortis P., Beyrle H., Barone Lumaga M. R., Cozzolino S., Ayasse M., 2015, Increased divergence in floral morphology strongly reduces gene flow in sympatric sexually deceptive orchids with the same pollinator *Evol. Ecol.* (2015) 29:703–717 DOI 10.1007/s10682-015-9779-2.
- MITTERMEIER R.A., ROBLES GIL P., HOFFMANN M., PILGRIM J., BROOKS T., MITTERMEIER C.G., LAMOREUX J., DA FONSECA G.A.B., 2004., *Hotspots Revisited*. Mexico: CEMEX.
- PAULUS H.F., GACK C., 1990, Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (*Orchidaceae*). *Isr J Bot* 39:43–79.
- PAULUS H.F., 2006, Deceived males pollination biology of the Mediterranean orchid genus *Ophrys* (*Orchidaceae*). *Journal Europäischer Orchideen* 38: 303–353.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen F.N.(eds), 2001–2014, *Genera Orchidacearum*, vol. 1–6. New York, NY: Oxford University Press.
- RAKOSY D., STREINZER M., PAULUS H.F., SPAETHE J., 2012, Floral visual signal increases reproductive success in a sexually deceptive orchid, *Arthropod-Plant Interactions* (2012) 6:671–681 DOI 10.1007/s11829-012-9217-0.
- SCHIESTL F. P., JOHNSON S. D., 2013, Pollinator-mediated evolution of floral signals, *Trends in Ecology and Evolution* Volume 28, Issue 5, Pages 307–315.

SCOPECE G., MUSACCHIO A., WIDMER A., COZZOLINO S., 2007, Patterns of reproductive isolation in Mediterranean deceptive orchids. *Evolution* 61:2623–2642.

TREMBLAY R.L., ACKERMAN J.D., ZIMMERMAN J.K., CALVO R.N., 2005, Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol J Linn Soc Lond* 84:1–54.

VEREecken N.J., 2009. Deceptive behavior in plants I. Pollination by sexual deception in orchids: a host–parasite perspective. In: Baluska F, ed. *Plant–environment interactions: from sensory plant biology to active behavior*. Berlin: Springer Verlag, 203–222.

VEREecken N.J., SCHIESTL F.P. 2009. On the roles of color and scent in a specialized floral mimicry system. *Annals of Botany* 104: 1077–1084.

VEREecken N.J., MCNEIL J.N., 2010. Cheaters and liars: chemical mimicry at its finest. *Canadian Journal of Zoology* 88: 725–750.

VEREecken N.J., STREINZER M., AYASSE M., SPAETHE J., PAULUS H.F., STÖKL J., CORTIS P., SCHIESTL F.P., 2011, Integrating past and present studies on *Ophrys* pollination – a reply to Bradshaw et al. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 329–335. Willmer P., 2011, *Pollination and Floral Ecology* Princeton University Press.

## **AUTORI AUTORS**

MICHELE LUSSU<sup>1</sup>, Email: michelelussu86@gmail.com

SILVIA SAU<sup>1\*</sup>, Email: sausilvia85@gmail.com

MARCO S. PUTZOLU<sup>1</sup>, Email: 7ilputzolu@live.it

ANNALENA COGONI<sup>1</sup>, Email: cogoni@unica.it

VINCENZO RODI<sup>1</sup>, Email: vincenzo.rodì@tiscali.it

ANTONIO DE AGOSTINI<sup>1</sup>, Email: deagostiniantonio@yahoo.it

ALBERTO CAREDDA<sup>1</sup>, Email: albero8692@gmail.it

PIERLUIGI CORTIS<sup>1</sup>, Email: pierluigi.cortis@unica.it

<sup>1</sup>Università degli Studi di Cagliari, Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente, Sezione Botanica, Via Sant’Ignazio da Laconi 11, 09100 Cagliari, Italy.

\*Corresponding author