

# Revista de Biología

22 | 2004



PO ISSN 0034-7736

PO ISSN 0034-7736

# REVISTA DE BIOLOGIA

VOL. 22

2004

N.<sup>OS</sup> 1-4

Publicação do  
Jardim Botânico  
Museu Nacional de História Natural  
Universidade de Lisboa  
Rua da Escola Politécnica 58, 1250-102 Lisboa (Portugal)

---

## REDACTORES

M. A. MARTINS-LOUÇÃO • F. M. CATARINO • IRENEIA MELO

Esta Revista tem revisão científica.

Título para citações bibliográficas: *Revista Biol. (Lisboa)*

Publicação do Jardim Botânico (M.N.H.N.), Universidade de Lisboa,  
Rua da Escola Politécnica, 58, 1250-102 Lisboa, Portugal.

Capa: Rocha e Loução

Montagem e arranjo gráfico no Jardim Botânico por J. Cardoso, Setembro de 2004.

---

LISBOA

# 8º ENCONTRO NACIONAL DE ECOLOGIA

*Promovido pela  
SPECO - Sociedade Portuguesa de Ecologia*

Évora, 30 de Outubro a 1 de Novembro de 2003

Publicação financiada pela:

**FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DA TECNOLOGIA

**POCTI - Programa Operacional "Ciência, Tecnologia, Inovação"**

## *PREFÁCIO*

O 8º Encontro Nacional de Ecologia, realizou-se de 30 de Outubro a 1 de Novembro de 2003, na Universidade de Évora, dando continuidade ao objectivo de abranger um leque cada vez maior de cientistas e investigadores nacionais que se dedicam ao estudo da ecologia nas suas diversas vertentes. Este Encontro assinala também o regresso a uma configuração mais aberta e diversificada do programa, com uma abordagem integrada dos contributos de todas as áreas específicas de investigação em Ecologia terrestre e aquática.

O presente volume da Revista de Biologia reúne alguns dos trabalhos que foram apresentados no âmbito do 8ºENE. Os artigos deste numero são contribuições de todos os que tendo apresentado comunicação sob a forma oral ou de painel manifestaram interesse em ver publicado o seu trabalho. Os trabalhos submetidos foram objecto de revisão por investigadores nacionais e ibéricos que procederam a críticas e sugestões, valorizando esta publicação de distribuição nacional e internacional.

A SPECO agradece o interesse de todos os que contribuíram com os seus trabalhos, aos que se disponibilizaram a rever e a sugerir alterações aos manuscritos, aos responsáveis pela edição da Revista de Biologia, Profª Paula Sobral (SPECO), Drª Ireneia Melo e Sr. José Cardoso e às entidades que nos apoiaram e assim tornaram possível esta publicação.

*A Direcção da SPECO  
Sociedade Portuguesa de Ecologia*

## Revisores do presente volume:

Augusto Dinis	<i>Universidade de Coimbra</i>
Rui Santos	<i>Universidade do Algarve</i>
Manuela Coelho	<i>Universidade de Lisboa</i>
Isabel Moura	<i>Jardim-Museu Agrícola Tropical</i>
Conceição Santos	<i>Universidade de Aveiro</i>
Fernando Lindon	<i>Universidade Nova de Lisboa</i>
Jorge Canhoto	<i>Universidade de Coimbra</i>
Cristina Nabais	<i>Universidade de Coimbra</i>
J. Santos Pereira	<i>Instituto Superior de Agronomia</i>
Filomena Magalhães	<i>Universidade de Lisboa</i>
João Bernardo	<i>Universidade de Évora</i>
Pedro Beja	<i>ERENA</i>
Pedro Anastácio	<i>Universidade de Évora</i>
Pedro Raposo	<i>Universidade de Évora</i>
Carlos Assis	<i>Universidade de Lisboa</i>
Otilia Correia	<i>Universidade de Lisboa</i>
Mari Cruz Diaz Barradas	<i>Universidad de Sevilla</i>
Amélia Loução	<i>Universidade de Lisboa</i>
Anabela Romano	<i>Universidade do Algarve</i>
C. Pinto-Gomes	<i>Universidade de Évora</i>
Mário Lousã	<i>Instituto Superior de Agronomia</i>
Graça Oliveira	<i>Universidade de Lisboa</i>
Helena Freitas	<i>Universidade de Coimbra</i>
Jorge Marques da Silva	<i>Universidade de Lisboa</i>
Cristina Branquinho	<i>Universidade Atlântica</i>
Sara Amâncio	<i>Instituto Superior de Agronomia</i>
Manuel João Pinto	<i>Jardim Botânico de Lisboa</i>
Jorge Capelo	<i>Estação Florestal Nacional</i>
Ana Maria Rodrigues	<i>Universidade de Aveiro</i>
J. C. Marques	<i>Universidade de Coimbra</i>
Maria Helena Costa	<i>Universidade Nova de Lisboa</i>
Orlando Luís	<i>Universidade de Lisboa</i>
Maria João Collares Pereira	<i>Universidade de Lisboa</i>
António Mira	<i>Universidade de Évora</i>

## ÍNDICE

Custódio, L., Fernandes, N., Carneiro, M. F., Romano, A. - Criopreservação de micrósoros de alfarrobeira ( <i>Ceratonia siliqua</i> L.).	7
Gonçalves, S., Romano, A., Nolasco, G. & Fonseca, F. - Variabilidade genética em populações algarvias de <i>Drosophyllum lusitanicum</i> .	21
Ribeiro, A. R., Moura, I., Carneiro, M. F. & Romano, A. - Crioconservação de ápices vegetativos de <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott.	31
Martins, M. D., Almeida, R. & Romano, A. - Influência do tipo de explantado e dos reguladores de crescimento na indução de rebentos em <i>Rhododendron ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i> .	43
Oliveira, G. & Peñuelas, J. - Respostas morfológicas e fisiológicas das folhas de duas espécies mediterrânicas a factores ambientais durante o Inverno.	53
Maia, H. & Valente, A. - Biology of the roach ( <i>Chondrostoma macrolepidotus</i> ) population in the Protected Area of the Lagoons of Bertandos and of São Pedro de Arcos (Northern Portugal).	65
Cruz, M. J., Andrade, P., Pascoal, S. & Rebelo, R. - Colonização de charcos temporários pelo lagostim-vermelho-americano, <i>Procambarus clarkii</i> .	79
Simões, M. P., Pereira, I. P., Pinto-Cruz, C. & Gazarini, L. - Dinâmica de uma comunidade de <i>Cistus salviifolius</i> L., após intervenção experimental. Padrões de regeneração da estrutura e biomassa.	91
Santos, J., Schreck Reis, C., Gonçalves, M. T. & Freitas, H. - Micorrizas em <i>Ammophila arenaria</i> - comparação entre dois sistemas dunares.	101
Vilaça, E. & Correia, O. - Contributo para a caracterização da vegetação da Mata do Bombarral.	109
Clemente, A.S., Rego, F.C. & Correia, O. - Padrões de sobrevivência de sementes em grupos funcionais de resposta ao fogo.	123
Luz, E., Mendes, M. L. & Romano, A. - Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Ruscus aculeatus</i> L.	133
Nunes, A., Brugnoli, E., Máguas, C. & Correia, O. - Efeito da deposição de poeiras calcárias na absorvância foliar de espécies mediterrânicas.	143
Silva, P., Peyroteo, P., Correia, A. I., Branquinho, C. & Correia, O. - Contributo para a caracterização da estrutura e diversidade da vegetação da Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica.	153

- Moura, A., Boaventura, D., Cúrdia, J., Carvalho, S., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Leitão, F. M., Santos, M. N. & Monteiro, C. C. - Benthic succession on an artificial reef in the south of Portugal - preliminary results. 169
- Carvalho, S., Moura, A., Falcão, M., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Dinis, M. T. & Pousão-Ferreira, P. - Dinâmica inicial das comunidades de macrofauna bentónica numa piscicultura em regime semi-intensivo. 183
- Pinto-Cruz, C., Simões, M. P., Gazarini, L. & Espírito-Santo, M. D. - Dinâmica de uma comunidade de *Cistus salviifolius* L., após intervenção experimental. Evolução do coberto vegetal. 199
- Pedroso, N., Santos-Reis, M. & Vasconcelos, L. - O Uso de Grandes Barragens pela Lontra no Alentejo. 211

## CRIOPRESERVAÇÃO DE MICRÓSPOROS DE ALFARROBEIRA (*CERATONIA SILIQUA* L.)

L. Custódio, N. Fernandes, M. F. Carneiro<sup>1</sup> & A. Romano

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve,  
Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

<sup>1</sup>Instituto de Investigação Científica Tropical, Centro de Investigação das Ferrugens do  
Cafeeiro, 2784-505 Oeiras, Portugal

Custódio, L., Fernandes, N., Carneiro, M. F., Romano, A. (2004). Criopreservação de micrósporos de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista de Biol. (Lisboa)* 22:7-19.

Neste trabalho estudou-se a viabilidade de micrósporos de alfarrobeira após 5 meses de criopreservação. A técnica de criopreservação utilizada foi a vitrificação, sendo aplicada a anteras isoladas de flores masculinas e hermafroditas de alfarrobeira nas fases de desenvolvimento I e II. Foram testados seis tipos de crioprotectores em diferentes concentrações: DMSO (3,5%, 5%, 7% e 10%), glicerol (5%, 10% e 15%), glicerol + DMSO (2,5% glicerol + 2,5% DMSO, 1% glicerol + 5% DMSO, 5% glicerol + 5% DMSO), prolina (10%), etilenoglicol (2,5%) e polietilenoglicol (10%). Após a criopreservação, a viabilidade dos micrósporos foi avaliada através do teste de FDA. De um modo geral, a aplicação de crioprotectores promoveu a viabilidade dos micrósporos, comparativamente ao controlo. Os melhores resultados (88% de viabilidade) foram obtidos com a combinação 2,5% glicerol + 2,5% DMSO e os piores (7% de viabilidade) com 5% DMSO. A adição isolada de glicerol e prolina conduziu à obtenção de boas percentagens de viabilidade (47-74% e 66%, respectivamente). Quando se utilizou DMSO como substância crioprotectora tanto o genótipo como a fase de desenvolvimento das flores mostraram ter grande influência nos resultados. Neste caso, as maiores percentagens de viabilidade foram obtidas em micrósporos provenientes de anteras isoladas de flores hermafroditas na fase de desenvolvimento I. De um modo geral verificou-se maior eficácia crioprotectora aplicando misturas de crioprotectores, comparativamente com o uso isolado de crioprotectores.

Palavras chave: Androgénese, *Ceratonia siliqua* L., criopreservação, germoplasma, vitrificação.

Custódio, L., Fernandes, N., Carneiro, M. F., Romano, A. (2004). Criopreservação de micrósporos de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista de Biol. (Lisboa)* 22:7-19.

In this work the effect of cryopreservation on carob microspore viability was evaluated after 5 months of storage. Anthers isolated from male and hermaphrodite flowers of carob tree at developmental phases I and II were cryopreserved by vitrification. Six types of cryoprotectants at different concentrations were tested: DMSO (3.5%, 5%, 7% and 10%), glycerol (5%, 10% and 15%), DMSO + glycerol (2.5% DMSO + 2.5% glycerol, 5% DMSO + 1% glycerol, 5% DMSO + 5% glycerol), proline (10%), ethyleneglycol (2.5%) and polyethyleneglycol (10%). After cryopreservation, the viability of microspores was evaluated by using the FDA test. The application of the cryoprotectants generally increased microspores viability, compared with the control. The best result (88% of viability) was obtained with 2.5% DMSO + 2.5% glycerol and the worst (7% of viability) with 5% DMSO. The use of glycerol and proline alone resulted in good viability results (47-74% and 66%, respectively). When DMSO was used as cryoprotector both the genotype and flower developmental stage had great influence on the viability of the microspores. In that case, the best results were obtained with microspores from anthers isolated from hermaphrodite flowers at phase I. Generally, better results were observed using mixture of cryoprotectors as compared with individual cryoprotectors at the same molarity.

Key words: Androgenesis, *Ceratonia siliqua* L., cryopreservation, germplasm, vitrification.

## INTRODUÇÃO

A diversidade biológica é vital para o desenvolvimento e sobrevivência das espécies, sendo a sua perda um dos principais problemas da actualidade. Um exemplo deste facto é a contínua perda de diversidade genética das culturas na agricultura moderna (HAWKES *et al.*, 2000). Deste modo, torna-se necessária a criação de um 'pool' seguro de material com diversidade genética, para que seja possível dar continuidade ao processo de monoculturas, e implementar técnicas de melhoramento com vista à optimização da produção.

A criopreservação é a conservação de material biológico a temperaturas ultra-baixas (-196°C), geralmente em azoto líquido. É considerada actualmente a melhor opção para o armazenamento a longo prazo de germoplasma, uma vez que a essa temperatura param todos os processos metabólicos, bem como as divisões celulares. Esta técnica tem sido aplicada a diversas espécies (BAJAJ, 1995), e tem-se revelado nas últimas décadas muito importante nos estudos

biotecnológicos (ZHANG *et al.*, 2001). Existem três técnicas básicas de criopreservação: congelamento lento, vitrificação e encapsulamento/desidratação. Na vitrificação, o material vegetal é desidratado por exposição a uma solução contendo substâncias crioprotectoras bastante concentradas (solução vitrificante) antes de ser rapidamente arrefecido em azoto líquido (NIINO *et al.*, 1992; TOWILL & JARRET, 1992). Como consequência, o líquido celular sofre uma transição da fase líquida ao estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo (REED *et al.*, 2001). Esta técnica requer equipamento simples, é amplamente aplicável e resulta em elevadas percentagens de recuperação do material criopreservado (PENNYCOOKE & TOWILL, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001). Substâncias crioprotectoras como o dimetilsulfóxido (DMSO) ou o glicerol aumentam a resistência das células às baixas temperaturas, devido, em parte, à sua capacidade de ligação à superfície exposta das bio-membranas (POPOVA & BUSHEVA, 2001) e ao facto de poderem provocar a diminuição da temperatura à qual o congelamento se inicia (WATANABE *et al.*, 1999).

Sabe-se que as culturas celulares haplóides são geneticamente instáveis, revertendo facilmente para o estado diplóide (BAJAJ, 1984). A criopreservação de material vegetal haplóide, como os micrósporos, assume um papel fundamental na conservação de germoplasma geneticamente estável, para ser utilizado em programas de melhoramento genético. Para tal, é necessário que as técnicas de criopreservação sejam optimizadas para cada espécie, tornando este procedimento mais fácil e rotineiro. Existem referências a trabalhos de criopreservação de micrósporos e grãos de pólen em várias espécies, nomeadamente *Triticum aestivum* e *Oryza sativa* (BAJAJ, 1984), *Simmondsia chinensis* (LEE *et al.*, 1985), *Brassica napus* (CHEN & BEVERSDORF, 1992) e *Panax ginseng* (ZHANG *et al.*, 1993). No caso da alfarrobeira, não há referências à aplicação de técnicas de criopreservação a qualquer tipo de material vegetal.

A alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae = Leguminosae) é das mais importantes árvores mediterrânicas (BATTLE & TOUS, 1997; ZOHARY, 2002), devido ao seu interesse económico. Este interesse económico provém da goma ('locust bean gum'-LBG) que é extraída das sementes, e que é utilizada na indústria alimentar numa larga variedade de produtos, tais como comida para bebés, sopas, gelados e alimento para animais. Esta goma é igualmente utilizada na indústria farmacêutica (WATANABE *et al.*, 1996; SUJJA-AREEVATH *et al.*, 1998). Tanto a goma de alfarroba como a polpa, cujo teor é rico em fibras e polifenóis (OWEN *et al.*, 2003), apresentam interesse no tratamento da diabetes (TSAI & PENG, 1981), de hipercolesterolemia (ZUNFT *et al.*, 2003), possuindo ainda propriedades anticancerígenas (CORSI *et al.*, 2002). A expansão das indústrias alimentares que utilizam a goma de alfarroba tem levado a um aumento da procura deste produto, sendo Portugal um dos mais importantes exportadores de alfarroba. Para além da sua importância económica, a alfarrobeira é também uma espécie com elevado interesse agroecológico.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de micrósperos criopreservados de alfarrobeira, após vitrificação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Inflorescências com flores em diversas fases de desenvolvimento foram colhidas de uma alfarrobeira adulta masculina de origem seminal, e de uma alfarrobeira com flores hermafroditas adulta enxertada, ambas com 12 anos, situadas num campo experimental não irrigado da Direcção Regional de Agricultura do Algarve, Delegação de Tavira.

### Estudos citológicos

Botões fechados e anteras de flores masculinas e hermafroditas em diferentes fases de desenvolvimento foram fixados numa solução de 100% etanol: 100% ácido acético (3:1, v/v) à temperatura ambiente. Após 24 h o material foi transferido para uma solução de 100% etanol: 100% ácido acético (1:1, v/v) e mantidas a 4 °C, no escuro. O estudo da microsporogénese foi efectuado em microscopia óptica e microscopia de fluorescência, tendo por base 10 observações por fase de desenvolvimento da flor. Para a microscopia óptica foram preparados esfregaços das anteras em carmim acético 4% (p/v). Para a microscopia de fluorescência foram preparados esfregaços de anteras corados com 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), 0,01 mg.ml<sup>-1</sup> em dimetilsulfóxido (DETCHEPARE *et al.*, 1989). Os esfregaços foram observados de imediato.

### Criopreservação de micrósperos

Anteras com micrósperos na fase pré-mitótica e com grãos de pólen bicelulados (Fig. 1C, D), foram isoladas e colocadas em eppendorfs sobre gelo. O pré-tratamento das anteras foi efectuado com diferentes concentrações, tipos, e combinações de crioprotectores: DMSO (3,5%, 5%, 7% e 10%, v/v), glicerol (5%, 10% e 15%, v/v), glicerol + DMSO (2,5% glicerol + 2,5% DMSO, 1% glicerol + 5% DMSO e 5% glicerol + 5% DMSO, v/v), prolina (10%, p/v), etilenoglicol (2,5%, v/v) e polietilenoglicol (10%, v/v). A cada eppendorf adicionou-se 1 ml da solução crioprotectora, em 4 aplicações de 0,25 ml em intervalos de 5 min. Após 20 min, os eppendorfs foram mergulhados em azoto líquido, durante 1 h, e armazenados a -80 °C durante 5 meses. Para cada ensaio foram utilizadas 50 anteras distribuídas por 2 eppendorfs. No final do período de criopreservação as amostras foram descongeladas em banho-maria a 40 °C, durante 15 min, e lavadas 3 vezes em 1 ml de meio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido, suplementado com 2 mg.l<sup>-1</sup> de benziladenina e 1 mg.l<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Como controlo foram utilizadas 100 anteras por clone e por fase de desenvolvimento das flores. As anteras foram submetidas ao mesmo tratamento de criopreservação, mas sem a adição de crioprotectores.

### Quantificação e análise dos resultados

A avaliação da viabilidade dos micrósporos foi realizada através do teste de diacetato de fluoresceína (FDA) (WIDHOLM, 1972). Foram contabilizados os micrósporos em 10 campos diferentes por lâmina, considerando-se viáveis os micrósporos que apresentavam fluorescência. Para cada ensaio utilizaram-se 2 lâminas. Os resultados são expressos em percentagem de viabilidade e são a média de 20 observações. Procedeu-se a uma análise de variância (ANOVA) trifactorial para determinar diferenças e interações usando o programa SPSS (release 11.0, SPSS INC). A significância entre médias foi testada pelo 'Duncan's New Multiple Range Test' ( $P=0,05$ ). Antes da sua análise, os dados foram transformados por arcsin da raiz quadrada.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A floração da alfarrobeira ocorre entre Setembro e Novembro, com um pico em Outubro (MARTINS-LOUÇÃO & BRITO DE CARVALHO, 1989; BATTLE & TOUS, 1997). As alfarrobeiras podem possuir flores masculinas, femininas e hermafroditas, e as inflorescências podem ainda ser poligâmicas, verificando-se uma elevada plasticidade ao nível das características das flores e das inflorescências (HASELBERG, 1986; TUCKER, 1992; BATTLE & TOUS, 1997).

Durante o desenvolvimento de flores masculinas e hermafroditas, foi possível identificar seis fases (Fig. 1A, B). Na Tabela 1 estão resumidas as principais características do androceu nas diferentes fases de desenvolvimento de flores masculinas e hermafroditas, bem como os principais acontecimentos que ocorrem durante a microsporogénese de alfarrobeira.

Para um grande número de espécies vegetais, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos mais adequado para a indução de androgénese é o imediatamente antes, durante, ou logo após a primeira mitose polínica (BHOJWANI & RAZDAN, 1983). Os estudos citológicos por nós efectuados (Fig. 1C-D) indicam que os micrósporos nesses estádios de desenvolvimento existem nas fases I e II de desenvolvimento da flor. Estas serão, por isso, as de maior interesse para a criopreservação de micrósporos, tendo em vista a ulterior indução de androgénese.

As Tabelas 2 e 3 mostram os resultados obtidos para os diferentes ensaios de criopreservação. De um modo geral, a aplicação de crioprotectores promoveu a viabilidade dos micrósporos criopreservados, comparativamente com o controlo.

Quando se utilizou DMSO como substância crioprotectora, verificou-se que a percentagem de viabilidade dos micrósporos era influenciada significativamente ( $P<0,001$ ) pela concentração desta substância, pelo clone, pela fase de desenvolvimento das flores e pelas interações possíveis entre estas variáveis. Exceptua-se a interacção clone vs fase de desenvolvimento das flores (Tabela 2).

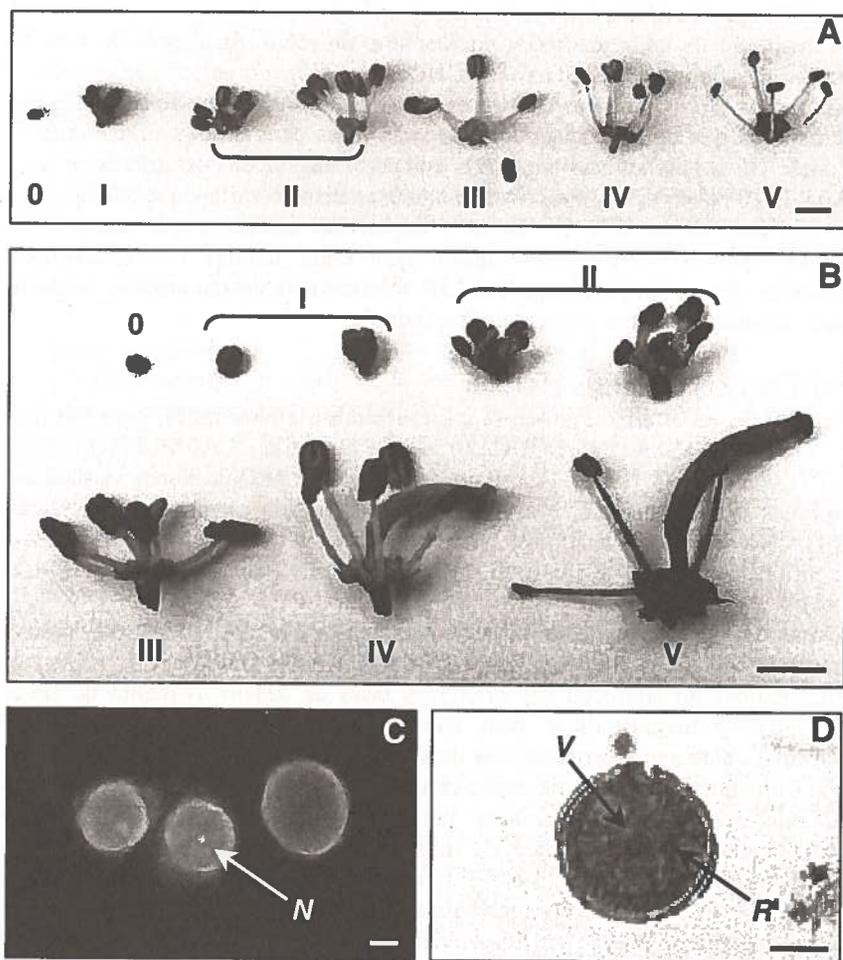


Figura 1. Fases de desenvolvimento (0-V) de flores masculinas (A) e flores hermafroditas (B) de alfarrobeira; barra = 4,4 mm. Micrósporos corados com DAPI (C); barra = 17,5 μm, e grão de pólen corado com carmim acético (D); barra = 12,2 μm. N: núcleo; V: núcleo vegetativo; R: núcleo generativo.

Para o clone masculino a percentagem de viabilidade dos micrósporos de flores na fase I foi estatisticamente superior à dos micrósporos de flores na fase II, à exceção do ensaio com 7% DMSO (Tabela 2). Esta maior viabilidade poderá dever-se às características do material vegetal mais jovem, com células mais pequenas, poucos vacúolos, citoplasma mais denso e relação núcleo/citoplasma elevada, que o tornam mais apto para a criopreservação

(BAJAJ, 1995). Sabe-se que as soluções crioprotectoras podem causar danos graves no material criopreservado, sendo estes danos mais frequentes em material de maiores dimensões, como sementes inteiras, e menos frequentes em células em suspensão e meristemas (REED, 2001; REED *et al.*, 2001).

Tabela 1. Correlação aproximada entre as fases de desenvolvimento das flores masculinas e androceu das flores hermafroditas de alfarrobeira, e os principais acontecimentos observados durante a microsporogênese.

Fases de desenvolvimento da flor	Características das flores	Microsporogênese
0	Botão floral com cerca de 1 mm; androceu coberto pelo cálice, composto por 5 sépalas	Formação do tecido esporogénico e das células-mãe dos grãos de pólen
I	As sépalas abrem e as anteras alongam	Meiose I e II e formação das tétradas de microsporos; microsporos unicelulados livres; 1ª mitose polínica
II	Filamento longa; nectário torna-se visível	Microsporos unicelulados e grãos de pólen
III	Secreção de néctar	Grãos de pólen adultos
IV	Libertação de grãos de pólen; degeneração e deiscência dos tecidos	-
V	Queda dos estames	-

Em anteras de flores masculinas na fase I, as percentagens de viabilidade obtidas foram semelhantes e estatisticamente superiores às obtidas no controlo. Com anteras de flores na fase II os melhores resultados foram obtidos com a concentração de 7%, estatisticamente superior às restantes e ao controlo (Tabela 2). No clone com flores hermafroditas as percentagens de viabilidade oscilaram entre os 17% e os 68% e, à semelhança do observado no clone masculino, foram obtidos melhores resultados quando se utilizaram anteras isoladas de flores na fase I. Comparando as mesmas concentrações e fases de desenvolvimento para os dois clones, verifica-se que foram obtidos valores estatisticamente superiores no clone com flores hermafroditas, à excepção da concentração 7% (v/v) na fase de desenvolvimento II (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da concentração de DMSO na viabilidade de micrósoros criopreservados de alfarrobeira.

DMSO (%)	Viabilidade (%)			
	<i>Flores masculinas</i>		<i>Flores hermafroditas</i>	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
0	17 b	33 b	44 d	17 b
3,5	46 a	28 bc	68 a	37 a
5	45 a	7 d	58 bc	37 a
7	44 a	45 a	61 b	37 a
10	45 a	23 c	55 c	41 a
Análise ANOVA				
Concentração de DMSO (A)				***
Clone (B)				***
Fase (C)				***
A × B				***
A × C				***
B × C				ns
A × B × C				***

Os valores representam a média de um mínimo de 20 observações. Para o mesmo clone e fase de desenvolvimento da flor, os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \geq 0,05$ . Foi efectuada uma análise ANOVA trifactorial (Duncan's New Multiple Range Test). ns, \*, \*\*, \*\*\*: não significativo, significativo para  $P < 0,05$ , significativo para  $P < 0,01$  e significativo para  $P < 0,001$ , respectivamente.

O DMSO é um crioprotector normalmente utilizado na criopreservação de diferentes tipos de material vegetal. Aplicado isoladamente permitiu obter elevadas taxas de sobrevivência em diferentes espécies, nomeadamente em *calli* embriogénicos de citrinos (PÉREZ *et al.*, 1999), ápices vegetativos de *Solanum tuberosum* (HARDING & STAINES, 2001), meristemas de *Ribes* (REED *et al.*, 2001), e *calli* e suspensões celulares de *Populus* (LAMBARDI, 2002).

Utilizando o glicerol como substância crioprotectora foram obtidas elevadas percentagens de viabilidade, correspondendo a maior percentagem de viabilidade (74%) à menor concentração de glicerol testada (Tabela 3). O glicerol é um crioprotector que raramente produz resultados satisfatórios quando adicionado isoladamente, sendo por isso normalmente utilizada em combinação com outros (BAJAJ, 1984; DE CARLO *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001; REED *et al.*, 2001). No entanto, foi utilizado com êxito em *calli* e suspensões celulares de *Populus* (LAMBARDI, 2002).

Tabela 3. Efeito do tipo e concentração de crioprotectores na viabilidade de micrósporos de anteras isoladas de flores masculinas na fase de desenvolvimento II.

<i>Solução crioprotectora</i>		<i>Viabilidade (%)</i>
Controlo		33 fg
	3,5%	28 h
DMSO	5%	7 j
	7%	45 e
	10%	23 i
Glicerol	5%	74 b
	10%	62 d
	15%	47 e
Glicerol 2,5% + DMSO 2,5%		88 a
Glicerol 1% + DMSO 5%		37 f
Glicerol 5% + DMSO 5%		69 cd
Prolina 10%		66 cd
Etilenoglicol 2,5%		43 e
Polietilenoglicol 10%		31 gh

Os valores representam a média de um mínimo de 20 observações. Os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes para  $P \geq 0,05$ .

Com a combinação de glicerol e DMSO, os melhores resultados foram obtidos com as concentrações mais baixas (2,5% glicerol + 2,5% DMSO), tendo sido a percentagem de viabilidade máxima obtida neste trabalho (88%) (Tabela 3). Comparando as soluções 1% glicerol + 5% DMSO e 5% glicerol + 5% DMSO, verificou-se que o aumento da concentração de glicerol levou a um aumento significativo da viabilidade dos micrósporos, o que demonstra mais uma vez a importância do glicerol como agente crioprotector. Estes resultados concordam com estudos anteriores que atribuem uma maior eficácia crioprotectora às misturas de crioprotectores comparativamente com o uso de crioprotectores isoladamente (WITHERS, 1992). A adição de glicerol em conjunto com DMSO foi igualmente utilizada com sucesso em cereais, na criopreservação de segmentos de anteras androgénicas (BAJAJ, 1984), e em *calli* e suspensões celulares de *Populus* (LAMBARDI, 2002).

Relativamente às restantes substâncias crioprotectoras verifica-se que todas elas permitiram a obtenção de percentagens de viabilidade estatisticamente superiores ao controlo, com excepção do polietilenoglicol (Tabela 3). Este crioprotector é geralmente utilizado em misturas de crioprotectores (REED, 1990; HÄGGMAN *et al.*, 1998), e os nossos resultados confirmam a sua ineficácia quando aplicado isoladamente. A solução crioprotectora contendo prolina permitiu uma viabilidade superior ao controlo (Tabela 3), contrariamente ao obtido em outras espécies, onde a sua aplicação não produziu tolerância das células ao congelamento (GÖLDNER *et al.*, 1991). O etilenoglicol é um

crioprotector normalmente utilizado na criopreservação por vitrificação, quando adicionado em conjunto com outras substâncias (DE CARLO *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001; REED *et al.*, 2001; LAMBARDI, 2002).

Durante a criopreservação de material vegetal, as células podem sofrer alterações ao nível da estabilidade genética e da estabilidade física e bioquímica (REED, 2001). As alterações ao nível da estabilidade genética podem provocar variações somaclonais nas plantas regeneradas a partir do material criopreservado. Estas variações são mais comuns em plantas obtidas a partir da cultura de células isoladas ou *calli* (REED, 2001), pelo que são necessários estudos genéticos de modo a avaliar a sua ocorrência. No entanto, alguns estudos revelam ser reduzida a probabilidade de tal se verificar (TOWILL, 1990; HÄGGMAN, *et al.*, 1998). A estabilidade física e bioquímica do material criopreservado pode ser alterada, no caso particular da vitrificação, pela instabilidade dos cristais formados durante o congelamento das células, como resposta a choques físicos ou a determinados processos de descongelamento (REED, 2001; REED *et al.*, 2001). Além disso, as soluções crioprotectoras podem ser tóxicas, pelo que a sua aplicação e remoção deve ser feita de modo preciso e controlado (REED, 2001; REED *et al.*, 2001).

O teste de FDA utilizado neste trabalho para avaliação da viabilidade dos micrósoros, é baseado na contagem microscópica de células viáveis e inviáveis, e pode conduzir a erros, nomeadamente contabilizando como viáveis células mortas ou com viabilidade reduzida (VAŇKOVÁ *et al.*, 2001). Deste modo, seria conveniente testar outros métodos de determinação da viabilidade dos micrósoros criopreservados.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que, independentemente do clone, as anteras das flores na fase de desenvolvimento I são as mais adequadas para a criopreservação de micrósoros de alfarrobeira por vitrificação, quando se utiliza o DMSO como agente crioprotector. Dos dois clones testados, o clone com flores hermafroditas foi o que proporcionou melhores resultados em termos de viabilidade dos micrósoros. De todos os crioprotectores testados, o que se revelou mais eficaz para a criopreservação de micrósoros de alfarrobeira foi a mistura 2,5% glicerol + 2,5% de DMSO, enquanto que o DMSO (5%) se revelou o menos adequado. Verificou-se uma maior eficácia crioprotectora resultante da aplicação de misturas de crioprotectores, comparativamente com o uso isolado de crioprotectores. Torna-se necessário estudar a viabilidade dos micrósoros de alfarrobeira em anteras isoladas de flores masculinas e hermafroditas nas fases de desenvolvimento I, testando a aplicação de outras substâncias crioprotectoras para além do DMSO, nomeadamente as aplicadas neste trabalho às anteras isoladas de flores masculinas na fase de desenvolvimento II.

## AGRADECIMENTOS

L. Custódio agradece uma bolsa de doutoramento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/1274/2000).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATTLE, I., TOUS, J. 1997. *Carob tree. Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of under-utilized and neglected crops. 17 (93p). *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resource Institute*. Rome. Italy.
- BAJAJ, Y.P.S. 1984. The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 67: 525-528.
- BAJAJ, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: *Biotechnology in Agriculture And Forestry Cryopreservation of Plant Germplasm* I. Bajaj, Y.P.S (ed), vol. 32, pp 3-18. Springer-Verlag, New York.
- BHOJWANI, S.S., RAZDAN, H.K. 1983. Haploid production. In: *Plant Tissue Culture Theory and Practice*, pp. 131-141.
- CHEN, J.L., BEVERSDORF, W.D. 1992. Cryopreservation of isolated microspores of spring rapessed (*Brassica napus* L.) for *in vitro* embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31: 141-149.
- CORSI, L., AVALLONE, R., COSENZA, F., FARINA, F., BARALDI, C., BARALDI, M. 2002. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*, 73: 674-684.
- DE CARLO, A., BENELLI, C., LAMBARDI, M. 2000. Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters*, 21: 215-222.
- DETCHEPARE, S., HEIZMANN, P., DUMAS, C. 1989. Changes in protein patterns synthesis during anther development in *Brassica oleracea*. *Journal of Plant Physiology*, 135, 129-137.
- GÖLDNER, E., SEITZ, U., REINHARD, E. 2001. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Ehrh. cell cultures: Preculture and freeze tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24: 19-24.
- HÄGGMAN, H., RYYNANEN, L., ARONEN, T., KRAJNAKOVA, J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 45-53.
- HARDING, K., STAINES, H. 2001. Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation. *CryoLetters*, 22: 255-262.
- HASELBERG, C. 1986. Flowering characteristics of male and female carob flowers. 1º *Encontro Linhas de Investigação de Alfarroba*. Oeiras, pp. 45-56.
- HAWKES, J.G., MAXTED, N., FORD-LLOYED, B.V. 2000. The *ex situ* conservation of plant genetic resources. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- LAMBARDI, M. 2002. Cryopreservation of germplasm of *Populus* (poplar) species. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 50. Towill, L.E., Bajaj, Y.P.S. (eds). *Cryopreservation of Plant Germplasm II*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 269-286.

- LEE, C., THOMAS, J., BUCHMANN, S. 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of jojoba pollen. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 110(5): 671-676.
- MARTINS-LOUÇÃO, M.A., BRITO DE CARVALHO, J. 1989. A cultura da alfarrobeira. *DGPA. Série divulgação n.º 1*. Lisboa.
- MATSUMOTO, T., MOCHIDA, K., ITAMURA, H., SAKAI, A. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports*, 20: 398-402.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NIINO, T., SAKAI, A., ENOMOTO, S., MAGOSI, J., KATO, S. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters*, 13: 303-312.
- OWEN, R.W., HAUBNER, R., HULL, W.E., ERBEN, G., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H., HABER, B. 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1727-1738.
- PENNYCOOKE, J.C., TOWILL, L.E. 2000. Cryopreservation of shoot tips *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19: 733-737.
- PÉREZ, R.M., MAS, O., NAVARRO, J., DURAN-VILA, N. 1999. Production and cryopreservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 71-74.
- POPOVA, A.V., BUSHEVA, M.R. 2001. Cryoprotective effect of glycine betaine and glycerol is not based on a single mechanism. *CryoLetters*, 22: 293-298.
- REED, B. 1990. Survival of *in vitro*-grown apical meristem of *Pyrus* following cryopreservation. *HortScience*, 25: 111-113.
- REED, B. 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters*, 22: 97-104.
- REED, B., DUMET, D., DENOMA, J., BENSON, E. 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation*, 10: 939-949.
- SUJJA-AREEVATH, J., MUNDAY, D.L., COX, P.J., KHAN, K.A. 1998. Relationships between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum mini-matrix formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6: 207-217.
- TOWILL, L. 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9: 178-180.
- TOWILL, L.E., JARRET, R.L. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, 11: 175-178.
- TSAI, A.C., PENG, B. 1981. Effects of locust bean gum on glucose tolerance, sugar digestion, and gastric mobility in rats. *J.Nutr*, 111: 2152-2156.
- TUCKER, S. 1992. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (*Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae*). *American Journal of Botany*, 79, 318-327.
- VANKOVÁ, R., GUNCOVÁ, G., OPATRŇÁ, J., SÜSSENBEKOVÁ, H., GAUDINOVÁ, A., VANĚK, T. 2001. Two-dimensional fluorescence spectroscopy - a new tool for the determination of plant cell viability. *Plant Cell Reports*, 20: 41-47.
- WATANABE K., YAKOU, S., TAKAYAMA, Y., ISOWA, K., NAGAI, T. 1996. Rectal absorption and mucosal irritation of rectal gels containing buprenorphine hydrochloride prepared with water-soluble dietary fibres, xanthan gum and locust bean gum. *Journal of Controlled Release*, 38: 29-37.

- WATANABE, K., KURIYAMA, A., KAWAI, F., KANAMORI, M. 1999. Effect of cryoprotectant treatment and post-thaw washing on the survival of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells after cryopreservation. *CryoLetters*, 20: 377-382.
- WIDHOLM, J. 1972. The use of fluoresceine diacetate and pheno-safranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47(4): 189-194.
- WITHERS, L.A. 1992. *In vitro* conservation. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. Hammerschlag, F., Litz, R.E. (eds). Biotechnology in Agricultural series, 7: 169-200.
- ZHANG, L.X., CHANG, W.C., WEI, Y.J., LIU, L., WANG, Y.P. 1993. Cryopreservation of *Ginseng* pollen. *HortScience*, 28(7): 742-743.
- ZHANG, Y.-X., WANG, J.-H., BIAN H.-W., ZHU, M.-Y. 2001. Pregrowth-dessication: a simple and efficient procedure for the cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells. *CryoLetters*, 22: 221-228.
- ZOHARY, D. 2002. Domestication of the carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Israel Journal of Plant Sciences*, 50: 141-145.
- ZUNFT, H.J.F., LÜDER, W., HARDE, A., HABER, B., GRAUBAUM, KOEBNICK, C., GRÜNWALD, J. 2003. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Nutrition*, 42: 235-242.

## VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES ALGARVIAS DE *DROSOPHYLLUM LUSITANICUM*

S. Gonçalves, A. Romano, G. Nolasco & F. Fonseca  
CDCTPV, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

Gonçalves, S., Romano, A., Nolasco, G. & Fonseca, F. (2004). Variabilidade genética em populações algarvias de *Drosophyllum lusitanicum*. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 21-30.

*Drosophyllum lusitanicum* é uma planta insectívora endémica do sudoeste da Península Ibérica e do nordeste de Marrocos, tendo sido recentemente considerada ameaçada e em perigo de extinção. Neste contexto, o conhecimento dos padrões genéticos e do nível de diversidade genética das populações torna-se essencial para desenvolver estratégias efectivas de conservação.

Neste estudo foram identificadas oito populações desta espécie no Algarve, donde se recolheu material foliar jovem para extracção de ADN. Para avaliar a variabilidade e estrutura genética das populações de *D. lusitanicum* foi feita a amplificação por PCR da região ITS do rADN, seguida de clonagem e amplificação das colónias transformadas, tendo os fragmentos obtidos sido sujeitos a análise de polimorfismo da conformação da cadeia simples (SSCP). Com base nos padrões obtidos para cada população foi calculado o coeficiente de heterozigocidade, que se revelou elevado em todas as populações amostradas excepto uma (Barranco do Velho).

Este estudo está a ser aprofundado através da análise de sequências da região ITS correspondentes a cada padrão de SSCP encontrado, a fim de avaliar o grau de diferenciação genética entre as populações e identificar as prioritárias para conservação.

Palavras-chave: espécie endémica, planta insectívora, ITS, rADN, SSCP.

Gonçalves, S., Romano, A., Nolasco, G. & Fonseca, F. (2004). Genetic variability of *Drosophyllum lusitanicum* populations in the Algarve region. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 21-30.

*Drosophyllum lusitanicum* is native to the southern part of the Iberian Peninsula and northern Morocco. According to recent results *D. lusitanicum* has become a threatened species. Information on patterns and levels of genetic diversity within and between populations are needed to develop effective conservation strategies for this species.

In this work eight populations were identified in the Algarve region and sampled for DNA extraction. To evaluate the genetic variability and structure of each population, the nuclear ribosomal DNA ITS region was amplified by PCR, followed by cloning, amplification of the transformed colonies and SSCP analysis of the amplicons obtained. On the basis of the SSCP patterns obtained from each population the respective heterozygosity coefficient was calculated. The values obtained were high for all populations sampled, with exception of one (Barranco do Velho).

This study will be continued with the analysis of DNA sequences corresponding to each SSCP pattern obtained, in order to evaluate the degree of genetic differentiation between populations and identify priorities for conservation.

Key words: endemic species, insectivorous plant, ITS, rDNA, SSCP.

## INTRODUÇÃO

*Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Droseraceae) é uma planta insectívora endémica do sudoeste da Península Ibérica e do nordeste de Marrocos (FRANCA, 1925; QUINTANILHA, 1926; SILVESTRE, 1987). É a única planta carnívora do hemisfério norte adaptada a habitats secos (GIVNISH *et al.*, 1984; JUPINER *et al.*, 1989), e estudos filogenéticos recentes vêm sugerir a criação de uma família monoespecífica para a espécie (WILLIAMS *et al.*, 1994; MEIMBERG *et al.*, 2000).

A propagação vegetativa desta espécie pelas técnicas convencionais não foi até à data descrita. *D. lusitanicum* só pode ser propagada pela via seminal (TILBROOKE, 1988; D'AMATO, 2000; CORREIA & FREITAS, 2002). O período de floração estende-se de Março a Agosto durante o qual são produzidas em média cinco flores bissexuadas por inflorescência (ORTEGA OLIVENCIA *et al.* 1995). Vários tipos de auto-polinização podem ocorrer simultaneamente em *D. lusitanicum* e a xenogamia parece limitada pela escassez e comportamento inespecífico de polinizadores bem como pela distribuição espacial em manchas das populações, separadas por distâncias superiores às da dispersão das sementes.

Esta planta, com características ecológicas e filogenéticas singulares, encontra-se em declínio (GARRIDO *et al.*, 2003). Em Espanha está incluída na *Andalusian Red List of Threatened Plants* (BOJA 1994) e em Marrocos é considerada rara (FENNANE & IBN TATTOU, 1998). Em Portugal, CALDAS

*et al.* (1996) consideraram-na uma espécie ameaçada e recentemente CORREIA & FREITAS (2002) analisaram a distribuição Portuguesa desta espécie tendo concluído que ocorreu uma regressão na sua distribuição nos últimos 60 anos. Embora a espécie não conste da base de dados da 2000 IUCN *List of Threatened Species* (HITTON-TAYLOR, 2000), pode ser considerada como em vias de extinção uma vez que ocorre em populações isoladas, geralmente envelhecidas e com poucos indivíduos (MÜLLER & DEIL, 2001). Estudos recentes recomendam a utilização urgente de estratégias de conservação tais como, a necessidade urgente de proteger os locais onde a espécie existe, no sentido de evitar a construção e desenvolvimento industrial (CORREIA & FREITAS, 2002) e o estudo da diversidade genética e re-introdução de plantas em campo (GARRIDO *et al.*, 2003).

Este estudo (análise da variabilidade genética de *D. lusitanicum*) vem no seguimento de outros trabalhos que visam desenvolver uma estratégia de conservação para esta espécie, nomeadamente a identificação de populações no Algarve, a produção de plantas em larga escala e a introdução das mesmas em campo em locais seleccionados (GONÇALVES *et al.*, 2003). Para projectar uma estratégia efectiva de conservação quer *in situ* quer *ex situ* é essencial conhecer a estrutura genética da espécie. Os padrões e os níveis de diversidade genética têm grande influência na persistência a longo prazo das populações e fornecem informação importante para o desenvolvimento de estratégias de conservação de plantas raras (GUSTAFSSON & SJÖGREN-GULVE, 2002). É importante conhecer o nível de diversidade dentro de cada população e o nível de diferenciação entre populações para decidir que populações têm prioridade na conservação (CESKA *et al.*, 1997).

A aplicação de marcadores moleculares tais como a região ITS (600-700 pb) do rADN tem sido utilizada em estudos de variabilidade intrapopulacional em plantas raras (SZALANSKI *et al.*, 2001). A amplificação por PCR, seguida de análise de polimorfismo da conformação de cadeia simples (SSCP) permite detectar alterações de sequência (ORITA *et al.*, 1989). Neste método o ADN amplificado por PCR e desnaturado pelo calor em associação com um agente desnaturante, é separado em gel de poliacrilamida não-desnaturante (SILVA & RUSSO, 2000). Diferenças entre sequências de igual tamanho podem ser detectadas através da análise dos padrões de mobilidade electroforética das conformações individuais das duas cadeias de ADN (*single strand DNA*) que compõem cada sequência (MORICCA & RAGAZZI, 1998). As principais vantagens deste método são a sua simplicidade e sensibilidade para detectar polimorfismos de ADN (FUKUOKA *et al.*, 1994).

O principal objectivo deste trabalho foi estudar os níveis de diversidade genética intrapopulacional de várias populações algarvias de *Drosophyllum lusitanicum* no intuito de contribuir para o estabelecimento de uma estratégia de conservação para a espécie.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Extracção de ADN

Foram localizados e amostrados indivíduos de *D. lusitanicum* em quatro regiões do Algarve: dois locais em Barranco do Velho (4 indivíduos), dois locais em Algoz (8 indivíduos), Albufeira (8 indivíduos) e Serra de Monchique (num total de 35 indivíduos em 3 locais) (Figura 1). Extraiu-se o ADN total a partir de folhas jovens recolhidas de cada uma das plantas seleccionadas nas diferentes populações através da utilização do Dneasy Plant Mini Kit da QIAGEN.

### Amplificação

Para cada amostra de ADN, foi feita a amplificação por PCR em tubos de 0,2 ml num volume final de 25 µl, que consistiam em 10 ng de DNA genómico, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl (Fermentas), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0,4 mM de dNTPs (Fermentas), 0,4 µM de cada um dos primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAGG-3'), considerados universais para esta região (WHITE *et al.*, 1990) e 1,5 U *Taq* Polimerase (Fermentas). As condições do termociclador foram as seguintes: 94 °C durante 3 min, seguindo-se 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 45 s. A extensão final foi efectuada a 72 °C durante 10 min. O tamanho do fragmento amplificado foi confirmado em gel de agarose a 1%, através de coloração em brometo de etídio e visualização sob luz UV. O produto da amplificação foi seguidamente sujeito a análise de SSCP.

### Análise de polimorfismo da conformação de cadeia simples (SSCP)

O produto da amplificação foi desnaturado por choque térmico e por tratamento com formamida. De acordo com a intensidade das bandas em gel de agarose adicionaram-se 1 ou 2 µl do produto de amplificação a 19 ou 18 µl de tampão de desnaturação (formamida 95%, EDTA 20 mM e azul bromofenol 0,05%), respectivamente. Provocou-se o choque térmico, colocando as amostras no bloco térmico a 92 °C durante 5 min e de seguida foram transferidas imediatamente para o gelo.

Foi feita electroforese em tampão TBE 1× em gel de poliácridamida não desnaturante a 8% (dimensões: 7×8 cm, 0,75 mm, Bio rad mini PROTEAN II). A electroforese desenrolou-se a 200V durante 3 h, a 4 °C. Os padrões obtidos, visualizados por coloração com nitrato de prata, evidenciaram um padrão complexo de várias bandas, indicadores da existência de cópias múltiplas da região ITS, em cada indivíduo. A fim de separar estas cópias, os produtos de amplificação dos indivíduos de cada população foram reunidos e clonados em conjunto. Para verificar que padrões menos frequentes não seriam excluídos da análise por este procedimento, procedeu-se também à clonagem, em separado, do produto da amplificação de pelo menos um indivíduo de cada população.

### Clonagem

De cada *bulk* obtido foram feitas pelo menos duas ligações ao vector pGEM-T *easy vector system I* (Promega) e o produto de cada ligação foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* (Inv  $\alpha$  F<sup>+</sup>) baseado no método descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). As colónias transformadas obtidas foram sujeitas a amplificação (30-40 colónias por população) com o mesmo par de primers, nas condições já mencionadas. O produto da amplificação foi sujeito a análise de SSCP. Colónias com diferentes padrões de SSCP foram seleccionadas para extracção do plasmídeo (Wizard Plus Minipreps ADN Purification System Kit, Promega) e sequenciação comercial (Macrogen Inc., Coreia do Sul).

### Coefficiente de heterozigocidade

Para cada população calculou-se o coeficiente de heterozigocidade (He) (NEI, 1987) utilizando a seguinte fórmula:  $He = (x/x-1) * 1 - \sum(\%P)^2$ , em que x representa o número total de colónias analisadas para cada população e (%P) representa a percentagem de colónias em que cada padrão identificado aparece. Este coeficiente varia entre 0 e 1.

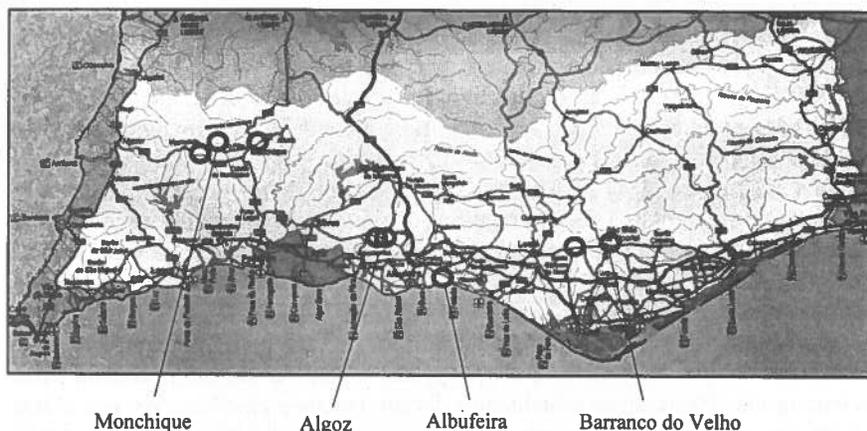


Figura 1. Localização das diferentes populações de *Drosophyllum lusitanicum* estudadas neste trabalho.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram localizadas populações de *D. lusitanicum* em quatro regiões do Algarve: Barranco do Velho, Algoz, Albufeira e Monchique, tendo-se observado grandes diferenças entre elas. Em Barranco do Velho foi encontrado um reduzido número de indivíduos evidenciando características de envelhecimento

(lenhificados). O mesmo aconteceu no caso de Algoz. A população de Albufeira encontrava-se próxima do mar, numa zona com pouca vegetação, em local muito afectado pela erosão, apresentando maior número de indivíduos e com aspecto mais vigoroso. As populações da Serra de Monchique apresentavam grandes diferenças entre si, nomeadamente em termos de exposição e possuíam maior número de indivíduos. Uma das populações (Monchique 1) apresentava indivíduos envelhecidos (lenhificados), mas também uma grande percentagem de plantas muito jovens. As restantes apresentavam maior percentagem de indivíduos germinados nesse ano, não existindo indivíduos mais velhos.

O par de primers ITS4 e ITS5 permitiu amplificar um único fragmento com aproximadamente 700 pb em todos os indivíduos das diferentes populações estudadas. A análise da sequência nucleotídica de fragmentos obtidos para diferentes indivíduos permitiu verificar a correspondência à zona ITS (ITS1-5.8S - ITS2) do rADN.

Analisando os padrões SSCP's correspondentes às colónias de *bulks* das diferentes populações estudadas, podemos verificar que alguns padrões são comuns a todas elas (Figura 2) podendo no entanto, existir em maior ou menor percentagem. Parecem existir padrões, embora em baixo número, característicos de determinada população, o que só poderá ser confirmando por sequenciação e respectiva análise das sequências.

Espécies vegetais podem tornar-se raras por causas antropogénicas, mas também em consequência dum baixo nível de variabilidade genética (HUENNEKE, 1991). Com o objectivo de caracterizar as diferentes populações amostradas neste trabalho, foi calculado o coeficiente de heterozigocidade ( $H_e$ ) (NEI, 1987), com base na frequência de padrões SSCP's obtidos em cada população, em que cada padrão diferente é tratado como um alelo. Quando o valor obtido se aproxima de zero significa que, independentemente do número de alelos considerados, um deles têm uma frequência muito mais elevada do que qualquer outro.

Como se pode observar na Tabela 1, os valores de  $H_e$ , bem como o número de padrões encontrados para cada população são, de uma maneira geral, elevados, contrariando o pressuposto de que as espécies endémicas raras apresentam baixa heterozigotia. Resultados semelhantes foram recentemente obtidos em outras plantas raras, com outros marcadores moleculares (ARCHIBALD *et al.*, 2001; GUSTAFSSON & SJÖGREN-GULVE, 2002; NEEL & ELLSTRAND, 2003). No entanto, na zona de Barranco do Velho, os valores do coeficiente são mais baixos do que nas outras populações. Tal não parece dever-se ao baixo número de indivíduos analisado, respectivamente 1 e 3, uma vez que nas populações de Algoz, igualmente com poucas amostras (4 indivíduos cada) os valores de  $H_e$  são elevados. Aquela diferença acentua-se ainda mais quando se comparam os valores de  $H_e$  e do número de padrões SSCP encontrados para os indivíduos analisados separadamente em cada local.

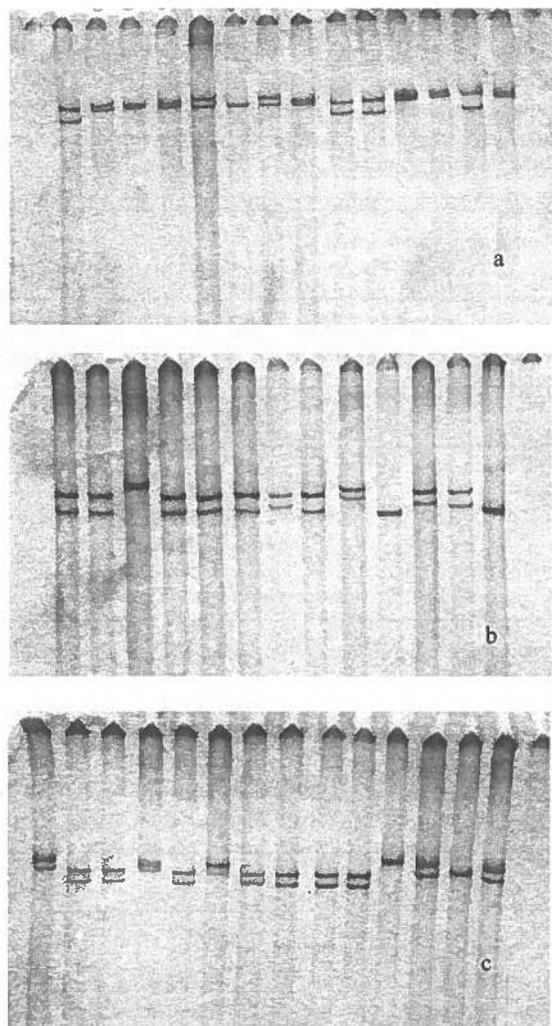


Figura 2. SSCP em gel de poliacrilamida não desnaturante após coloração com nitrato de prata. Estão representados os padrões de bandas do produto amplificado por PCR (ITS4 e ITS5) de vários clones de *bulks* constituídos por indivíduos das populações de: (a) Algoz 1, (b) Albufeira e (c) Monchique 3.

Verifica-se, no caso de Barranco do Velho, que não só o grau de polimorfismo intragenómico presente é baixo como são quase nulos os níveis de heterozigocidade individual. Embora o esclarecimento das causas desta situação não esteja no âmbito deste trabalho, supõe-se que esteja relacionada com aspectos da própria estratégia de reprodução da espécie.

Tabela 1. Coeficiente de heterozigocidade ( $H_e$ ) (Nei, 1987), calculado para alguns indivíduos e respectivas populações, com base nos padrões de SSCP encontrados. São também indicados o número de padrões de SSCP encontrados em cada indivíduo analisado e no bulk de cada população.

População (Nº total de indivíduos)	Indivíduos		Bulk	
	Nº de padrões/ indivíduo	$H_e$	Nº de padrões/ população	$H_e$
Algoz 1 (4)	4	0,81	13	0,89
Algoz 2 (4)	5	0,97	13	0,87
	3	0,70		
	3	0,71		
Barranco do Velho 1 (3)	1	0,00	3	0,68
	1	0,00		
	2	0,25		
Barranco do Velho 2 (1)	3	0,38	3	0,38
Albufeira (8)	3	0,48	9	0,78
Monchique 1 (14)	4	1,00	14	0,92
Monchique 2 (5)	3	0,71	13	0,84
Monchique 3 (16)	4	0,81	10	0,88

De acordo com estudos de ORTENGA-OLIVENCIA *et al.* (1998), vários tipos de auto-polinização ocorrem simultaneamente em *D. lusitanicum*, verificando-se baixos níveis de frutificação e formação de sementes em condições de polinização cruzada, devido à escassez e comportamento inespecífico de polinizadores. Não existindo aparentemente qualquer processo de dispersão de sementes, plantas vizinhas terão um nível muito próximo de parentesco, pelo que, a existir polinização cruzada, esta poderá conduzir a *inbreeding*. A situação

verificada em Barranco do Velho poderá ser uma etapa já avançada dum processo de extinção da espécie naquela área.

A autogamia, como um fenómeno generalizado nesta espécie, terá de ser confirmada em estudos futuros que passarão nomeadamente pela sequenciação do ADN correspondente a padrões SSCP's seleccionados e respectiva análise, pela utilização de outros marcadores e pela análise individual de indivíduos obtidos a partir de germinação de sementes recolhidas de cada população.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHIBALD, J.K., WOLF, P.G., TEPEDINO, V.J. & BAIR, J. 2001. Genetic relationships and population structure of the endangered steamboat buckwheat *Eriogonum ovalifolium* var. *williamsiae*. *Am. J. Bot.*, 88: 608-615.
- BOJA nº 107 1994. Decreto 104/1994, de 10 de Mayo, por el que se establece el catálogo Andaluz de la flora silvestre amenazada. Junta de Adalucía, Sevilla.
- CALDAS, F.B., SÉNECA, A.M., ALMEIDA DA SILVA, R., CARVALHO, A.C.H., AGUIAR BRANCO, H., ALVES, H.N. & HONRADO, J.J. 1996. Distribuição geográfica e estatuto de ameaça das espécies da flora a proteger. Relatório do projecto "Conhecimento e gestão do património natural de Portugal". Contrato life, B., 4-3200/93/771. ICETA. Universidade do Porto.
- CESKA, J.F., AFFOLTER, J.M. & HAMRICK, J.L. 1997. Developing a sampling strategy for *Baptisia arachnifera* based on allozyme diversity. *Conserv. Biol.*, 11: 1133-1339.
- CORREIA, E. & FREITAS, H. 2002. *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediteeeanean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Bot. J. Linn. Soc.*, 140: 383-390.
- D'AMATO, P. 2000. Savage garden: Slack-Potting the dewy pine. *Carnivorous Plants Newsletter*, 29: 101-102.
- FENNANE, M. & IBN TATTOU, M. 1998. Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du maroc. *Bocconea*, 8 : 1-243.
- FRANCA, C. 1925. Recherches sur les plantes carnivores. II. *Utricularia vulgaris*. Archives Portugaises des Sciences Biologiques 1: 11-37.
- FUKUOKA, S., INOUE, T., MIYAO, A. & MONNA, L. 1994. Mapping of squence-tagged sites in rice by single strand conformation polymorphism. *DNA research*, 1: 271-277.
- GARRIDO, B., HAMPE, A., MARAÑÓN, T. & ARROYO, J. 2003. Regional differences in land use affect population performance of the threatened insectivorous plant *Drosophyllum lusitanicum* (droseraceae). *Divers. Distrib.*, 9: 335-350.
- GIVNISH, T.J., BURKHARDT, E.L., HAPPEL, R.E. & WEINTRAUB, J.D. 1984. Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, and nutrient-poor habitats. *Am. Nat.*, 124: 479-497.
- GONÇALVES, S., JESUS, J. & ROMANO, A. 2003. Produção *in vitro* de plantas de *Drosophyllum lusitanicum* com vista à sua conservação. *Revista Biol.*, 21: 17-27.
- GUSTAFSSON, S. & SJÖGREN-GULVE, P. 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conserv. Genet.*, 3: 225-234.

- HILTON-TAYLOR, C. 2000. 2000 IUCN Red list of Threatened Species. Gland and Cambridge: IUCN/SSC.
- HUENNEKE, L.F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: *Genetics and conservation of rare plants* (eds. Falk DA, Holsinger KE), pp. 31-44. Oxford University Press Inc., New York.
- JUNIPER, B.E., ROBINS, R.J. & JOEL, D.M. 1989. *The carnivorous plants*. Academic press, London.
- MEIMBER, H., DITTRICH, P., BRINGMANN, G., SCHLAUER, J. & HEUBL, G. 2000. molecular phylogeny of Caryophyllidae s.l. based on matk sequences with special emphasis on carnivorous taxa. *Plant Biol.*, 2: 218-228.
- MORICCA, S. & RAGAZZI, A. 1998. Use of RFLP analysis to differentiate the pine rusts *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. *Mycology Research*, 102: 666-670.
- MÜLLER, J. & DEIL, D. 2001. Ecology and structure of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link populations in the south-western of the Iberian peninsula. *Acta Bot. Malacitana*, 26: 47-68.
- NEEL, M.C. & ELLSTRAND, N.C. 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var: *vineum* (Polygonaceae). *Conserv. Genet.*, 4: 337-352.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- ORITA, M. SUZUKI, Y., SEKIYA, T. & HAYASHI, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase *Chain reaction*. *Genomics*, 5: 874-879.
- ORTEGA OLIVENCIA, A., LÓPEZ PAREDES, J.A., RODRIGUEZ-RIAÑO, T. & DEVESA, J.A. 1998. Modes of self-pollination and absence of cryptic selfincompatibility in *Drosophyllum lusitanicum* (Droseraceae). *Botanica*, 111: 474-480.
- QUINTANILHA, A. 1926. O problema das plantas carnívoras. Estudo citofisiológico da digestão no '*Drosophyllum lusitanicum*'. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 2a sér. 4: 44-129.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- SILVA, E.P. & RUSSO, A.M. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia*, 420: 119-135.
- SILVESTRE, S. 1987. *Drosophyllum*. In: Valdés B, Talavera S, Fernández-Galiano E. (eds), *Flora Vascular de Andalucía Occidental*, pp 334. Ketres, Barcelona.
- SZALANSKI, A.L., STEINAUER, G., BISCHOF, R., & PETERSEN, J. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened Ute Ladies'-tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *Am. J Bot.*, 88: 177-180.
- TILBROOKE, R.D. 1988. Scape and axil cuttings of *Drosophyllum*. *Carnivorous Plants Newsletter*, 17:106.
- WHITE, T.J., BRUNS, B., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rRNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (eds. Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White TJ), pp. 315-322. Academic Press, San Diego.
- WILLIAMS, S.E., ALBERT, V.A. & CHASE, M.W. 1984. Relationships of Droseraceae: A cladistic analysis of rbcL sequences and morphological data. *Am. J. Bot.*, 81: 1027-1037.

## CRIOCONSERVAÇÃO DE ÁPICES VEGETATIVOS DE *COLOCASIA ESCULENTA* (L.) SCHOTT

A. R. Ribeiro<sup>1</sup>, I. Moura<sup>2</sup>, M. F. Carneiro<sup>3</sup> & A. Romano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais, Universidade do Algarve,  
Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

<sup>2</sup> Jardim-Museu Agrícola Tropical/IICT, Largo dos Jerónimos, 1400-209 Lisboa

<sup>3</sup> Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro/IICT,  
Quinta do Marquês 2784-504 Oeiras

Ribeiro, A. R., Moura, I., Carneiro, M. F. & Romano, A. (2004).  
Crioconservação de ápices vegetativos de *Colocasia  
esculenta* (L.) Schott. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 31-41.

Habitualmente o germoplasma de *Colocasia esculenta* (L.) Schott é conservado em colecções de campo, plantando anual ou bienalmente o material vegetativo disponível, o que é trabalhoso e caro, acarretando riscos de perda de diversidade. Consequentemente, para salvaguardar os recursos genéticos desta espécie é importante desenvolver alternativas fiáveis de conservação, nomeadamente conservação *in vitro* e crioconservação. O presente trabalho visou a optimização de técnicas de crioconservação de ápices vegetativos de *C. esculenta*. Foram estudadas as técnicas de encapsulamento/desidratação e vitrificação. Na técnica de encapsulamento/desidratação foram testados três meios de encapsulamento, contendo diferentes concentrações e combinações dos crioprotectores sacarose e glicerol; e três processos de desidratação: em câmara de fluxo laminar (com e sem pré-cultura das cápsulas em meio com 0,75 M de sacarose), e em recipientes contendo sílica gel. Na técnica de vitrificação, testou-se a influência do tempo de pré-cultura dos rebentos dadores de explantados em meios de cultura com concentração elevada de sacarose (0,3 M), com o objectivo de aumentar a resistência dos ápices à fitotoxicidade dos agentes crioprotectores e à imersão em azoto líquido. Quando se utilizou a técnica de encapsulamento/desidratação, verificou-se que a taxa mais elevada de sobrevivência dos explantados (5,6%) foi obtida em ápices encapsulados em meios contendo 0,4 M de sacarose ou 0,4 M de sacarose + 2 M de glicerol, e não submetidos a pré-cultura. Os ápices encapsulados em meio com 0,4 M de sacarose e submetidos a pré-cultura apresentaram uma taxa de sobrevivência de 4,3%. No estudo da técnica de vitrificação,

as taxas de sobrevivência mais elevadas foram obtidas em ápices provenientes de rebentos não pré-cultivados (4,7%), seguindo-se os ápices provenientes de rebentos pré-cultivados durante três semanas (2,5%).

Palavras-chave: *Colocasia esculenta*, conservação, crioprotectores, encapsulamento/desidratação, germoplasma, vitrificação.

Ribeiro, A. R., Moura, I., Carneiro, M. F. & Romano, A. (2004). Criopreservation of shoot tips of *Colocasia esculenta* (L.) Schott. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 31-41.

Usually the conservation of *Colocasia esculenta* (L.) Schott germplasm is in field collections, however this method is laborious, expensive and involves the danger of genetic diversity loss. So, the development of reliable conservation methods, namely *in vitro* conservation and cryopreservation, is a priority to safe keep the genetic resources of this species. The present work aimed to optimise cryopreservation techniques for *C. esculenta* shoot tips using the techniques encapsulation/dehydration and vitrification. When encapsulation/dehydration technique was used, three encapsulation media with different concentrations and combinations of cryoprotectors (sucrose and glycerol) and three dehydration procedures were tested: in a laminar flow hood cabinet (with or without pre-culture of the beads in medium supplemented with 0,75 M sucrose), and in containers with silica gel. When studying the vitrification technique, the influence of pre-culturing the donor shoots in a conditioning medium with high concentration of sucrose (0,3 M) was tested, in order to increase shoots resistance to phytotoxicity of cryoprotective agents and to immersion in liquid nitrogen. When encapsulation/dehydration was used, the best survival rates (5,6%) were obtained with shoot tips encapsulated in medium supplemented with 0,4 M sucrose or with 0,4 M sucrose + 2 M glycerol without pre-culture treatment. In shoot tips encapsulated in medium supplemented with 0,4 M sucrose and submitted to pre-culture treatment, the survival rate after cryopreservation was 4,3%. In the vitrification study the best survival rates were obtained in shoot tips excised from non-pre-cultured shoots (4,7%), followed by shoot tips excised from shoots pre-cultured for three weeks (2,5% survival rate).

Key words: *Colocasia esculenta*, conservation, cryoprotectors, encapsulation/dehydration, germplasm, vitrification.

## INTRODUÇÃO

A *Colocasia esculenta* (L.) Schott, vulgarmente conhecida por taro, inhame, falso-inhame, colocasia e ainda por outras designações, dependendo da região

geográfica, é uma herbácea perene, pertencente à família *Araceae*. É uma espécie originária do sul da Ásia Central, muito cultivada nos climas tropicais e temperados quentes pelos seus cormos comestíveis. O taro raramente frutifica, sendo tradicionalmente propagado por via vegetativa. O método habitual de conservação de germoplasma desta espécie é em colecções de campo, pela plantação anual ou bienal do material vegetativo disponível. Esta forma de conservação, trabalhosa e cara, pode dar origem a perdas significativas de diversidade genética. Assim, o desenvolvimento de métodos fiáveis de conservação, nomeadamente *in vitro* e criopreservação, é muito importante como forma alternativa ou complementar de preservar os recursos genéticos desta espécie, bem como de outras espécies propagadas vegetativamente (ROCA *et al.*, 1989; ENGELMANN, 1997).

A metodologia *in vitro* permite a conservação de germoplasma vegetal a médio prazo, através da utilização de técnicas de redução da velocidade de crescimento e a longo prazo por criopreservação. As técnicas de criopreservação mais recentes, onde se incluem o encapsulamento/desidratação e a vitrificação, baseiam-se na remoção da água intracelular por desidratação física ou osmótica seguindo-se uma congelação ultra-rápida, por imersão directa em azoto líquido, sem que se verifique a formação de cristais de gelo os quais são prejudiciais para a integridade da estrutura celular (PAULET *et al.*, 1993; TAKAGI *et al.*, 1998).

A técnica de encapsulamento/desidratação fundamenta-se na metodologia desenvolvida para a produção de sementes sintéticas em que os embriões somáticos são encapsulados em gotas de um gel hidrossolúvel (TAYLOR, 2002). Os passos normalmente seguidos na técnica de encapsulamento/desidratação são: encapsulamento do material vegetal que se pretende criopreservar; pré-cultura das cápsulas (desidratação osmótica); dessecação das cápsulas (desidratação por evaporação); imersão em azoto líquido; descongelação e recuperação.

Na técnica de vitrificação os explantados são desidratados por exposição a uma solução que inclui substâncias crioprotectoras muito concentradas (solução vitrificante) antes de serem rapidamente arrefecidos em azoto líquido (YEOMAN, 1986). Como consequência, o líquido celular, concentrado, solidifica na forma de sólido amorfo (vitrificação) (HIRAI *et al.*, 1998; TAKAGI *et al.*, 1998; TAYLOR, 2002). Na vitrificação é por vezes recomendado um tratamento prévio aos explantados para reduzir a sensibilidade dos mesmos à desidratação com a solução vitrificante (TAYLOR, 2002). Este tratamento consiste na exposição dos explantados a uma solução contendo substâncias crioprotectoras (solução de carregamento) em concentrações inferiores às da solução vitrificante (TAKAGI *et al.*, 1997). Alguns autores recomendam também a realização de uma pré-cultura do material vegetal (antes do isolamento dos explantados) em meio rico em sacarose, o que poderá aumentar a tolerância aos tratamentos ulteriores (TAKAGI *et al.*, 1997; THIN *et al.*, 1999).

O trabalho que se apresenta teve como objectivo geral otimizar técnicas de conservação *in vitro* de ápices vegetativos de *C. esculenta* com recurso às técnicas de criopreservação encapsulamento/desidratação e vitrificação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Os ápices utilizados nos ensaios de criopreservação foram obtidos a partir de rebentos de *C. esculenta* cultivados *in vitro*, em meio de cultura constituído pelos sais minerais MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 100 mg.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 10 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina HCl, 50 mg.l<sup>-1</sup> de L-cisteína, (meio I<sub>0</sub>) com 30 g.l<sup>-1</sup> (0,09 M) de sacarose, 0,8 % de agar e pH 5,7. As culturas foram mantidas num fotoperíodo de 16 horas, com intensidade do fluxo de fotões de 60 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e à temperatura de 26°C dia/23°C noite.

### Criopreservação directa dos ápices

Foi efectuado um ensaio controlo para observar o efeito da imersão directa dos ápices em azoto líquido, sem qualquer pré-tratamento ou crioprotecção. Os ápices foram colocados em criotubos de 2 ml e imersos em azoto líquido, durante 2 h e 30 min. Após este período de imersão os criotubos foram aquecidos em banho-maria a 37°C, durante 4 minutos. Depois de descongelados, os ápices foram colocados em meio I<sub>0</sub>, contendo 0,09 M de sacarose e 0,8% (p/v) de agar.

### Encapsulamento/desidratação

A metodologia seguida na criopreservação de ápices de *C. esculenta* por encapsulamento/desidratação, baseou-se nos estudos de diferentes autores (PAULET *et al.*, 1993; HIRAI *et al.*, 1998; PATTAIK & CHAND, 2000; WANG *et al.*, 2000). Os ápices, constituídos pelo meristema apical e 2 ou 3 primórdios foliares, foram isolados a partir dos rebentos cultivados *in vitro*. Os ápices foram cultivados em meio I<sub>0</sub>, contendo 0,09 M de sacarose e 0,2% (p/v) de gelrite, durante a noite, após o que foram encapsulados. Foram testados três meios de encapsulamento: En<sub>1</sub> - solução contendo sais minerais MS, 0,09 M de sacarose, 3% (p/v) de alginato de sódio, gotejada sobre uma solução de CaCl<sub>2</sub> a 0,1 M e 0,09 M de sacarose; En<sub>2</sub> - solução contendo sais minerais MS, 0,4 M de sacarose, 3% (p/v) de alginato de sódio, gotejada sobre uma solução de CaCl<sub>2</sub> a 0,1 M e 0,4 M de sacarose; En<sub>3</sub> - solução contendo sais minerais MS, 0,4 M de sacarose, 2 M de glicerol, 3% (p/v) de alginato de sódio, gotejada, sobre solução de CaCl<sub>2</sub> a 0,1 M, 0,4 M de sacarose e 2 M de glicerol. O pH das soluções foi ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. As gotas (cápsulas) foram mantidas na solução de cloreto de cálcio durante aproximadamente 25 min. após o que foram passadas por água destilada autoclavada, de modo a remover os vestígios de cloreto de cálcio.

A fase de desidratação das cápsulas por evaporação foi objecto de ensaios prévios, a fim de escolher a técnica de secagem mais conveniente (em câmara de

fluxo laminar ou em recipientes com sílica gel) e determinar o período de tempo necessário para as cápsulas atingirem o valor de, aproximadamente, 20% de humidade em relação à matéria fresca. Foram traçadas curvas de dessecação, tendo-se verificado que o método de desidratação com sílica gel era muito demorado (ao fim de 7 h de ensaio as cápsulas tinham 50-65% de humidade em relação à matéria fresca), pelo que se optou, nos ensaios subsequentes, pelo uso da desidratação em fluxo laminar. Relativamente às características físicas das cápsulas, verificou-se que, do meio  $En_1$  para o meio  $En_3$ , as cápsulas se apresentavam menos duras e menos opacas.

Na desidratação em fluxo laminar foram testadas duas modalidades: A – sem pré-cultura em meio rico em sacarose, tendo as cápsulas sido colocadas em placas de Petri (6 cm de diâmetro) destapadas, sobre duas folhas de papel de filtro Whatman nº1 e mantidas na câmara de fluxo laminar durante 1 h e 20 min; B – pré-cultura em meio rico em sacarose, tendo as cápsulas sido cultivadas em meio líquido (sais minerais MS) suplementado com 0,75 M de sacarose, durante 16 horas com agitação (90 rpm), em Erlenmeyers de 50 ml. As cápsulas foram depois transferidas para placas de Petri (6 cm de diâmetro) destapadas, sobre duas folhas de papel de filtro e mantidas na câmara de fluxo laminar durante 1 h e 30 min. Depois de atingirem o teor de humidade pretendido, as cápsulas foram transferidas para criotubos de 2 ml. Os criotubos foram colocados em mangas as quais foram seladas por calor, colocadas em suportes de alumínio ('canisters') e imersas em azoto líquido durante 2 h e 30 min. Foi utilizado um criotubo por tratamento com 10 cápsulas. A descongelação das cápsulas foi realizada por imersão das mangas em banho-maria a 37°C, durante 4 min., com agitação a 60 rpm. A re-hidratação das cápsulas efectuou-se em meio de cultura  $I_0$  líquido contendo 0,09 M de sacarose, sobre duas folhas de papel de filtro bem embebidas em meio, em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, durante 30 min. Para regeneração dos ápices as cápsulas foram cultivadas em meio  $I_0$ , contendo 0,09 M de sacarose e 0,2% de gelrite. As cápsulas foram mantidas às escuras durante 4 dias e depois transferidas para as condições' de luz e temperatura utilizadas no estabelecimento e crescimento das culturas.

Para avaliar a influência dos tratamentos de encapsulamento e desidratação na viabilidade dos explantados, foi realizado um ensaio controlo, em que os ápices foram encapsulados e desidratados sem terem sido imersos em azoto líquido.

### Vitrificação

O estudo da crioconservação de ápices de *C. esculenta* pela técnica de vitrificação baseou-se nos estudos de TAKAGI *et al.* (1997; 1998). Rebentos com 1 a 2 cm de comprimento foram cultivados durante 3 e 10 semanas em meio de cultura  $I_0$  suplementado com 0,3 M de sacarose. Efectuou-se um ensaio controlo em que os rebentos não foram pré-cultivados em meio  $I_0$  com elevada concentração de sacarose. Os ápices, isolados a partir dos rebentos cultivados, eram constituídos pelo meristema apical e 2 a 3 primórdios foliares. Os ápices

isolados foram submetidos a um pré-tratamento que consistiu no seu cultivo em meio de cultura I<sub>0</sub> com 0,3 M de sacarose e 0,2% de gelrite, às escuras, durante 16 horas, a 25°C, em frascos de cultura com 10 ml de meio, 8 ápices por frasco.

Após este período, os ápices foram colocados em criotubos (10 ápices por criotubo) de 2 ml contendo 1,8 ml de solução de carregamento por criotubo, constituída por 2 M de glicerol, 0,4 M de sacarose e os sais minerais de MS, pH 5,7. Ao fim de 20 minutos a solução de carregamento foi substituída pela solução vitrificante (PVS<sub>2</sub>) (SAKAI *et al.*, 1990) constituída pelos sais minerais de MS contendo 30% (p/v) de glicerol + 15% (p/v) de etilenoglicol + 15% (p/v) de dimetilsulxócido (DMSO) + 0,4 M de sacarose. A solução vitrificante foi distribuída pelos criotubos (1,8 ml por criotubo) e foi mantida durante 10 minutos. Após esse período foi removida e substituída por solução vitrificante fresca.

Os criotubos foram colocados em mangas, estas colocadas em 'canisters' e imersas, rapidamente, em azoto líquido, onde permaneceram durante 2 h e 30 min. A descongelação realizou-se em banho-maria a 37°C, durante 5 min., com agitação (60 rpm). Após a rápida descongelação retirou-se a solução vitrificante dos criotubos substituindo-a por meio contendo os sais minerais MS e 1,2 M de sacarose. Os ápices permaneceram nesta solução durante 10 minutos.

Para regeneração os ápices foram cultivados sobre duas camadas de papel de filtro dispostas sobre meio contendo os sais minerais MS, 100 mg.l<sup>-1</sup> mio-inositol, 10 mg.l<sup>-1</sup> tiamina HCl, 50 mg.l<sup>-1</sup> cisteína-HCl, 0,3 M de sacarose e 0,2% de gelrite. Ao fim de 2 dias foram transferidos para meio idêntico ao anterior mas com 0,1 M de sacarose. Durante os primeiros 10 dias, os ápices foram mantidos sob luz difusa, com a temperatura e o fotoperíodo já referidos.

### Tratamento estatístico

A análise dos dados foi feita no programa SPSS. Antes da sua análise os dados foram transformados por arcsin da raiz quadrada. Os resultados foram avaliados estatisticamente através de análise de variância. A significância entre médias foi testada pelo 'Duncan's New Multiple Range Test' ( $P=0.05$ ). Os valores significativamente diferentes são assinalados com letras diferentes.

## RESULTADOS

### Crioconservação directa dos ápices

No ensaio de crioconservação directa dos ápices, que teve por finalidade observar o seu comportamento após imersão em azoto líquido (-196°C), a taxa de sobrevivência foi nula, verificando-se assim que os ápices de *C. esculenta*, na ausência de qualquer tratamento prévio, não têm capacidade para sobreviver a uma exposição a temperaturas tão baixas.

### Crioconservação por encapsulamento/desidratação

Depois de retirados do azoto líquido e colocados em meio de regeneração, os ápices encapsulados foram observados semanalmente durante 4 semanas. Os

valores apresentados na Tabela 1 referem-se à percentagem de sobrevivência ao fim de 4 semanas. No meio de encapsulamento En<sub>1</sub> nenhum ápice sobreviveu à criopreservação. Nos meios En<sub>2</sub> e En<sub>3</sub> observou-se regeneração, no entanto, as taxas de sobrevivência foram baixas (5,6%) (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagem de sobrevivência dos ápices submetidos ao processo de encapsulamento/desidratação sem pré-cultura.

<i>Meios de encapsulamento</i>	<i>Número de cápsulas/ápices</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
En <sub>1</sub>	17	0 c
En <sub>1</sub> C*	5	60 b
En <sub>2</sub>	18	5,6 c
En <sub>2</sub> C*	6	50 b
En <sub>3</sub>	18	5,6 c
En <sub>3</sub> C*	6	33 b
Sem tratamento**	17	82 a

Meios de encapsulamento: En<sub>1</sub> – MS + 0,09 M sacarose + 3% alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,9 M sacarose; En<sub>2</sub> – MS + 0,4 M sacarose + 3% alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,4 M sacarose; En<sub>3</sub> – MS + 0,4 M sacarose + 3% alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,4 M sacarose + 2 M glicerol

\*ensaio controlo: ápices submetidos aos tratamentos de encapsulamento/desidratação, mas não imersos em azoto líquido. \*\*ápices não imersos em azoto líquido nem submetidos ao processo de encapsulamento/desidratação.

Nos ápices submetidos aos tratamentos de encapsulamento/desidratação, mas não imersos em azoto líquido, as taxas de sobrevivência variaram entre 33 e 60% (Tabela 1). Nos ápices sujeitos a pré-cultura em meio com 0,7 M de sacarose apenas se observa regeneração no meio de encapsulamento En<sub>2</sub>, com uma taxa de sobrevivência de 4,3% (Tabela 2).

Os tratamentos de encapsulamento e de desidratação tiveram um efeito negativo nas taxas de sobrevivência dos ápices. As taxas de sobrevivência nos ensaios controlo foram de 40%, 33% e 17% para os meios En<sub>1</sub>, En<sub>3</sub> e En<sub>2</sub>, respectivamente (Tabela 2). Estes valores foram inferiores aos observados em ápices não submetidos àqueles tratamentos, nem imersos em azoto líquido, cuja taxa de sobrevivência foi de 82%.

### Crioconservação por vitrificação

Neste estudo foram comparados ápices provenientes de rebentos pré-cultivados em meio com 0,3 M de sacarose durante 0, 3 ou 10 semanas. A percentagem de sobrevivência, após 4 semanas em meio de regeneração, foi superior nos ápices que não foram pré-cultivados (4,7%), e diminuiu com o aumento da duração do período de pré-cultura (Tabela 3).

Tabela 2. Percentagem de sobrevivência dos ápices submetidos ao processo de encapsulamento/desidratação com pré-cultura em meio com 0,75 M de sacarose.

<i>Meios Encapsulamento</i>	<i>Número de cápsulas/ápices</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
En <sub>1</sub>	17	0 c
En <sub>1</sub> C*	5	40 b
En <sub>2</sub>	23	4,3 c
En <sub>2</sub> C*	6	17 b
En <sub>3</sub>	22	0 c
En <sub>3</sub> C*	6	33 b
Sem tratamento**	17	82 a

Meios de encapsulamento: En<sub>1</sub> – MS + 0,09 M sacarose + 3% alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,9 M sacarose; En<sub>2</sub> – MS + 0,4 M sacarose + 3% alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,4 M sacarose; En<sub>3</sub> – MS + 0,4 M sacarose + 3% alginato de sódio e 0,1 M CaCl<sub>2</sub> + 0,4 M sacarose + 2 M glicerol

\*ensaio controle: ápices submetidos aos tratamentos de encapsulamento/desidratação, mas não imersos em azoto líquido. \*\*ápices não imersos em azoto líquido nem submetidos ao processo de encapsulamento/desidratação.

Nos ápices submetidos aos tratamentos de vitrificação mas não imersos em azoto líquido a taxa de sobrevivência foi de 57%. Por sua vez a taxa de sobrevivência observada para os ápices não submetidos ao processo de vitrificação nem imersos em azoto líquido foi de 82%.

Tabela 3. Influência da pré-cultura em I<sub>0</sub> (0,3 M de sacarose) na percentagem de sobrevivência dos ápices submetidos ao processo de vitrificação e imersão em azoto líquido.

<i>Tratamento</i>	<i>Número de ápices</i>	<i>Sobrevivência (%)</i>
3 semanas em pré-cultura	40	2,5 a
10 semanas em pré-cultura	58	1,7 b
Sem pré-cultura	64	4,7 a
Sem tratamento*	9	0 b

\*ápices imersos em azoto líquido sem terem sido submetidos às técnicas de vitrificação.

## DISCUSSÃO

Na técnica de encapsulamento/desidratação, verificou-se que a pré-cultura das cápsulas em meio com elevada concentração de sacarose (desidratação osmótica) não aumentou a taxa de sobrevivência dos ápices. Em ambos os ensaios (com e sem pré-cultura), os ápices imersos em azoto líquido apresentaram taxas de sobrevivência mais elevadas ( $p < 0,05$ ) quando encapsulados em meio En<sub>2</sub> (0,4 M

sacarose) (Tabela 2) e, no ensaio sem pré-cultura, em En<sub>3</sub> (0,4 M sacarose + 2 M glicerol) (Tabela 1).

No controlo (sem imersão em azoto líquido), as taxas de sobrevivência mais elevadas foram obtidas com ápices encapsulados em meio En<sub>1</sub> (0,09 M sacarose), onde não se tinha registado qualquer crescimento dos ápices quando imersos em azoto líquido (Tabela 1). No entanto estes resultados não foram estatisticamente diferentes dos obtidos com os restantes meios de encapsulamento ( $p > 0,05$ ). Como já foi referido, a composição das cápsulas influenciou a sua consistência. Verificou-se que cápsulas com a mesma percentagem de humidade apresentavam opacidade e dureza diferentes, o que pode ser devido à presença de glicerol, que as torna mais brandas. Poder-se-ia inferir que a maior consistência das cápsulas influenciaria negativamente a viabilidade e capacidade de regeneração dos ápices, no entanto, no controlo, verificou-se que as maiores percentagens de sobrevivência dos ápices foram obtidas em En<sub>1</sub> (cápsulas mais duras).

Relativamente à técnica de vitrificação, o protocolo utilizado baseou-se no trabalho de TAKAGI *et al.* (1997), que referem o efeito tóxico da solução vitrificante PVS<sub>2</sub>. Aqueles autores verificaram que a exposição de diferentes tipos de explantados (gemas axilares e ápices vegetativos) à solução PVS<sub>2</sub>, a 25°C, provocava um decréscimo das taxas de sobrevivência a partir de 30 minutos de exposição. As soluções de carregamento foram também optimizadas por aqueles autores, tendo sido obtidos os melhores resultados com uma solução composta por 1,5 M glicerol + 0,4 M sacarose + 5% DMSO. O tempo de exposição a este último tratamento também foi estudado por aqueles autores e os melhores resultados foram obtidos com uma exposição de 20 min. A pré-cultura dos rebentos, antes do isolamento dos ápices, em meio com 0,3 M de sacarose também teve uma influência positiva na taxa de sobrevivência.

No presente trabalho, as taxas de sobrevivência mais elevadas ( $p < 0,05$ ) foram observadas nos ápices isolados de rebentos que não foram pré-cultivados (Tabela 3). Nos ápices de rebentos submetidos a pré-cultura durante 3 semanas antes da vitrificação verificou-se uma maior sobrevivência comparativamente com os pré-cultivados durante 10 semanas. Estes resultados não estão de acordo com o referido por TAKAGI *et al.* (1997) que conseguiu um aumento da taxa de sobrevivência dos explantados quando realizou a pré-cultura durante 3 semanas.

As baixas taxas de sobrevivência poderão ter sido devidas ao facto de o período de tempo de exposição às várias soluções (de carregamento e de vitrificação) não ter sido o mais adequado para o genótipo em estudo. A diferença entre as percentagens de sobrevivência obtidas no presente trabalho e as referidas por TAKAGI *et al.* (1997) para o taro podem ter sido influenciadas pelo genótipo. PAULET *et al.* (1993), ESCOBAR *et al.* (1997), TAKAGI *et al.* (1997) e WANG *et al.* (2000), em estudos com, respectivamente, cana-de-açúcar, mandioca, taro e videira, observaram diferenças nas taxas de sobrevivência de diferentes cultivares e mesmo dentro da mesma cultivar. Estas

diferenças podem estar relacionadas com a resistência dos ápices à desidratação (teor óptimo em água) (PAULET *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000) ou com a sensibilidade ao efeito tóxico das substâncias crioprotectoras, e consequentemente à congelação em azoto líquido (TAKAGI *et al.*, 1997).

Outra das possíveis causas das baixas taxas de sucesso poderá ser devido ao facto de a esterilização das soluções crioprotectoras ter sido realizada por autoclavagem. Embora normalmente não seja referida a necessidade de esterilizar as soluções por ultra-filtração, DIXON (1985) refere que os crioprotectores devem ser esterilizados por filtração para evitar o risco de caramelização.

Outro aspecto a ter em conta e que poderá ter influenciado negativamente a taxa de sobrevivência dos ápices tem a ver com o facto de estes serem muito frágeis e as diferentes manipulações a que são submetidos durante todo o processo poderem prejudicar a sua viabilidade. Por isso uma das preocupações no desenvolvimento da metodologia foi reduzir ao mínimo o número de manipulações.

No presente estudo verificou-se ainda, que embora os ápices fossem de dimensões aproximadas, os ápices com 2-2,5 mm tiveram maior crescimento, pelo que em futuros estudos se deverá optar por ápices com este tamanho.

O presente trabalho cumpriu em parte os seus objectivos, na medida em que se efectuaram algumas optimizações principalmente no que se refere à técnica de encapsulamento/desidratação, mas os seus resultados não podem ser considerados definitivos. É necessário dar continuidade aos estudos com uma maior amostragem, tanto no que se refere aos ápices crioconservados como aos controlo, de modo a permitir uma optimização dos protocolos para o genótipo em estudo. No entanto, é de salientar a viabilidade dos métodos, pois apesar das baixas taxas de sobrevivência, observou-se o crescimento e desenvolvimento de alguns ápices, não se observando diferenças morfológicas entre ápices crioconservados e ápices controlo.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DIXON, R. A. 1985. *Plant Cell Culture – a practical approach*. IRL Press Limited, Oxford.
- Engelmann, F. 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. *Acta Hort.* 447: 471-475.
- ESCOBAR, R. H., MAFLA, G. & ROCA, W. M. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep.* 16: 474-478.
- HIRAI, D., SHIRAI, K., SHIRAI, S. & SAKAI, A. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica.* 101: 109-115.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- PATTHAIK, S. & CHAND, P. K. 2000. Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 177-185.

- PAULET, F., ENGELMANN, F. & GLASZMANN, J. C. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugar cane (*Saccharum* sp. Hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep.* 12: 525-529.
- ROCA, W. M., CHAVEZ, R., MARIN, M. L., ARIAS, D I., MAFLA, G. & REYES, R. 1989. *In vitro* methods of germ-plasm conservation. *Genome.* 31: 813-817.
- SAKAI, A., KOBAYASHI, S. & OIYAMA, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 30-33.
- TAKAGI, H., THINH, N. T., ISLAM, O. M., SENBOKU, T. & SAKAI, A. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.* 16: 594-599.
- TAKAGI, H., THINH, N. T. & KYESMU, P. M. 1998. Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification. *Acta Hort.* 461: 485-494.
- TAYLOR, M. 2002. *Cryopreservation of germplasm*. A conservation and use project for Pacific Islands countries, 8 pp (disponível em [http://users bigpond.net.au/graham/Cryo\\_report.html](http://users.bigpond.net.au/graham/Cryo_report.html))
- THINH, N.T., TAKAGI, H. & YASHIMA, S. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification. *Cryo Lett.* 20: 163-174.
- WANG, Q., TANNE, E., ARAV, A. & GAFNY, R. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation/dehydration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63: 41-46.
- YEOMAN, M.M. 1986. *Botanical Monographs – Plant Cell Culture Technology*, vol. 23. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

# INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTADO E DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE REBENTOS EM *RHODODENDRON PONTICUM* SUBSP. *BAETICUM*

M. D. Martins, R. Almeida & A. Romano

Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

Martins, M. D., Almeida, R. & Romano, A. (2004). Influência do tipo de explantado e dos reguladores de crescimento na indução de rebentos em *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 43-52.

A adelfeira, *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*, é uma planta endémica da Península Ibérica que cresce nas Serras de Monchique e Caramulo (Portugal), sendo protegida, desde 1971, na Reserva Botânica do Cambarinho. Considerada uma espécie ornamental da flora espontânea portuguesa, com elevado interesse económico, está sujeita a erosão genética acelerada, sendo importante desenvolver e otimizar técnicas que permitam a sua propagação. Com este trabalho pretendeu-se estudar a influência do tipo de explantado e dos reguladores de crescimento na indução de rebentos. Foram testados quatro tipos de explantado: nó, entrenó, folha e limbo, e três citocininas (zeatina, 2iP e TDZ), isoladamente ou combinadas com a auxina AIA. Nos explantados nó, folha e limbo foi observada formação de *calli* em todos os meios de indução testados. Nos entrenós apenas se verificou formação de *calli* nos dois meios suplementados com TDZ. Em todos os explantados, à excepção dos entrenós (<22% de calogénese), foram observadas elevadas percentagens de calogénese (>88%). A regeneração de rebentos foi observada em todos os explantados, onde se verificou a formação de *calli*. Após duas subculturas em meio de alongamento, o maior número de rebentos regenerados (105 rebentos/nó), foi obtido nos *calli* originados em nós e provenientes dos meios de indução contendo TDZ + AIA. Os rebentos regenerados foram transferidos para meio de multiplicação, tendo apresentado uma elevada capacidade de multiplicação e enraizamento.

Palavras-chave: adelfeira, citocininas, organogénese, calogénese.

Martins, M. D., Almeida, R. & Romano, A. (2004). Influence of explant type and growth regulators on shoot regeneration induction of *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*. *Revista Biol. (Lisboa)* **22**: 43-52.

*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* is an endemic plant confined to the mountains of Monchique and Caramulo, on Botanical Reserve of Cambarinho, where it is protected since 1971. It is considered an ornamental species of the Portuguese flora with high economical interest. Therefore, the development and optimisation of propagation techniques for this species it is of utmost importance. The aim of this work was to study the influence of explant type and growth regulators on shoot regeneration. Four different types of explant were tested: nodes, internodes, leaves and leaf blades. Three cytokinins were tested in induction medium (zeatin, 2iP and TDZ), alone or combined with the auxin IAA. *Calli* formation was observed in all induction media for nodes, leaves and leaf blades. For internodes, *calli* formation was only observed in the two induction media containing TDZ. For these two media, high percentage of calogenesis was observed for all the explants (>88%), except internodes (<22%). Shoot regeneration occurred in all explants where *calli* formation had been observed. After two subcultures in regeneration medium, the highest number of regenerated shoots (105 shoots/node) was obtained in *calli* from nodes previously grown in induction media with TDZ + IAA. The regenerated shoots were transferred to multiplication medium and showed high multiplication and rooting capacity.

Key words: Iberian rose, cytokinins, organogenesis, callogenesis.

## INTRODUÇÃO

O *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*, conhecido por adelfeira (Serra de Monchique) ou loendro (Serra do Caramulo), é uma espécie da flora portuguesa, de raro interesse científico e invulgar beleza decorativa, que se encontra ameaçada (MEJÍAS *et al.*, 2002), sendo protegida desde 1971 na Reserva Botânica do Cambarinho (DIAS, 1986). A regeneração desta espécie (*in situ* e *ex situ*) constitui uma prioridade, porque a sua propagação no campo é baixa (ARROYO & MEJÍAS, 2000; GARRIDO & MEJÍAS, 2000).

Os *Rhododendrons* são normalmente propagados por estaca, ou cultura *in vitro* de tecidos, mas a propagação seminal e enxertia são também uma opção. A informação publicada sobre a cultura *in vitro* de Rododendros está relacionada apenas com algumas espécies e cultivares de elevado valor económico (SHEVADE & PREECE, 1993; BRIGGS *et al.*, 1994; HSIA *et al.*, 1998). Até ao momento, os únicos trabalhos que se conhecem e que foram desenvolvidos para a propagação *in vitro* de *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*, foram realizados por ALMEIDA *et al.* (2003).

Sendo o *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum* uma subespécie em vias de extinção, a propagação por estaca não será o método mais adequado, uma vez que obrigaria a extensos cortes nas poucas plantas existentes, situação que se agravou com os incêndios ocorridos na serra de Monchique, no Verão de 2003.

Os métodos biotecnológicos são actualmente uma componente essencial na gestão dos recursos genéticos vegetais e cada vez mais um modo de conservação de espécies raras ou em vias de extinção (BENSON *et al.*, 2000; IANKOVA *et al.*, 2001; BHATIA *et al.*; 2002). A cultura *in vitro* parece ser um método adequado, em particular a regeneração de rebentos adventícios, porque permite a produção de plantas em larga escala, e por outro lado, pode ser usada para a conservação de germoplasma (NORMAH *et al.*, 1997). As técnicas de cultura *in vitro* podem também facilitar a aplicação de processos de manipulação genética (KNAPP *et al.*, 2001).

O sucesso da aplicação das tecnologias *in vitro* depende da existência de um protocolo de regeneração reprodutível (KOROCH *et al.*, 2002). São muitos os factores que influenciam a reprodutibilidade desse protocolo, nomeadamente o estado fisiológico das plantas *in vivo*, a escolha do tipo de explantado, a composição do meio cultura e a selecção dos reguladores de crescimento (AGARWALL & RANU, 2000).

Este trabalho teve como objectivo o estudo da influência do tipo de explantado e dos reguladores de crescimento na indução de rebentos em *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os explantados utilizados neste trabalho, são provenientes de rebentos micropropagados e mantidos em cultura *in vitro*, com subcultura, a cada 8 semanas, em meio de Anderson modificado, constituído pelos macronutrientes de ANDERSON (1984) e pelos micronutrientes e vitaminas de MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado com 1 mg.l<sup>-1</sup> de zeatina, 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g.l<sup>-1</sup> de agar. O pH foi ajustado a 5,75 e o meio autoclavado, durante 20 minutos, a 121°C, e 1 atm. As culturas foram mantidas em condições ambientais controladas, com fotoperíodo de 16 h, sob densidade de fluxo de fotões de 55 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, e temperatura de 25 ± 2 °C.

### Indução de *calli*

Os meios de indução de *calli* foram preparados com o meio base acima referido, suplementado com diferentes reguladores de crescimento. Foram testadas as citocininas zeatina, 2-isopentiladenina (2iP) e tidiazurão (TDZ), na concentração de 4 mg.l<sup>-1</sup> isoladamente, ou combinadas com a auxina ácido indolacético (AIA) na concentração de 1 mg.l<sup>-1</sup>.

Testaram-se quatro tipos de explantado: nó contendo um gomo axilar não desenvolvido (5-6 mm), entrenó (5-6 mm), folha e limbo. Os nós, as folhas e os limbos foram inoculados em posição vertical no meio de cultura e os entrenós na

posição horizontal. O número de explantados testados por ensaio foi de dezassete e cada ensaio foi repetido três vezes.

### **Regeneração dos rebentos**

Após a fase de indução de rebentos, procedeu-se à regeneração e ao alongamento dos mesmos. Assim, os explantados que apresentavam formação de *calli* no final da fase de indução, foram distribuídos uniformemente por dois meios de regeneração. Estes meios foram compostos pelo meio base referido anteriormente, e suplementados com os seguintes reguladores: meio A - 1,5 mg.l<sup>-1</sup> zeatina; meio B - 1,5 mg.l<sup>-1</sup> zeatina + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> AIA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (ácido giberélico).

### **Quantificação e análise dos resultados**

Os resultados foram quantificados no final de cada subcultura, com a duração de 8 semanas. Para a indução e proliferação de *calli* foram realizadas duas subculturas, sendo avaliada a percentagem de explantados com formação de *callus* (% calogénese) no final da primeira subcultura. Para a regeneração e alongamento dos rebentos foram realizadas duas subculturas. No final de cada uma avaliaram-se os seguintes parâmetros: número rebentos desenvolvido por *callus* e comprimento (mm) do rebento mais longo desenvolvido por *callus*. Após cada subcultura os rebentos que se apresentaram suficientemente desenvolvidos (1-1,5 cm) foram excisados e transferidos para meio de multiplicação.

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) bifatorial para determinar diferenças e interações usando-se o programa SPSS (release 11.0, SPSS INC). A significância entre médias foi testada pelo "Duncan's New Multiple Range Test" ( $p = 0,05$ ). Os dados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro-padrão sendo os valores significativamente diferentes assinalados com letras diferentes.

## **RESULTADOS**

### **Indução de *calli***

Nos nós foi observada a formação de *calli* em todos os meios de cultura testados, obtendo-se a percentagem de calogénese mais elevada (98%) na combinação 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA (Figura 3A). Os entrenós apresentaram resultados estatisticamente inferiores, sendo a formação de *calli* apenas observada nos meios com 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ e 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA (Figura 3B), com uma percentagem de calogénese de 22% na combinação 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA (Figura 1).

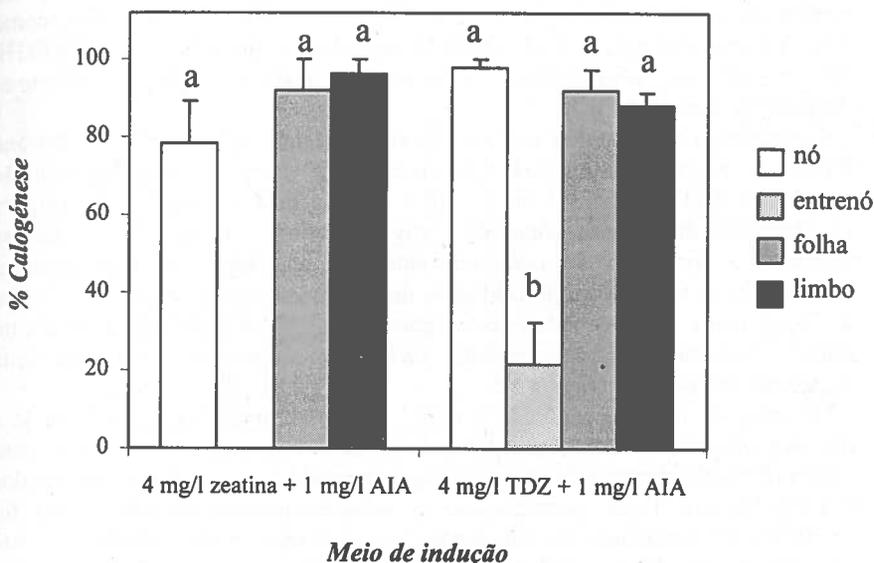


Figura 1. Influência do meio de indução e do tipo de explantado (nó, entrenó, folha e limbo), na percentagem de calogênese, após oito semanas de indução. Os valores seguidos de letras diferentes, apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

O TDZ é uma citocinina muito eficiente na indução de *calli* em plantas lenhosas, especialmente quando é usada em concentrações superiores a  $0,022 \text{ mg.l}^{-1}$ . Esta citocinina foi mais efectiva que a zeatina na indução de *calli* em *Phaseolus* (HUETTEMAN & PREECE, 1993). CUENCA *et al.* (2000), em entrenós de *Fagus sylvatica*, obtiveram a formação de *calli*, para várias concentrações de TDZ + AIA, e LI *et al.* (1999) trabalhando com explantados semelhantes de *Mentha spicata*, obtiveram a formação de *calli* para várias concentrações de TDZ, embora em percentagens baixas (<4%).

Nos explantados folha e limbo, foram testadas as citocininas zeatina e TDZ combinadas com a auxina AIA. A formação de *calli* verificou-se em ambos os meios e para os dois tipos de explantado, sendo as percentagens de calogênese obtidas elevadas (>88%). Para a folha foi obtida a formação de *calli* em ambas as combinações citocinina + auxina, sendo as percentagens de calogênese de 92% (Figura 3C). No caso do limbo, foi observada a formação de *calli* nos dois meios, sendo a percentagem de calogênese superior para a combinação  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  zeatina +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  AIA (96%).

A indução de calogénese e regeneração de rebentos em folhas e em explantados com origem em folhas, já foi descrita para várias espécies, como *Prunus dulcis* (AINSLEY *et al.*, 2000), *Rosa hybrida* (IBRAHIM & DEBERGH, 2001), *Dianthus caryophyllus* (JAIN *et al.*, 2001) e *Echinacea purpurea* (KOROCH *et al.*, 2002).

Comparando os diferentes explantados (nó, entrenó, folha e limbo), o entrenó foi aquele que apresentou piores resultados para ambos os meios de indução testados (4 mg.l<sup>-1</sup> zeatina + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA e 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA) (Figura 1). No meio de indução contendo 4 mg.l<sup>-1</sup> zeatina + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA, não se verificou a formação de *calli* em entrenós, enquanto que nos restantes explantados se observaram percentagens de calogénese superiores a 78% (Figura 1). Neste meio, a percentagem de calogénese mais elevada (96%) foi obtida no limbo, embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 1).

No meio de indução contendo 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA, verificou-se a formação de *calli* no explantado entrenó, contudo, a percentagem de calogénese obtida (22%) foi muito inferior às percentagens obtidas nos restantes explantados (>88%) (Figura 1). A percentagem de calogénese mais elevada (98%) foi verificada no explantado nó, não sendo este resultado estatisticamente diferente ( $p > 0,05$ ) dos obtidos para folhas e limbos (Figura 1).

### Regeneração de rebentos

A regeneração de rebentos *in vitro*, no género *Rhododendron* foi anteriormente descrita. Em *R. simsii*, a formação de rebentos adventícios em folhas, foi descrita por RADICE & CASO (1990), mas apenas em folhas provenientes de rebentos axilares das cultivares “Rex” e “Petrick”. MERTENS *et al.* (1996) referem também a regeneração com sucesso, de rebentos em diferentes explantados de *R. simsii* cv. “Hellmut Vogel”, em meio de cultura contendo as citocininas zeatina ou TDZ.

No presente estudo, a regeneração de rebentos ocorreu com particular sucesso, nos *calli* originados em três explantados – nó, entrenó e folha, provenientes do meio de indução contendo 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA. Após duas subculturas o número médio de rebentos desenvolvidos nos diferentes explantados e em dois meios de regeneração, foi elevado (>22 rebentos/explantado). O número médio de rebentos foi especialmente elevado (105 rebentos/nó) para os *calli* originados em nós e em meio de regeneração B (Figura 2, Figura 3D). Em ambos os meios de regeneração, o número médio de rebentos foi estatisticamente superior ( $p < 0,05$ ) nos *calli* originados em nós (Figura 2). Porém, o comprimento dos rebentos foi estatisticamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao dos rebentos regenerados em *calli* originados em entrenós e folhas (Figura 2).

As citocininas, em geral, estimulam a proliferação de rebentos e inibem o seu alongamento. Assim, a inibição do alongamento provocada pelo TDZ está consistente com a sua elevada actividade. O problema do alongamento pode ser

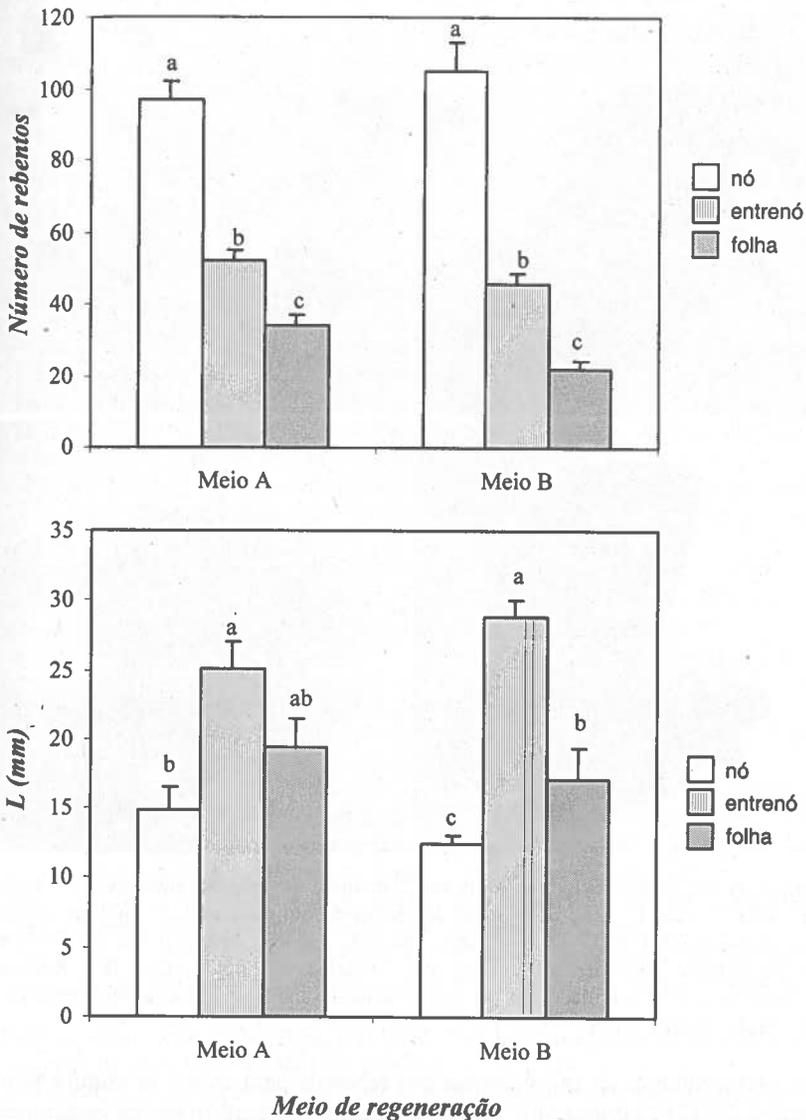


Figura 2. Influência do meio de regeneração, no número médio de rebentos e no comprimento do rebento mais longo (mm), em *calli* originados em três explantados diferentes (nós, entrenós, folhas). Meio de regeneração A - 1,5 mg.l<sup>-1</sup> zeatina e meio de regeneração B - 1,5 mg.l<sup>-1</sup> zeatina + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> AIA + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Para cada meio de alongamento, os valores representados com letras diferentes, apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Duncan (p<0,05).

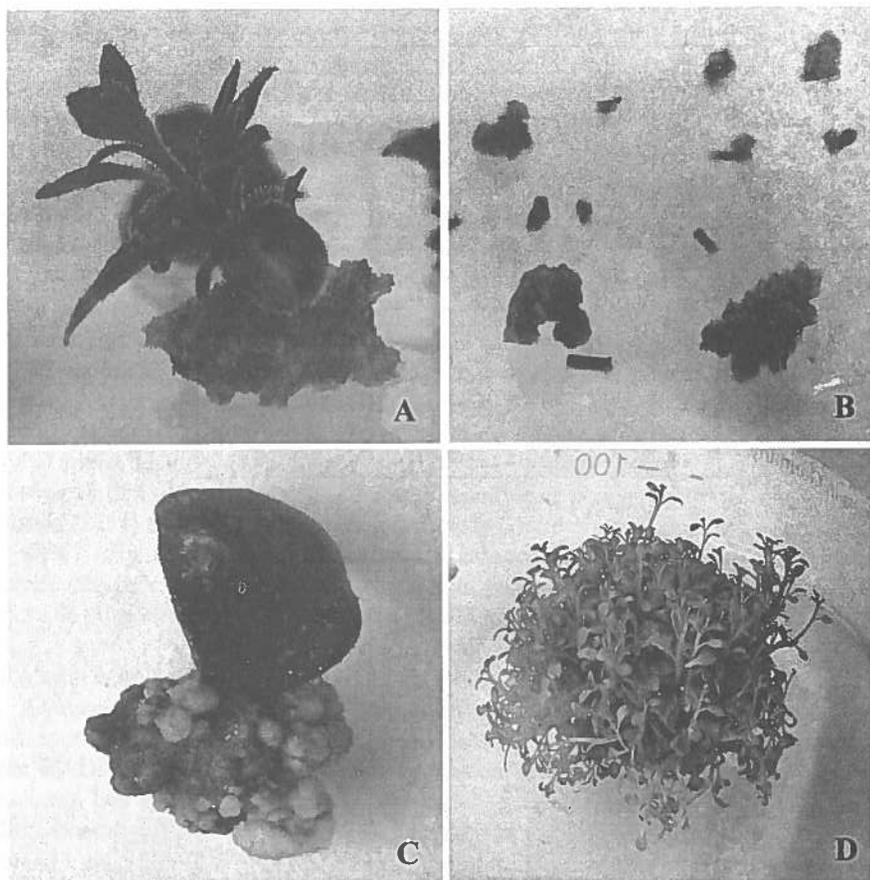


Figura 3. A – *Callus* desenvolvido em nós, em meio de indução suplementado com 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA; B – *Callus* desenvolvido em entrenós, em meio de indução suplementado com 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA; C – *Callus* desenvolvido em folha, em meio de indução suplementado com 4 mg.l<sup>-1</sup> zeatina + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA; D – Rebentos formados em *callus* originado em nó, proveniente do meio de indução suplementado 4 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg.l<sup>-1</sup> AIA.

ultrapassado através da transferência dos rebentos para meios de cultura sem a presença de TDZ ou com um balanço diferente de reguladores de crescimento (HUETTEMAN & PREECE, 1993).

Neste trabalho verificou-se que os rebentos regenerados, depois de transferidos para meio de multiplicação, apresentavam taxas de multiplicação semelhantes às obtidas por ALMEIDA *et al.* (2003), em segmentos nodais e gomos apicais, o que revela uma boa capacidade de multiplicação *in vitro* desta espécie. Os rebentos produzidos apresentaram igualmente boa capacidade rizogênica (>80%).

## AGRADECIMENTOS

Trabalho desenvolvido no âmbito do projecto "Micropropagação de adelfeira (*Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*) e sua reintrodução em solos degradados na serra de Monchique", financiado pelo Programa AGRO Medida 8 – Acção 8.1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWALL, P. K. & RANU, R. S. 2000. Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium* × *Hortorum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant.* 36: 392-397.
- AINSLEY, P. J., COLLINS, G. G. & SEDGLEY, M. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill. ). *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant.* 36: 470-474.
- ALMEIDA, R., GONÇALVES, S. & ROMANO, A. 2003. Micropropagação de adelfeira. Contributos para a conservação e reprodução de uma espécie endémica da serra de Monchique. *Revista Biol.* 21: 29-42.
- ANDERSON, W. C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109: 343-347.
- ARROYO, J. & MJÍAS, J. A. 2000. Libro de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía. Tomo I. *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- BENSON, E. E., DANAHER, J. E., PIMBLEY, I. M., ANDERSON, C. T., WAKE, J. E., DALEY, S. & ADAMS, L. K. 2000. *In vitro* propagation of primula scotica: a rare Scottish plant. *Biod. & Conserv.* 9: 711-726.
- BHATIA, P., BHATIA, N. P. & ASHWATH, N. 2002. *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): a rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biod. & Conserv.* 11: 1469-1477.
- BRIGGS, B. A., MCCULLOCH, S. M., CATON, L. A. & SPETHMANN, W. 1994. *In vitro* propagation of *rhododendron*. *Acta Hort.* 364: 21-26.
- CUENCA, B., BALLESTER, A. & VIEITEZ, A. M. 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 213-220.
- DIAS, M. 1986. A Flora e a vegetação do Algarve – Achegas para o seu conhecimento e protecção. Actas do 4º Congresso do Algarve, 2º Vol. Raca Club. pp. 708.
- GARRIDO, M. J. & MEJÍAS, J. A. 2000. Éxito reproductivo de las poblaciones de *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*. *Almoraima* 23: 123-131.
- HSIA, C. N. & KORBAN, S. S. 1998. Effect of growth regulators, dark treatment and light intensity on shoot organogenesis from leaf tissues of evergreen azalea. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 73: 53-60.
- HUETTEMAN, C. A. & PREECE, J. E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.
- IANKOVA, E., CANTOS, M., LIÑAN, J., ROBEVA, P. & TRONCOSO, A. 2001. *In vitro* propagation of *Angelica panicii* Vauds., an endangered plant species in Bulgaria. *Seed Sci. e & Tech.* 29: 477-482.
- IBRAHIM, R. & DEBERGH, P. C. 2001. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L. ). *Sci. Hort.* 88: 41-57.
- JAIN, A., KANTIA, A. & KOTHARI, S. L. 2001. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. *Sci. Hort.* 87: 319-326.

- KNAPP, J. E., KAUSCH, A. P., AUER, C. & BRAND, M. H. 2001. Transformation of *Rhododendron* through microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 20: 749-754.
- KOROCH, A., JULIANI, H. R., KAPTEYN, J. & SIMON, J. E. 2002. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 79-83.
- LI, X., NIU, X., BRESSAN, R. A., WELLER, S. C. & HASEGAWA, P. M. 1999. Efficient plant regeneration of native spearmint (*Mentha spicata* L. ). *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 35: 333-338.
- MEJÍAS, J. A., ARROYO, J. & OJEDA, F. 2002. Reproductive ecology of *Rhododendron ponticum* (Ericaceae) in relict Mediterranean populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 297-311.
- MERTENS, M., WERBROUCK, S., SAMYN, G., BOTELHO DOS SANTOS MOREIRA DA SILVA, H. & DEBERGH, P. 1996. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45: 231-236.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NORMAH, M. N., HAMIDAH, S. & GHANI, F. D. 1997. Micropropagation of *Citrus halimii* - an endangered species of South-east Asia. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 225-227.
- RADICE, S. & CASO, O. H. 1990. *In vitro* organogenesis in leaves of azaleas "Petrick" and "Rex". *Sci. Hortic.* 41: 343-347.
- SHEVADE, A., & PREECE J. E. 1993. *In vitro* shoot and floral organogenesis from stamen explants from a *Rhododendron* PJM group clone. *Sci. Hortic.* 56: 163-170.

## RESPOSTAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE DUAS ESPÉCIES MEDITERRÂNICAS A FACTORES AMBIENTAIS DURANTE O INVERNO

Graça Oliveira <sup>1</sup> & Josep Peñuelas <sup>2</sup>

<sup>1</sup> CEBV (Centro de Ecologia e Biologia Vegetal), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Bloco C2, Piso 4, 1749-016 Lisboa, Portugal; <sup>2</sup> Unitat Ecofisiologia CSIC-CEAB-CREAF, Edifici C, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Espanha

Oliveira, G. & Peñuelas, J. (2004). Respostas morfológicas e fisiológicas das folhas de duas espécies mediterrânicas a factores ambientais durante o Inverno. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 53-63.

Em estudos anteriores observou-se que as folhas das mesmas espécies podem apresentar variações em certas características morfológicas e fotoquímicas entre locais sujeitos a diferentes temperaturas. Tal variação parece depender não apenas do local e clima, mas também da zona da copa, da época do ano ou da espécie. Pode colocar-se então a hipótese de que as plantas do sítio mais frio evitam ou toleram as baixas temperaturas através de alterações morfológicas e funcionais que minimizem, por exemplo, o excesso de radiação absorvida e que não pode ser utilizada quando a actividade enzimática envolvida na fotossíntese está limitada pela temperatura. Com este trabalho procurámos testar esta hipótese, quantificando diversos parâmetros morfológicos (e.g. peso, área, espessura, absorvância) e fisiológicos (eficiência fotoquímica, grau de degradação das membranas). Por outro lado, comparou-se o desempenho das plantas no Verão e no Inverno, de modo a avaliar a relevância do *stress* imposto pela estação fria.

Amostraram-se arbustos de *Quercus ilex* e *Cistus albidus* entre Janeiro de 1998 e Setembro de 1999, em dois Parques Naturais próximos de Barcelona (NE Espanha).

As folhas apresentaram as variações morfológicas esperadas no Verão. As eficiências fotoquímicas revelaram-se semelhantes entre o Verão e o Inverno, indicando graus de *stress* ambiental semelhantes nos dois períodos. Contudo, as alterações morfo-estruturais foram menos evidentes na estação fria. Apenas a redução do teor clorofilino pareceu ocorrer, em *Q. ilex* do local mais frio. É possível que esta estratégia (entre outras) permita a esta espécie manter

eficiências fotoquímicas semelhantes nos dois locais estudados, enquanto a espécie semi-decídua piora o seu desempenho fotoquímico em locais mais frios. No entanto, verificou-se que a menor eficiência fotoquímica registada no local mais frio não era acompanhada de maior grau de dano das membranas celulares (potencialmente provocado pelas baixas temperaturas), o que sugere outros factores indutores desse dano no local mais quente, tais como a poluição atmosférica.

Palavras chave: *Cistus albidus*, *Quercus ilex*, Inverno, Verão.

Oliveira, G. & Peñuelas, J. (2004). Leaf morphological and physiological responses of two Mediterranean species to environmental factors in Winter. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 53-63.

Previous studies have reported a number of morphological and photochemical changes in the leaves of Mediterranean species growing at sites with different temperatures. Such variations seem to depend not only on the site and climate, but also on the position in the canopy, time of the year and species. This leads to the hypothesis that plants of a colder site avoid or tolerate low temperatures through morphological and/or functional changes that minimize, for example, the excessive absorption of radiation which cannot be used in photochemistry due to temperature-limited enzyme activity. With this work we tried to test this hypothesis, quantifying several morphological (eg. leaf mass per area, area, thickness, absorbance) and physiological (e.g. photochemical efficiency, cell membrane leakage) parameters. The performance of plants in Summer and Winter has also been compared, in order to evaluate the importance of cold-imposed stress on Mediterranean plant species.

Shrubs of *Quercus ilex* and *Cistus albidus* have been sampled between January 1998 and September 1999, at two Natural Parks near Barcelona (NE Spain). Leaves in Summer exhibited the expected morphological changes, and their photoinhibition levels were similar to those recorded in Winter, indicating similar degrees of environmental stress on the two seasons. However, morphological changes were less evident during the cold season. Only the reduction of chlorophyll contents appeared to be consistent in *Q. ilex* at the colder site. It is possible that this strategy (among others) allows the evergreen species to maintain similar photochemical efficiencies at both studied sites, while *C. albidus* has a poorer performance at the colder site. However, the higher photoinhibition levels recorded at this site were not accompanied by higher membrane leakage (which could be

induced by cold damage), which was observed at the warmer site. This suggested that other environmental factors such as air pollution could be involved.

Keywords: *Cistus albidus*, *Quercus ilex*, Summer, Winter.

## INTRODUÇÃO

As adaptações morfológicas e fisiológicas das espécies vegetais mediterrânicas às limitações térmicas e hídricas impostas pela secura estival têm sido amplamente estudadas. Contudo, pouco se sabe acerca do papel dessas ou de outras adaptações na manutenção e sobrevivência das plantas durante a estação fria. De facto, este período é também potencialmente limitante para as espécies mediterrânicas (MITRAKOS 1980, OLIVEIRA & PEÑUELAS 2000, 2001).

Alguns estudos mostraram que as folhas podem apresentar variações em certas características morfológicas e fotoquímicas entre locais sujeitos a diferentes temperaturas (OLIVEIRA & PEÑUELAS 1999, 2000, 2001). Tal variação parece depender não apenas do local e clima, mas também da zona da copa, da época do ano ou da espécie considerados.

Neste trabalho avalia-se a diferença, entre o Verão e o Inverno, de diversas características morfológicas e fisiológicas das folhas de uma espécie semi-decídua (*Cistus albidus* L.) e de uma espécie perenifolia (*Quercus ilex* L.). Testa-se ainda a hipótese de que as plantas de sítios mais frios resistem melhor a eventuais danos provocados pela baixa temperatura do que indivíduos da mesma espécie crescendo em locais mais quentes. Tal resistência reflectir-se-á em alterações morfológicas e/ou funcionais que minimizem, por exemplo, o excesso de radiação absorvida e que não pode ser utilizada quando a actividade enzimática envolvida na fotossíntese está limitada pela baixa temperatura. Por fim analisa-se a expressão das alterações acima descritas a nível da copa.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo decorreu entre Janeiro de 1998 e Setembro de 1999 em dois locais próximos de Barcelona (NE Espanha): Collserola (Parc Natural de Collserola, 41° 26' N 2° 08' E, 350m) e Sant Llorenç (Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac, 41° 38' N 2° 01' E, 900m). Em ambos os locais a precipitação média anual é de 700mm, sendo a temperatura média anual de 14°C em Collserola e 12°C em Sant Llorenç. Os valores médios de temperatura do ar no Verão oscilam entre 21-24°C (Collserola - local "quente") e 18-22°C (Sant Llorenç - local "frio"), enquanto no Inverno variam, respectivamente, entre 8-11°C e 5-8°C.

Em três arbustos de cada espécie - *Quercus ilex* L. e *Cistus albidus* L. - amostraram-se, em cada data e local, folhas expostas a Norte e a Sul.

*In situ* determinou-se a eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm) com um fluorímetro PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Alemanha) em três folhas por arbusto e exposição. As folhas foram mantidas na escuridão c. de 20 min antes

da medição, que foi efectuada antes do nascer-do-sol (*predawn*) e/ou ao meio-dia solar (*midday*). Os valores apresentados referem-se a três dias de amostragem no Inverno e um dia no fim do Verão (1998), para cada local.

Em laboratório analisaram-se as amostras foliares colhidas em Janeiro e Agosto de 1999 de cada arbusto e exposição. Para avaliação do dano das membranas celulares, duas folhas de cada amostra foram imersas em 50mL de água destilada ultra-pura, em tubo hermético, e sujeitas a agitação suave durante 24h, à temperatura ambiente; ao fim deste tempo determinou-se a condutância eléctrica da solução ( $C_{\text{inicial}}$ ), com um medidor INSTRAN 10 (Dicoel, Barcelona, Espanha) submetendo-se depois os tubos a autoclavagem (30min, 120°C), para destruição total das membranas celulares; após 12 h em agitação à temperatura ambiente, foi novamente determinada a condutância eléctrica da solução ( $C_{\text{max}}$ ), calculando-se então o grau de degradação (%) das membranas nas folhas vivas como  $C_{\text{inicial}} * 100 / C_{\text{max}}$  (BOORSE *et al.* 1998).

A concentração de clorofila (a+b) foi determinada em 9-12 folhas por amostra com um aparelho SPAD-502 (Minolta, Japão), sendo os valores corrigidos para cada espécie de acordo com rectas de calibração previamente determinadas. Nas mesmas folhas foram determinados a área foliar (*LA, leaf area*) (Area-Meter Li-Cor 3100, Nebraska, EUA), espessura (*LT, leaf thickness*) (micrómetro Palmer) e peso seco (após secagem a 80°C, 24h), sendo posteriormente calculados a massa por área foliar (*LMA, leaf mass per area*) e a densidade (*LD, leaf density*). Foi medida, ao microscópio, a espessura dos parênquimas foliares (paliçada e lacunoso) em cortes transversais de cinco folhas por amostra de *Q. ilex*. Calculou-se o índice xerofítico ( $I_{\text{xer}}$ ) como a razão entre a espessura do parênquima em paliçada e a do mesófilo. A absorvância foliar foi medida em três folhas por amostra, com um espectroradiómetro (SE 590WB-R, Spectron Engineering, Denver, CO, EUA) ao qual se adaptou um sensor com um campo de visão de 15°, posicionado para o zénite em dias de céu limpo. A absorvância foi determinada como  $A=(R_a-R_b)$ , sendo  $R_a$  e  $R_b$ , respectivamente, a radiação medida sobre e sob a folha, a 679nm.

A significância da diferença entre médias foi avaliada através de ANOVA a 1 factor, seguida do teste de Tukey ( $p=0,05$ ) (Statistica, Statsoft, Inc., 1995, Tulsa, EUA).

## RESULTADOS

A eficiência fotoquímica máxima a meio do dia ( $F_v/F_m$  *midday*) foi semelhante no Inverno e no Verão, em ambas as espécies (Fig. 1). Antes do nascer-do-sol (*predawn*) os valores de  $F_v/F_m$  durante o Inverno foram semelhantes nos dois locais em folhas de *Q. ilex*, mas inferiores em Sant Llorenç no caso de *C. albidus*. Esta espécie mostrou valores diferentes entre os dois locais, quer no Inverno, quer no Verão. De um modo geral, as folhas expostas a Sul, de ambas as espécies, apresentaram menor  $F_v/F_m$  que as expostas a Norte, sendo a diferença mais acentuada no Inverno do que no Verão.

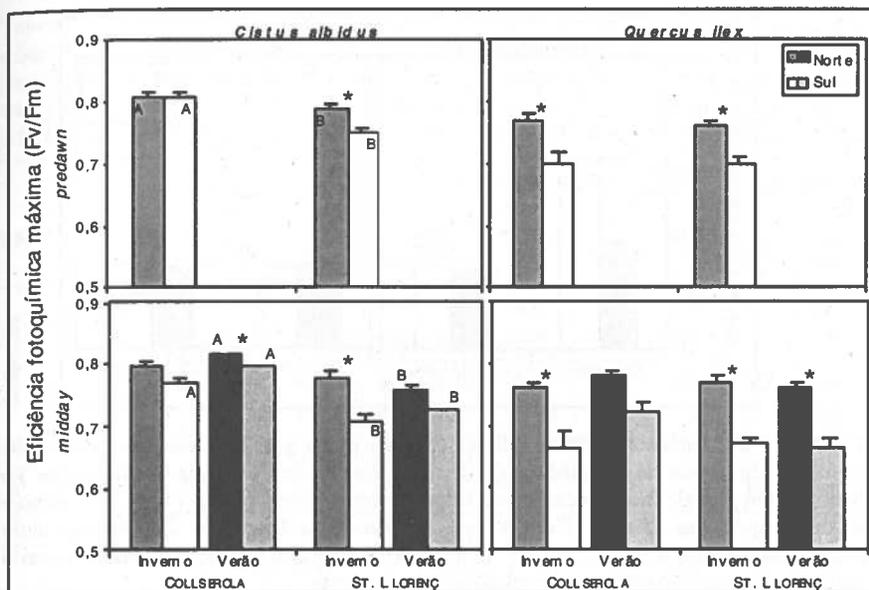


Figura 1 - Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) ao alvorecer (*predawn* - valor máximo diário) e a meio do dia (*midday* - valor mínimo diário) em *C. albidus* e *Q. ilex*. Medições efectuadas em Collserola (local "quente") e Sant Llorenç (local "frio"). Mostram-se valores médios  $\pm$  erro-padrão ( $n=3-15$ ) em duas estações do ano (Inverno e Verão) e duas exposições na copa (Norte e Sul). Indicam-se as diferenças significativas entre locais (maiúsculas) e exposições (\*),  $p < 0,05$ . A correspondência entre pares de letras é indicada pela posição que ocupam relativamente às barras.

A condutância eléctrica relativa, usada para estimar a perda de integridade das membranas celulares (BOORSE *et al.* 1998), foi superior em Collserola no caso de *C. albidus*; as folhas de *Q. ilex* expostas a Sul apresentaram a mesma tendência (Fig. 2). As folhas de *C. albidus* expostas a Sul mostraram-se significativamente mais afectadas do que as expostas a Norte em Collserola, mas não em Sant Llorenç. Neste local, foram as folhas Norte de *Q. ilex* que se mostraram mais danificadas no Inverno.

Observaram-se reduções significativas nos teores em clorofila do Inverno para o Verão, em ambas as espécies e locais (Fig. 3). Os valores foram geralmente mais altos em Sant Llorenç do que em Collserola no caso de *C. albidus*, ocorrendo o inverso em *Q. ilex*. Esta espécie foi também a que mostrou sempre diferenças no teor clorofilino entre as duas exposições estudadas.

A absorvância foliar diminuiu do Inverno para o Verão, embora a diferença só fosse significativa nas folhas expostas a Norte (Tabelas 1 e 2). *Cistus albidus* mostrou diferenças significativas entre folhas de Sul e de Norte em Collserola.

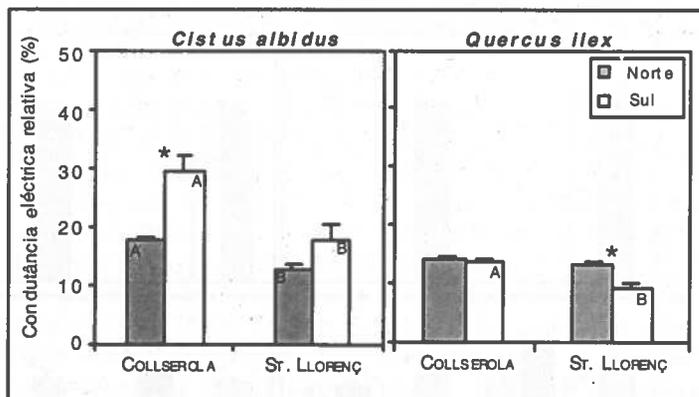


Figura 2 - Condutância eléctrica relativa (estimativa do grau de dano nas membranas celulares) das folhas de *C. albidus* e *Q. ilex* provenientes de Collserola (local "quente") e Sant Llorenç (local "frio"). Mostram-se valores médios  $\pm$  erro-padrão ( $n=5$ ) de Inverno e de duas exposições na copa (Norte e Sul). Indicam-se as diferenças significativas entre locais (maiúsculas) e exposições (\*),  $p<0,05$ . A correspondência entre pares de letras é indicada pela posição que ocupam relativamente às barras.

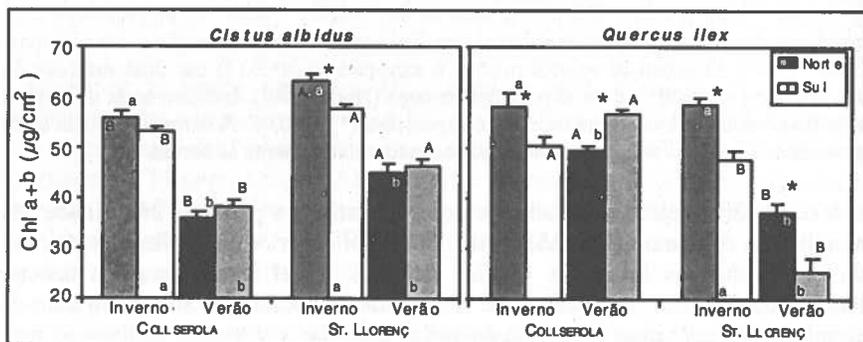


Figura 3 - Concentração em clorofila (a+b) das folhas de *C. albidus* e *Q. ilex* provenientes de Collserola (local "quente") e Sant Llorenç (local "frio"). Mostram-se valores médios  $\pm$  erro-padrão ( $n=12$ ) em duas estações do ano (Inverno e Verão) e duas exposições na copa (Norte e Sul). Indicam-se as diferenças significativas entre locais (maiúsculas), estações (minúsculas) e exposições (\*),  $p<0,05$ . A correspondência entre pares de letras é indicada pela posição que ocupam relativamente às barras.

A área foliar (LA) de *C. albidus* diminuiu significativamente do Inverno para o Verão, acompanhada do espessamento da folha (LT) e do aumento da sua massa por área foliar (LMA) (Tabela 1). Em *Q. ilex* as alterações estacionais das características foliares foram menos evidentes, notando-se contudo redução

Tabela 1 - Características foliares de *C. albidus* provenientes de Collserola (local quente) e Sant Llorenç (local frio): absorvância ( $A_{679nm}$ ), massa por área foliar (*LMA*), área (*LA*), densidade (*LD*) e espessura (*LT*). Mostram-se valores médios  $\pm$  e.p. em duas estações do ano (Verão e Inverno) e duas exposições na copa (Norte e Sul). São indicadas as diferenças significativas entre locais (maiúsculas) e estações (letras minúsculas),  $p < 0,05$ .

Local	Estação	$A_{679nm}$ (%)		$LMA$ (mg/cm <sup>2</sup> )*		$LA$ (cm <sup>2</sup> )*		$LD$ (mg/cm <sup>3</sup> )		$LT$ ( $\mu$ m)*	
		Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul
Collserola	Verão	81 (1) b	78 (7)	14,9 (0,8) <sup>A</sup>	14,6 (0,3)	1,44 (0,14)	1,43 (0,09) <sup>B</sup>	636 (13) <sup>AA</sup>	614 (10) <sup>A</sup>	237 (10)	237 (5)
	Inverno	91 (0) a	89 (0)	8,8 (0,3) <sup>B</sup>	12,0 (0,3)	2,42 (0,27)	2,14 (0,15)	564 (18) <sup>b</sup>	587 (13)	161 (7) <sup>B</sup>	208 (6)
St. Llorenç	Verão	85 (7)	85 (3)	12,8 (0,4) <sup>B</sup>	13,7 (0,3)	1,44 (0,11)	1,78 (0,13) <sup>A</sup>	531 (10) <sup>B</sup>	574 (10) <sup>B</sup>	241 (5)	241 (5)
	Inverno	92 (0)	90 (0)	10,9 (0,4) <sup>A</sup>	12,4 (0,3)	2,85 (0,22)	2,57 (0,20)	548 (23)	564 (18)	208 (12) <sup>A</sup>	224 (6)

<sup>§</sup>n=3; <sup>+</sup>n=9-12. \* todos os valores de Inverno significativamente diferentes dos seus correspondentes no Verão.

consistente de *LA*, *LD* e *LMA* em Sant Llorenç. As folhas de *Q. ilex* eram maiores e menos espessas em Sant Llorenç do que em Collserola. Relativamente ao local "quente", em Sant Llorenç as folhas de *C. albidus* expostas a Norte tinham maior *LMA*, e as de Inverno eram mais espessas. As diferenças entre exposições evidenciaram-se nas folhas de Inverno de *C. albidus* (*LMA*, *LT*) e durante o Verão nas de *Q. ilex* (*LMA*, *LT*). As folhas de *Q. ilex* apresentaram menor proporção de parênquima em paliçada em Collserola do que em Sant Llorenç (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

### Efeito sazonal (resposta a médio prazo)

A eficiência fotoquímica das folhas de *Q. ilex* e *C. albidus* revelou-se semelhante no Verão e no Inverno, e inferior à registada noutros períodos do ano (OLIVEIRA & PEÑUELAS 2001, 2002). Isto indica um grau de *stress* equiparável entre as duas estações do ano, embora com causas diferentes: escassez de água e alta temperatura no Verão, e baixas temperaturas no Inverno. Em ambas as épocas há um factor que, em conjunto com aqueles, potencia o *stress*: a intensa radiação.

Neste trabalho observaram-se as alterações morfo-estruturais que normalmente se descrevem como vantajosas para as folhas durante o período estival (e.g. KYPARISSIS & MANETAS 1993, GRATANI & BOMBELLI 2000). Assim, *C. albidus* apresentou folhas mais pequenas, mais espessas e com maior massa por

Tabela 2 - Características foliares de *Q. ilex* provenientes de Collserola (local quente) e Sant Llorenç (local frio): absorvância ( $A_{679nm}$ ), massa por área foliar ( $LMA$ ), área ( $LA$ ), espessura ( $LT$ ), densidade ( $LD$ ) e índice xerofítico ( $I_{xer}$ ). Mostram-se valores médios  $\pm$  e.p. em duas estações do ano (Verão e Inverno) e duas exposições na copa (Norte e Sul). São indicadas as diferenças significativas: entre locais (maiúsculas) e estações (letras minúsculas),  $p < 0,05$ .

Local	Est.	$A_{679nm}$ (%)		$LMA$ (mg/cm <sup>2</sup> )		$LA$ (cm <sup>2</sup> )		$LD$ (mg/cm <sup>3</sup> )		$LT$ ( $\mu$ m)		$I_{xer}$	
		Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul	Norte	Sul
Collserola	Verão	85 (1) b	87 (2)	18,7 (0,4) b A	21,5 (0,5) A	2,82 (0,18)	2,50 (0,12) A	799 (12) a A	734 (9) A	247 (4) b B	278 (4) B	-	-
	Inverno	90 (1) a	90 (1)	20,2 (0,4) a A	20,8 (0,6)	2,68 (0,20) B	2,19 (0,10) B	730 (7) b	753 (10)	277 (5) a	279 (9)	0,46 (0,01) B	0,41 (0,02)
St. Llorenç	Verão	87 (2) b	83 (5)	17,7 (0,2) B	19,8 (0,4) B	3,01 (0,15)	1,96 (0,11) B	645 (7) b B	665 (7) b B	275 (4) A	298 (4) A	-	-
	Inverno	94 (1) a	90 (1)	19,0 (0,4) B	21,7 (0,4)	3,52 (0,20) A	3,16 (0,18) A	703 (12) a	744 (8) a	272 (7)	291 (4)	0,52 (0,02) A	0,45 (0,02)

<sup>b</sup>n=3; <sup>a</sup>n=9-12; <sup>\*</sup>n=5. \* todos os valores de Inverno significativamente diferentes dos seus correspondentes no Verão, nas amostras de St. Llorenç.

área foliar no Verão. Estas características associam-se normalmente à adaptação a ambientes quentes e secos, tendo como resultado a minimização das perdas de água por transpiração. Em ambas as espécies diminuiu o teor clorofílico e a absorvância foliar, no Verão. Esta é uma das estratégias mais comuns das plantas mediterrânicas para reduzir a captação de energia luminosa excessiva durante esta estação (KYPARISSIS & MANETAS 1993, EHLERINGER & COMSTOCK 1987). A redução da concentração foliar de clorofila e o aumento de  $LMA$  e da espessura da folha constituem também mecanismos de adaptação ao frio (NÚÑEZ-OLIVERA et al. 1994, WARREN et al. 1998, FILELLA & PEÑUELAS 1999). Contudo, as plantas estudadas não pareceram alterar significativamente as características foliares para enfrentar a estação fria, nem mesmo *C. albidus* que, pelo seu dimorfismo foliar, poderia mais facilmente modificar as características das folhas de Inverno.

#### Efeito do local (resposta a longo prazo)

Considerando os eventuais efeitos da diferença climática entre os locais estudados, registaram-se respostas distintas entre as duas espécies. No local mais

frio (Sant Llorenç) *C. albidus* apresentou menor eficiência fotoquímica, mas maior concentração foliar de clorofila e densidade foliar que no local mais quente (Collserola), onde a degradação das membranas foi mais acentuada. Por seu turno, *Q. ilex* teve eficiências fotoquímicas semelhantes nos dois locais, mas menor teor clorofilino e maior índice xerofítico (i.e., maior proporção de parênquima em paliçada relativamente ao mesófilo, GRATANI & BOMBELLI 2000) em Sant Llorenç; no Inverno apresentou menor área foliar e danos membranares mais acentuados em Collserola. Embora as espécies estudadas não aparentem estratégias claras de protecção contra o frio, em contraste com as utilizadas para suportar o *stress* de Verão, a redução do teor clorofilino parece ter alguma relevância em *Q. ilex* quando se encontra em locais mais frios. Por seu lado, nestes locais, as folhas de *C. albidus* expostas a temperaturas mais baixas tendem a tornar-se mais espessas e com maior *LMA*.

Verificou-se que os danos de membrana não se relacionavam com a diminuição da eficiência fotoquímica, nem com as características climáticas dos locais. É possível que a poluição atmosférica fosse a causa destes resultados. Os níveis de poluentes passíveis de induzir degradação de membranas (LUCAS & PEÑUELAS 1989) foram, durante o período de estudo, mais elevados na estação mais próxima de Collserola do que na estação próxima de Sant Llorenç (Tabela 3). Isto poderia explicar os valores mais altos de condutância eléctrica registados nas folhas colhidas em Collserola, mas para o comprovar seria necessária uma abordagem experimental mais específica para avaliação dos efeitos dos poluentes atmosféricos nestas plantas.

Tabela 3 - Níveis de diversos poluentes atmosféricos nas estações mais próximas dos locais estudados: Gràcia (Collserola, local "quente") e Terrassa (Sant Llorenç, local "frio"). Os valores são médias referentes ao período de Janeiro a Março de 1999, excepto AOT20 (*Accumulated Over Threshold 20*), que é a concentração de ozono acima de 20 ppbv acumulada durante esse período.

Local	O <sub>3</sub> (ppbv)	AOT20 (ppbv)	SO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	NO ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	NO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
Gràcia (Collserola)	26	3630	11,2	164	88
Terrassa (St. Llorenç)	13	676	6,8	98	61

### Efeito da exposição

Tal como já foi salientado noutros trabalhos, a posição das folhas na copa influencia o seu comportamento e características estruturais (OLIVEIRA & PEÑUELAS 1999, 2000). De um modo geral, as folhas expostas a Sul estão mais sujeitas às limitações ambientais e desenvolveram mais características xeromórficas. Apesar disso foram normalmente as que apresentaram menores eficiências fotoquímicas e maior degradação de membranas no Inverno.

## CONCLUSÕES

Em *Q. ilex* e *C. albidus* o frio sazonal fez diminuir a eficiência fotoquímica relativamente a outros períodos do ano, atingindo níveis de fotoinibição semelhantes aos do Verão. As folhas destas espécies apresentam alterações morfo-estruturais vantajosas para superar o *stress* estival. Algumas dessas alterações são também benéficas no Inverno, mas as plantas não parecem desenvolver características específicas para enfrentar as temperaturas baixas que ocorrem sazonalmente (resposta a médio prazo). No entanto, nota-se que, num local mais frio (resposta a longo prazo), as folhas mais ensombradas (e, portanto, expostas a menores temperaturas) tendem a desenvolver características de robustez tais como o incremento de *LMA* e de espessura (*C. albidus*) ou o índice xerofítico (*Q. ilex*). Apesar destas alterações, a espécie semi-decídua mostrou-se fotoquimicamente mais susceptível em ambientes mais frios, o que poderá associar-se ao facto de, ao contrário de *Q. ilex*, não reduzir o teor foliar em clorofila e, conseqüentemente, não evitar o excesso de energia luminosa. A degradação celular devida ao frio pareceu pouco importante, sendo as folhas ensombradas da espécie perenifolia no local mais frio as mais afectadas. É possível que o aumento da degradação observado no local mais quente se deva a um maior grau de poluição.

## AGRADECIMENTOS

À Administração do Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac pela autorização de realização destes trabalhos num dos locais. A J. Sardans pelas observações histológicas, a A. Ribas pelos dados de poluição atmosférica, a I. Filella pela colaboração nas determinações da absorvância foliar e a O. Correia pela revisão do manuscrito. Este trabalho foi possível graças ao Programa PRAXIS XXI (BPD/11810/97, G.O.) e aos projectos MCYT REN2000-003 e REN 2001-0278 (J.P.).

## REFERÊNCIAS

- BOORSE, G. C., BOSMA, T. L., MEYER, A. -C., EWERS, F. W. & DAVIS, S. D. 1998. Comparative methods of estimating freezing temperatures and freezing injury in leaves of chaparral shrubs. *Int. J. Plant Sci.* 159(3): 513-521.
- EHLERINGER, J. R. & COMSTOCK, J. 1987. Leaf absorptance and leaf angle: mechanisms for stress avoidance. In *Plant response to stress. Functional analysis in Mediterranean ecosystems* (eds. J. D. Tenhunen, F. M. Catarino, O. L. Lange, W. C. Oechel), NATO ASI Series, Vol. G15, pp. 55-76, Springer, Berlin.
- FILELLA, I. & PEÑUELAS, J. 1999. Altitudinal differences in UV absorbance, UV reflectance and related morphological traits of *Quercus ilex* and *Rhododendron ferrugineum* in the Mediterranean region. *Plant Ecol.* 145: 157-165.
- GRATANI, L. & BOMBELLI, A. 2000. Correlation between leaf age and other leaf traits in three Mediterranean maquis shrub species: *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia* and *Cistus incanus*. *Environ. Exp. Bot.* 43: 141-153.
- KYPARISSIS, A. & MANETAS, Y. 1993. Seasonal leaf dimorphism in a semi-deciduous Mediterranean shrub: ecophysiological comparisons between winter and summer leaves. *Acta Oecol.* 14(1): 23-32.

- LUCAS, P. W. & PEÑUELAS, J. 1989. The effects of ozone and growth temperature on the development of winter injury in sitka spruce seedlings. In: *Environmental Research with Plants in Closed Chambers*. Air Pollution Research 26, Commission of the European Communities, pp. 381-395. Munich.
- MITRAKOS, K. 1980. Plant life under mediterranean climatic conditions. *Portug. Acta Biol. (A)* XVI (1-4): 33-44.
- NÚÑEZ-OLIVERA, E., MARTÍNEZ-ABAIGAR, J. & ESCUDERO, J. C. 1994. Chlorophyll content of a Mediterranean shrub (*Cistus ladanifer* L.) over a latitude and altitude gradient in the Iberian Peninsula. *Photosynthetica* 30(1): 133-142.
- OLIVEIRA, G. & PEÑUELAS, J. 1999. Respostas fotoquímicas e fenológicas de uma espécie perenifólia e de uma espécie semi-decídua durante o Inverno mediterrânico. *Revista Biol. (Lisboa)* 17: 249-259.
- OLIVEIRA, G. & PEÑUELAS, J. 2000. Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecol.* 21(2): 97-107.
- OLIVEIRA, G. & PEÑUELAS, J. 2001. Allocation of absorbed light energy into photochemistry and dissipation in a semi-deciduous and an evergreen Mediterranean woody species during winter. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 471-480.
- OLIVEIRA, G. & PEÑUELAS, J. 2002. Comparative protective strategies of *Cistus albidus* and *Quercus ilex* facing photoinhibitory winter conditions. *Environm. Exp. Bot.* 47: 281-289.
- WARREN, C. R., HOVENDEN, M. J., DAVIDSON, N. J. & BEADLE, C. L. 1998. Cold hardening reduces photoinhibition of *Eucalyptus nitens* and *E. pauciflora* at frost temperatures. *Oecologia* 113: 350-359.

**BIOLOGY OF THE ROACH (*CHONDROSTOMA  
MACROLEPIDOTUS*) POPULATION IN THE PROTECTED  
AREA OF THE LAGOONS OF BERTIANDOS AND OF SÃO  
PEDRO DE ARCOS (NORTHERN PORTUGAL)**

**Hugo Maia & Alexandre Valente**

Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto  
Unidade de Investigação em Eco-Etologia, Unidade FCT N° 331/94  
Praça Gomes Teixeira, 4099-002 Porto – Portugal  
hmaia@fc.up.pt

Maia, H. & Valente, A. (2004). Biology of the roach (*Chondrostoma macrolepidotus*) population in the Protected Area of the Lagoons of Bertíandos and of São Pedro de Arcos (Northern Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 65-78.

The roach (*Chondrostoma macrolepidotus*) is an Iberian endemism considered threatened. The population that exists in the Protected Area of the Lagoons of Bertíandos and of São Pedro de Arcos (PALBSPA) watershed has consequently an enormous patrimonial value. Therefore more information about its biology is essential for further and appropriate management strategies.

PALBSPA is a regional protected wetland situated in Ponte de Lima municipality, northwest of Portugal. It has an area of 350 ha which comprises the lower river section of the river Estorãos, two lagoons and some ditches resulting in a fluvial system with permanent and temporary freshwater habitats.

The study of the roach was conducted from November 2001 to October 2002. Electrofishing was carried out in a quarterly basis in representative sites of the aquatic habitats within the PALBSPA. A fish trap installed in the river Estorãos allowed the collection of additional information on population movements and reproduction.

The roach is the most abundant fish population and is widely distributed in the PALBSPA hydrographic basin. The mean estimated density is 19.8 ind./100m<sup>2</sup> and the mean estimated biomass is 117.8 g/100m<sup>2</sup>. Six age classes (0+ to 5+) were identified but the 2+ class was the most represented. Growth is practically isometric and can reach a theoretical maximum length of 16.89 cm.

An increase of the roach movements was detected in late March, coinciding with the proximity of the spawning period,

but sexually mature specimens were only caught in April. The water temperature was the main abiotic factor related to these movements.

Our results suggest that the population characteristics do not differ substantially from those of other roach populations. Further research on other aspects of roach biology, namely the spawning behaviour and the inventory and characterization of the spawning grounds is essential to the definition of adequate conservation strategies.

Keywords: *Chondrostoma macrolepidotus*, density, growth, movement, Portugal.

Maia, H. & Valente, A. (2004). Biologia da população de ruivaco (*Chondrostoma macrolepidotus*) na Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandos e São Pedro de Arcos (Norte de Portugal). *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 65-78.

O ruivaco (*Chondrostoma macrolepidotus*) é uma espécie endémica da Península Ibérica, onde é considerada ameaçada. Esse seu carácter confere-lhe uma importância patrimonial acrescida e da qual resulta uma necessidade imperiosa de um aprofundamento dos conhecimentos sobre sua biologia, visando no futuro a implementação de medidas adequadas de gestão.

A Paisagem Protegida das Lagoas de Bertandos e S. Pedro de Arcos (PPLBSPA) é uma zona húmida protegida de âmbito regional situada no concelho de Ponte de Lima. Abrange uma área de 350 ha que se enquadra no terço inferior da bacia hidrográfica do rio Estorãos e forma-se em torno de duas lagoas e do rio, resultando num sistema fluvial de habitats temporários e permanentes.

O estudo da população de ruivaco decorreu entre Novembro de 2001 e Outubro de 2002. Foram realizadas amostragens trimestrais, recorrendo à pesca com electricidade, em locais representativos dos habitats aquáticos da PPLBSPA. Um sistema de armadilhas instalado no rio Estorãos permitiu obter informações adicionais sobre os movimentos da população.

A população de ruivaco é, localmente, a mais abundante e apresenta-se distribuída por toda a área da PPLBSPA. Os valores de densidade média estimados são de 19,8 ind./100m<sup>2</sup>, a que corresponde uma biomassa média estimada em 117,8 g/100m<sup>2</sup>. Foram identificados, após análise das escamas, indivíduos pertencentes a 6 classes de idade (0<sup>+</sup> a 5<sup>+</sup>), com maior representação da classe 2<sup>+</sup>. O crescimento é praticamente isométrico podendo ser atingido um comprimento máximo teórico de 16,89 cm.

As capturas no sistema de armadilhas permitiram detectar um

aumento das deslocações de ruivacos a partir do final do mês de Março. Este aumento de actividade coincidiu com a proximidade do período reprodutor, já que a partir do início de Abril começaram a surgir indivíduos sexualmente maduros. A temperatura da água foi o principal factor ambiental relacionado com estes movimentos.

As informações recolhidas permitem concluir que esta população não apresenta características muito diversas das de outras populações de ruivacos. O prosseguimento de investigações, nomeadamente a análise do comportamento reprodutor e o levantamento e caracterização dos locais de desova, é essencial na definição de medidas de conservação apropriadas para este importante património natural.

Palavras-chave: *Chondrostoma macrolepidotus*, densidade, crescimento, movimento, Portugal.

## INTRODUCTION

Since a considerable number of Portuguese fish species are Iberian endemisms (ALMAÇA, 1995) the study of their biology is essential to the further development of adequate management strategies aiming their conservation.

The species systematic was first studied by COLLARES-PEREIRA (1979, 1983) and ZARDOYA & DOADRIO (1998) but has been recently revised and following genetic analysis has assigned some previously considered *Chondrostoma arcasii* Portuguese populations to *C. macrolepidotus* (DOADRIO, 2001; V. ALMADA & J. ROBALO, pers. com.).

Natural geographical distribution has consequently been updated and the species is found from the river Lima basin to the river Tornada basin (V. ALMADA & J. ROBALO, pers. com.). This species is not only an endemic one but its also considered threatened in Portugal (SNPRCN, 1991).

The literature on the biology and ecology of *C. macrolepidotus* is scarce and specially refers to the Lima basin (MAIA & VALENTE, 1999) and according to the suggestions of DOADRIO (2001) presumably also to the river Ancora (FORMIGO, 1997; FORMIGO & PENCZAK, 1998; and PENCZAK & FORMIGO, 2000). According to DOADRIO (2001), *C. arcasii* only occurs in Spanish rivers where its biology was already studied (LOBÓN-CERVIÁ, *et al.*, 1985; ROJO & RAMOS, 1988 and RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ, 1989).

In contrast, data on lengths at age, reproductive period and influence of abiotic parameters on the population mobility is still lacking for *C. macrolepidotus*.

The population inhabiting the Protected Area of the Lagoons of Bertíandos and of São Pedro de Arcos, a regional protected area located in the Northwest of Portugal, was studied and data on the density, biomass, condition factor, age and growth patterns, population mobility and reproductive parameters were collected. Our results are compared with the available data for the Portuguese *C. macrolepidotus* populations and its sister species *C. arcasii* populations.

## MATERIAL AND METHODS

### Study area

The Protected Area of the Lagoons of Bertandos and of São Pedro de Arcos (PALBSPA) is a 350 ha protected wetland (figure 1) located in the Ponte de Lima municipality (Northwest of Portugal).

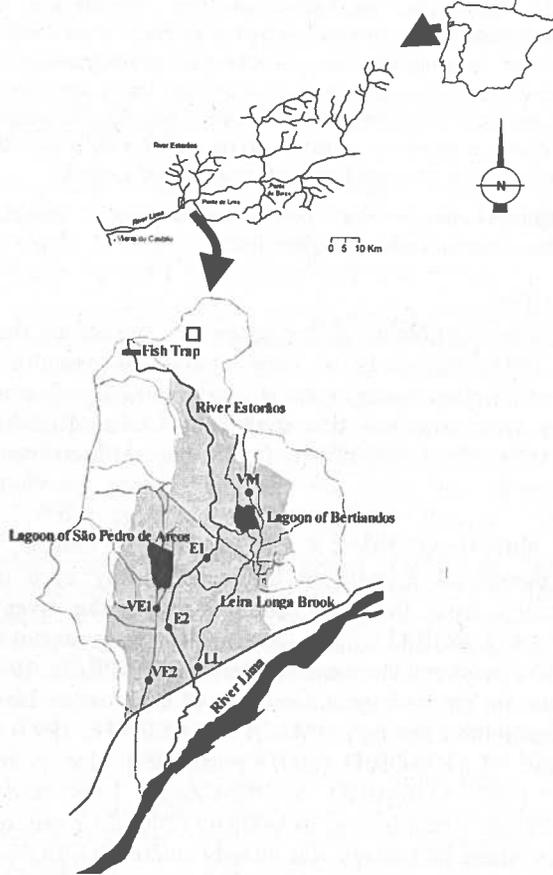


Figure 1 – Study area location in the river Lima hydrographic basin in Northern Portugal. The PALBSPA area and its main water bodies (bottom). Sampling sites (E1; E2; VE1; VE2; VM; LL) and the fish trap installed in river Estorãos are shown – scale 1: 40000.

### Sampling

The study of the roach was conducted from November 2001 to October 2002. Electrofishing (600 V, d. c. current) was carried out in a quarterly basis. Six sampling sites with 40-70 metres were selected as representative of the aquatic habitats within the PPLBSPA (figure 1). These sites were closed with stop nets

(mesh size 0.5 cm) before sampling. All fish caught were measured (fork length to the nearest mm) and weighted (to the nearest 0.1g). Scale samples were collected (OMBREDANE & BAGLINIÈRE, 1992) for age determination. All fish were returned to the stream.

### Density and biomass

Density and biomass were estimated according to the two-pass removal method with constant sampling effort - maximum likelihood estimator of Seber & Le Cren (LOBÓN-CERVIÁ, 1991). When the catch probability was very low or only one fish removal was possible, other catch probability values were utilized (LOBÓN-CERVIÁ, 1991). In such cases we used catch probability values obtained in other sampling sites where hydrological conditions, sampling season or site characteristics were similar (LOBÓN-CERVIÁ, 1991).

### Age, condition and growth

Age classes were identified by scale reading (BAGENAL & TESCH, 1978). The Fulton condition factor and the length-weight relationship parameters were calculated (BAGENAL & TESCH, 1978). Total scale radius and distance from the focus to each annulus were measured on the latero-ventral field. The length at each age class was obtained by backcalculation and the Von Bertalanffy's growth equation parameters were estimated (BAGENAL & TESCH, 1978). The instantaneous growth rate was also determined (BAGENAL & TESCH, 1978).

### Mobility and reproduction

A fish trap was installed in the river Estorãos to obtain additional information about the population movements (figure 1). The system consisted of two fyke-nets (mesh size 0.5 cm) which allowed the capture of all the fish moving either upstream or downstream. All captured fish were measured (fork length to the nearest mm) and weighted (to the nearest 0.1g). Sex was determined by abdominal compression. All fish were returned to the stream.

From November 2001 to 13 June 2002, water temperature (° C), water depth (cm) and current velocity (cm/s) were measured three times a day (at 09:00, 17:00 and 22:00 hours) near the fish trap, and the fyke-nets were controlled for the presence of fish. During extreme flood conditions the fish trap was deactivated.

The data was analysed to test possible relationships between fish movements and water temperature (° C), water flow (m<sup>3</sup>/s), current velocity (cm/s) and water depth (cm). Linear regression parameters were calculated and the correlation coefficients obtained were transformed into a t-student ratio (D' HAINAUT, 1992) to test the statistical significance of the relationships found.

## RESULTS

### Density and biomass

The estimated density values ranged from 1.7 to 129.70 ind./100 m<sup>2</sup> (table 1).

The overall mean for the PALBSPA area was 19.8 ind. /100 m<sup>2</sup> with an estimated mean biomass of 117.8 g /100 m<sup>2</sup>. During the first sampling period (December 2001) only one capture was carried out in all sites except in site VE1 since the water surface was frozen. In later sampling dates (July and October 2002) some sites were not sampled because they were completely dry.

Table 1 – Density (*D*, ind. /100 m<sup>2</sup>), biomass (*B*, g/100 m<sup>2</sup>), confidence intervals (95%) and catch probability (*p*) values for the roach population in the different sampling dates and sites.

Date		E1	E2	VE1	VE2	VM	LL
Dec 01	<i>D</i>	5.32	4.31	0	23.93	98.13	44.87
		1.49-9.16	4.26-4.68		20.93-27.48	93.56-102.70	41.13-65.63
	<i>B</i>	15.31	22.88	0	162.17	763.47	295.47
		4.28-26.35	22.60-24.85		138.15-186.18	727.92-799.02	270.85-432.11
	<i>p</i>	0.89	0.89	-	0.65	0.39	0.92
Apr 02	<i>D</i>	2.11	1.7	0	14.81	129.70	9.28
		-	1.28-4.59		13.02-16.61	81.48-208.42	9.22-9.78
	<i>B</i>	4.94	8.51	0	89.69	772.45	56.17
		-	6.38-22.96		78.81-100.57	485.25-1241.20	55.78-59.18
	<i>p</i>	1	0.50	-	0.65	0.39	0.92
Jul 02	<i>D</i>	31.84	11.82	0	42.25	0	0
		18.95-52.90	11.35-12.30		37.04-50.83		
	<i>B</i>	137.53	42.63	0	226.90	0	0
		81.84-228.50	40.92-44.35		198.89-272.94		
	<i>p</i>	0.36	0.36	-	0.65	-	-
Oct 02	<i>D</i>	43.27	10.89	0	0	0	0
		31.32-56.42	9.36-14.65				
	<i>B</i>	187.28	31.79	0	0	0	0
		135.53-241.61	27.32-42.75				
	<i>p</i>	0.47	0.63	-	-	-	-

### Age, condition and growth

The fish caught pertained to 6 age classes (0<sup>+</sup> to 5<sup>+</sup>) (figure 2). The 2<sup>+</sup> age class was the most represented but we believe that the 0<sup>+</sup> fraction was underestimated.

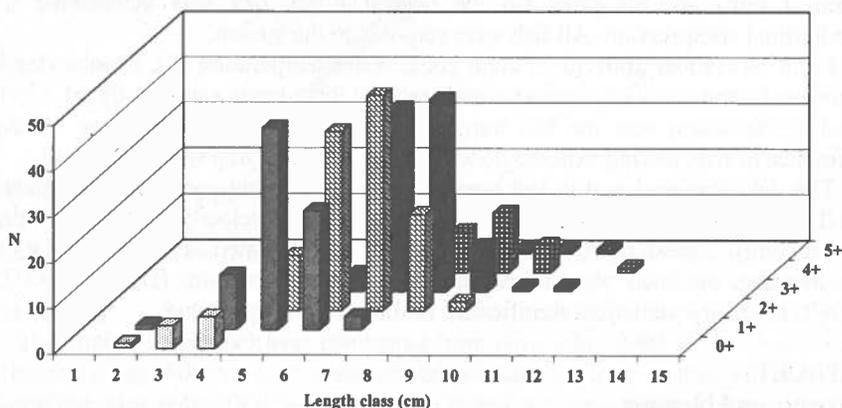


Figure 2 – Distribution of the roach catch according to length and age classes (N = 355).

In fact we preferred to ignore the very small juveniles in order to avoid misleading results as *Chondrostoma macrolepidotus* and *Squalius carolitertii* juveniles are morphologically similar.

The length-weight relationship parameters reveal an isometric growth (table 2) and the Fulton's condition factor values (table 3) indicate that fish were in good physiological conditions. However, the condition factors observed in the ditches and in Leira Longa brook were significantly higher (t-test,  $p < 0.001$ ) than the observed in the river Estorãos. The condition factor increased in April coinciding with the reproductive period. The condition factor for the mature fish was significantly higher (t-test,  $p < 0.001$ ) in females than in males (table 3).

Table 2 – Length-weight relationship parameters for the roach caught in the fish trap and for those caught in the sampling sites.

		a	b	r <sup>2</sup>	N
Fish Trap	Females	0.0153	2.94	0.96	123
	Males	0.0144	2.94	0.94	80
	Total	0.0143	2.95	0.95	478
Sampling sites	Total	0.0101	3.13	0.97	533

The power model  $L = 5.7779 \times S^{0.6531}$  ( $n = 355$  and  $r^2 = 0.78$ ;  $L$  = fork length;  $S$  = scale length) showed the best fit for the body and scale growth relationship. Using backcalculated lengths at age (table 4) we estimated the Von Bertalanffy growth equation:  $L_t = 16.89 [1 - e^{(-0.145(t + 0.788)}]$ . The roach can achieve an ultimate length of 16.89 cm with a low growth rate. The mean instantaneous weight growth rates reveal a major growth from the first to the second year of life followed by a decrease with age (table 4).

### Mobility and reproduction

The daily mean water temperature values ranged from 6.2 to 18.4 °C with a mean daily fluctuation of 1.3 °C (0.3 to 2.5 °C) and water discharge values ranged from 0.18 to 25.01 m<sup>3</sup>/s (figure 3). Water depth showed important fluctuations during winter floods (34.3 to 215 cm) and the current velocity ranged from 0.07 to 1 m/s.

From the 478 individuals caught in the fish trap 68.5 % were moving upstream (figure 3). The majority of the movements was observed from late March onwards and were mainly correlated with water temperature (table 5) and occurred after a period of high discharge (see figure 3).

The fish trap was operational during almost all the reproductive period, thus it was possible to analyse the activity during this period. Mature individuals appeared in early April (figure 4) and they were caught in the fish trap until 13 June 2002 when traps were removed. Females' length ranged from 5.0 to 11.8 cm and males' length ranged from 5.8 to 11.0 cm (figure 5).

Table 3 – Mean Fulton's condition factor for the roach caught in the fish trap and in the sampling sites. CF – Condition Factor; SD – Standard Deviation.

			Nov 01	Dec 01	Jan 02	Feb 02	Mar 02	Apr 02	May 02	Jun 02	Jul 02	Oct 02	Total
Fish Trap	Females	CF	-	-	-	-	-	1.36	1.41	1.33	-	-	1.37
		SD	-	-	-	-	-	0.17	0.19	0.20	-	-	0.17
		N	-	-	-	-	-	93	23	6	-	-	123
	Males	CF	-	-	-	-	-	1.30	1.28	1.39	-	-	1.29
		SD	-	-	-	-	-	0.11	0.14	0.08	-	-	0.12
		N	-	-	-	-	-	36	42	2	-	-	80
	Total	CF	1.46	1.41	1.29	1.21	1.29	1.33	1.28	1.33	-	-	1.31
		SD	0.19	0.26	0.12	0.10	0.14	0.17	0.20	0.17	-	-	0.18
		N	2	4	9	12	53	267	117	14	-	-	478
Sampling Sites	E1	CF	-	1.16	-	-	-	1.25	-	-	1.26	1.26	1.24
		SD	-	0.18	-	-	-	0.16	-	-	0.12	0.19	0.17
		N	-	35	-	-	-	8	-	-	68	118	229
	E2	CF	-	1.23	-	-	-	1.33	-	-	1.26	1.14	1.20
		SD	-	0.12	-	-	-	0.01	-	-	0.10	0.08	0.11
		N	-	10	-	-	-	3	-	-	13	22	48
	LL	CF	-	1.34	-	-	-	1.40	-	-	-	-	1.35
		SD	-	0.13	-	-	-	0.09	-	-	-	-	0.13
		N	-	57	-	-	-	12	-	-	-	-	69
	VM	CF	-	1.36	-	-	-	1.43	-	-	-	-	1.40
		SD	-	0.13	-	-	-	0.11	-	-	-	-	0.12
		N	-	31	-	-	-	62	-	-	-	-	93
	VE1	CF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VE2	CF	-	1.34	-	-	-	1.38	-	-	1.43	-	1.40
		SD	-	0.08	-	-	-	0.13	-	-	0.11	-	0.11
		N	-	21	-	-	-	23	-	-	50	-	94
	Total	CF	-	1.30	-	-	-	1.40	-	-	1.33	1.24	1.31
		SD	-	0.16	-	-	-	0.12	-	-	0.14	0.19	0.17
		N	-	154	-	-	-	108	-	-	131	140	533

Table 4 – Mean backcalculated lengths at age and mean instantaneous growth rates ( $\bar{G}$ ) for the different age intervals for the roach population.

Age class \ Age	I	II	III	IV	V	N
1+	3.87					86
2+	3.89	5.88				121
3+	3.74	5.46	7.00			98
4+	3.60	5.25	7.15	8.39		32
5+	3.84	5.13	6.76	8.80	10.00	3
Global Mean	3.79	5.43	6.97	8.59	10.00	340
$\bar{G}$	1.248	0.856	0.541	0.413		340

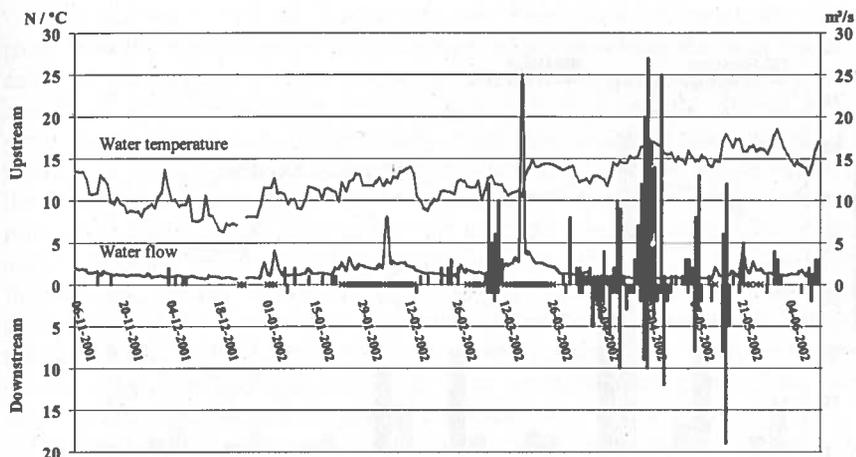


Figure 3 – Number of roach caught in the fish trap (upstream – upper columns; downstream – lower columns) during the study period and the daily mean water temperature and water flow. Marks in the X-axis correspond to the period of system deactivation.

A significant relationship (ANOVA,  $p < 0.05$ ) between the number of mature individuals/spawners caught and the changes in water temperature was also found; the number of spawners increased gradually since the first appearance of mature specimens (at April 9) and until the 4<sup>th</sup> week of April. In the same period the mean water temperature raised about 3 °C while the mean water flow remained unchanged (figure 4). Furthermore, although both sexes first appear at the same time, in a first wave females were much more abundant while males appeared in higher numbers in a second wave (figure 4).

Overall, the sex ratio in the river Estorãos was favourable to the females (1.54 ♀: 1 ♂) and according to our data sexual maturity is attained during its second year of life.

Table 5 –T-student ratio values for the relationships between the number of roach caught in each direction and the abiotic parameters. t – t-student ratio; DF – degrees of freedom; S – significance; \*\* very significant ( $P < 0, 01$ ); \* slightly significant ( $P < 0, 05$ ); ns – not significant.

Parameters	Downstream trap			Upstream trap		
	t	S	DF	t	S	DF
Water temperature	2,854	**	40	4,637	**	70
Water flow	2,236	*	40	1,521	ns	70
Current velocity	1,794	ns	40	2,233	*	70
Water depth	2,164	*	40	1,164	ns	70

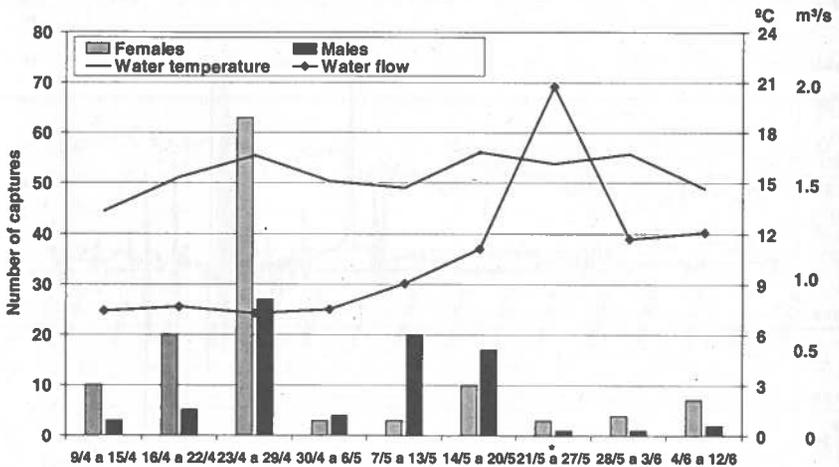


Figure 4 – Number of mature roach caught in the fish trap during the reproductive period and evolution of the weekly mean water temperature and flow. \* Fish trap deactivated during three days.

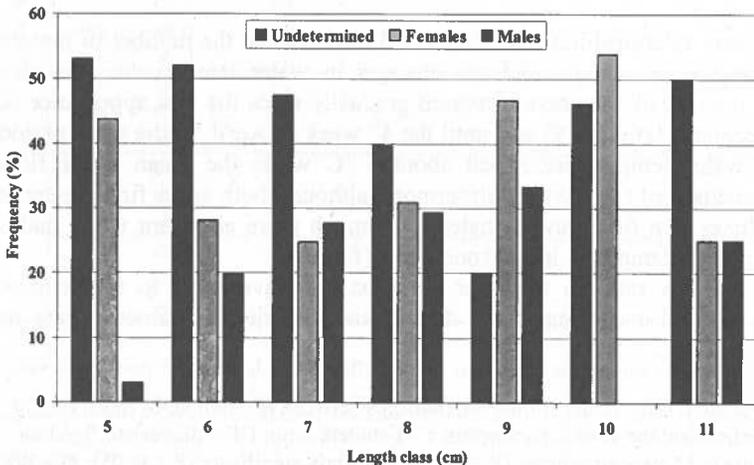


Figure 5 – Distribution frequency (%) of the roach caught in the fish trap during the reproductive period by length classes. Undetermined (N = 174); Females (N = 123) and Males (N = 80).

## DISCUSSION

The roach population is widely distributed within the PALBSPA hydrographic basin. The only exception is the VE1 site, near lagoon of São Pedro de Arcos, where no fish was caught. However we believe that fish can enter this ditch, at least when major floods occur.

Some fluctuations of the density estimates were observed, especially in the river Estorãos sampling sites. The decrease observed during the winter period could be a consequence of the natural mortality resulting from the unfavourable conditions. The development of the young-of-the-year and the drying out of some small brooks and ditches might have contributed to the considerable increase in the fish density observed in July and October. The higher values of the density estimates obtained in the ditches and in the Leira Longa brook are probably related to the existence of an adequate overwintering habitat (low current velocity, abundant feeding and/or shelter and refuge from predators); the fish moved laterally to the floodplain trying to escape to the high water discharges and were trapped in these ditches and brooks. LUCAS & BARAS (2001) referred to that even when fish normally remain within the river channel during winter, during flood events fish often temporally move out of the river channel, into the inundated floodplain, into backwaters or tributaries.

The mean density estimate is similar to the values previously referred to by N. BARROS (pers. com.) (16.69 ind./100 m<sup>2</sup>) for the river Estorãos. MAIA & VALENTE (1999) referred lower values (8.15 ind./100 m<sup>2</sup>) for upper stretches of the same river and values ten times higher (137.67 ind./100 m<sup>2</sup>) for the river Vade mouth. FORMIGO & PENCZAK (1998) also observed higher mean densities for the river Âncora (55.72 ind./100 m<sup>2</sup>). Some caution is however necessary when considering the estimated densities because the catch probability was low in several occasions, as also referred in other studies (VALENTE, 1993; FORMIGO, 1997; MAIA & VALENTE, 1999; N. BARROS, pers. com.).

The age structure is in accordance with the observations in Portuguese rivers (FORMIGO, 1997; N. BARROS, pers. com.) and also for its sister species (*Chondrostoma arcasii*) in Spanish rivers (ROJO & RAMOS, 1988; RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ, 1989). Only LOBÓN-CERVIÁ *et al.* (1985) refers a smaller longevity (4<sup>+</sup>) in the Pinnila Reservoir (Spain).

The results for the length-weight relationship are in agreement with those referred to by ROJO & RAMOS (1988) and RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ (1989) for *C. arcasii*. Only LOBÓN-CERVIÁ *et al.* (1985) referred significant differences between sexes. The higher condition factor determined for the roach caught in the ditches and in the Leira Longa brook might be an indicator of the better conditions referred previously. The highest condition factor found for the females probably reflects the normal gonad maturation cycle as in *C. arcasii* (ROJO & RAMOS, 1988).

The backcalculated lengths revealed values similar to those referred by RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ (1989) for *C. arcasii* populations in the river Ucero but somewhat higher than the values observed in the river Moros. The instantaneous growth rates exhibit the same pattern observed for *C. arcasii* in the same Spanish rivers (RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ, 1989), although during the initial period the growth was lower. The estimated ultimate length for the

PALBSPA roach population is superior to those referred to by N. BARROS (pers. com.) for an upstream section of the river Estorãos and other tributaries of the river Lima and similar to the values obtained by FORMIGO (1997). Furthermore, the estimated final length is higher than the values referred to for *C. arcasii* populations in Spanish rivers (LOBÓN-CERVIÁ *et al.*, 1985; ROJO & RAMOS, 1988; RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ, 1989).

Sexual maturity is reached during roach second year of life as also referred by RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ (1989) for *C. arcasii*. The different methodology used to determine the sexual maturity might explain the smaller percentage of mature individuals found (figure 5). A sex ratio favourable to the females was also reported by RINCÓN & LOBÓN-CERVIÁ (1989) to *C. arcasii*, although these authors observed that the females only dominate the 3<sup>+</sup> and older classes.

More over, our results indicate that water temperature is apparently the major factor associated with the fish movements as also referred to by SANTOS *et al.* (2002) for the upstream movement of the roach population in the river Lima. This mobility is enhanced by the variation of the environmental parameters and is associated to the proximity of the reproductive period. Water flow, water temperature and photoperiod are some of the environmental variables that have been demonstrated to have an important role in the regulation of fish movements, either upstream or downstream, as well as in the migratory phenomena (JONSSON, 1991). Fish benefit from the conditions created by the previous increase in water flow and the rise of water temperature in the spring when seeking appropriated spawning grounds.

Overall, the results obtained during the present study suggest that the characteristics of this population do not differ substantially from those referred to other *Chondrostoma macrolepidotus* populations as well as for its sister species *C. arcasii* populations. However, *C. macrolepidotus* final length ( $L_{\infty}$ ) is bigger.

Further research in the PALBSPA should though be directed to the inventory and characterization of the spawning grounds, and to the description of roach spawning behaviour. Such information will certainly contribute for the adjustment of the management strategies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Carla Maia, Filipe Pires, Jorge Silva, Susana Carneiro, Pedro Correia and António Sá Pereira for their help during the fieldwork. We thank the Protected Area of the Lagoons of Bertandos and of São Pedro de Arcos and to the Ponte de Lima Municipality for all their support. We also thank to the Direcção Geral das Florestas. This study is part of the project "Inventory of the fish community in the Protected Area of the Lagoons of Bertandos and of São Pedro de Arcos" financed by Ponte de Lima Municipality.

#### REFERENCES

- ALMAÇA, C. (1995). Freshwater fish and their conservation in Portugal. *Biol. Conserv.* 72: 125-127.

- BAGENAL, T. B. & TESCH, F. W. (1978). Age and Growth. In: Bagenal, T. B. (Ed.). *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. IPB Handbook 3. 3<sup>rd</sup> Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford - London: 101-136.
- COLLARES-PEREIRA, M. J. (1979). On the systematic position of the Iberian CYPRINIDAE forms *arcasii* (STEINDACHNER, 1866) and *macrolepidotus* (STEINDACHNER, 1866) of the genus *Rutilus*, *Arq. Mus. Bocage* 6 (22): 361-393.
- COLLARES-PEREIRA, M. J. (1983). *Estudo sistemático e citogenético dos pequenos ciprinídeos ibéricos pertencentes aos géneros Chondrostoma Agassiz, 1835, Rutilus Rafinesque, 1820 e Anaecypris Collares-Pereira, 1983*. PH. D. Thesis. Lisbon University. Portugal. 511 pp.
- D'HAINAUT, L. (1992). *Conceitos e métodos da estatística. Vol. II - Duas ou três variáveis segundo duas ou três dimensões*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisbon: 366 pp.
- DOADRIO, I. (Ed.) 2001. *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España*. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- FONTOURA, A. P. (1989). Evolução da qualidade da água do rio Lima. *Actas do Colóquio Luso-espanhol sobre Ecologia das Bacias Hidrográficas e Recursos Zoológicos*. Oporto Faculty of Sciences, Portugal, 23-25 March 1988. 149-154.
- FORMIGO, N. (1997). *A Bacia Hidrográfica do rio Âncora*. PH. D. Thesis. Oporto University. Portugal. 500 pp.
- FORMIGO, N. & PENCZACK, T. (1998). Fish stocks of the Âncora River, north Portugal: sampling, community and populations. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 45 (2): 151-164.
- JONSSON, N. (1991). Influence of water flow, water temperature and light on fish migration in rivers. *Nord. J. Freshw. Res.* 66: 20-35.
- LOBÓN-CERVÍÁ, J. (1991). Dinâmica de poblaciones de peces en rios. Pesca eléctrica y métodos de capturas sucesivas en la estima de abundancias. *Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales* 3. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid: 156 pp.
- LOBÓN-CERVÍÁ, J., ROVIRA, P., SORIANO, O. (1985). Contribución a la biometria de la bermejuela *Rutilus arcasii* (Steindch., 1866) del embalse de Pinilla. *Donña, Acta Vertebrata* 12 (1): 5-19.
- LUCAS, M. C. & BARAS, E. K. (2001). *Migration of freshwater fishes*. Blackwell Science, London, 420 pp.
- MAIA, C. F. Q. & VALENTE, A. C. N. (1999). The brown trout *Salmo trutta* L. populations in the river Lima catchment. *Limnetica* 17: 119-126.
- OMBREDANE, D. & BAGLINIÈRE, J. L. (1992). Les écailles et leurs utilisations en Écologie halieutique. In: «*Tissus durs et âge individuel des vertébrés*». Colloque national, Bondy, France, 4-6 of March 1991. Baglinière, J. L., Castanet, J., Conand, F., Meunier, F. J. (eds.). Colloques et Séminaires ORSTOM-INRA: 151-192.
- PENCZAK, T. & FORMIGO, N. (2000). Fish stocks in Âncora River, north Portugal. Food consumption estimated with a bioenergetics model. *Fish. Res.* 49: 117-128
- RINCÓN, P. A., LOBÓN-CERVIA, J. (1989). Reproductive and growth strategies of the red roach, *Rutilus arcasii* (Steindachner, 1866), in two contrasting tributaries of the River Duero, Spain. *J. Fish Biol.* 34: 687-705.
- ROJO, A. & RAMOS, P. (1988). Contribución al estudio de la bermejuela, *Rutilus arcasi*, Steindachner, 1866 de la cuenca del Júcar (Osteichthyes: Cyprinidae). II. Edad y crecimiento. *Donña, Acta Vertebrata* 15 (1): 5-17.

- SANTOS, J. M., FERREIRA, M. T., GODINHO, F. N. & BOCHECHAS, J. (2002). Performance of fish lift recently builds at the Touvedo Dam on the Lima River, Portugal. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 118-123.
- SNPRCN (1991). *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal. Vol. II - Peixes dulciaquícolas e migradores*. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza, Lisbon: 55 pp.
- VALENTE, A. C. N. (1988). The trout population of a Portuguese river. *Publ. Inst. Zool. Dr. Augusto Nobre* 204, 10 pp.
- VALENTE, A. C. N. (1993). *Biologia e dinâmica das populações de truta-de-rio, Salmo trutta L., da bacia hidrográfica do rio Lima*. PH. D. Thesis. Oporto University. Portugal. 244 pp.
- ZARDOYA, R & DOADRIO, I. (1998). Phylogenetics relationships of Iberian cyprinids: systematics and biogeographical implications. *Proc. R. Soc. London, B* 265: 1365-1372.

## COLONIZAÇÃO DE CHARCOS TEMPORÁRIOS PELO LAGOSTIM-VERMELHO-AMERICANO, *PROCAMBARUS CLARKII*

Maria João Cruz, Pedro Andrade, Sandra Pascoal & Rui Rebelo

Centro de Biologia Ambiental, D.B.A., F.C.U.L., 1749-016 Lisboa

(e-mail: mjacruz@fc.ul.pt)

Cruz, M. J., Andrade, P., Pascoal, S. & Rebelo, R. (2004). Colonização de charcos temporários pelo lagostim-vermelho-americano, *Procambarus clarkii*. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 79-90.

O Lagostim-vermelho-americano, *Procambarus clarkii*, foi introduzido em Portugal no fim dos anos 70. Nas áreas onde o lagostim é abundante, apenas os charcos temporários não possuem populações estáveis, podendo servir como refúgio para espécies que sofrem um forte decréscimo na presença de *P. clarkii*. Com o objectivo de avaliar a capacidade de colonização de corpos de água temporários por *P. clarkii*, estudámos 23 charcos temporários localizados na margem esquerda do rio Sado, comparando a estrutura das populações de *P. clarkii* que os colonizaram com a de populações estabelecidas em 11 charcos permanentes. As amostragens foram realizadas em Novembro/Dezembro de 2002 e Fevereiro, Abril e Junho de 2003, através de passagens de camaroeiro e armadilhas de funil.

Foram colonizados 3 charcos temporários no Outono, 4 no Inverno e 2 na Primavera. A maioria dos charcos situados a menos de 200m de um ponto de água com lagostins foi colonizada, enquanto que nenhum dos charcos localizados a mais de 1km destas possíveis fontes de lagostins foi colonizado. A distância (mas não o desnível do terreno) entre o charco e a fonte de lagostins mais próxima apresentou uma correlação negativa com a probabilidade de colonização por lagostim.

No Outono, *P. clarkii* apresentou abundâncias muito baixas nos charcos temporários. Porém, em Fevereiro atingiu abundâncias elevadas, superiores às observadas nos charcos permanentes. Os lagostins atingiram tamanhos maiores, e a proporção de indivíduos em muda foi mais elevada nos charcos temporários.

Os resultados obtidos neste estudo permitem identificar os charcos com elevada probabilidade de ser colonizados repetidamente por

*P. clarkii*, possibilitando a planificação de medidas práticas para a gestão destes corpos de água.

Palavras-chave: abundância, dispersão, espécies invasoras, estrutura populacional, habitats mediterrânicos.

Cruz, M. J., Andrade, P., Pascoal, S. & Rebelo, R. (2004). Colonization of temporary ponds by the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 79-90.

The red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, was introduced in Portugal in the late 1970's. In high density areas, only temporary ponds do not maintain stable populations, and may constitute a refuge for species that are vulnerable to predation by *P. clarkii*. To evaluate the ability of this crayfish to colonize isolated ponds, we studied 23 temporary ponds located in the regions of the Sado River and Grândola. We also studied 11 permanent ponds with established crayfish populations in order to compare the population structure in these ponds with that of the temporary ponds recently colonized. The ponds were sampled in November/December 2002 and February, April and June 2003 with two sampling techniques: dip-netting and funnel traps.

Three temporary ponds were colonized by *P. clarkii* in autumn, 4 in winter and 2 in spring. None of the ponds located more than 1 km and most of those located less than 200 m from a crayfish source were colonized. Distance (but not slope) between the pond and the closest crayfish source was negatively correlated with the probability of colonization by *P. clarkii*.

*P. clarkii* was scarce in the temporary ponds just after colonization, in autumn. However, in winter it was more abundant than in permanent ponds. The crayfish attained larger sizes and the proportion of moulting individuals was higher in temporary than in permanent ponds.

Our results allow the identification of those ponds susceptible to repeated colonization by *P. clarkii*, and may contribute for the management of these habitats.

Keywords: abundance, dispersal, invasive species, Mediterranean habitats, population structure.

## INTRODUÇÃO

No fim da década de 70 foi registado pela primeira vez em Portugal o Lagostim-vermelho-americano, *Procambarus clarkii*, uma espécie nativa dos Estados Unidos, (RAMOS & PEREIRA, 1981). A colonização ocorreu provavelmente através dos

afluentes espanhóis do rio Guadiana, onde foi introduzido com intuítos comerciais. No Centro e Sul de Portugal, onde não existem lagostins-de-rio nativos (ALMAÇA, 1991), a sua expansão foi rápida, tendo alcançado densidades muito elevadas em algumas áreas (CORREIA, 1995a).

*P. clarkii* tem sido introduzido com sucesso em inúmeras áreas do globo, encontrando-se actualmente em todos os continentes excepto na Antártida e na Austrália (HOBBS *et al.*, 1989). A maioria destas introduções teve consequências negativas (HOBBS *et al.*, 1989; ANASTÁCIO & MARQUES, 1995; HARPER *et al.*, 2002) e têm sido dispendidos esforços consideráveis para erradicar as suas populações com pesticidas (HOBBS *et al.*, 1989). Porém, uma vez introduzido em habitats favoráveis, *P. clarkii* muito dificilmente é eliminado (HOBBS *et al.*, 1989). O elevado sucesso na colonização de novas áreas e o grande impacto nas áreas que coloniza parecem advir da sua grande plasticidade ecológica. *P. clarkii* ajusta a sua dieta à disponibilidade de alimentos (GUTIÉRREZ-YURRITA *et al.*, 1998; CORREIA, 2002) e possui uma grande capacidade de adaptação às condições hidrológicas e de temperatura dos novos habitats (GUTIÉRREZ-YURRITA & MONTES, 1999). Além disso, taxas de crescimento muito elevadas (ANASTÁCIO & MARQUES, 1995) e uma elevada capacidade reprodutora (HOBBS *et al.*, 1989; GUTIÉRREZ-YURRITA & MONTES, 1999), permitem o rápido desenvolvimento de populações extremamente numerosas.

A dispersão de *P. clarkii* processa-se maioritariamente ao longo dos cursos de água. No entanto, como se trata de uma espécie com uma elevada resistência a condições adversas (CORREIA, 1995b), consegue também atravessar terra seca e colonizar corpos de água isolados. Esta colonização é aparentemente lenta, supondo-se que seja limitada a pequenas distâncias e dependente das condições atmosféricas; porém, não existem estudos sobre os padrões temporais e espaciais deste tipo de dispersão para esta espécie.

Nos cursos de água e corpos de água lânticos permanentes, é difícil erradicar populações já instaladas, mas nos charcos temporários, que secam todos os anos, os lagostins apenas se mantêm se o substrato permitir a construção de túneis e se o solo mantiver alguma humidade durante todo o período seco. Os charcos temporários mediterrânicos são um habitat prioritário (anexo I da Directiva Habitats), que podem conter uma diversidade florística e faunística muito elevada, e albergar espécies com amplitudes ecológicas muito específicas, dependentes da ausência dos predadores típicos de sistemas permanentes (BRÖNMARK AND HANSSON, 1998). Por outro lado, estes corpos de água poderão servir como refúgio para algumas espécies que parecem sofrer um forte decréscimo na presença de *P. clarkii*, nomeadamente macrófitas (SMART *et al.*, 2002), anfíbios (GAMRADT & KATS, 1996; REBELO

& CRUZ, dados não publicados) e gastrópodes (GUTIÉRREZ-YURRITA *et al.*, 1998).

Neste estudo foram monitorizados corpos de água temporários localizados a distâncias variáveis de áreas com lagostins ao longo de um ano, de modo a compreender os padrões de dispersão desta espécie e os factores que influenciam a probabilidade de colonização de cada charco. Procurou-se ainda comparar a estrutura das populações de *P. clarkii* nos charcos temporários colonizados com a de populações estabelecidas em charcos permanentes.

## MÉTODOS

A área de estudo situa-se no Noroeste alentejano, incluindo toda a margem esquerda do rio Sado e a Serra de Grândola. Esta área inclui zonas com elevadas densidades de lagostim, tais como arrozais, lagoas costeiras, albufeiras e o próprio rio Sado, assim como áreas sem lagostim, maioritariamente na Serra de Grândola.

Numa primeira fase foi estudada a distribuição do lagostim pelos principais cursos de água e nos principais corpos de água lânticos, seleccionando-se posteriormente 23 charcos temporários, sem lagostins, a distâncias variáveis de uma possível fonte de lagostins, e 11 charcos permanentes com populações de *P. clarkii* estabelecidas. Estes corpos de água foram medidos (largura máxima, comprimento máximo e profundidade) e amostrados em quatro épocas de amostragem: de 20 de Novembro a 6 de Dezembro de 2002; de 10 a 25 de Fevereiro; de 15 a 30 de Abril e de 9 a 22 de Junho de 2003. Foi efectuada uma última visita em Setembro de 2003 aos charcos colonizados, durante a qual foi prospectado toda a área do leito dos charcos por dois observadores, tendo-se procurado vestígios de actividade de lagostim e, em particular, galerias. As galerias encontradas foram escavadas para determinar se o seu ocupante se mantinha vivo no fim da época seca.

Cada corpo de água foi amostrado utilizando passagens de camaroeiro (método mais direccionado para a captura de juvenis) e armadilhas de funil iscadas (método mais direccionado para a captura de adultos). Em cada charco realizaram-se cinco passagens de camaroeiro (30 cm de diâmetro e malha verde fina, com 2mm) com cerca de 3 metros de extensão e colocaram-se durante uma noite, três conjuntos de duas armadilhas de funil com 20 cm de comprimento e abertura única, uma das quais com abertura de 43mm e outra com abertura de 25mm (diâmetro menor). As armadilhas foram iscadas com comida de gato com sabor a peixe. Procurou-se amostrar toda a variedade de microhabitats associada a cada corpo de água.

Os exemplares de *P. clarkii* capturados foram quantificados. A 10 exemplares, seleccionados aleatoriamente por armadilha ou por passagem de camaroeiro, foi medido o comprimento da carapaça (CC, em mm), identificado o sexo, e registado se

estavam em muda (na ecdise, os lagostins ficam com a carapaça mole durante cerca de dois dias), tendo sido posteriormente devolvidos ao corpo de água.

Utilizou-se uma análise de regressão logística para avaliar a probabilidade de colonização de um charco temporário. De entre todas as variáveis de um charco que poderão estar associadas à sua colonização por *P. clarkii*, foram seleccionadas para a análise as mais facilmente mensuráveis e com significado biológico: (i) distância à fonte de lagostins mais próxima; (ii) maior declive entre a fonte de lagostins mais próxima e o charco; (iii) área do charco. Foi realizada uma regressão logística univariada para cada variável. As variáveis e as interações entre variáveis consideradas significativas ( $P < 0.25$ ) pelo teste de Wald (HOSMER & LEMESHOW, 2000) foram retidas. As variáveis não retidas foram analisadas para a sua linearidade e, quando necessário, transformadas logaritmicamente de modo a cumprir esse pressuposto. As novas variáveis transformadas foram de novo sujeitas a uma análise univariada e, se consideradas significativas ( $P < 0.25$ ) pelo teste de Wald, retidas. Uma vez seleccionadas as variáveis pela análise univariada, procedeu-se a uma regressão logística multivariada com eliminação por passos (HOSMER & LEMESHOW, 2000).

Para cada charco amostrado, foram calculados dois índices de abundância relativa de lagostim a partir dos valores de capturas com cada um dos métodos utilizados. Uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal nem homogeneidade de variâncias, mesmo após transformação, foi utilizado um teste de Mann-Whitney U (ZAR, 1996) para comparar as abundâncias relativas nos dois tipos de charcos em cada época de amostragem. A presença de lagostins recém-eclodidos (CC <10mm) foi utilizada como indicação de reprodução recente (CORREIA, 1995b). A frequência de indivíduos em muda em charcos temporários e permanentes foi comparada por meio de um teste do Chi-quadrado (ZAR, 1996). Todos os tratamentos estatísticos foram realizados no programa Statistica 6.0.

## RESULTADOS

Dos 23 charcos temporários amostrados, 21 já estavam cheios aquando da primeira amostragem (Novembro); os restantes dois apenas encheram no Inverno. Um total de 9 charcos temporários foi colonizado pelo lagostim: 3 no Outono, 4 no Inverno e 2 na Primavera. Em Junho, a maioria já estava seca (82.6%). Em Setembro, apenas um dos charcos colonizados mantinha lagostins em galerias subterrâneas. No entanto, a escavação das galerias permitiu confirmar que a maioria estava morta por dessecação.

Oito dos 10 charcos situados a menos de 200m de uma fonte de lagostins foram colonizados; quanto aos dois últimos, existia um grande desnível entre as possíveis fontes de lagostim e o charco (Fig. 1). Nenhum dos charcos localizados a mais de

1 km de um ponto de água com lagostins foi colonizado. Foram colonizados charcos de tamanhos muito diversos, desde um dos mais pequenos ( $15.5\text{m}^2$ ), até um dos maiores ( $754\text{m}^2$ ). Na regressão logística apenas o factor distância foi retido (Tabela 1). O teste do  $R^2$  de Nagelkerke indica um bom ajuste do modelo aos dados ( $R^2$  Nagelkerke = 0.606).

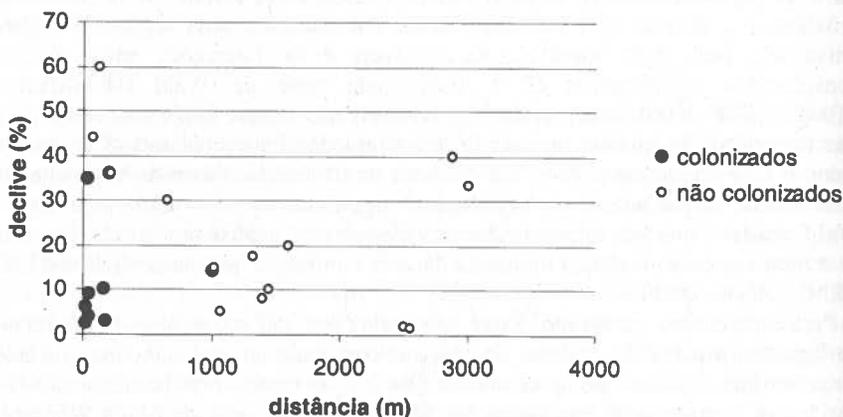


Figura 1. Colonização de charcos temporários por *P. clarkii* em função do declive a ultrapassar e da distância à fonte de lagostins.

Tabela 1. Modelo obtido com a regressão logística multivariada (ver métodos). Coeficiente  $\beta$  – coeficientes estimados; S. E. ( $\beta$ ) – desvios padrão dos coeficientes estimados; Wald – resultados do teste Wald; Wald ( $P$ ) – significância do teste Wald.

Variável	Coeficiente $\beta$	S. E. ( $\beta$ )	Wald	Wald ( $P$ )
Constante	-2,073	0,928	4,985	0,026
Log(distância)	-3,001	1,120	7,179	0,007

Na Figura 2 pode observar-se as abundâncias relativas de lagostim obtidas com cada um dos métodos de amostragem. No Outono *P. clarkii* apresentou abundâncias mais baixas nos charcos temporários que nos permanentes. Porém, em Fevereiro, nos

charcos temporários atingiram-se abundâncias elevadas, superiores às observadas nos charcos permanentes, tendência que se mantém em Abril e Junho. O teste de Mann-Whitney U realizado para comparar os valores de abundância entre charcos temporários e permanentes deu resultados diferentes consoante o método de captura em análise. Quando as abundâncias foram calculadas com base no método "armadilhas de funil" obteve-se diferenças significativas apenas na amostragem de Novembro ( $Z = -2.752, P = 0.006$ ). Quando as abundâncias são calculadas com base no método "passagens de camaroeiro" obtêm-se diferenças significativas na amostragem de Fevereiro ( $Z = 2.239, P = 0.025$ ) e de Abril ( $Z = 2.079, P = 0.038$ ).

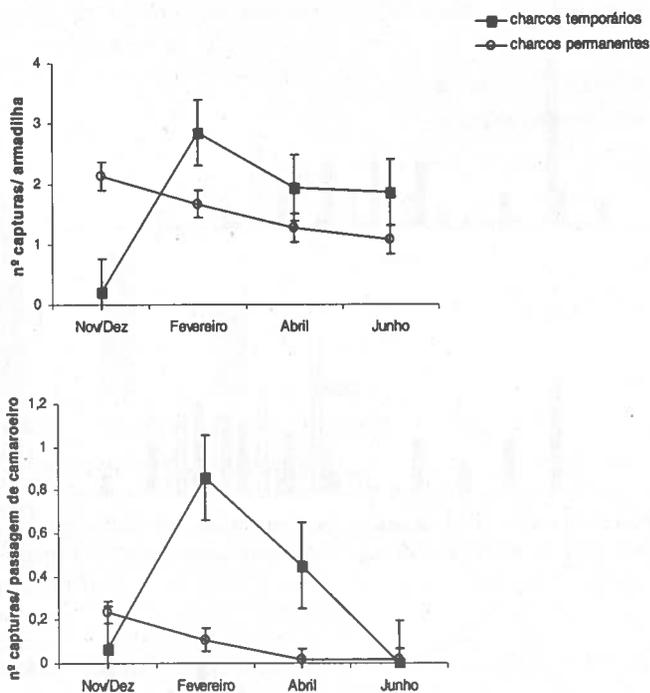


Figura 2. Abundâncias relativas de *P. clarkii* em cada tipo de charco (temporário ou permanente), obtidas com os dois métodos de captura (armadilhas e passagens de camaroeiro). As barras verticais representam os erros padrão.

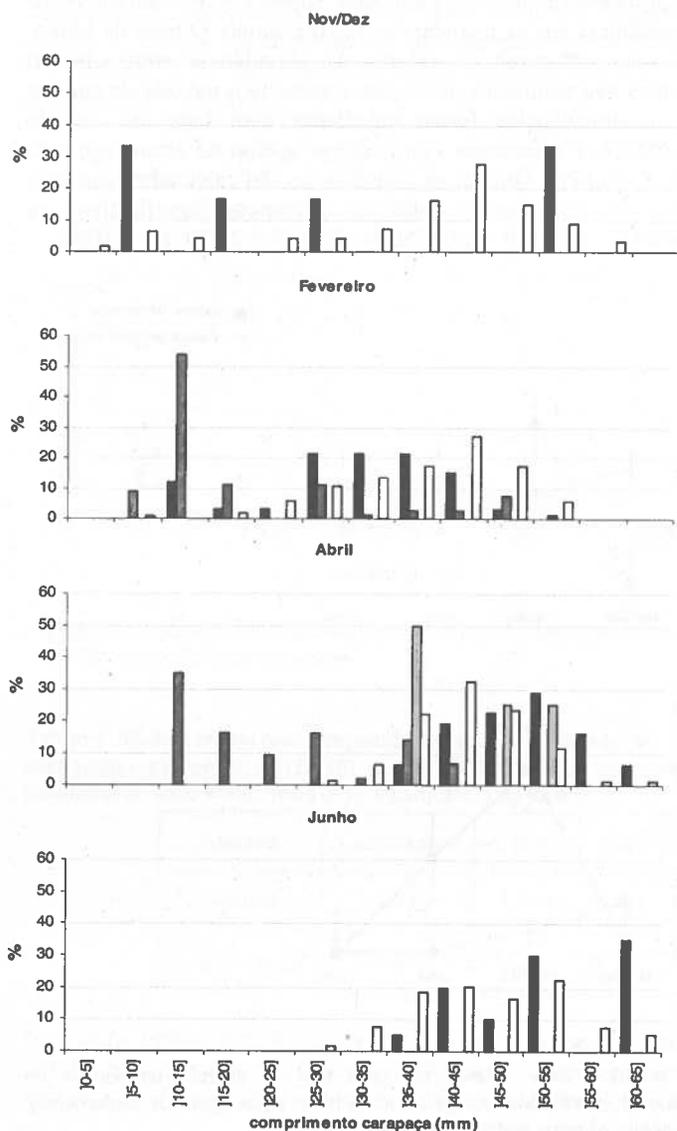


Figura 3. Estrutura de tamanhos corporais de *P. clarkii* em charcos temporários colonizados em diferentes épocas e charcos permanentes, em cada época de amostragem. Legenda: barras brancas - charcos permanentes; barras pretas - charcos temporários colonizados no Outono; barras cinza-escuro - charcos temporários colonizados no Inverno; barras cinza-claro - charcos temporários colonizados na Primavera.

Nos charcos permanentes e nos charcos temporários colonizados no Outono o recrutamento restringiu-se às duas primeiras épocas de amostragem (Fig. 3). Nos charcos temporários colonizados no Inverno, capturaram-se indivíduos muito pequenos ( $CC < 15\text{mm}$ ) até Abril, indicadores de reprodução recente (Fig. 3). Nos charcos apenas colonizados na Primavera não foi possível determinar se houve reprodução uma vez que em Abril só se capturaram adultos e em Junho estes charcos já se encontravam secos.

Em Junho encontram-se proporcionalmente mais indivíduos maiores nos charcos temporários do que nos permanentes (Fig. 3). A frequência de indivíduos em muda foi também significativamente mais elevada nos charcos temporários que nos permanentes em todas as classes de tamanho consideradas, excepto para os indivíduos maiores (testes de  $\chi^2$ ; Fig. 4).

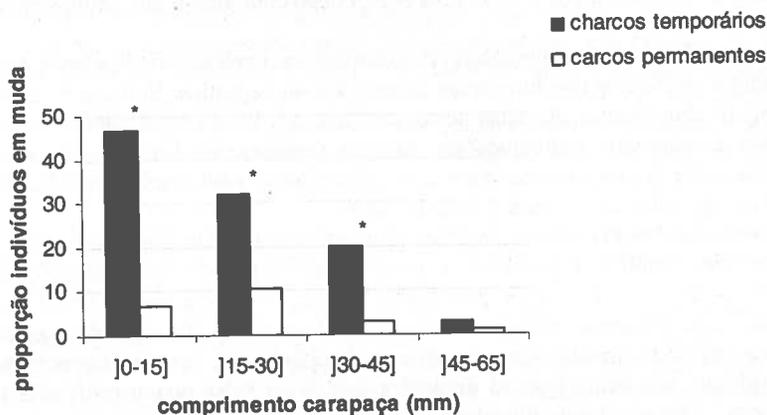


Figura 4. Proporção de indivíduos em muda em charcos temporários e permanentes para diferentes classes de tamanho. \* representa diferenças significativas entre os dois tipos de charcos (testes de  $\chi^2$ ;  $P < 0.05$ ).

## DISCUSSÃO

Como GUTIÉRREZ-YURRITA & MONTES (1999) referiram, *P. clarkii* caracteriza-se por uma elevada capacidade de adaptar o seu ciclo reprodutor a cada habitat específico, apresentando um período reprodutor altamente variável. Neste estudo, *P. clarkii* reproduziu-se na primeira oportunidade em cada um dos habitats amostrados: nos charcos permanentes e nos charcos temporários colonizados no Outono, a reprodução deu-se no Outono e Inverno, mas nos charcos colonizados no Inverno, a reprodução estendeu-se até à Primavera.

Após a colonização, *P. clarkii* atingiu rapidamente abundâncias muito elevadas, mesmo superiores às observadas em charcos permanentes. Provavelmente nos charcos temporários houve uma baixa mortalidade juvenil, devido a um menor risco de predação, por aí não existirem peixes, os principais predadores aquáticos desta espécie (HARPER *et al.*, 2002), nem lagostins adultos em elevadas densidades, que predam os indivíduos mais pequenos e os indivíduos em muda e competem por alimento (GUTIÉRREZ-YURRITA *et al.*, 1998). A frequência de indivíduos em muda está directamente relacionada com a taxa de crescimento (THORP & WINERTER, 1981 in ANASTÁCIO & MARQUES, 1995) e foi também mais elevada nos charcos temporários que nos permanentes. Estas elevadas taxas de crescimento terão levado às maiores frequências de indivíduos de grande tamanho nos charcos temporários e poderão também ser explicadas pelo baixo risco de predação nestes charcos e pela baixa competição com indivíduos adultos previamente estabelecidos.

A probabilidade de colonização dos charcos temporários por *P. clarkii* depende da distância aos locais que funcionam como fonte de lagostins. Embora *P. clarkii* tenha atingido abundâncias elevadas nestes charcos, no fim do Verão apenas num charco foram encontrados indivíduos em galerias (embora, na sua maioria, mortos por dessecação), o que parece indicar que estes charcos não apresentam condições para que os lagostins sobrevivam à seca de Verão.

Estas observações têm implicações práticas para a gestão dos charcos temporários, permitindo identificar os charcos com uma elevada probabilidade de ser colonizados repetidamente por *P. clarkii*. Resultados de trabalhos anteriores indicam-nos que *P. clarkii* não consegue ultrapassar alguns obstáculos facilmente ultrapassáveis por outras espécies características de charcos temporários e com melhores capacidades trepadoras, tais como troncos de árvore caídos ou valas pouco profundas (Cruz & Rebelo, dados não publicados). Poderá assim ser possível, através de um conhecimento aprofundado das suas capacidades de locomoção, criar barreiras físicas à colonização de corpos de água isolados. Em charcos temporários, estas barreiras deverão funcionar desde as primeiras chuvas e até ao final do Inverno, uma vez que na Primavera, a colonização destes charcos parece não ter grande sucesso, não se registando a produção de populações densas que se observou nos charcos colonizados no Outono e Inverno. Em charcos permanentes, as barreiras deverão ser mantidas em contínuo. Este tipo de medida poderá ser especialmente importante na manutenção das comunidades nativas em áreas onde o lagostim já colonizou a maioria dos corpos de água.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela FCT e FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio (Bolsa de Investigação SFRH/BD/6286/2001) e pela FCT no âmbito do projecto PNAT/1999/BIA/15039/C. Agradecemos a dois revisores anónimos os comentários ao manuscrito.

## REFERÊNCIAS

- ALMAÇA, C. 1991. L'ecrevisse a pieds blancs, *Astacus pallipes* Lereboullet 1858, au Portugal. *L'Astaciculteur de France* 28: 11-16.
- ANASTÁCIO, P. M. & MARQUES, J. C. 1995. Population biology and production of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in the lower Mondego valley, Portugal. *Journal of Crustacean Biology* 15: 156-168.
- BRÖNMARK, C. & HANSSON, L. -A. 1998. *The Biology of Lakes and Ponds*. Oxford, Oxford University Press.
- BUCHAN, L. A. J. & PADILLA, D. K. 1999. Estimating the probability of long-distance overland dispersal of invading aquatic species. *Ecological applications* 9: 254-265.
- CORREIA, A. M. 1995a. Population dynamics of *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) in Portugal. *Freshwater Crayfish* 8: 276-290.
- CORREIA, A. M. 1995b. *Biologia populacional e interações tróficas de Procambarus clarkii* (Crustácea, Decapoda, Cambaridae) no sistema hidrográfico do rio Tejo (Ribatejo, Portugal). Tese de Doutoramento, Departamento de Zoologia e Antropologia - FCUL, Lisboa.
- CORREIA, A. M. 2002. Niche breadth and trophic diversity: feeding behaviour of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal). *Acta Oecol.* 23: 421-429.
- FISHER, R. N. & SHAFFER, H. B. 1996. The Decline of Amphibians in California's Great Central Valley. *Conservation Biology* 5: 1387-1397.
- GUTIÉRREZ-YURRITA, P. J., SANCHO, G., BRAVO, M. A., BALTANÁS, A. & MONTES, C. 1998. Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Doñana national park temporary fresh-water marsh (Spain). *Journal of Crustacean Biology* 18: 120-127.
- GUTIÉRREZ-YURRITA, P. J. & MONTES, C. 1999. Bioenergetics and phenology of reproduction of the introduced red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in Doñana national park, Spain, and implications for species mangment. *Freshwater Biology* 42: 561-574.
- HAMER, A. J., LANE, S. J. & MAHONY, M. J. 2002. The role of introduced mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) in excluding the native green and golden bell frog (*Litoria aurea*) from original habitats in south-eastern Australia. *Oecologia* 132: 445-452.
- HARPER, D. M., SMART, A. C., COLEY, S., SCHMITZ, S., BEAUREGARD, A-C. G., NORTH, R., ADAMS, C., OBADE, P. & KAMAU, M. 2002. Distribution and abundance of the Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* Girard at Lake Naivasha, Kenya, between 1987 and 1999. *Hydrobiologia* 488: 143-151.

- HOBBS, H. H. , JASS, J. P. & HUNER, J. V. 1989. A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two north american species. *Crustaceana* 56: 299-316.
- HOSMER, D. W. & LEMESHOW, S. 2000. *Applied logistic regression*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- KNAPP, R. A. & MATTHEWS, K. R. 2000. Non-native fish introductions and the decline of the mountain yellow-legged frog from within protected areas. *Conservation Biology* 14: 428-438.
- RAMOS, M. A. & PEREIRA, T. M. 1981. Um novo Astacidae para a fauna portuguesa: *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas, Lisboa*, 6: 37-47.
- SAKAI, A. K., ALLENDORF, F. W., HOLT, J. S., LODGE, D. M., MOLOFSKY, J., WITH, K. A., BAUGHMAN, S., CABIN, R. J., COHEN, J. E., ELLSTRAND, N. C., MCCAULEY, D. E., O'NEIL, P., PARKER, I. E., THOMPSON, J. N. & WELLER, S. G. 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32: 305-332.
- SMART, A. C., HARPER, D. M., MALAISSE, F., SCHMITZ, S., COLEY, S. & BEAUREGARD, A-C. G. 2002. Feeding of the exotic Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Crustacea, Decapoda), in an African tropical lake: Lake Naivasha, Kenya. *Hydrobiologia* 488: 129-142.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3<sup>rd</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall International.
- WITH, K. A. , 2001. The Landscape Ecology of Invasive Spread. *Conservation Biology* 16: 1192-1203.

## DINÂMICA DE UMA COMUNIDADE DE *CISTUS SALVIIFOLIUS* L., APÓS INTERVENÇÃO EXPERIMENTAL. PADRÕES DE REGENERAÇÃO DA ESTRUTURA E BIOMASSA

M. P. Simões, I. P. Pereira, C. Pinto-Cruz & L. Gazarini

Dep. Biologia/ICAM, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

E-mail: [mps@uevora.pt](mailto:mps@uevora.pt)

Simões, M. P., Pereira, I. P., Pinto-Cruz, C. & Gazarini, L. (2004). Dinâmica de uma comunidade de *Cistus salviifolius* L., após intervenção experimental. Padrões de regeneração da estrutura e biomassa. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 91-100.

Estudou-se a dinâmica de regeneração da estrutura e biomassa de uma comunidade arbustiva dominada por *Cistus salviifolius* L., após intervenção experimental (corte da biomassa arbustiva, com incorporação, deposição e extracção), durante 5 anos.

Verificou-se uma tendência de regeneração da comunidade, através de um processo de auto-sucessão, após a intervenção. A densidade arbustiva máxima foi registada no primeiro ano, no segundo na parcela de deposição, tendo o máximo sido menos acentuado na parcela de extracção. A altura dos arbustos e a biomassa produzida aumentaram durante todo o período de estudo. Contudo, enquanto a biomassa foliar aumentou apenas nos 3 primeiros anos após a intervenção, a biomassa lenhosa e a necromassa ainda continuavam a aumentar no final do período do estudo. A razão de peso foliar (LWR) atingiu, assim, o máximo no primeiro ano, diminuindo posteriormente até ao final do período de estudo, sendo o decréscimo na parcela de incorporação menos pronunciado. Observaram-se algumas diferenças, entre os 3 tipos de intervenção, apenas nos 3 primeiros anos. No final dos 5 anos que durou o estudo, os valores de densidade, altura, biomassa e índices de área, registados para os arbustos de *C. salviifolius*, eram semelhantes nas 3 parcelas. Contudo, enquanto a densidade dos arbustos era ainda bastante mais elevada do que na situação pré-tratamentos, a sua altura média era próxima da inicial. Os valores de biomassa, quer total quer dos seus componentes, assim como os do índice de área foliar (LAI), pelo contrário, eram ainda bastante inferiores aos obtidos antes da intervenção, principalmente na parcela de incorporação.

Palavras chave: Dinâmica da vegetação, *Cistus salviifolius*, Intervenção experimental, Regeneração.

Simões, M. P., Pereira, I. P., Pinto-Cruz, C. & Gazarini, L. (2004). Dynamics of a *Cistus salviifolius* L. community after experimental disturbances. Patterns of structure and biomass recover. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 91-100.

Regeneration after experimental disturbances (cutting of shrubs followed by biomass removal, deposition on soil surface and incorporation with the soil) was studied in a shrubland dominated by *Cistus salviifolius* L. The changes in shrub density, biomass and structure were quantified over a 5-year period.

The community tended to recover by an autosuccession process after the disturbances. The higher shrub density was observed in the first year in the incorporation and removal plots and two years after cutting in the deposition plot. Nevertheless, the lowest maximum was registered in the removal plot. Shrub size and biomass production increased through the whole study period. However, while leaf biomass increased only for the first three years after the disturbances, wood and necromass continued increasing till the end. Leaf weight ratio (LWR) was maximum in the first year, decreasing afterwards. The decrease was less pronounced in the incorporation than in the other two plots.

Differences between treatments were observed only in the first three years. Five years after the disturbances, density, size, biomass and leaf index values, measured for *C. salviifolius* shrubs, were similar in all plots. However, while shrub density was still higher than that registered before treatments, its medium size was similar to the initial. Conversely, biomass values, either total biomass or the different components biomass, as well as leaf area index (LAI), were still lower than those before disturbances, mainly in the incorporation plot.

Keywords: Vegetation dynamics, *Cistus salviifolius*, Experimental disturbance, Regeneration.

## INTRODUÇÃO

Os ecossistemas mediterrânicos são caracterizados por uma grande variedade de condições ambientais, que podem limitar o crescimento das plantas e os processos de sucessão (SCARASCIA-MUGNOZZA *et al.*, 2000). Entre estas, destacam-se a variabilidade da precipitação e a estação seca, longa e severa, que caracterizam o clima mediterrânico.

As plantas dominantes nestas regiões são árvores e arbustos perenifólios, que desenvolveram estratégias adaptativas de tolerância ao período seco (MILLER, 1981; ARIANOUTSOU & MARDIRIS, 1987; PUIGDEFÁBREGAS & PUGNAIRE, 1999). Segundo KUMMEROW (1989) e ANDREU *et al.* (1998), os arbustos representam mesmo as formas mais características destes ecossistemas, sendo as áreas cobertas por vegetação arbustiva superiores às ocupadas por formações arbóreas.

O estudo detalhado da produtividade e das reservas e partilha do carbono, bem como da dinâmica da regeneração destas comunidades, é essencial para a sua utilização, gestão e conservação (SCARASCIA-MUGNOZZA *et al.*, 2000; COOMES *et al.*, 2002). Este conhecimento reveste-se de particular importância nas regiões mediterrânicas, onde se espera que os impactos das alterações climáticas globais (como o aquecimento e o aumento da frequência dos períodos secos) na vegetação se façam sentir de forma acentuada (DE ANGELIS *et al.*, 2000; SABATÉ *et al.*, 2002).

No sul de Portugal, o abandono das actividades de produção de cereais e pastagens, que tem vindo a ocorrer, tem contribuído para a ocupação progressiva de extensas áreas de montado por comunidades de espécies mediterrânicas arbustivas, nomeadamente de cistáceas, oleáceas e anacardiáceas.

As práticas correntes para controle destas comunidades, algumas das quais dominadas por *Cistus salviifolius* L., têm sido o corte e o fogo. Embora os efeitos do fogo na recuperação da vegetação tenham sido alvo de numerosos estudos (TRABAUD, 1994), a resposta dos arbustos ao corte tem sido menos estudada. Neste contexto, procedeu-se ao estudo comparativo, durante 5 anos, das respostas de uma comunidade de *C. salviifolius*, a 3 intervenções experimentais, tradicionalmente usadas no controle da vegetação: corte da biomassa arbustiva, com deposição, extracção e incorporação, de forma a estabelecer se os diferentes tipos de intervenção condicionam diferentes padrões de regeneração da comunidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área experimental

O trabalho experimental decorreu no Centro de Estudos e Experimentação da Mitra, a cerca de 12 km da cidade de Évora. O clima da região é do tipo mediterrânico, sendo a temperatura média anual de 15,7°C e a precipitação média anual de 624,8 mm (Normais Climatológicas de 1961-90). O período seco, durante a estação quente, atinge até 5 meses. A litologia da área experimental corresponde a formações de corneanas e gnaisses granitóides e migmatitos. Os solos predominantes são Solos Litólicos Não Húmicos (AGUIAR & GRILLO, 1975). A vegetação consiste num montado aberto de *Quercus suber* L. e *Q. rotundifolia* Lam., com um sub-bosque arbustivo que tem como espécie característica e dominante *Cistus salviifolius* L. acompanhada principalmente por *C. ladanifer* L., *C. crispus* L., *Quercus coccifera* L., *Myrtus communis* L. e *Arbutus unedo* L.

A área experimental foi vedada em Julho de 1991, 7 anos antes do início do estudo, não sendo intervencionada, desde então.

### Metodologia

Seleccionou-se, na área experimental, uma parcela homogénea, na qual se delimitaram 9 talhões experimentais de 50 x 14 m, para aplicação dos

tratamentos. Em 3 dos talhões estabelecidos, cortaram-se todos os arbustos, com corta-mato, tendo-se depositado, à superfície do solo, a biomassa cortada - tratamento deposição. Noutro grupo de 3 talhões, cortaram-se todos os arbustos, com moto-serra, tendo o material vegetal sido retirado; o solo foi, em seguida, gradado com grade de discos - tratamento extracção. Nos 3 talhões restantes, cortaram-se todos os arbustos, com corta-mato, tendo a biomassa sido incorporada no solo, através de uma gradagem - tratamento incorporação. Todos os tratamentos foram aplicados em Junho de 1998.

A densidade, a altura e a biomassa aérea do *C. salviifolius* foram amostradas anualmente, no mês de Maio, de 1999 a 2003. Antes da intervenção experimental (1998), amostraram-se os mesmos parâmetros, para caracterização da situação inicial. A densidade e a altura dos indivíduos foram obtidas por contagem e medição directas numa área de 0,25 m<sup>2</sup> (quadrado de 0,5 x 0,5 m), escolhida ao acaso, num total de 9 amostras em cada data (3 em cada talhão). A biomassa aérea foi quantificada, por determinação directa, através da colheita e pesagem do material contido nas mesmas áreas. Toda a biomassa aérea colhida foi separada por componentes (folhas verdes, folhas senescentes, raminhos verdes, caules e ramos lenhosos, ramos mortos e órgãos reprodutivos). A área foliar projectada foi medida, com um medidor de área foliar LI-COR (modelo LI-3000), em subamostras de todas as amostras de folhas (verdes e senescentes), proporcionais ao peso total. Todos os componentes da biomassa foram secos (80° C) em sacos de papel devidamente identificados, em estufa de ventilação forçada, até peso constante e o seu peso seco obtido separadamente.

O índice de área foliar (LAI) foi calculado através da razão entre a área foliar projectada e a superfície do solo correspondente à sua projecção vertical e a razão de peso foliar (LWR) através da razão entre o peso das folhas e o peso total da biomassa aérea.

As comparações de médias foram efectuadas através de análises de variância (ANOVA) de classificação simples, após transformação dos dados, quando necessário, para obtenção de homogeneidade de variâncias, seguidas de testes múltiplos de Student-Newman-Keuls, através do programa SPSS.

## RESULTADOS

A densidade máxima dos arbustos de *C. salviifolius* foi registada no primeiro ano após a intervenção (cerca de 220 a 350 plantas m<sup>-2</sup>), tendo os valores da parcela com extracção sido os mais baixos, embora as diferenças não tenham sido significativas (Fig. 1). No segundo ano, verificou-se um decréscimo pronunciado do número de indivíduos, nos tratamentos com extracção e incorporação, ao passo que, no tratamento com deposição, se observou a manutenção dos indivíduos germinados no primeiro ano, tendo a sua densidade diminuído apenas no terceiro ano. Apesar dos decréscimos observados, no final do período de estudo, os valores determinados (aproximadamente 20 a 45 plantas m<sup>-2</sup>) eram ainda muito superiores ao inicial (1 planta m<sup>-2</sup>).

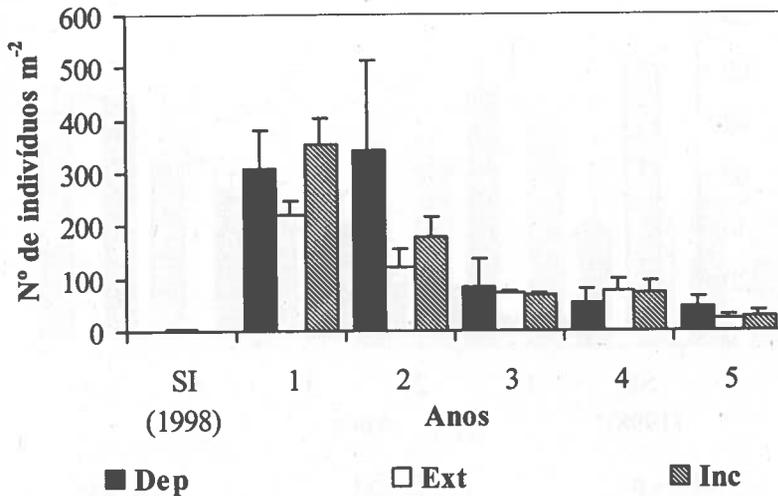


Figura 1. Evolução da densidade média de *C. salviifolius* (número de indivíduos m<sup>-2</sup>), ao longo do período de estudo (SI – situação pré-tratamentos; Dep – tratamento deposição; Ext – tratamento extração; Inc – tratamento incorporação). As barras representam o erro padrão (n=3).

A altura média das plântulas de *C. salviifolius* atingiu, no primeiro ano após as intervenções, cerca de 6 cm (Fig. 2), não se tendo verificado diferenças significativas entre os tratamentos. Durante o período de estudo restante, verificou-se um aumento progressivo, da mesma ordem de grandeza em todos os tratamentos. No final do estudo, a altura atingida em todos os tratamentos (cerca de 90 cm) não era significativamente diferente da obtida antes da intervenção (aproximadamente 1 m).

Observou-se uma tendência temporal para o aumento da biomassa produzida pelo *C. salviifolius*, durante todo o período de estudo (Tab. 1 e Figs. 3 e 4). Contudo, a biomassa foliar (Fig. 3), semelhante nos 3 tratamentos, aumentou apenas nos 3 primeiros anos, após o que apresentou uma tendência para a estabilização. O decréscimo ocorrido no quarto ano poderá, pelo menos em parte, ser atribuído ao facto deste ter sido um ano muito seco (de Setembro de 2001 a Agosto de 2002, a precipitação registada pelo Instituto de Meteorologia, para a região de Évora, atingiu apenas 489 mm) O índice de área foliar (LAI) apresentou o mesmo padrão de variação, com valores máximos 3 anos após a intervenção (Tab. 1).

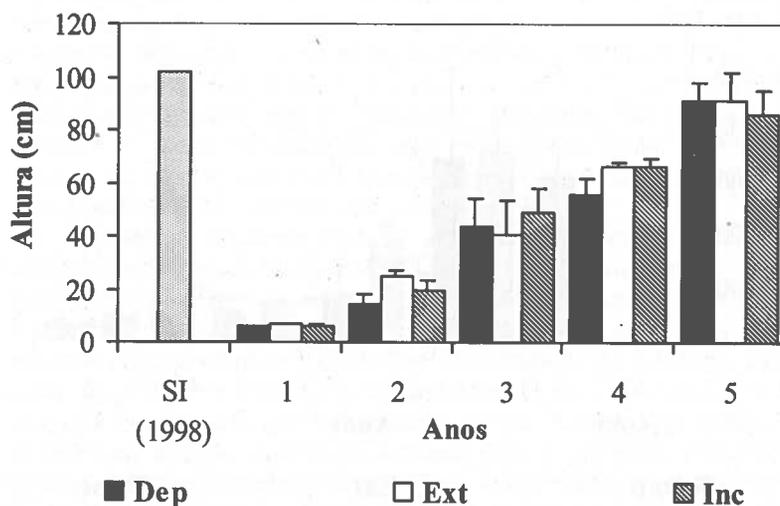


Figura 2. Evolução da altura média de *C. salviifolius* (cm), ao longo do período de estudo (SI – situação pré-tratamentos; Dep – tratamento deposição; Ext – tratamento extracção; Inc – tratamento incorporação). As barras representam o erro padrão (n=3).

Tabela 1. Valores médios da biomassa total ( $\text{g m}^{-2}$ ), razão de peso foliar (LWR) e índice de área foliar (LAI), ao longo do período de estudo (SI-situação pré-tratamentos; Dep-deposição; Ext-extracção; Inc-incorporação). Os valores entre parêntesis representam o erro padrão (n=3). Não se determinaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Anos	Biomassa Total			LWR			LAI		
	Dep	Ext	Inc	Dep	Ext	Inc	Dep	Ext	Inc
SI		2232 (131)			0,10 (0,00)			2,3 (0,07)	
1	30 (4)	29 (16)	32 (14)	0,73 (0,01)	0,72 (0,04)	0,73 (0,02)	0,2 (0,02)	0,2 (0,09)	0,2 (0,09)
2	181 (42)	264 (58)	219 (52)	0,59 (0,03)	0,53 (0,03)	0,52 (0,02)	1,4 (0,38)	1,7 (0,14)	1,5 (0,19)
3	551 (146)	590 (101)	486 (116)	0,33 (0,06)	0,28 (0,01)	0,31 (0,03)	1,9 (0,32)	2,0 (0,53)	1,4 (0,17)
4	465 (73)	869 (212)	472 (74)	0,17 (0,02)	0,16 (0,01)	0,23 (0,03)	0,9 (0,15)	1,4 (0,20)	0,7 (0,14)
5	842 (128)	849 (190)	604 (40)	0,13 (0,00)	0,14 (0,02)	0,16 (0,02)	1,0 (0,28)	0,9 (0,22)	1,0 (0,27)

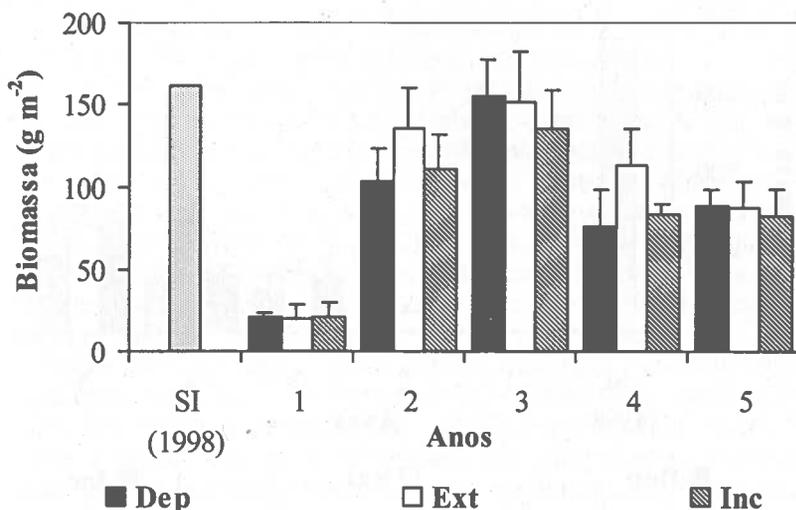


Figura 3. Evolução da biomassa foliar de *C. salviifolius* ( $\text{g m}^{-2}$ ), ao longo do período de estudo (SI – situação pré-tratamentos; Dep – tratamento deposição; Ext – tratamento extração; Inc – tratamento incorporação). As barras representam o erro padrão ( $n=3$ ).

A biomassa lenhosa (com um valor inicial de  $1460 \text{ g m}^{-2}$ ) e a necromassa (com  $464 \text{ g m}^{-2}$ , no início) aumentaram durante todo o período de estudo. No final, os valores obtidos nos tratamentos deposição e extração eram apenas de cerca de um terço dos iniciais (Fig. 4). No tratamento com incorporação, a diferença observada, após o mesmo período, era ainda mais acentuada, representando os valores registados apenas um quarto dos iniciais. A razão de peso foliar (LWR) atingiu o máximo no primeiro ano após a intervenção, em todos os tratamentos, apresentando decréscimos progressivos, durante o restante período de estudo (Tab. 1). No final do estudo, os valores determinados para a LWR, assim como, para a biomassa total e lenhosa e para a necromassa, ainda eram significativamente diferentes dos iniciais.

## DISCUSSÃO

O conhecimento dos padrões de resposta das comunidades de *C. salviifolius* a diferentes formas de intervenção, representativas dos impactos antrópicos, é de primordial importância para o estabelecimento da gestão adequada destas comunidades.

A densidade máxima dos arbustos de *C. salviifolius* obteve-se no primeiro anos após a intervenção. Embora se tenha verificado alguma competição com espécies herbáceas, *C. salviifolius* tornou-se dominante nos primeiros anos, o que está de acordo com o referido para outras espécies arbustivas (ALONSO *et al.*, 1994;

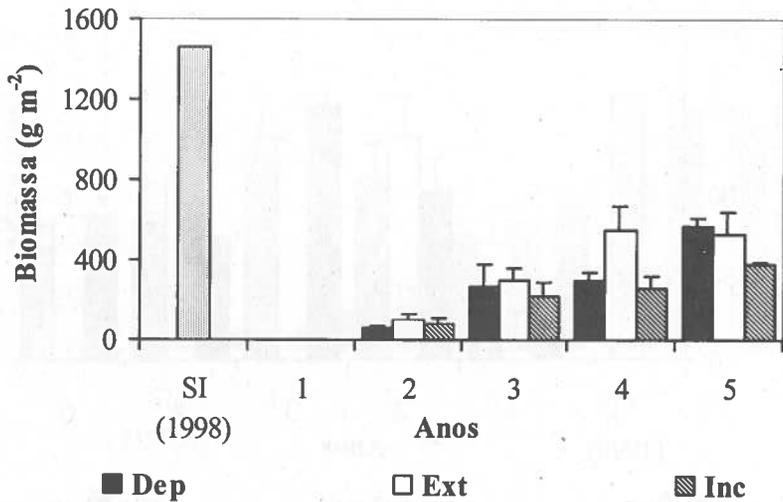


Figura 4. Evolução da biomassa lenhosa (excluindo a necromassa) de *C. salvifolius* ( $\text{g m}^{-2}$ ), ao longo do período de estudo (SI – situação pré-tratamentos; Dep – tratamento deposição; Ext – tratamento extracção; Inc – tratamento incorporação). As barras representam o erro padrão ( $n=3$ ).

CALVO *et al.*, 2002). A rápida regeneração desta espécie deveu-se à sua elevada capacidade de germinação, desde o início. Uma taxa de germinação elevada foi anteriormente observada noutras espécies de *Cistus* (ALONSO *et al.*, 1994; DE LUÍS *et al.*, 2001; TÁRREGA *et al.*, 2001). A partir do primeiro ano, observou-se a diminuição do número de arbustos, devido ao decréscimo da germinação e à mortalidade de plântulas e arbustos jovens. Contudo, enquanto nos tratamentos com extracção e incorporação a mortalidade foi muito pronunciada no segundo ano após a intervenção, o que se pode atribuir, para além da competição intraspecífica (RUNDEL *et al.*, 1987), às elevadas temperaturas e à secura estival, no tratamento com deposição, observou-se, no mesmo ano, a manutenção dos indivíduos germinados no primeiro ano, tendo a sua densidade diminuído apenas no terceiro ano após a intervenção. A menor mortalidade ocorrida neste tratamento poderá ser atribuída à protecção conferida pela biomassa depositada, a qual terá contribuído para reduzir a evaporação, mantendo a humidade do solo em níveis superiores aos dos outros tratamentos. Embora a taxa de germinação tenha sido mais baixa na extracção, o tipo de tratamento influenciou a densidade arbustiva apenas nos 2 primeiros anos, após os quais, já não se observavam diferenças.

A altura dos indivíduos e a biomassa produzida aumentaram durante todo o período de estudo. Contudo, embora a altura média dos arbustos, no final deste período, fosse já próxima da situação inicial, a estrutura da copa era ainda

bastante diferente. A biomassa foliar e o LAI aumentaram apenas nos 3 primeiros anos, aproximando-se da situação inicial, tal como observado por DIÁZ BARRADAS *et al.* (1999) em *Lavandula stoechas*, mas a biomassa lenhosa e a total, assim como a proporção biomassa fotossintética:biomassa lenhosa, eram ainda bastante inferiores às iniciais, o que parece indicar que, 5 anos após a intervenção, a comunidade ainda não tinha atingido o equilíbrio.

Parece claro que o corte é uma forma de manter a dominância de *C. salviifolius*, o que está de acordo com os resultados obtidos para outras espécies arbustivas (CALVO *et al.*, 2002). Contudo, pretende-se continuar este estudo por forma a determinar o período de tempo necessário para que a comunidade atinja o equilíbrio, assim como para a obtenção detalhada dos padrões de resposta de *C. salviifolius*, a intervenções antrópicas.

A comunidade apresentou uma elevada resiliência às intervenções experimentadas, tal como relativamente ao fogo (TRABAUD, 1981), que se traduziu numa rápida recuperação por auto-sucessão, tendo-se claramente acentuado a dominância do *C. salviifolius*, quer relativamente a espécies herbáceas, quer a outras espécies arbustivas. Adicionalmente, verificou-se que a dinâmica da regeneração da comunidade não foi influenciada pelo tipo de intervenção aplicada. Os efeitos iniciais associados aos tratamentos, além de pouco acentuados, só se verificaram nos dois primeiros anos, atenuando-se com a idade da comunidade, à semelhança do referido noutros estudos de regeneração (ALLDREDGE *et al.*, 2001).

#### AGRADECIMENTOS

O presente trabalho realizou-se no âmbito do Projecto PAMAF nº 8004/97.

#### BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, F. B. & GRILO, J. T. 1975. *Memória Descritiva da Carta de Solos da Herdade da Mitra*. Universidade de Évora, Évora (não publicado).
- ALONSO, I., LUIS-CALABUIG, E. & TÁRREGA, R. 1994. Cambios en la estructura de la comunidad en jarales sometidos a perturbaciones experimentales. *Studia Oecol.* X-XI: 281-287.
- ALLDREDGE, M. W., PEEK, J. M. & WALL, W. A. 2001. Shrub community development and annual productivity trends over a 100-year period on an industrial forest of Northern Idaho. *For. Ecol. Manage.* 152: 259-273.
- ANDREU, V., RUBIO, J. L. & CERNI, R. 1998. Effects of Mediterranean shrub cover on eater erosion (Valencia, Spain). *J. Soil Water Conserv.* 53: 112-120.
- ARIANOUTSOU, M. & MARDIRIS, Th. A. 1987. Observations on the phenology of two dominant plants of the Greek maquis. In Tenhunen, J. D. *et al.* (eds.). *Plant Response to Stress. Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems*. NATO ASI Series. Vol. G15. Springer-Verlag, Berlin. pp. 515-519.
- CALVO, L., TÁRREGA, R. & LUIS, E. 2002. Regeneration patterns in a *Calluna vulgaris* heiceland in the Cantabrian mountains (NW Spain) : Effects of burning, cutting and ploughing. *Acta Oecol.* 23: 81-90.

- COOMES, D. A., ALLEN, R. B., SCOTT, N. A., GOULDING, C. & BEETS, P. 2002. Designing systems to monitor carbon stocks in forests and shrublands. *For. Ecol. Manage.* **164**: 89-108.
- DE ANGELIS, P., CHIGWERWWE, K. S. & MUGNOZZA, G. E. S. 2000. Litter quality and decomposition in a CO<sub>2</sub>-enriched Mediterranean forest ecosystem. *Plant Soil* **224**: 31-41.
- DE LUÍS, M., GARCÍA-CANO, M. F., CORTINA, J., RAVENTÓS, J., GONZÁLEZ-HIDALGO, J. C. & SÁNCHEZ, J. R. 2001. Climatic trends, disturbances and short-term vegetation dynamics in a Mediterranean shrubland. *For. Ecol. Manage.* **147**: 25-37.
- DÍAZ BARRADAS, M. C., MATEOS, M. A., ORELLANA, R., ZUNZUNEGUI, M. & GARCÍA NOVO, F. 1999. Changes in the canopy structure of the Mediterranean shrub *Lavandula stoechas* after disturbance. *J. Veget. Sci.* **10**: 449-456.
- KUMMEROW, J. 1989. Structural aspects of shrubs in Mediterranean-type plant communities. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* **3**: 5-11.
- MILLER, P. C. 1981. Similarities and limitations of resource utilization in Mediterranean type ecosystems. In Miller, P. C. (ed.). *Resource Use by Chaparral and Matorral*. Ecological Studies 39. Springer-Verlag, NY. pp. 369-407.
- PUIGDEFABREGAS, J. & PUGNAIRE, F. I. 1999. Plant survival in arid environments. In Pugnaire, F. & Valladares, F. (eds.). *Handbook of Functional Plant Ecology*. Marcel Dekker, Inc., USA. pp. 381-405.
- RUNDEL, P. W., BAKER, G. A., PARSONS, D. J. & STOHLGREN, T. J. 1987. Postfire demography of resprouting and seedling establishment by *Adenostoma fasciculatum* in the California chaparral. In Tenhunen, J. D. et al. (eds.). *Plant Response to Stress. Functional Analysis in Mediterranean Ecosystems*. NATO ASI Series. Vol. G15. Springer-Verlag, Berlin. pp. 575-596.
- SABATÉ, S., GRACIA, C. A. & SÁNCHEZ, A. 2002. Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. *For. Ecol. Manage.* **162**: 23-37.
- SCARASCIA-MUGNOZZA, G., OSWALD, H., PFUSSI, P. & RADOGLU, K. 2000. Forests of the Mediterranean region: gaps in knowledge and research needs. *For. Ecol. Manage.* **132**: 97-109.
- TÁRREGA, R., LUIS-CALABUIG, E. & VALBUENA, L. 2001. Eleven years of recovery dynamic after experimental burning and cutting in two *Cistus* communities. *Acta Oecol.* **22**: 277-283.
- TRABAUD, L. 1981. Man and fire: impacts on mediterranean vegetation. In Di Castri, F., Goodall, D. W. & Specht, R. L. (eds.). *Mediterranean-Type Shrublands*. Ecosystems of the World 11. Elsevier Scientific, Amsterdam. pp. 1-52.
- TRABAUD, L. 1994. Postfire plant community dynamics in the mediterranean basin In Moreno, J. M. & Oechel, W. C. (eds) *The Role of Fire in Mediterranean-Type Ecosystems*. Ecological Studies 107. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-15.

## MICORRIZAS EM *AMMOPHILA ARENARIA* – COMPARAÇÃO ENTRE DOIS SISTEMAS DUNARES

Joaquim Santos<sup>1\*</sup>, Catarina Schreck Reis<sup>1</sup>, M. Teresa Gonçalves<sup>2</sup>  
& Helena Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto do Mar, Dep. Botânica, Universidade de Coimbra, 3000 Coimbra

<sup>2</sup> Instituto Ambiente e Vida, Dep. Botânica, Universidade de Coimbra, 3000 Coimbra

\* Joaquimsantos@mail.pt

Santos, J., Schreck Reis, C., Gonçalves, M. T. & Freitas, H. (2004). Micorrizas em *Ammophila arenaria* – comparação entre dois sistemas dunares. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 101-108.

A gramínea *Ammophila arenaria* é uma espécie muito importante na protecção dos sistemas dunares europeus. Em virtude da sua vasta distribuição geográfica e grande amplitude ecológica, esta espécie apresenta grande variabilidade, tendo-se registado em trabalhos prévios algumas diferenças entre as populações existentes na costa portuguesa.

Neste trabalho foram comparadas as associações micorrízicas de duas populações de *A. arenaria* – uma em S. Jacinto e outra na Comporta – uma vez que a associação com fungos micorrízicos tem sido referida como condição importante para o vigor vegetativo da planta, principalmente em condições de acumulação de areia. Determinou-se a percentagem de colonização radicular e a densidade de esporos presentes na rizosfera das plantas amostradas. Ambos os parâmetros foram significativamente mais elevados em S. Jacinto. Apenas se registou relação directa entre a percentagem de colonização e o número de esporos em S. Jacinto. Neste local, não se verificou correlação significativa da percentagem de colonização nem do número de esporos com a temperatura do ar, a precipitação ou a humidade relativa do solo. Na Comporta, registou-se uma relação significativa entre a percentagem de colonização e a humidade do solo. As diferenças encontradas devem-se, provavelmente, a diferenças na composição em espécies das populações de fungos AM nos dois locais de estudo.

Palavras-chave: micorrizas arbusculares, fungos AM.

Santos, J., Schreck Reis, C., Gonçalves, M. T. & Freitas, H. (2004). Mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Portuguese coastal sand dunes. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 101-108.

*Ammophila arenaria* is a very important species for sand dunes protection all along the European coast. According to its wide distribution, this species shows high variability, and some differences between populations of Portuguese coast have been recorded in a previous work.

Since the association with mycorrhizal fungi has been noticed as an important feature for growth and development of *A. arenaria*, especially when sand deposition occurs, we have compared mycorrhizas in two populations - S. Jacinto (North of Portugal) and Comporta (South of Portugal).

Mycorrhizal associations were compared by quantification of root length colonization and by determination of spore density in the rhizosphere. The levels of colonization were different, being greater in S. Jacinto, the northern site. Spore density was also different between field sites, with higher values in S. Jacinto as well. Correlation between colonization and spore number was found only in S. Jacinto. No correlation was found between temperature, precipitation or soil moisture with colonization or spore number, except in Comporta between colonization and soil moisture.

Differences in mycorrhizal colonization of *A. arenaria* between north and southern locations in Portugal are probably due to differences in the specific composition of mycorrhizal fungi populations.

Key words: Arbuscular mycorrhizas, AM fungi.

## INTRODUÇÃO

A gramineia *Ammophila arenaria* (L.) Link é uma espécie particularmente importante na protecção dos sistemas dunares europeus, uma vez que consegue formar uma barreira eficaz contra a erosão, dada a sua enorme capacidade de retenção e fixação de areia (HUISKES, 1979). Em condições naturais, *A. arenaria* estabelece micorrizas arbusculares (AM) (GIOVANNETTI & NICOLSON 1983; ERNST *et al.*, 1984).

Recentemente, alguns estudos demonstraram o efeito benéfico das micorrizas no crescimento e vigor de populações de *A. arenaria* em condições naturais e em plantações efectuadas em sistemas dunares degradados (KOSKE & GEMMA, 1997). Em condições experimentais, LITTLE & MAUN (1996) verificaram que a micorrização das plântulas promovia o aumento da área foliar e, quando associada à acumulação de areia, promovia o incremento do peso seco das raízes em *Ammophila breviligulata*, espécie congénere norte-americana. A principal vantagem da colonização micorrízica para *A. arenaria* pode ser a exploração do

solo recém-formado quando há acumulação de areia (PERUMAL & MAUN, 1999), explicação que permite conciliar a estimulação do crescimento das plantas pela deposição de areia com os benefícios esperados das AM.

Estudos anteriores efectuados em sete locais ao longo da costa portuguesa (REIS, 2000) mostraram existir diferenças entre algumas populações, nomeadamente no que diz respeito ao tamanho, densidade dos indivíduos e floração (peso e comprimento das inflorescências). Entre esses locais, os que apresentaram menores diferenças relativamente aos factores físico-químicos do ecossistema foram a Reserva Natural de S. Jacinto e a Praia da Comporta.

Sendo conhecidas as vantagens para as plantas da associação micorrízica (SMITH & READ, 1997), pretendeu-se aprofundar o estudo em sistemas dunares portugueses no que se refere à existência de fungos AM associados a *A. arenaria*, concretamente, investigar se os fungos AM podem contribuir para as diferenças observadas entre as populações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Áreas de estudo

O estudo foi realizado em populações de *A. arenaria* de dois ecossistemas dunares localizados, respectivamente, no norte e no sul do país: S. Jacinto (Reserva Natural das Dunas de S. Jacinto) e Comporta (Reserva do Estuário do Sado). Foram obtidos os dados meteorológicos das estações mais próximas dos

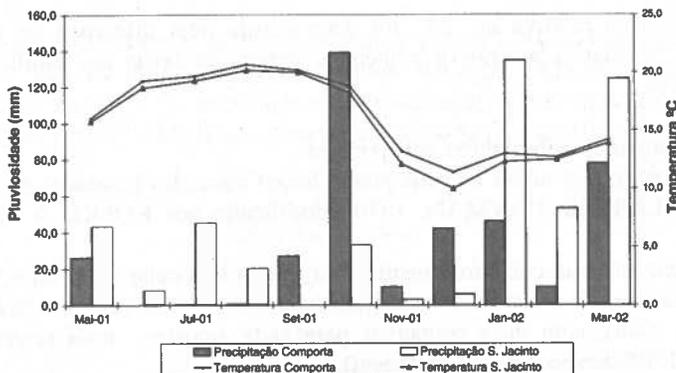


Figura 1. Dados meteorológicos dos dois locais para o período estudado (temperatura média do ar e precipitação total) (dados do Instituto Nacional de Meteorologia).

locais de estudo (Fig. 1), tendo-se verificado que a temperatura média mensal foi idêntica nos dois locais ao longo de todo o estudo. Relativamente à precipitação, embora o valor total anual tenha sido semelhante nos dois locais, verificaram-se diferenças consideráveis nos valores médios mensais que foram superiores em S. Jacinto, excepto nos meses de Setembro a Dezembro de 2001.

### Recolha e armazenamento das amostras

Em cada local de estudo efectuaram-se seis colheitas com intervalos de dois meses, entre Maio de 2001 e Março de 2002. Em cada amostragem foram colhidas amostras de raízes e de solo rizosférico de dez exemplares ao acaso, na duna primária. As amostras de raízes foram preservadas em etanol a 70% até serem processadas. As amostras de solo rizosférico foram mantidas a 4 °C e posteriormente secas à temperatura ambiente.

Para a caracterização geral do solo, determinaram-se alguns parâmetros físico-químicos nas amostras da primeira amostragem (Maio de 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos do solo dos locais de estudo. Os valores apresentados referem-se às amostras de Maio de 2001

	S. JACINTO	COMPORTA
pH	8,21 ± 0,06	8,25 ± 0,06
Matéria orgânica*	0,12 ± 0,005	0,15 ± 0,005
Azoto total (%)	0,002 ± 0,0002	0,002 ± 0,0005
Fósforo total (µg/g)	3,55 ± 0,08	3,69 ± 0,14

\* Parâmetros para os quais houve diferenças significativas (ANOVA - 0,05)

A humidade relativa do solo foi determinada pela diferença de peso das amostras pesadas logo após a colheita e depois de secas em estufa a 70°C, durante 48h.

### Quantificação da colonização micorrízica

Sub-amostras das raízes de cada planta foram clareadas e coradas com *trypan blue* (PHILLIPS & HAYMAN, 1970, modificado por KOSKE & GEMMA, 1989).

A colonização radicular foi quantificada à lupa binocular (×25 ou ×50), pelo método da linha de intersecção (*grid-line intersect method*) (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980), com duas contagens para cada amostra, após rearranjo (no mínimo, 150 intersecções por contagem).

### Extracção e quantificação de esporos do solo rizosférico

Para a quantificação dos esporos apenas foram utilizadas quatro das dez amostras de solo rizosférico de cada amostragem. Essas quatro amostras foram escolhidas em função da percentagem de colonização micorrízica (previamente quantificada): utilizaram-se as amostras de solo rizosférico das plantas com os dois valores mais elevados e os dois valores mais baixos de colonização micorrízica.

De cada amostra pesaram-se 50 g (peso seco) e efectuaram-se várias suspensões que foram crivadas (malhas de 0,25 mm, 0,100 mm e 0,045 mm) e filtradas (adaptado de GERDEMANN & NICOLSON, 1963). A contagem dos esporos foi efectuada sobre o filtro, à lupa binocular ( $\times 50$ ) e estes separados em um de quatro morfotipos, de acordo com a cor: preto, rosa, castanho e creme.

### Análise estatística

Uma vez que não se verificou homogeneidade de variâncias, mesmo após transformação angular dos valores apresentados em percentagem ( $x = \arcsen \sqrt{x}$ ) foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para comparação dos resultados obtidos. A relação entre diferentes parâmetros foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância considerado foi de 0,05 em ambos os testes estatísticos. Toda a análise estatística foi desenvolvida no programa Statistica 5.1 para Windows.

## RESULTADOS

### Colonização Micorrízica

Durante o período de amostragem, 93% das amostras de *S. Jacinto* e 80% das amostras da *Comporta* apresentavam-se colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (AM). As estruturas fúngicas observadas nas raízes colonizadas foram hifas e vesículas, não se tendo registado a presença de arbúsculos.

As percentagens de colonização radicular foram significativamente diferentes entre os dois locais de estudo e, de modo geral, apresentaram valores baixos, com a média de 5,9% em *S. Jacinto* (0% a 25,2%) e de 1,9% na *Comporta* (0% a 8,3%). Os valores das percentagens médias de cada colheita encontram-se representados na Fig. 2. A percentagem de colonização variou significativamente em função do período de colheita apenas na *Comporta* ( $p = 0,0102$ ).

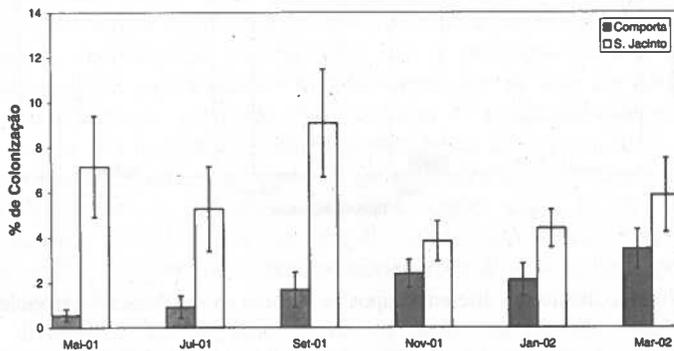


Figura 2 – Percentagens médias do comprimento de raiz colonizada em de *A. arenaria* nos meses de amostragem ( $\pm$  erro padrão).

### Densidade de esporos

O número de esporos encontrados foi significativamente diferente nos dois locais de estudo, com uma média de 38 esporos/100 g de solo em S. Jacinto (de 0 a 170) e 3,8 esporos/100 g de solo na Comporta (de 0 a 24). Na Fig. 3 apresentam-se os valores médios mensais e na Fig. 4 a densidade de cada morfotipo. O número de esporos não variou significativamente em função da época de colheita.

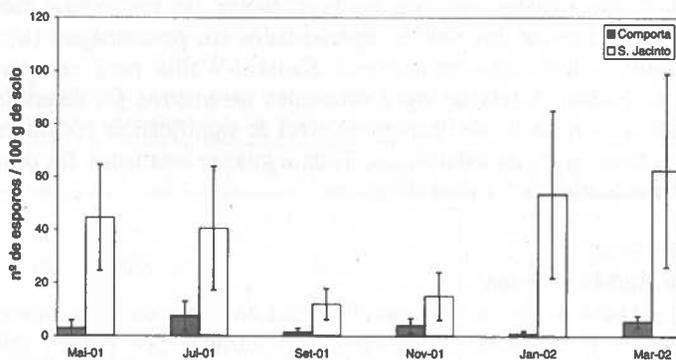


Figura 3 – Número médio de esporos encontrados em solo rizosférico de *A. arenaria* nos meses de amostragem ( $\pm$  erro padrão).

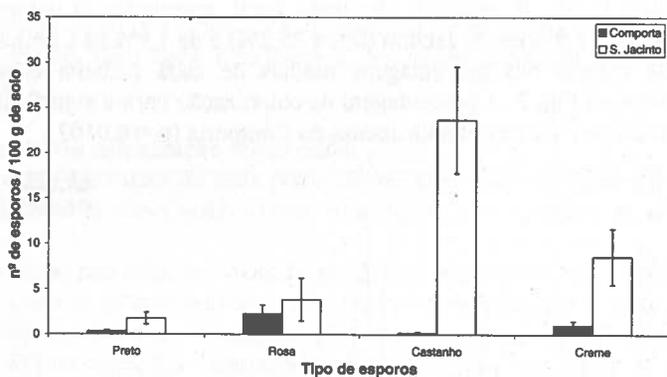


Figura 4 – Número médio dos diferentes tipos de esporos encontrados ( $\pm$  erro padrão).

Observou-se relação positiva significativa ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,523$ ) entre o número de esporos e a percentagem de colonização micorrízica apenas em S. Jacinto. Por sua vez, na Comporta a tendência foi inversa, apesar de não haver relação significativa.

A humidade relativa do solo foi significativamente diferente nos dois locais (fig. 5), mas apenas na Comporta se registou relação significativa entre a percentagem de colonização e a humidade do solo ( $p = 0,0259$ ;  $r = 0,2733$ ).

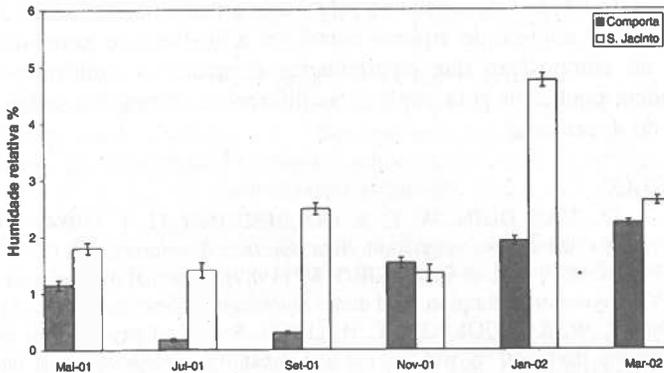


Figura 5 – Humidade relativa do solo nos meses de amostragem para os dois locais de estudo ( $\pm$  erro padrão).

## DISCUSSÃO

A percentagem de colonização de *A. arenaria* e o número de esporos da rizosfera apresentaram valores baixos, o que pode estar relacionado com as condições adversas do ecossistema dunar (MAUN, 1998). Os valores da percentagem de colonização referidos para *A. arenaria* são, de modo geral, reduzidos (e.g. GIOVANNETTI & NICOLSON 1983; ERNST *et al.*, 1984) tendo no entanto GIOVANNETTI & NICOLSON (1983) observado grande quantidade de micélio extra-radicular na rizosfera das plantas. Neste trabalho, não se procedeu à observação nem à quantificação desse micélio.

O facto de não se verificarem padrões de sazonalidade em relação ao número de esporos encontrados, não significa que a produção de esporos não seja sazonal, uma vez que os esporos podem permanecer no solo por longos períodos de tempo. Há ainda a ter em conta o facto de existirem diferentes tipos de esporos (Fig. 4) que, provavelmente, pertencem a espécies diferentes e que podem apresentar diferentes padrões de esporulação, em virtude de eventuais interacções entre as diferentes espécies, como sugerido por GEMMA e colaboradores (1989). Uma vez que os valores utilizados na análise são os valores totais, os eventuais padrões sazonais de determinadas espécies podem não ser evidentes.

As diferenças encontradas entre os dois locais não são explicáveis isoladamente por nenhum dos factores exógenos analisados: a temperatura do ar foi idêntica nos dois locais e a humidade do solo, que foi significativamente diferente nos dois locais, apenas apresentou correlação com a percentagem de colonização na Comporta. Um dos factores determinantes que poderá explicar as diferenças observadas é a composição das comunidades fúngicas, apesar de ser

conhecido que a quantidade e tipo de esporos encontrados não é um indicador fiável das espécies de fungos que estabelecem associações com a planta (KOWALCHUK *et al.*, 2002). Também o facto de se terem verificado resultados diferentes nos dois locais de estudo ao relacionar a percentagem de colonização micorrízica com o número de esporos corrobora a hipótese de haver diferenças acentuadas na composição das comunidades fúngicas. A confirmar-se, esta hipótese poderá contribuir para explicar as diferenças observadas entre as duas populações de *A. arenaria*.

#### REFERÊNCIAS

- ERNST, W. H. O., VAN DUIN, W. E. & OOLBEKKING, G. T. (1984). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in dune vegetation. *Acta Botanica Neerlandica* 33 (2): 151-160.
- GEMMA, J. N., KOSKE, R. E. & CARREIRO, M. (1989). Seasonal dynamics of selected species of VA mycorrhizal fungi in sand dune. *Mycological Research* 92 (3): 317-321.
- GERDEMANN, J. W. & NICOLSON, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- GIOVANNETTI, M. & NICOLSON, T. H. (1983). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas in Italian sand dunes. *Transactions of the British Mycological Society* 80 (3): 552-557.
- HUISKES, A. H. L. (1979). Biological flora of the British Isles: *Ammophila arenaria* (L.) Link (*Psamma arenaria* (L.) Roem. et Schult; *Calamagrotis arenaria* (L.) Roth). *Journal of Ecology* 67: 363-382.
- KOSKE, R. E. & GEMMA, J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA micorhizas. *Mycological Research* 92 (4): 486-488.
- KOSKE, R. E. & GEMMA, J. N. (1997) Mycorrhizae and succession in plantings of beachgrass in sand dunes. *American Journal of Botany* 84 (1): 118-130
- KOWALCHUK, G. A., SOUZA, F. A. D. & VAN VEEN, J. A. (2002). Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 11: 571-581.
- LITTLE, L. R. & MAUN, M. A. (1996). The "Ammophila problem" revisited: a role for mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 84: 1-7.
- MAUN, M. A. (1998). Adaptations of plants to burial in coastal sand dunes. *Canadian Journal of Botany* 76: 713-738.
- PERUMAL, J. V. & MAUN, M. A. (1999). The role of mycorrhizal fungi in growth enhancement of dune plants following burial in sand. *Functional Ecology* 13: 560-566.
- PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55 (1): 158-161.
- REIS, C. S. C. (2000). "Monitorização de *Ammophila arenaria* (L.) Link em ecossistemas dunares portugueses." Tese de Mestrado. *Faculdade de Ciências e Tecnologia*: Coimbra, Universidade de Coimbra 84 pp
- SMITH, S. E. & READ, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. London, Academic Press.

## CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA VEGETAÇÃO DA MATA DO BOMBARRAL

E. Vilaça<sup>1,2</sup> & O. Correia<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dep. Ciências Naturais, Escola Secundária do Bombarral, 2540-004 Bombarral; <sup>2</sup> Real 21 – ADRR. email: evilaca@esb.pt <sup>3</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Bloco C2, 4º Piso, 1749-016 Lisboa. email: odgato@fc.ul.pt

Vilaça, E. & Correia, O. (2004). Contributo para a caracterização da vegetação da Mata do Bombarral. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 109-121.

A Mata do Bombarral é uma mancha florestal com cerca de quatro hectares, situada no centro da vila. É um bosque de feição tipicamente mediterrânica, onde predominam o medronheiro (*Arbutus unedo*), o aderno (*Phillyrea latifolia*), a aroeira (*Pistacia lentiscus*), o folhado (*Viburnum tinus*), o sobreiro (*Quercus suber*), o carrasco (*Quercus coccifera*) e o carvalho cerquinho (*Quercus faginea*), entre outros. O presente estudo tem o objectivo de reunir um conjunto de informações que permitam contribuir, por um lado, para uma gestão fundamentada da Mata e, por outro, para a sua valorização do ponto de vista ambiental e pedagógico. Apresentam-se os resultados obtidos com base em estudos demográficos e de regeneração realizados para algumas das espécies dominantes, que visam diagnosticar a sua situação actual.

Palavras-chave: Bombarral, Mata, estudos demográficos.

Vilaça, E. & Correia, O. (2004). Contribution to the characterization of Bombarral woodland vegetation. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 109-121.

Bombarral woodland is about four hectares, located in the center of Bombarral town. It is a typical mediterranean forest, dominated by *Arbutus unedo*, *Phillyrea latifolia*, *Pistacia lentiscus*, *Viburnum tinus*, *Quercus suber*, *Quercus coccifera* and *Quercus faginea*. The main objective of the present study is to get some useful information for Bombarral woodland management and valorization as a very important educational resource. The results were obtained through demographic and regeneration studies on some of the prevailing species, in order to diagnose the present situation.

Keywords: Bombarral, Woodland, Demographic studies.

## INTRODUÇÃO

Na história do Bombarral não são muitas as referências à Mata Municipal, outrora coutada particular anexa ao palácio dos Henriques, apresentando por isso um elevado grau de preservação da vegetação original.

Classificada de "Interesse Público" (Diário do Governo 299, II Série, 24/12/1941), é constituída actualmente por formações semi-naturais, resultantes de uma acção humana constante, uma vez que, como mata urbana, esta acção tem estado sempre presente através de limpezas e abertura de caminhos. A sua gestão tem estado entregue à autarquia, a qual tem promovido algumas intervenções mais ou menos significativas. A última intervenção, em 1998, abrangeu toda a Mata e consistiu na redução do número de loureiros (*Laurus nobilis*), espécie que assumia então características de invasora. Foram também removidos diversos carrascos (*Quercus coccifera*) e demais vegetação com o objectivo de evidenciar os exemplares notáveis e incrementar a regeneração natural das diferentes espécies.

Esta mata reveste-se de grande interesse, em virtude de constituir um dos últimos redutos da vegetação que há vários séculos dominava a Região. Algumas das espécies apresentam exemplares com dimensões absolutamente invulgares, chegando mesmo alguns sobreiros a ultrapassar os 20 metros de altura.

Segundo Braun-Blanquet *et al.* (1956), a região biogeográfica onde se situa o Bombarral pertence à aliança *Quercion-faginea*, aliança mediterrâneo-atlântica que no ocidente da Península Ibérica substitui o *Quercion ilicis*. Segundo estes autores a associação que inclui o centro litoral até ao Mondego corresponde ao domínio climácico do *Arisareto-Quercetum faginea*, dominada pelo carvalho cerquinho (*Quercus faginea*) ao qual se associa muito frequentemente *Quercus rotundifolia* e, em solos descarbonatados, *Quercus suber*. Actualmente estes povoamentos naturais do *Arisareto-Quercetum faginea* são muito raros, encontrando-se apenas algumas parcelas mais ou menos intactas em locais não aproveitados pelo Homem e que nos permitem ter uma imagem da floresta natural destas regiões.

Segundo a classificação de COSTA *et al.* (1998), o Bombarral situa-se na Região Mediterrânea, Sub-Região Mediterrânica Ocidental, Província Gaditano-Onubo-Algarviense. É uma unidade biogeográfica essencialmente litoral que se estende desde a ria de Aveiro até aos areais da Costa del Sol. Dentro desta província inclui-se o sector Divisório Português, caracterizado por uma vegetação de grande originalidade e onde se salientam os bosques de carvalho cerquinho – *Arisaro-Quercetum broteroi* e os de sobreiro – *Asparago aphylli-Quercetum suberis*.

A gestão e conservação de espaços verdes, como a Mata do Bombarral, está dependente de um conhecimento profundo acerca da distribuição das populações das espécies dominantes, e que no momento actual contribuem para a sua matriz estrutural determinando o mosaico da vegetação. Para além duma análise do estado actual de conservação destas formações vegetais, o conhecimento das

estratégias de regeneração e de estabelecimento destas espécies é fundamental em planos de gestão, permitindo-nos prever o curso da evolução de determinadas comunidades face a diferentes constrangimentos ambientais e/ou antropogénicos.

Com o presente trabalho pretende-se fazer uma caracterização ecológica da Mata tendo presente dois aspectos fundamentais: (i) contribuição para a sua conservação e gestão e (ii) perspectivar a Mata em termos de educação ambiental fazendo a ligação às escolas e comunidade de uma forma geral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

#### *Localização, topografia, geologia e solos*

O Bombarral localiza-se na Região Oeste de Portugal (fig. 1), cerca de 70 Km ao norte de Lisboa (39°16'N e 09°09'W), na província ecológica Gaditano-Onubo-Algarviense, Sector Divisório português (RIVAS-MARTINEZ, 1987; COSTA *et al.* 1998). O clima de feição tipicamente mediterrânica, caracteriza-se por Invernos chuvosos e frescos que contrastam com Verões quentes e secos, embora temperados pela proximidade do mar.

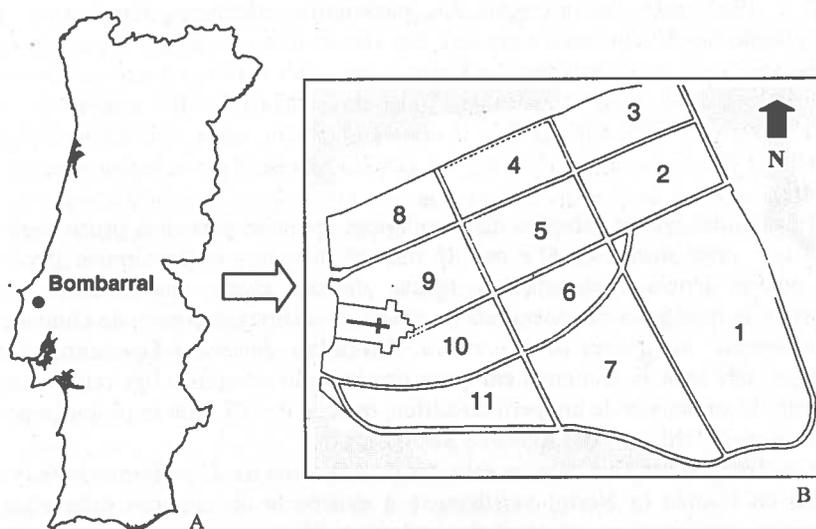


Figura 1. (A) Localização do Bombarral. (B) Planta da Mata - numeração dos talhões proposta por OLIVEIRA & FABIÃO (1991).

Do ponto de vista geológico predominam as chamadas Camadas do Freixial, do Portlandiano (Jurássico superior), que são representadas por grés argilosos, por vezes micáceos, com algumas intercalações conglomeráticas, por argilas e margas, por vezes com concreções calcárias (ZBYSZEWSKI & FERREIRA, 1966).

Segundo CARDOSO (1950) no Bombarral existem solos vermelhos mais ou menos podzolizados, podzols e solos podzolizados e raros solos pardos florestais. Estaremos assim na zona de transição da região podzólica para a região das terras vermelhas mediterrânicas.

O solo da Mata tem uma textura claramente arenosa, com uma percentagem de matéria orgânica de 10 a 15% a 5 centímetros de profundidade que diminui para 1 a 2% aos 30 centímetros. Relativamente ao pH, análises recentes a amostras recolhidas em vários pontos da Mata revelaram-nos a existência de alguma heterogeneidade, que, no entanto, confirma o carácter ácido deste solo ( $5,8 \pm 0,2$  são os valores mais frequentes).

### *Clima*

A classificação do clima foi feita de acordo com o índice xerotérmico de Gaussen e os andares bioclimáticos de Emberger (ALCOFORADO *et al.*, 1982).

Recorreu-se aos dados de uma estação meteorológica da Direcção Regional de Agricultura do Ribatejo e Oeste a 2 Km de Bombarral, na aldeia de Azambujeira dos Carros (39°17'N e 09°11'W). Analisaram-se os registos efectuados entre 1985 e 1992 para determinação dos parâmetros climáticos temperatura e precipitação (médias mensais e anuais). Em virtude de se tratar de um período de apenas sete anos, os valores obtidos foram confrontados com os dados recolhidos entre 1936 e 1960 pelas estações de Caldas da Rainha (39°24'N e 09°08'W) e Dois Portos (39°02'N e 09°11'W). Usaram-se também, como referência, dados da estação de Óbidos entre 1978 e 1994 (INAG / Rede Meteorológica - estação 17C/07).

Os dados das quatro estações meteorológicas apontam para uma precipitação anual que varia entre os 600 e os 745 mm. O diagrama ombrotérmico (fig.2) põe em evidência características típicas de um clima mediterrânico: a) precipitação moderada e concentrada na estação fria (Inverno e parte do Outono), concretamente nos meses de Novembro, Dezembro, Janeiro e Fevereiro; com destaque para os dois primeiros em que a precipitação ultrapassa ligeiramente os 100 mm; b) existência de um período xérico, em que  $P < 2T$ , que se prolonga por quatro meses (Junho, Julho, Agosto e Setembro).

Da análise comparativa entre as estações de Azambujeira, Dois Portos (a Sul) e Caldas da Rainha (a Norte) verificou-se a existência de algumas diferenças, raramente significativas, ao nível dos valores médios mensais da precipitação que, no entanto, em nada interferem com a presente análise. Apenas no mês de Março a estação de Azambujeira apresenta um desvio significativo relativamente às outras duas. Mas, o confronto com os dados, seus contemporâneos, da estação de Óbidos sugere que, efectivamente, nos últimos anos se verificou uma tendência para a diminuição da precipitação no mês de Março. Considerámos importante utilizar os dados da estação de Azambujeira em virtude de se encontrar apenas a 2 Km da área em estudo.

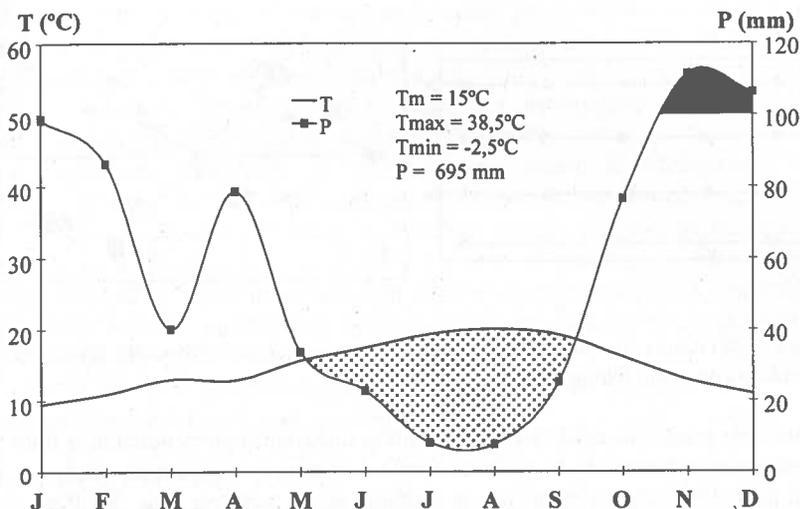


Figura 2. Diagrama ombrotérmico de Gaussen com base em valores recolhidos entre 1985 e 1992. (Azambujeira)

De acordo com o índice xerotérmico de Gaussen calculado por ALCOFORADO *et al* (1982), o clima do Bombarral pode classificar-se de Mesomediterrâneo atenuado ( $x = 58$  para Caldas da Rainha e  $x = 71$  para Dois Portos), e Sub-húmido de acordo com os andares bioclimáticos de Emberger .

As plantas esclerófilas sempre verdes, características dos climas mediterrânicos (BLONDEL & ARONSON, 1999), estão representadas na Mata do Bombarral por diversos géneros, o que confirma tratar-se, efectivamente, de uma mancha representativa daquela que é (embora devastada pela mão do Homem) a vegetação natural da região.

## Metodologia

### *Caracterização dos estratos arbóreo e arbustivo*

Para a caracterização do estrato arbóreo e arbustivo foi utilizado um dos métodos das distâncias - o método dos quadrantes desenvolvido por Cottam & Curtis, 1956 (MULLER-DOMBOIS & ELLENBERG, 1974). O levantamento da vegetação decorreu entre os meses de Março e Julho.

A Mata encontra-se dividida em 11 talhões definidos pelas ruas (fig. 1). Em cada talhão foram definidas linhas de amostragem paralelas aos caminhos Este-Oeste (normalizou-se a direcção N 70° E). A primeira linha de cada talhão foi sempre marcada a 3 metros da rua adjacente (excepto nos casos em que existiam barreiras físicas, passando para os 5 metros). A distância entre cada linha foi de 10 metros e ao longo de cada linha foram marcados pontos de amostragem de 10 em 10 metros (fig. 3).

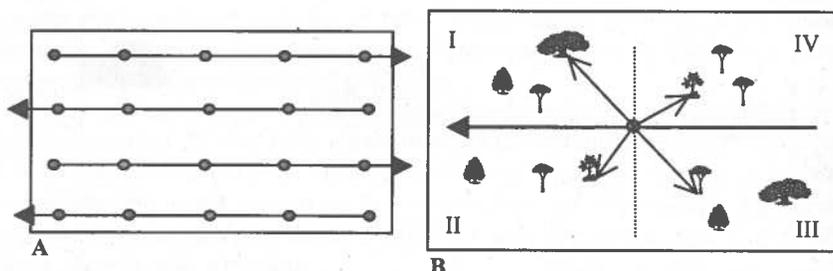


Figura 3. (A) Representação esquemática da amostragem de um talhão. (B) Amostragem em cada ponto pelo Método dos Quadrantes.

Em cada ponto foi estabelecida uma linha imaginária perpendicular à linha de amostragem, estabelecendo-se desta forma 4 quadrantes. Em cada quadrante foi medida a distância do ponto ao indivíduo mais próximo (fig. 3). Para cada indivíduo foi ainda registado o diâmetro à altura do peito – DAP (a 1,30 m de altura). Definiu-se como critério de inclusão um DAP  $\geq 1$  cm. Nas plantas com menos de 1,80 m de altura o diâmetro foi medido a meia altura.

Esta metodologia acabou por se traduzir na marcação sistemática de pontos que, no seu conjunto, definem uma rede de amostragem que cobriu a totalidade da área da Mata. Ao todo foram amostrados 268 pontos. O primeiro ponto de cada linha foi marcado alternadamente nos extremos Este e Oeste.

#### *Estudos de Regeneração*

Em cada ponto de amostragem das linhas efectuadas no método dos quadrantes foram realizadas amostragens em quadrados de  $0.25 \text{ m}^2$ , tendo como centro o ponto. Em cada quadrado foram registados o número de plântulas ( $< 1$  ano) e de juvenis (diâmetro  $< 1$  cm) das espécies arbóreas e arbustivas.

#### *Tratamento dos resultados*

Os dados de campo foram registados numa base de dados, a partir da qual foi calculada a densidade total ( $Dt$ , nº indivíduos/ha) e a área basal total ( $AB$ ) do povoamento, segundo as fórmulas propostas por MULLER-DOMBOIS & ELLENBERG (1974). Posteriormente foram calculados para cada espécie os seguintes parâmetros:  $n$  - número de indivíduos,  $ab$  - área basal total,  $p$  - frequência absoluta (número de pontos de ocorrência),  $F$  - frequência relativa,  $D$  - densidade relativa,  $Do$  - dominância relativa,  $Da$  - densidade absoluta e importância ( $F + D + Do$ ).

Os resultados obtidos no método dos quadrados e dos quadrantes permitiram-nos quantificar o número de plântulas ( $< 1$  ano), de juvenis (diâmetro  $< 1$  cm) e o número de indivíduos por classes etárias, utilizando os diâmetros medidos à

altura do peito. Foram elaborados histogramas para distribuição de frequência das classes de diâmetro (DAP) por espécie, tendo-se considerado apenas as que apresentam um valor de densidade absoluta  $\geq 100$  indivíduos por hectare. O cálculo do número de classes (NC) e amplitude das mesmas (IC) foi efectuado segundo Spiegel, 1970 (KURTZ & ARAÚJO, 2000).

Apresenta-se, para todas as espécies, uma classe K (diâmetro  $< 1\text{cm}$ ) amostrada pelo método dos quadrados. Atendendo ao critério de inclusão ( $\text{DAP} \geq 1\text{cm}$ ), optou-se por criar uma classe comum a todas as espécies que engloba os indivíduos com DAP entre 1 e 5cm. A classe 1 a 5 não é definida para o folhado (*Viburnum tinus*), em virtude de apresentar uma amplitude de diâmetros bastante reduzida. O limite superior de cada classe de diâmetro foi incluído na respectiva classe.

Das 15 espécies amostradas foram seleccionadas 6 para realização de estudos demográficos, de acordo com o critério  $D_a \geq 100$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização dos estratos arbóreo e arbustivo

O levantamento efectuado pelo Método dos Quadrantes amostrou 268 pontos ao longo de 54 linhas e um total de 1044 indivíduos, distribuídos por 11 famílias, 13 géneros e 15 espécies. Recorde-se que com este método se amostraram apenas os indivíduos com  $\text{DAP} \geq 1$ , a que chamaremos população na fase estabelecida.

Foi calculada a distância média entre os indivíduos de 2,44 m e um total de 1674 exemplares por hectare. Com base no DAP, determinou-se a área basal por hectare ( $61,2 \text{ m}^2$ ) e uma área basal média por planta amostrada de  $0,037 \text{ m}^2$  (Tabela 1).

As espécies com maior valor de importância foram, por ordem decrescente, *Phillyrea latifolia*, *Quercus suber*, *Quercus coccifera*, *Laurus nobilis*, *Arbutus unedo* e *Viburnum tinus*. *Q. suber*, sendo a 2ª espécie mais importante da Mata, apresenta valores de dominância bastante elevados devido ao facto destas populações serem essencialmente constituídas por árvores de grande porte, o que lhe confere um valor de importância muito elevado. As outras espécies como *P. latifolia*, *Q. coccifera*, *L. nobilis*, *A. unedo* e *V. tinus* apresentam uma distribuição mais ou menos homogénea apresentando, cada uma delas, valores semelhantes de densidade, frequência e dominância.

Das espécies que apresentam um valor de cobertura médio destaca-se a *Quercus faginea* subsp. *broteroi* com valores de dominância muito mais elevados que a densidade e a frequência. *Rhamnus alaternus*, *Pistacia lentiscus*, *Olea europaea* var. *sylvestris* apresentam uma distribuição semelhante em termos de densidade, frequência e dominância.

As restantes espécies apresentam valores de importância muito reduzidos.

Tabela 1. Determinação de alguns parâmetros fitossociológicos com base nos dados recolhidos através do Método dos Quadrantes.

Espécie	Frequência relativa (F)	Densidade relativa (D)	Dominância relativa (Do)	Densidade absoluta	Dominância absoluta	Importância (F+D+Do)
<i>Arbutus unedo</i>	8,16%	6,51%	8,34%	109,04	5,1065	23,01
<i>Buxus sempervirens</i>	0,84%	0,57%	0,08%	9,62	0,0504	1,50
<i>Fraxinus angustifolia</i>	0,28%	0,29%	0,57%	4,81	0,3497	1,14
<i>Laurus nobilis</i>	15,75%	15,90%	5,65%	266,18	3,4597	37,30
<i>Myoporum tenuifolium</i>	0,42%	0,29%	0,23%	4,81	0,1423	0,94
<i>Olea europaea v. sylv.</i>	1,41%	1,05%	2,29%	17,64	1,4046	4,75
<i>Phillyrea latifolia</i>	27,85%	34,77%	21,22%	582,06	12,9970	83,84
<i>Pistacia lentiscus</i>	2,11%	2,11%	0,59%	35,28	0,3607	4,81
<i>Quercus coccifera</i>	18,00%	18,30%	8,88%	306,26	5,4400	45,18
<i>Quercus faginea</i>	1,55%	1,05%	4,89%	17,64	2,9916	7,49
<i>Quercus suber</i>	8,16%	6,42%	46,80%	107,43	28,6601	61,38
<i>Rhamnus alaternus</i>	5,06%	3,83%	0,11%	64,14	0,0678	9,01
<i>Robinia pseudacacia</i>	0,28%	0,29%	0,06%	4,81	0,0368	0,63
<i>Ulmus sp.</i>	0,14%	0,10%	0,00%	1,60	0,0005	0,24
<i>Viburnum tinus</i>	9,99%	8,52%	0,27%	142,71	0,1670	18,78
	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>1674,03</b>	<b>61,2347</b>	

### Estudos demográficos e de regeneração

De acordo com Daubenmire, 1968 (KURTZ & ARAÚJO, 2000), para árvores e arbustos com câmbio activo, o diâmetro do tronco é um indicador razoavelmente seguro da idade relativa, desde que as classes de tamanho não sejam divididas muito finamente, nem interpretadas muito de perto, e que se tenha em mente que a mesma amplitude de tamanhos em espécies diferentes não implica amplitudes equivalentes de idade. Uma série gradual de tamanhos tem aproximadamente o mesmo significado sucessional de uma série gradual de idades, considerando-se cada espécie individualmente. Os histogramas de distribuição de frequência de classes de diâmetro da figura 4, ilustram a estrutura demográfica de cada população.

Embora não se tenham efectuado estudos demográficos para as espécies com densidade absoluta < 100, apresenta-se na Tabela 2 o número de indivíduos pertencentes às classes etárias dos estádios juvenis para as diferentes espécies.

### Medronheiro (*Arbutus unedo*)

Com cerca de 100 indivíduos /ha a população de medronheiro encontra-se relativamente envelhecida. Cerca de metade da população na fase estabelecida apresenta um DAP  $\geq$  14cm.

Relativamente à regeneração salienta-se o reduzido número de indivíduos na classe etária de 1 a 5. Muitos dos indivíduos amostrados nesta classe (assim como em K) encontram-se muito próximos de indivíduos de grandes dimensões,

pelo que existe uma elevada probabilidade de, em muitos casos, se tratar de rebentação. Das espécies com maior valor de importância, o medronheiro é o que apresenta o menor número de plantas com diâmetro inferior a 1 cm (Fig.4).

Tabela 2. Número de indivíduos jovens, por classes de diâmetro, por cada 100m<sup>2</sup>: P1 - plântulas; P2 -  $\varnothing \leq 0,5$  cm; P3 -  $0,5$  cm  $< \varnothing < 1$  cm.

Espécie	P1	P2	P3
<i>Arbutus unedo</i>	13,43	20,90	0,00
<i>Buxus sempervirens</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Fraxinus angustifolia</i>	8,96	1,49	0,00
<i>Laurus nobilis</i>	526,87	671,64	68,66
<i>Myoporum tenuifolium</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Phillyrea latifolia</i>	102,99	47,76	20,90
<i>Pistacia lentiscus</i>	1,49	0,00	0,00
<i>Quercus coccifera</i>	76,12	104,48	40,30
<i>Quercus faginea</i>	4,48	4,48	0,00
<i>Quercus suber</i>	38,81	26,87	1,49
<i>Rhamnus alaternus</i>	0,00	0,00	5,97
<i>Robinia pseudacacia</i>	0,00	0,00	0,00
<i>Ulmus</i> sp.	0,00	0,00	0,00
<i>Viburnum tinus</i>	68,66	53,73	14,93
<b>Total</b>	<b>841,79</b>	<b>931,34</b>	<b>152,24</b>

### Loureiro (*Laurus nobilis*)

O loureiro foi um dos principais motivos da última grande intervenção na Mata do Bombarral. Antes desta, OLIVEIRA & FABIÃO (1991) referiu-se à abundância do loureiro como sendo de facto excessiva, podendo mesmo considerar-se como invasora que, pela sua abundante regeneração natural, comprometia a regeneração das outras espécies, acabando por alterar a composição da Mata e pondo assim em risco o seu carácter de "reliquia" representativa da primitiva vegetação natural.

Com cerca de 270 indivíduos / ha, a população de loureiro teria uma distribuição em "J" invertido, se não tivesse sido sujeito ao corte acentuado dos indivíduos mais jovens ( $1 < \text{DAP} < 8$ ). O loureiro passa, assim, de uma estrutura populacional estável para uma situação de desequilíbrio que, num futuro distante, se poderá traduzir numa redução efectiva da importância desta espécie na Mata.

No entanto, o loureiro parece possuir grande resiliência e, em aparente resposta ao desequilíbrio gerado, possui actualmente o maior efectivo de plantas com  $\text{DAP} < 1$  cm (63.358 plantas / 0,5 ha).

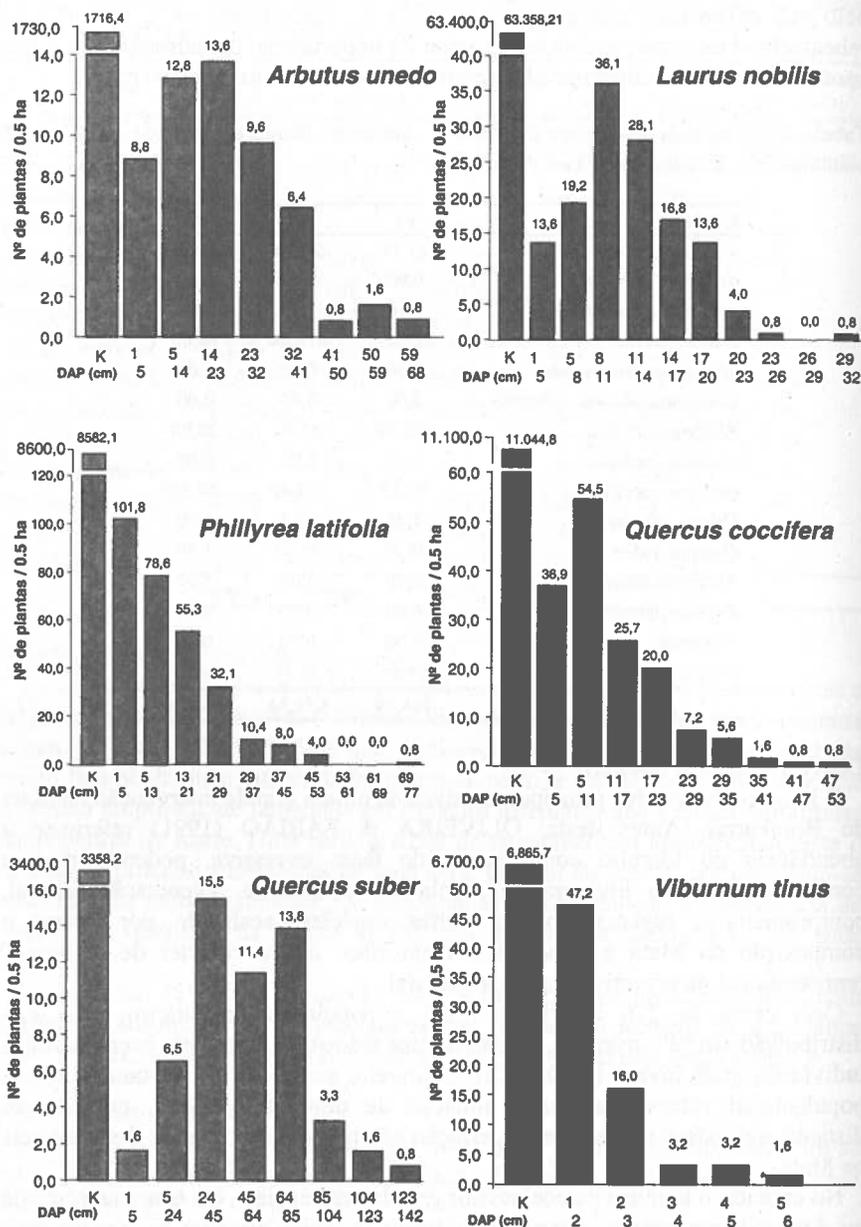


Figura 4. Estudos demográficos realizados apenas para as espécies com densidade absoluta > 100. Os valores de K resultam dos estudos de regeneração ( $K = P1+P2+P3$ ).

**Aderno (*Phillyrea latifolia*)**

O aderno é a espécie que apresenta maior valor de importância, o que decorre, essencialmente, da sua elevada densidade, cerca de 580 indiv./ha ( $Da = 582$ ), embora existam na Mata indivíduos desta espécie com um DAP muito considerável ( $\geq 70$  cm).

A análise do histograma (fig. 4) evidencia uma distribuição claramente em "J" invertido, correspondente a uma estrutura populacional estável, com regeneração natural abundante.

**Carrasco (*Quercus coccifera*)**

Com cerca de 300 indivíduos / ha, apresenta uma população com distribuição quase regular. O número de plantas inferior ao desejável na classe 1 a 5 poderá dever-se a dois factores: i) *Q. coccifera* também sofreu um corte merecedor de referência, aquando da última intervenção; ii) o seu porte muitas vezes arbustivo, poderá ter interferido na sua selecção como indivíduo mais próximo durante a amostragem. São plantas que podem apresentar um diâmetro  $\geq 1$ cm sem, contudo, terem um porte que as evidencie por entre a restante vegetação. No entanto, a espécie apresenta uma abundante regeneração natural (11.045 plantas / ha), embora muitas das planta contabilizadas possam ter ocorrido por rebentação.

Na Mata surgem, também, exemplares desta espécie com porte notável: DAP  $\geq 50$ cm e altura superior a 15m. Estes indivíduos, assim como outros de porte inferior, foram considerados como *Quercus coccifera* L. *sensus lato*, embora segundo CAPELO & COSTA (2001) trate de *Quercus coccifera* L. subsp. *rivasmartinezi*, que ocorre quase estritamente na Serra da Arrábida e endémico de Portugal.

**Sobreiro (*Quercus suber*)**

A importância assumida por esta espécie decorre, em grande medida, das dimensões evidenciadas pela maioria dos indivíduos (dominância relativa - 47%). No entanto, embora apresente alguma regeneração natural (Tabela 2), verifica-se uma predominância dos indivíduos de idade avançada. Trata-se, pois, de uma população claramente envelhecida, como demonstra o histograma de distribuição de frequência de classes de diâmetro (fig. 4). Devem considerar-se a implementação de medidas de protecção de plantas jovens, de forma a aproximar esta população do equilíbrio.

**Folhado (*Viburnum tinus*)**

Trata-se de um arbusto que não assume grandes dimensões mas que se destaca pela sua abundância (143 indiv./ha). Apresenta uma regeneração abundante e estrutura populacional estável.

## CONCLUSÕES

Na Mata do Bombarral encontramos espécies com populações diminutas e reduzida regeneração que contribuem pouco para a sua matriz estrutural, mas são igualmente importantes se se pretender manter a diversidade que actualmente caracteriza a Mata, pelo que deverão merecer uma atenção particular. Referimos, em especial, ao carvalho cerquinho (*Q. faginea*) e ao zambujeiro (*Olea europaea* var. *sylvestris*), cujas populações adultas são constituídas por um pequeno número de indivíduos, pelo que a sua presença na Mata estará comprometida caso não sejam tomadas medidas de apoio à regeneração

Outras espécies, com maior representatividade, apresentam populações envelhecidas: o medronheiro (*Arbutus unedo*) com relativamente poucos indivíduos jovens (muitos deles originários de rebentação) e uma regeneração natural baixa; o sobreiro (*Q. suber*), com uma população composta, essencialmente, por indivíduos de grande porte e com uma regeneração também bastante reduzida.

Outras ainda, pelo contrário, têm um grande peso na matriz estrutural da Mata: o aderno (*Phillyrea latifolia*) apresenta uma população estruturalmente muito estável com regeneração considerável; o carrasco (*Q. coccifera*), ligeiramente afectado pelos mais recentes cortes de vegetação, apresenta, mesmo assim, uma estrutura populacional que se poderá considerar estável.

O loureiro (*Laurus nobilis*) é uma situação especial pois a sua população reflecte, claramente, o efeito das últimas intervenções na Mata do Bombarral. Esta espécie apresentava uma densidade considerável, pelo que houve um grande desbaste, essencialmente ao nível dos indivíduos mais jovens. Em resposta ao aumento da luminosidade ao nível do solo terá havido um "boom" na regeneração natural desta espécie, pese embora a enorme facilidade com que se propaga por rebentação. Será necessário clarificar até que ponto as técnicas de controlo da sua regeneração não estarão a afectar negativamente outras espécies.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao senhor Viana Costa a cedência amável dos dados meteorológicos da estação de Azambujeira-dos-Carros, assim como aos guardas da Mata do Bombarral pela colaboração prestada, em particular ao senhor guarda Silva pela total disponibilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCOFORADO, M. J., ALEGRIA, M. F., PEREIRA, A. R., SIRGADO, C. 1982. *Domínios bioclimáticos em Portugal*, Centro de Estudos Geográficos, Lisboa.
- BLONDEL, J., Aronson, J. 1999. *Biology and Wildlife of Mediterranean Region*. Oxford University Press. Oxford.
- BRAUN-BLANQUET, J., PINTO DA SILVA, A. R. & ROZEIRA, A. (1956). *Resultats de deux excursions geobotaniques à travers le Portugal Septentrional et Moyen. II Chenaies à feuilles caduques (Quercion occidentale) et chenaies a feuilles persistentes (Quercion fagineae) au Portugal*.

- CAPELO, J. & COSTA, J. C. 2001. Notas do Herbário da Estação Florestal Nacional. Notícia acerca dos carrascais arbóreos da Serra da Arrábida. *Silva Lusitana*. Vol. 9 (2), 269 – 271.
- CARDOSO, J. V. 1950. A classificação dos solos do Bombarral e alguns índices climáticos locais. *XIII Congresso luso-espanhol para o progresso das ciências*. Separata do Tomo X. Associação Portuguesa para o Progresso das Ciências. Lisboa.
- COSTA, J.C., AGUIAR C., CAPELO J.H., LOUSÁ M. & NETO C. (1998). Biogeografia de Portugal Continental. *Quercetea*, Vol 0, 5- 56.
- KURTZ, B. C., ARAÚJO, D. 2000. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de um trecho de Mata Atlântica na Estação Ecológica estadual do Paraíso. *Rodriguésia* 51 (78/115): 69-112.
- MUELLER-DOMBOIS, D., H. ELLENBURG. 1974. *Aims and methods of vegetation ecology*. John Wiley & Sons, New York.
- OLIVEIRA, A., FABIÃO, A. 1991. *Estudo para a conservação da Mata Municipal do Bombarral*. ISA, Lisboa.
- RIVAS-MARTINES, S. 1987. Nociones sobre Fitossociologia, Biogeografia y Bioclimatología. *La vegetación de España. Colección Aula Abierta*, nº3.
- ZBYSZEWSKI, G. & FERREIRA, O. 1966. Carta Geológica de Portugal na escala 1/50.000. Notícia explicativa da folha 30B – Bombarral. Serviços Geológicos. Lisboa.

## PADRÕES DE SOBREVIVÊNCIA DE SEMENTES EM GRUPOS FUNCIONAIS DE RESPOSTA AO FOGO

Adelaide S. Clemente<sup>1</sup>, Francisco C. Rego<sup>2</sup> & Otilia Correia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ecologia e Biologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande 1749-016 Lisboa. <sup>2</sup>Centro de Ecologia Aplicada, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa.

Clemente, A.S., Rego, F.C. & Correia, O. (2004). Padrões de sobrevivência de sementes em grupos funcionais de resposta ao fogo. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 123-132.

Este trabalho teve como objectivo determinar os padrões de sobrevivência de sementes de espécies mediterrânicas pertencentes a diferentes grupos funcionais de resposta ao fogo: *Cistus monspeliensis*, *Psoralea bituminosa* e *Rosmarinus officinalis* (regeneração por semente); *Myrtus communis*, *Phillyrea angustifolia* e *Rhamnus lycioides* (regeneração vegetativa) e *Juniperus phoenicea* (sem mecanismo de regeneração). As sementes foram enterradas no solo num matagal da Serra da Arrábida e foram recuperadas após 1 a 3 anos, para determinação da percentagem de viabilidade.

Entre as espécies com regeneração por semente, a fracção de sementes viáveis no final do primeiro ano foi superior a 60% em *C. monspeliensis* e *P. bituminosa*, contrastando com apenas 1% em *R. officinalis*. Entre as espécies com regeneração vegetativa, não foram encontradas sementes viáveis em *R. lycioides* após um ano, enquanto em *M. communis* e *P. angustifolia* 28 e 35% das sementes enterradas ainda se encontrava viável. Em *J. phoenicea* este valor foi 46%. No segundo ano, a viabilidade das sementes de *P. angustifolia* e *J. phoenicea* foi inferior a 5%, enquanto no terceiro ano este valor se manteve acima de 35% em *C. monspeliensis* e *P. bituminosa*.

A elevada viabilidade das sementes de *C. monspeliensis* e *P. bituminosa* ao fim de três anos indica longevidade elevada, contrastando com a baixa persistência das sementes de *R. officinalis*. Esta espécie poderá depender da produção de semente imediatamente anterior para regenerar as populações após o fogo. Embora as sementes de *P. angustifolia* e *M. communis* possam permanecer viáveis por períodos superiores a um ano, não houve evidências de acumulação de bancos de sementes persistentes. Assim, os resultados obtidos

estão de acordo com a hipótese de uma longevidade de sementes superior nas espécies com regeneração por semente. No entanto, dentro deste grupo funcional, as diferenças na longevidade das sementes poderão conduzir a respostas diferenciadas a um mesmo regime de fogos, revelando assim a necessidade de hierarquização das classificações em grupos funcionais de modo a incluir características demográficas determinantes na resposta a perturbações, como a longevidade das sementes.

Palavras-chave: banco de sementes, espécies mediterrânicas, fogo, grupos funcionais, viabilidade de sementes.

Clemente, A.S., Rego, F.C. & Correia, O. (2004). Patterns of seed survival within fire response groups. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 123-132.

The aim of this study was to assess patterns of seed survival in Mediterranean species belonging to different functional types in relation to regenerative response after fire: *Cistus monspeliensis*, *Psoralea bituminosa* and *Rosmarinus officinalis* (seeders); *Myrtus communis*, *Phillyrea angustifolia* and *Rhamnus lycioides* (resprouters) and *Juniperus phoenicea* (nonsprouter, recruitment not stimulated by fire). Seed survival was estimated in a burial and retrieval experiment in a maquis stand at Serra da Arrábida. Seeds were buried from one to three years and recovered seeds were tested for viability.

One year after burial, more than 60% of buried seed remained viable in *C. monspeliensis* and *P. bituminosa*, contrasting with only 1% in *R. officinalis*. Among resprouters, seeds of *M. communis* and *P. angustifolia* had a viability of 28 and 35%, respectively, whereas no viable seeds remained for *R. lycioides*. The corresponding value was 46% for *J. phoenicea*. After 2 years, the percentage of viable seeds in *P. angustifolia* and *J. phoenicea* was lower than 5%, while in the third year those values remained above 35% for *C. monspeliensis* and *P. bituminosa*, respectively.

High seed longevity in *C. monspeliensis* and *P. bituminosa* is suggested by the high proportion of viable seeds three years after burial, while the results obtained for *R. officinalis* indicate low seed persistence in the seed bank. The regeneration of *R. officinalis* populations after fire may rely entirely on the previous seed crop. Although seeds of *P. angustifolia* and *M. communis* may remain viable for more than 1 year, there were no evidences of a persistent seed bank in these species. Our results confirm the hypothesis of a higher seed longevity in seeders than in resprouters. However, within seeders, variation in seed longevity is

expected to affect species response to changes in fire regimes. Thus, a hierarchical framework including demographic traits like seed longevity should be considered in disturbance-based functional types.

Keywords: fire, functional types, Mediterranean plant species, seed bank, seed viability.

## INTRODUÇÃO

As plantas dos ecossistemas mediterrânicos apresentam síndromes de características relacionadas com a sua resposta ao fogo. O mecanismo de regeneração após o fogo e as características demográficas permitem separar dois grupos principais: espécies com regeneração por semente (RS) e espécies com regeneração vegetativa (RV). As espécies RS produzem um grande número de sementes, sem mecanismos de dispersão especializados, e que se acumulam localmente em bancos de sementes persistentes. Geralmente, as sementes apresentam dormência, que é quebrada por estímulos relacionados com o fogo, como a temperatura elevada. Na ausência do fogo ou de outras perturbações, as sementes permanecem dormentes. O recrutamento de plântulas restringe-se aos primeiros anos após o fogo, sendo as populações constituídas por plantas da mesma idade. A maioria das espécies RV produz frutos carnudos, que são dispersos pelos animais, e as sementes germinam após a dispersão. Normalmente, as sementes não apresentam dormência e a germinação não ocorre na presença de estímulos relacionados com o fogo. Consequentemente, estas espécies não acumulam bancos de sementes e o recrutamento de plântulas ocorre nas condições métricas das comunidades mais maduras (KEELEY 1991, BOND & VAN WILGEN 1996, PAUSAS 1999).

As espécies RV mantêm a população a seguir ao fogo, enquanto as espécies RS podem apresentar diferenças acentuadas nas populações pré- e pós-fogo, uma vez que dependem do banco de sementes para se restabelecer. As espécies que não acumularam sementes suficientes ou cujas plantas e bancos de sementes atingiram a longevidade máxima na altura do fogo podem ser eliminadas localmente (BOND & VAN WILGEN 1996). Assim, a longevidade das sementes é um dos parâmetros essenciais para prever a resposta das espécies RS a alterações no regime de fogos. Apesar disso, é conhecida para um reduzido número de espécies (PARKER & KELLEY 1989, BOND & VAN WILGEN 1996, AULD *et al.* 2000). Com base nos síndromes de características acima descritos, assume-se normalmente que a longevidade das sementes é elevada nas espécies RS e baixa nas espécies RV. Contudo, a correlação entre a longevidade das sementes e as restantes características de cada grupo funcional não foi ainda comprovada.

Neste estudo pretende-se testar a hipótese da existência de variação na longevidade das sementes entre grupos funcionais de resposta ao fogo. Devido ao longo intervalo de tempo requerido para estimar a longevidade das sementes,

esta foi inferida a partir dos padrões de sobrevivência a curto prazo em espécies pertencentes a diferentes grupos funcionais de resposta ao fogo - regeneração por semente (RS), regeneração vegetativa (RV) e sem mecanismo de regeneração.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na Serra da Arrábida (38°27' - 38°29' N, 8°57' - 9°01' W). O local é caracterizado por um clima mediterrânico, com precipitação e temperatura média anuais de 747 mm e 16 °C, respectivamente (estação meteorológica de Setúbal, IM). Foi seleccionada uma área de estudo com cerca de 1 ha, com exposição sul, declive pouco acentuado e uma altitude de 30 m. Predominam os solos mediterrânicos vermelhos de calcários e margas e a vegetação consiste num matagal mediterrânico com cerca de 1,5 m de altura. A vegetação apresenta uma cobertura total de cerca de 90% e é dominada por *Rosmarinus officinalis*, *Cistus monspeliensis*, *Phillyrea angustifolia*, *Pistacia lentiscus* e *Myrtus communis* (CLEMENTE 2002).

As espécies estudadas foram seleccionadas entre as espécies arbustivas dominantes na área de estudo, sendo incluída apenas uma espécie herbácea - *Psoralea bituminosa*. Assim, os grupos funcionais considerados foram: i) espécies RS - *Cistus monspeliensis*, *Rosmarinus officinalis* e *Psoralea bituminosa*; ii) espécies RV - *Myrtus communis*, *Rhamnus lycioides* e *Phillyrea angustifolia* e iii) espécies sem mecanismo de regeneração - *Juniperus phoenicea*.

As sementes foram recolhidas em várias plantas de cada espécie no Verão e Outono de 1995 (Junho de 1997 em *R. officinalis*). As sementes secaram a temperatura ambiente e foram guardadas no escuro, em sacos de papel. A viabilidade inicial foi determinada em quatro réplicas de 25 sementes (Tabela 1), usando o método do tetrazólio (14 horas no escuro numa solução de cloreto de tetrazólio a 0,1%, MOORE 1973). As sementes com coloração vermelha ou rosada foram consideradas viáveis.

Em Novembro de 1995 foram estabelecidos 8 a 16 pontos ao acaso na área de estudo, tendo-se enterrado em cada um deles um a três sacos por espécie, contendo cada saco 25 sementes (Tabela 1). Em Julho de 1997 foram estabelecidos quatro pontos adicionais apenas para *R. officinalis*, num total de 20 pontos para esta espécie. Os sacos (14×12 cm) consistiam numa malha de nylon de 860 µm, foram enterrados a cerca de 1 cm de profundidade e cobertos com o solo e folhada originais. Em cada ponto, foi recuperado um saco por espécie ao fim de 11, 23 e 35 meses (Outubro de 1996, 1997 e 1998, respectivamente), correspondendo aos períodos de 1 a 3 anos referidos na Tabela 1. As sementes de *R. officinalis* permaneceram apenas 12 meses no solo (Julho 1997-Julho 1998).

As sementes recuperadas foram contadas e inspeccionadas à lupa, separando-se em intactas e danificadas (tegumento quebrado, sem embrião). Nas sementes intactas foi testada a viabilidade usando o método do tetrazólio. A análise do padrão de sobrevivência das sementes foi feita com base numa classificação em

três classes: i) perdas ((n° inicial-n° recuperado)+danificadas ou com sinais de germinação), ii) viáveis e iii) inviáveis. Os padrões de sobrevivência das sementes ao fim de um ano foram comparados dentro de cada grupo funcional com um teste  $\chi^2$ . O efeito do tempo de permanência no solo na viabilidade das sementes foi testado para cada espécie com uma ANOVÁ, seguida do teste Tukey (programa STATISTICA, Stat Soft Inc.). Foi utilizada a transformação arcseno.

Tabela 1. Espécies estudadas, mecanismo de regeneração pós-fogo, viabilidade do lote de sementes usado (determinada após a colheita), número de réplicas (sacos contendo 25 sementes) e duração da experiência (período de permanência das sementes no solo).

Mecanismo de regeneração pós-fogo	Viabilidade inicial (%)	n° réplicas	Duração (anos)
Semente (RS)			
<i>Cistus monspeliensis</i> L.	89±7	16	1, 2 e 3
<i>Psoralea bituminosa</i> L.	97±2	16	1, 2 e 3
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	55±9	20	1
Vegetativa (RV)			
<i>Myrtus communis</i> L.	61±10	16	1
<i>Phillyrea angustifolia</i> L.	94±5	16	1 e 2
<i>Rhamnus lycioides</i> L.	50±21	16	1
Nenhum			
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	57±8	8	1 e 2

## RESULTADOS

A sobrevivência das sementes ao fim de um ano de permanência no solo foi maior nas espécies RS do que nas espécies RV (Figura 1). Contudo, o padrão de sobrevivência apresentou alguma variabilidade dentro de cada grupo funcional ( $\chi^2=845,10$ ,  $P<0,001$ , g.l.=4 e  $\chi^2=236,28$   $P<0,001$ , g.l.=4 nas espécies RS e RV, respectivamente). Entre as espécies RS, 77% e 62% das sementes enterradas permaneceram viáveis em *C. monspeliensis* e *P. bituminosa*, respectivamente, contrastando com apenas 1% em *R. officinalis* (Figura 1). Esta última espécie destacou-se ainda das anteriores pela elevada percentagem de sementes inviáveis: 66%. Contudo, este valor não poderá ser atribuído a perda de viabilidade no solo, uma vez que a formação de sementes inviáveis mas aparentemente intactas resulta de um processo de interrupção do desenvolvimento do embrião quando ocorre autopolinização (HIDALGO & UBERA 2001).

Nas espécies RV não foram encontradas sementes viáveis em *R. lycioides* após um ano, enquanto em *M. communis* e *P. angustifolia* 28 e 35% das sementes enterradas ainda se encontrava viável (Figura 1). Em *J. phoenicea*, este valor foi 46%. Nestas quatro espécies, a percentagem de sementes inviáveis registou valores muito superiores aos de *C. monspeliensis* e *P. bituminosa*.

De um modo geral, não se registaram diferenças acentuadas na percentagem de

sementes não recuperadas e danificadas (perdas) entre grupos funcionais, registando-se valores entre 22 e 37% (Figura 1). Na maioria dos casos, não foi possível determinar as causas de perda ou dano nas sementes, embora tenham sido observados alguns sinais de germinação.

O decréscimo na proporção de sementes viáveis com o tempo foi significativo em todas as espécies que permaneceram no solo por períodos superiores a um ano, excepto em *P. bituminosa* (ANOVA  $F=15,48$ ,  $P=0$ ,  $g.l.=2$  *C. monspeliensis*;  $F=1,81$ ,  $P=0,17$ ,  $g.l.=2$  *P. bituminosa*;  $F=76,10$ ,  $P=0$ ,  $g.l.=1$  *P. angustifolia*;  $F=99,87$ ,  $P=0$ ,  $g.l.=1$  *J. phoenicea*) (Figura 2). No entanto, esse decréscimo foi mais acentuado em *P. angustifolia* e *J. phoenicea*, com fracções de sementes viáveis de apenas 3% no segundo ano. Em *C. monspeliensis* não se registaram decréscimos acentuados na viabilidade das sementes do segundo para o terceiro ano (teste Tukey,  $P=0,68$ ). Nesta espécie e em *P. bituminosa*, o decréscimo na percentagem de sementes viável deveu-se sobretudo a um aumento na fracção de sementes não recuperadas ou danificadas, e não a um aumento da fracção de sementes inviáveis, que se manteve baixa (1-9%, dados não apresentados).

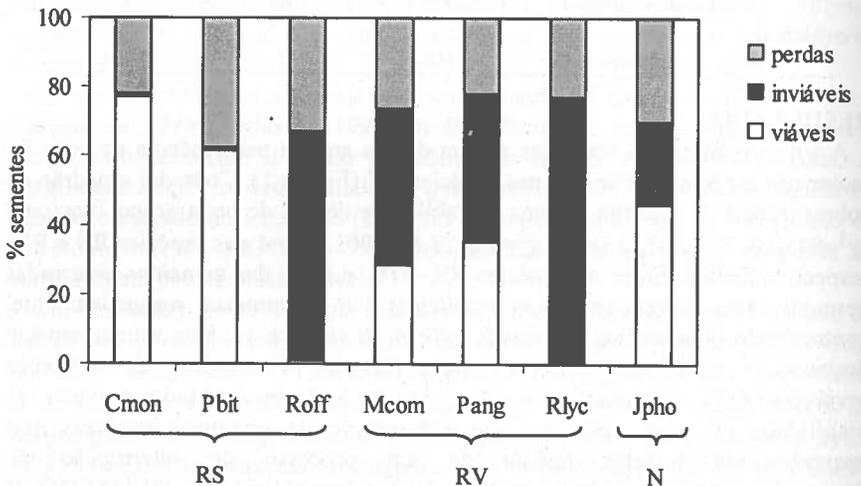


Figura 1. Padrão de sobrevivência de sementes enterradas no solo (1 cm de profundidade) durante um ano em espécies com diferentes mecanismos de regeneração após o fogo ( $n=200-500$ ). Espécies com regeneração por semente (RS): Cmon- *Cistus monspeliensis*, Pbit - *Psoralea bituminosa* e Roff - *Rosmarinus officinalis*; regeneração vegetativa (RV): Mcom - *Myrtus communis*, Pang - *Phillyrea angustifolia* e Rlyc - *Rhamnus lycioides* e sem mecanismo de regeneração (N): Jpho - *Juniperus phoenicea*. (para definição das categorias da legenda, ver material e métodos).

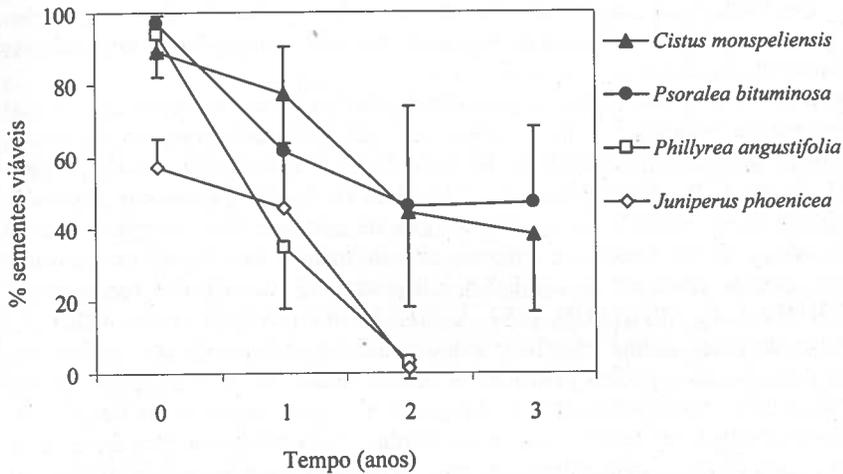


Figura 2. Variação da percentagem de sementes viáveis (média±d.p., n=4-20) com o tempo de permanência no solo (1 cm de profundidade) em espécies com diferentes mecanismos de regeneração após o fogo: regeneração por semente (RS) – *C. monspeliensis* e *P. bituminosa*; regeneração vegetativa (RV) – *P. angustifolia* e sem mecanismo de regeneração – *J. phoenicea*. Ao tempo zero corresponde a viabilidade inicial (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão de acordo com a hipótese de uma maior longevidade das sementes nas espécies RS, embora exista alguma variabilidade dentro de cada grupo funcional. As sementes das espécies RV apresentaram uma longevidade baixa, concordante com as características descritas para este grupo funcional. Contudo, as sementes de *P. angustifolia* e *M. communis* poderão permanecer viáveis por períodos superiores a um ano e, embora este facto tenha pouco significado na constituição de um banco de sementes, poderá constituir uma estratégia compensatória em anos de fraca produção de semente, como acontece frequentemente com *P. angustifolia* (CLEMENTE 2002).

A regeneração das populações de *J. phoenicea* não foi observada após o fogo na Serra da Arrábida (CLEMENTE *et al.* 1996) e a ausência de mecanismos de regeneração foi igualmente documentada por outros autores (PAUSAS 1999). Os resultados obtidos neste trabalho indicam a inexistência de um banco de sementes persistente que, juntamente com a possível destruição das sementes pelo fogo, poderá justificar a ausência de regeneração pós-fogo.

Nas espécies RS, os bancos de sementes de *C. monspeliensis* e *P. bituminosa* poderão ser classificados como bancos de sementes persistentes, devido à permanência de uma fracção considerável de sementes viáveis ao fim de três

anos, enquanto a reduzida fracção de sementes viáveis de *R. officinalis* ao fim de um ano indica que as sementes desta espécie poderão ter uma baixa persistência no banco de sementes.

Embora, de um modo geral, a persistência das sementes das espécies RS seja superior à das espécies RV, as primeiras registam normalmente perdas anuais do banco de sementes (PARKER & KELLY 1989, TROUMBIS & TRABAUD 1987, PIERCE & COWLING 1991, CLEMENTE 2002). Em muitas espécies, incluindo as do género *Cistus*, a produção de semente é polimórfica, sendo constituída por uma fracção de sementes com dormência e outra cuja germinação ocorre quando reunidas as condições adequadas de humidade e temperatura (TROUMBIS & TRABAUD 1987, KEELEY 1991, AULD *et al.* 2000). A germinação desta última fracção é independente da ocorrência do fogo ou de outra perturbação e poderá justificar as perdas anuais dos bancos de sementes. No caso de *C. monspeliensis* e *P. bituminosa*, a germinação desta fracção de sementes poderá ser responsável pelas perdas observadas nos primeiros dois anos, registando-se posteriormente uma tendência para a estabilização da viabilidade das sementes enterradas (Figura 2). Em fases posteriores, a persistência das sementes poderá depender da sobrevivência da fracção com dormência. A sobrevivência das sementes poderá ainda depender das características do microhabitat, que apresentam grande variação espacial e temporal nos ecossistemas mediterrânicos (MORGAN 1995, AULD *et al.* 2000). Este factor poderá ser responsável pelos valores elevados do desvio-padrão registados para a viabilidade das sementes (Figura 2).

A baixa persistência e a elevada proporção de sementes inviáveis em *R. officinalis* indicam que a manutenção de um banco de sementes e o restabelecimento das populações após o fogo poderão depender da produção contínua de semente. Assim, qualquer factor que limite a produção de semente poderá reduzir significativamente o recrutamento após o fogo, se este anteceder a reposição do banco de sementes. Para além disso, a reposição do banco de sementes de *R. officinalis* após o fogo é mais lenta do que a de *C. monspeliensis* (CLEMENTE 2002), o que poderá conduzir a reduções mais acentuadas no recrutamento de *R. officinalis* num regime de fogos frequentes.

Em simulações da resposta de grupos funcionais a alterações no regime de fogos, PAUSAS (1999) incluiu *R. officinalis* e *C. monspeliensis* no mesmo grupo funcional e prevê um comportamento semelhante para as duas espécies face a um aumento da frequência do fogo. Estes resultados poderão dever-se ao facto de ter sido atribuída às duas espécies longevidade de sementes semelhante. Embora as características demográficas e de regeneração, que determinam a sobrevivência das espécies, sejam essenciais para prever a sua resposta a uma alteração do regime de fogos (BOND & VAN WILGEN 1996), geralmente a sua utilização permite individualizar apenas grupos principais (espécies RS e RV, com longevidade elevada e baixa, respectivamente), e não a distinção de espécies dentro do mesmo grupo funcional. Os resultados obtidos neste trabalho indicam

que a variabilidade na persistência das sementes pode ser um dos mecanismos responsáveis por respostas diferenciadas a um mesmo regime de fogos dentro de grupo funcionais. O facto de a longevidade variar dentro de cada grupo funcional indica que esta característica não poderá ser inferida a partir de outras características que definem o grupo funcional.

Actualmente admite-se que a capacidade de previsão dos modelos de dinâmica de vegetação com base em grupos funcionais poderá depender da criação de uma hierarquia nas respectivas classificações (DÍAZ *et al.* 1999). Esta hierarquia, aplicada aos grupos de resposta ao fogo, requer a definição de classes em características como a longevidade das sementes. Essas classes deverão basear-se nos limites de tolerância das espécies, podendo apresentar um carácter qualitativo quando a estimativa desses limites apresenta dificuldades metodológicas.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito de uma bolsa de doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia, atribuída a A.S. Clemente (PRAXIS XXI, BD/2936/94).

#### BIBLIOGRAFIA

- AULD, T. D., KEITH, D. A. & BRADSTOCK, R. A. 2000. Patterns in longevity of soil seedbanks in fire-prone communities of south-eastern Australia. *Aust. J. Bot.* 48: 539-548.
- BOND, W. J. & VAN WILGEN, B. W. 1996. *Fire and plants*. Chapman & Hall, London.
- CLEMENTE, A. S. 2002. *Dinâmica da vegetação após o fogo na Serra da Arrábida*. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa.
- CLEMENTE, A. S., REGO, F. C. & CORREIA, O. A. 1996. Demographic patterns and productivity of post-fire regeneration in portuguese Mediterranean maquis. *Int. J. Wildland Fire* 6: 5-12.
- DÍAZ, S., CABIDO, M. & CASANOVES, F. 1999. Functional implications of trait-environment linkages in plant communities. In: WEIHER, E. & KEDDY, P. (eds.) *Ecological assembly rules. Perspectives, advances, retreats*, pp. 338-362. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- HIDALGO, P. J. & UBERA, J. L. 2001. Inbreeding depression in *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Developmental Biology* 45: 43-44.
- KEELEY, J. E. 1991. Seed germination and life history syndromes in the California chaparral. *Bot. Rev.* 57: 81-116.
- MOORE, R. P. 1973. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: Heydecker, W. (ed.) *Seed ecology*, pp. 347-366. Butterworths, London.
- MORGAN, J. W. 1995. Ecological studies of the endangered *Rutidosia leptorrhynchoides*. I. Seed production, soil seed bank dynamics, population density and their effects on recruitment. *Aust. J. Bot.* 43: 1-11.
- PARKER, V. T. & KELLY, V. R. 1989. Seed banks in California chaparral and other Mediterranean climate shrublands. In: LECK, M. A., PARKER, V. T. & SIMPSON, R. L. (eds.) *Ecology of soil seed banks*, pp. 231-255. Academic Press, San Diego.
- PAUSAS, J. G. 1999. Response of plant functional types to changes in the fire regime in Mediterranean ecosystems: a simulation approach. *J. Veg. Sci.* 10: 717-722.

- PIERCE, S. M. & COWLING, R. M. 1991. Dynamics of soil-stored seed banks of six shrubs in fire-prone dune fynbos. *J. Ecol.* 79: 731-747.
- TROUMBIS, A. Y. & TRABAUD, L. 1987. Dynamique de la banque de graines de deux espèces de *Cistes* dans les maquis grecs. *Acta Oecol. /Oecol. Plant.* 8: 167-179.

## MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *RUSCUS ACULEATUS* L.

E. Luz<sup>1,2</sup>, M. L. Mendes<sup>2</sup> & A. Romano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Engenharia dos Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

<sup>2</sup> Direcção Regional de Agricultura do Algarve, Apt. 282, 8001-904 Faro

Luz, E., Mendes, M. L. & Romano, A. (2004). Multiplicação *in vitro* de *Ruscus aculeatus* L. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 133-142.

*Ruscus aculeatus* L. (*Liliaceae*) é uma espécie Mediterrânica com interesse medicinal e ornamental. A propagação desta espécie por métodos tradicionais é difícil, constituindo a aplicação de técnicas de micropropagação uma alternativa. Foi objectivo deste trabalho o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Ruscus aculeatus*, partindo de diferentes tipos de explantados (secções do caule, ápices vegetativos do caule, segmentos axilares laterais, secções de cladódios e segmentos nodais do caule) provenientes de uma planta adulta seleccionada. A iniciação *in vitro* de culturas de *Ruscus*, foi pouco afectada pelas contaminações. Dos explantados testados, os ápices vegetativos de caule e as secções de cladódios foram os que mostraram menor incidência de contaminações. O meio de cultura base utilizado foi o MS modificado, contendo 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BA. Na fase de multiplicação, os segmentos imediatamente abaixo da parte apical, sem gomos ou escamas foliares, foram cultivados em meio contendo 1 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BA). Observou-se a regeneração de gomos, rebentos e raízes ou rizomas a partir dos *calli*, após 14 semanas em cultura. Em secções de cladódio observou-se a transformação de gomos florais em vegetativos em meio contendo 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de TDZ e 1 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Palavras-chave: *Liliaceae*, cultura de tecidos vegetais, micropropagação, rebentos adventícios.

Luz, E., Mendes, M. L. & Romano, A. (2004). *In vitro* multiplication of *Ruscus aculeatus* L. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 133-142.

*Ruscus aculeatus* L. (*Liliaceae*) is a Mediterranean species with medicinal and ornamental interest. The propagation of

this species through conventional methods is difficult, being the micropropagation an alternative. The purpose of this work was the establishment and multiplication *in vitro* of *Ruscus aculeatus* L., using different types of explants (stem sections, shoot tips, lateral axilar segments, phylloclades sections and stem nodal segments) from a selected adult plant. The initiation *in vitro* of *Ruscus* cultures was not very affected by contaminations. Shoot-tips explants and phylloclades showed fewer incidence of contaminations. The basal medium used was MS modified, supplemented with 0.1 mg.l<sup>-1</sup> of BA. In the multiplication phase, the fragments below the apical part, without buds or leaf scales, were cultured in medium containing 1 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D and 0,1 mg.l<sup>-1</sup> of BA. From the developed *calli* adventitious shoots and roots or rhizomes developed, after 14 weeks in culture. In phylloclades sections the transformation of floral buds into vegetative ones was observed in medium supplemented with 0.1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ plus 1 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D.

Key words: *Liliaceae*, tissue culture, micropropagation, adventitious shoots.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Ruscus aculeatus* L. (Est. 1A) vulgarmente conhecida por Gilbarbeira ou Gilbardeira pertence à família *Liliaceae*. Esta espécie é uma planta espontânea característica da região Mediterrânica, Europa central e meridional, que convém preservar (MARTINEZ-PALLE & ARONNE, 2000). Em Portugal, encontra-se nos Açores e em quase todo o continente até cerca de 700 m de altitude. Cresce em matos xerofílicos sob coberto de matas e em areais litorais. No Algarve, predomina na zona do Barrocal.

Esta planta é uma fonte de sapogeninas (ruscogenina e neurogenina), substâncias extraídas dos seus rizomas e utilizadas em medicina no tratamento de insuficiência venosa crónica (PARRADO & BUZZI, 1999; PITTLER, 2001) e de hemorróidas (BERTANI & FORNI, 1984).

A plantação de *Ruscus* com fins ornamentais tem tido relativo sucesso devido à longa duração da folhagem após o corte, baixos custos de plantação, capacidade de resistência a baixas temperaturas e à reduzida oferta no mercado (CURIR & SCHIVA, 1992). *Ruscus aculeatus*, no entanto, possui baixa produção de frutos e sementes (MARTINEZ-PALLE & ARONNE, 2000), o que reduz a disponibilidade de sementes viáveis para propagação seminal. Por outro lado, embora esta espécie possa ser propagada vegetativamente, esta técnica é laboriosa e lenta. Assim, a micropropagação assume particular interesse, principalmente devido à produção em larga escala de plantas com garantia varietal e sanitária. As técnicas de cultura *in vitro* têm sido usadas com sucesso na propagação de várias espécies de *Liliaceae* (DIPAK & SUMITRA, 1985).

incluindo *Ruscus* (ZIV, 1983; SUMITA & SUMITRA, 1985; ZHONG *et al.*, 2000).

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de propagação *in vitro* para *Ruscus aculeatus*, com vista à sua conservação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Estabelecimento *in vitro*

O material vegetal utilizado neste trabalho proveio de uma planta adulta de *Ruscus aculeatus* L. a crescer ao ar livre na Direcção Regional de Agricultura do Algarve, Patação, Faro. Foram recolhidos directamente do campo, caules em início de crescimento (turiões) e ramos jovens em crescimento activo com cerca de 15 cm de comprimento. A partir deste material vegetal foram utilizados como explantados primários para a iniciação da cultura *in vitro* secções e ápices vegetativos do caule, segmentos axilares laterais, secções de cladódios e segmentos nodais do caule.

A partir do caule principal em início de crescimento foram retirados os 5 cm imediatamente abaixo dos ápices. Este segmento foi cortado em secções transversais (discos) com cerca de 0,6 cm de espessura (secções do caule - *sc*). Foram também usados ápices vegetativos (0,8-1,0 cm) do caule principal em início de crescimento incluindo os gomos laterais e as escamas foliares (ápices vegetativos do caule - *ap*). Foram usados segmentos nodais (0,8-1,0 cm) contendo pelo menos um nó, provenientes do ramo foliáceo em crescimento activo, de que se retiraram os cladódios (segmentos axilares laterais - *segax*). Cladódios jovens retirados de rebentos em crescimento activo foram cortados de forma a ser cultivada a parte central incluindo a nervura e gomos florais (secções de cladódios - *cl*). Utilizaram-se ainda segmentos nodais do caule (*segn*) com cerca de 0,8-1,0 cm, contendo pelo menos um nó, provenientes do caule principal em crescimento activo de que se retiraram os ramos foliáceos.

Os explantados foram lavados em água com detergente (Teepol) durante 30 segundos, seguida de passagem por água corrente. De seguida, foram desinfectados por imersão em solução aquosa de lixívia comercial 10% (v/v) contendo 2 gotas de Tween 20, durante 20 minutos, após o que se efectuaram três lavagens sucessivas em água esterilizada, durante 5 minutos cada, para remoção do agente desinfectante.

Como meio de cultura base utilizou-se os sais MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo tiamina (1 mg.l<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (1 mg.l<sup>-1</sup>), piridoxina (0,5 mg.l<sup>-1</sup>), meso-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarose (30 g.l<sup>-1</sup>) e suplementado com 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de benziladenina (BA). O pH do meio foi ajustado a 5,7, e este solidificado com Difco Bacto Agar (0,7%), autoclavado a 121°C, durante 15 minutos. Os explantados foram cultivados em tubos de ensaio e frascos de vidro contendo 8 e 25 ml de meio, respectivamente. As culturas foram mantidas à temperatura de 23 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas (28 µmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, lâmpadas fluorescentes Osram L36W/20 Cool White).

### **Multiplicação *in vitro***

Após seis semanas em meio de iniciação as culturas foram transferidas para meio de multiplicação. Foram testados apenas os ápices e secções de cladódios, explantados que reagiram positivamente na fase de estabelecimento.

Os ápices vegetativos de caule foram cortados em parte apical e parte basal. A parte apical, contendo todos os nós, foi cultivada no meio suplementado com 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BA e a parte basal (Basal 1) sem gomos laterais nem escamas foliares, em meio base contendo 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BA + 1 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D. A parte apical, após uma subcultura para alongamento, foi cortada em segmentos nodais e basais (Basal 2), com cerca de um centímetro de comprimento. A parte basal foi transferida para o mesmo meio fresco e os segmentos nodais para o meio base suplementado com 1 mg.l<sup>-1</sup> de zeatina.

As secções de cladódios foram cortadas transversalmente e inoculadas em meios contendo diversas combinações citocinina/auxina.

### **Quantificação e análise dos resultados**

No final do período de estabelecimento das culturas, 6 semanas, registou-se a percentagem de explantados não contaminados, apresentando exsudação de compostos fenólicos e de explantados viáveis.

Na fase de multiplicação, no final de cada subcultura (8 semanas) registou-se o número de explantados com *callus* e com raízes. Em secções de cladódios a taxa de multiplicação foi definida, pelo número de secções de tamanho semelhante obtidas de cada cladódio inicial. Relativamente aos explantados que mostraram formação de *callus*, foi registado o número médio de rebentos desenvolvidos por explantado e o comprimento médio, em centímetros, dos rebentos.

O número mínimo de explantados utilizado em cada ensaio foi de 10, tendo-se repetido cada ensaio pelo menos 2 vezes. Os dados foram submetidos a uma análise de variância para determinar diferenças usando-se o programa Statgraphics Plus. A significância entre as médias foi testada pelo teste de Duncan ( $p = 0,05$ ). Os dados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro-padrão, sendo os valores significativamente diferentes assinalados com letras diferentes.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Iniciação *in vitro***

A micropropagação de espécies lenhosas é difícil e a escolha do explantado inicial é determinante para o estabelecimento das culturas. A idade da planta-mãe, o tipo e desenvolvimento do explantado, o tamanho e época do ano da colheita, podem condicionar o sucesso desta fase. Na Figura 1 estão representados os resultados obtidos no estudo do efeito do tipo de explantado na iniciação de *Ruscus*. A percentagem de explantados não contaminados foi, em geral, elevada. Os ápices e os cladódios, tecidos menos lenhificados e mais

jovens, foram os explantados onde se observou valores significativamente mais elevados de viabilidade.

A viabilidade dos explantados foi reduzida o que poderá estar relacionado com a elevada percentagem de acastanhamento registada, devido à oxidação de substâncias fenólicas exsudadas. A percentagem de explantados acastanhados foi significativamente superior nas secções de caule comparativamente com a obtida nos restantes tipos de explantados. Este facto deveu-se provavelmente à maior extensão de tecidos expostos ao corte nas secções de caule, provocando uma maior exsudação de compostos fenólicos (COMPTON & PREECE, 1986). Para estudos posteriores com este tipo de explantado recomenda-se o uso de antioxidantes para minimizar esses efeitos. CURIR & SCHIVA (1992) minoraram o problema do acastanhamento em *R. racemosus* lavando os explantados em solução de ácido ascórbico ou cítrico ( $1-2 \text{ g.l}^{-1}$ ). Anteriormente, a iniciação de culturas a partir de secções de caule foi obtida com sucesso em várias espécies, como *Asparagus racemosus* (DIPAK & SUMITRA, 1985), *Ruscus hypophyllum* (SUMITA & SUMITRA, 1985) e *Lilium longiflorum* (NHUT *et al.*, 2001).

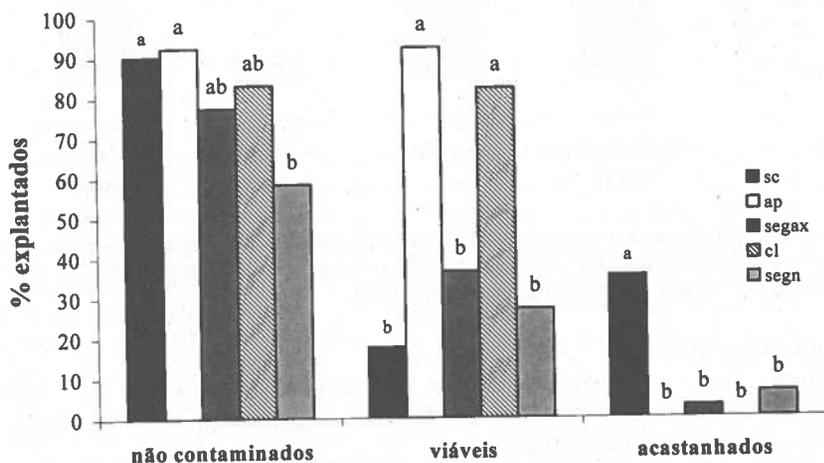


Figura 1. Percentagem de explantados não contaminados, viáveis e acastanhados, observada para os diferentes tipos de explantado testados: sc (secções de caule), ap (ápices vegetativos de caule), segax (segmentos axilares laterais), cl (secções de cladódio) e segn (segmentos nodais de caule), em meio de iniciação após 6 semanas. Os valores representados seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ( $p=0,05$ ).

Na Figura 2 podemos observar que a percentagem de explantados viáveis foi mais elevada em culturas de ápices vegetativos de caule (Estampa 1B) e de secções de cladódios (Estampa 1C). À semelhança do nosso estudo, outros

autores testaram diversos tipos de explantados para a iniciação *in vitro* de espécies relacionadas. ZIV (1983) usou ápices vegetativos, cladódios e segmentos laterais, de *Ruscus hypophyllum*, tendo obtido maior viabilidade nos primeiros dois tipos de explantado. NHUT (1998) usou extremidades apicais em *Lilium longiflorum*.

Durante o período de estabelecimento (6 semanas) não se observou formação de *callus* nem de gomos ou rebentos, em nenhum dos tipos de explantados estudados.

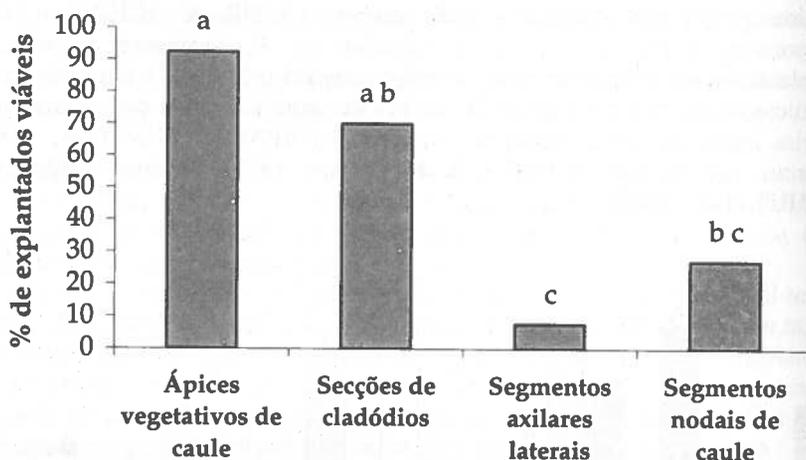


Figura 2. Influência do tipo de explantado na percentagem de explantados viáveis. Meio base suplementado com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de BA. Os valores representados seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ( $p=0,05$ ).

### Multiplicação *in vitro*

Nesta fase, apresentam-se apenas os resultados referentes aos ápices vegetativos de caule e secções de cladódios, explantados onde se verificou formação de rebentos adventícios.

Após o período de iniciação, os ápices vegetativos de caule foram cortados em parte apical e basal (Basal 1). Decorridas 6 semanas, na parte apical não se observou regeneração de gomos ou rebentos. Assim, a porção apical foi de novo dividida em segmentos nodais e segmentos basais (Basal 2), cultivados e estudados separadamente. No entanto, FONNESBECH *et al.* (1977), utilizando extremidades apicais de rebentos laterais de *Asparagus plumosus*, obtiveram rebentos logo na fase de iniciação em meio contendo BA ou zeatina. WAWROSCH *et al.* (2001), em *Allium wallichii* obtiveram multiplicação de rebentos em meio MS contendo  $4,4 \text{ mg.l}^{-1}$  de zeatina, partindo de culturas já estabelecidas.

Relativamente aos explantados da porção Basal 1, estes foram subcultivados em meio contendo  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D, para indução de *calli*, tendo-se observado 38% de calogénese. Os *calli* obtidos eram compactos, nodulares e de cor amarela a esverdeada (Estampa 1D). Foi observada diferenciação de rebentos em 21% dos *calli*. Em alguns destes observou-se ainda a formação de rizomas ou raízes (8%) após 8-10 semanas em cultura. Foi ainda observada a diferenciação de rebentos e o desenvolvimento de longos cladódios à volta destes. Os rebentos obtidos (5-10 mm) foram isolados e subcultivados individualmente em meio suplementado com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de BA, para induzir o seu alongamento (Estampa 1E, F).

Por sua vez, os explantados da porção Basal 2, formaram *calli* após duas subculturas em meio contendo  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D. Observou-se calogénese em 7% dos explantados, sendo as características dos *calli* semelhantes às dos provenientes da porção Basal 1. A diferenciação de rebentos ocorreu em apenas 4% dos explantados, verificando-se também a formação de rizomas ou raízes em 11%. Os rebentos obtidos foram isolados e subcultivados para meio contendo  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BA.

O número de rebentos desenvolvido por explantado, Basal 1 ou Basal 2, foi condicionado pela interacção significativa entre o tipo de explantado e pelas subculturas (Figura 3). O número de rebentos mais elevado foi obtido no explantado Basal 1 na primeira subcultura. Nos dois tipos de explantados registou-se um decréscimo significativo no número de rebentos desenvolvidos da primeira para a segunda subcultura. O comprimento médio dos rebentos foi semelhante para os dois tipos de explantado e em ambas as subculturas ( $\pm 1$  cm).

A utilização de ápices vegetativos do caule mostrou resultados satisfatórios, na medida em que, o alongamento *in vitro* do segmento imediatamente abaixo da parte apical do turião, sem gomos ou escamas foliares, permitiu a indução de *callus* e regeneração de gomos na presença de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D, após 14 semanas em cultura. Resultados semelhantes foram observados por SUMITA & SUMITRA (1985) em explantados provenientes de *Ruscus hypophyllum*.

Relativamente às secções de cladódios, a taxa de multiplicação (número de secções de tamanho semelhante obtidas a partir de cada cladódio inicial), observada em meio basal suplementado com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D, foi de 5, não se tendo observado formação de *calli* ou rebentos. Após transferência destes explantados para meio contendo  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ (tidiazurão) +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D observou-se transformação de gomos florais em vegetativos (Estampa 1G, H) após três subculturas. Por sua vez, verificou-se a formação de rebentos em explantados cultivados em meio base contendo  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  TDZ +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D e frutificação e amadurecimento de frutos em meio suplementado com  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D. A produção de meristemas vegetativos ou florais a partir da cultura de tecidos da flor ou inflorescências tem sido observada em diversas espécies (MARGARA, 1988). NHUT *et al.* (2001) regeneraram plantas de

*Lilium longiflorum* cultivando secções de receptáculos em meio MS contendo  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  ANA ou AIB.

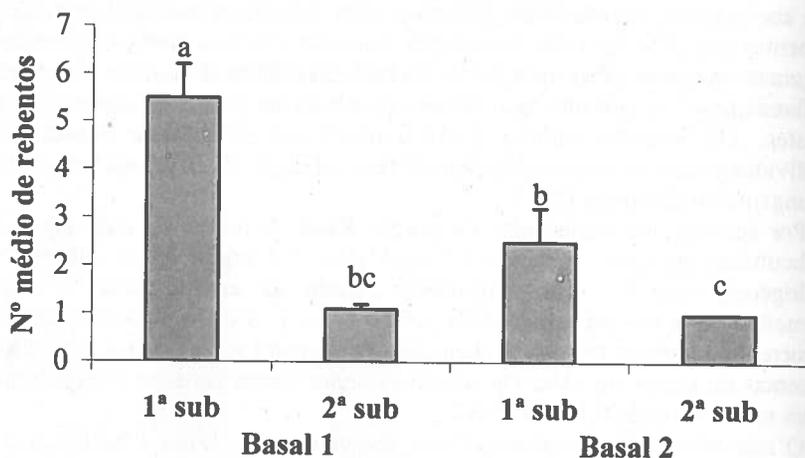
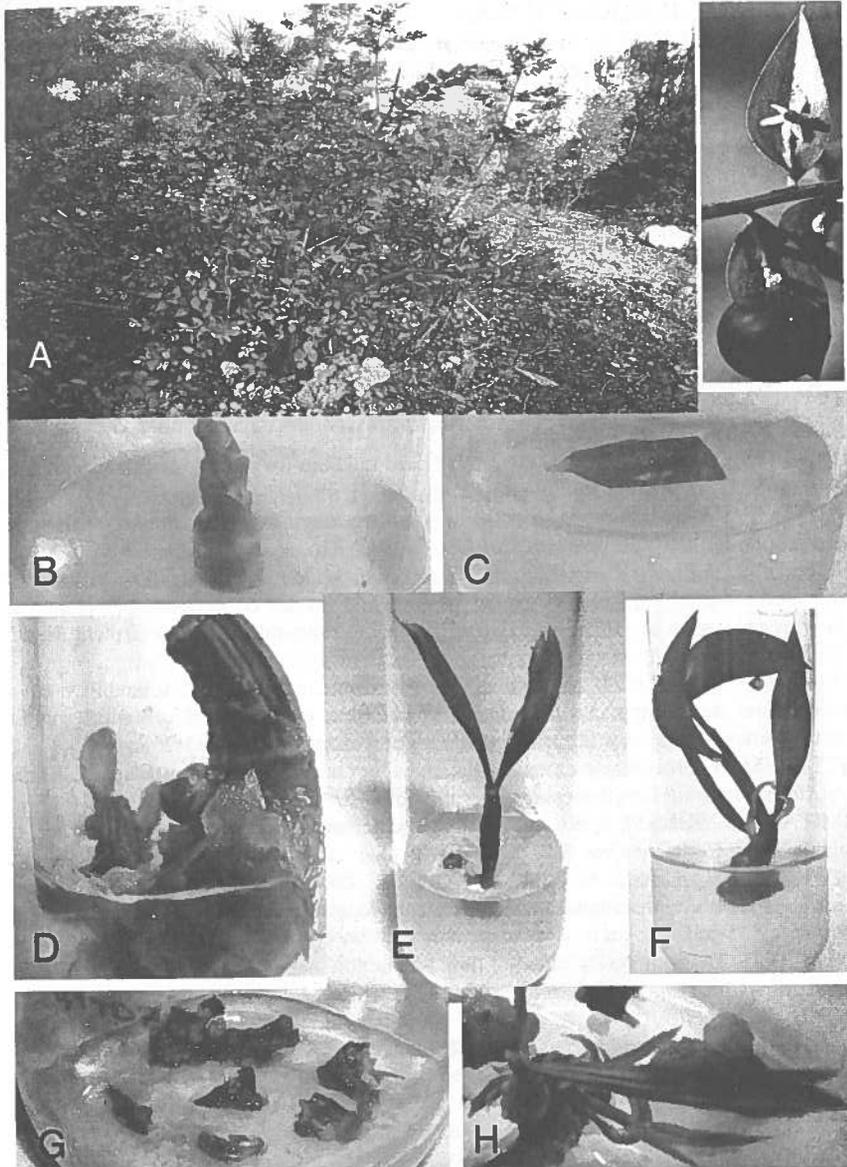


Figura 3. Influência do tipo de explantado e das subculturas no número médio de rebentos desenvolvidos por explantado. Os valores representados seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ( $p=0,05$ ).

A iniciação e estabelecimento *in vitro* de *Ruscus aculeatus* mostrou poucos problemas em termos de contaminações. De todos os tipos de explantados cultivados, os ápices vegetativos do caule e as secções de cladódios mostraram ser os tecidos mais apropriados para a sua iniciação *in vitro*. A combinação de 2,4-D com BA ou TDZ induziu a formação de rebentos. Deste modo, sugere-se em estudos futuros de *Ruscus* o alongamento da parte apical do turião *in vitro* ou cultivando apenas a secção imediatamente abaixo do ápice, em BA ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) individualmente ou em combinação com 2,4-D ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Sugere-se também a cultura de secções de cladódios contendo os gomos florais, com o objectivo de induzir a sua transformação em gomos vegetativos.

O presente trabalho é uma primeira abordagem sobre a cultura *in vitro* de *Ruscus aculeatus* e representa um contributo para futuros trabalhos de micropropagação nesta espécie e para a sua conservação.



Estampa 1. A - Aspecto geral e pormenor da planta-mãe; B - Segmento apical; C - Secção de cladódio com gomo floral; D - Segmento basal com formação de *callus* e regeneração de rebentos após 2 meses de cultura em meio contendo 2,4-D ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e BA ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ); E e F - Rebento isolado com 2 e 3 meses respectivamente, em meio contendo  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de BA; G e H - Transformação de gomos florais em gomos vegetativos em secções de cladódios cultivadas em meio contendo TDZ ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTANI, W. & FORNI, G. P. 1984. HPLC determination of ruscogenin and neurogenin in raw material and pharmaceutical preparations. *Fitoterapia*, 55: 101-104.
- COMPTON, M. E. & PREECE, J. E. 1986. Exudation and explant establishment. IAPTC Newsletter, 50: 9-18.
- CURIR, P. & SCHIVA, T. 1992. Micropropagation of *Ruscus racemosus* L. In: Bajaj, Y. P. S., ed., Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation IV, Vol. 20. Springer-Verlag Publishers, pp 343-356.
- DIPAK, K. & SUMITRA, S. 1985. Propagation of *Asparagus racemosus* through tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 5: 89-95.
- FONNESBECH, A., FONNESBECH, M. & BREDMOSE, N. 1977. Growth and development of *Asparagus plumosus* shoot tips *in vitro*. *Acta Hort.* 78, pp 287.
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. *Los Meristemos y la Organogénesis*. Mundi-Prensa, Madrid, 232 pp.
- MARTINEZ-PALLE, E. & ARONNE, G. 2000. Pollination failure in mediterranean *Ruscus aculeatus* L. *Bot. J. Linnean Soc.* 134: 443-452.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NHUT, D. T. 1998. Micropropagation of Lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Rep.* 17: 913-916.
- NHUT, D. T., LE, B. V., FUKAI, S., TANAKA, M. & VAN, K. 2001. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regul.* 33: 59-65.
- PARRADO, F. & BUZZI, A. 1999. A study of the efficacy and tolerability of a preparation containing *Ruscus aculeatus* in the treatment of chronic venous insufficiency of the lower limbs. *Clinical Drug Investigation*, 18: 255-261.
- PITTLER, M. H. 2001. Complementary therapies for chronic venous insufficiency. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 6: 3-5.
- SUMITA, J. & SUMITRA, S. 1985. *In vitro* regeneration of *Ruscus hypophyllum* L. plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 5: 79-87.
- WAWROSCHEK, C., MALLA, P. R. & KOPP, B. 2001. Micropropagation of *Allium wallichii* Kunth, a threatened medicinal plant Nepal. *In Vitro Cell. Develop. Biol. - Plant*, 5: 555-557.
- ZIV, M. 1983. The stimulatory effect of liquid induction medium on shoot proliferation of *Ruscus hypophyllum* L. *Sci. Hortic.* 19: 387-394.
- ZHONG, L., LI, Y., JIANG, Z. & NI, J. 2000. Tissue culture of *Ruscus aculeatus* L. *Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology*, 27: 32-34.

## EFEITO DA DEPOSIÇÃO DE POEIRAS CALCÁRIAS NA ABSORVÂNCIA FOLIAR DE ESPÉCIES MEDITERRÂNICAS

A. Nunes<sup>1</sup>, E. Brugnoli<sup>2</sup>, C. Máguas<sup>1</sup> & O. Correia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEBV - Centro de Ecologia e Biologia Vegetal. Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, Bloco C2, 4º Piso, 1749-016 Lisboa. email: alicenunes@yahoo.com. <sup>2</sup>Instituto di Biologia Agroambientale e Florestale (CNR) Villa Paolina, Viale G. Marconi, 2, 05010 Porano (Tr), Itália.

Nunes, A., Brugnoli, E., Máguas, C. & Correia, O. (2004). Efeito da deposição de poeiras calcárias na absorvância foliar de espécies mediterrânicas. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 143-151.

A extracção mineral e a produção de cimento originam níveis elevados de poluição por poeiras atmosféricas. A expansão destas actividades ao longo do séc. XX tem acentuado a necessidade de conhecer o impacto da deposição de poeiras na vegetação das zonas envolventes. O presente trabalho consistiu em estudos comparativos das características ópticas (reflectância, transmitância e absorvância) da superfície foliar de duas espécies mediterrânicas, face a diferentes níveis de deposição artificial de poeira proveniente de uma pedreira-cimenteira. As espécies estudadas pertencem a dois grupos funcionais distintos: uma esclerófila (*Olea europaea*) e uma semi-decídua (*Cistus laurifolius*). A deposição de poeira na superfície foliar parece afectar sobretudo a reflectância, uma vez que esta aumenta com níveis crescentes de deposição, originando um decréscimo complementar na absorvância foliar, em ambas as espécies. Face a estes resultados prevê-se que a poeira afecte o balanço energético foliar e a actividade fotossintética, o que implicaria uma eventual diminuição na produtividade das plantas afectadas. Contudo, este efeito parece ser mais pronunciado em *C. laurifolius* em comparação com *O. europaea*. Esta resposta diferencial pode implicar um efeito mais pronunciado da poeira para determinado grupo de espécies, com eventual alteração da respectiva tolerância a outros factores de stresse característicos do clima mediterrânico e consequentemente, da sua capacidade competitiva, o que poderá ter impacto ao nível da composição específica da vegetação das zonas afectadas pela poeira.

Palavras-chave: Poeira atmosférica, *Olea europaea*, *Cistus laurifolius*, propriedades ópticas, reflectância.

Nunes, A., Brugnoli, E., Máguas, C. & Correia, O. (2004). Effect of dust deposition on foliar absorbance of mediterranean species. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 143-151.

Mineral extraction and cement production are important sources of atmospheric dust pollution. Dust deposition onto vegetation is increasing due to an increase in these activities. Therefore, it is extremely important to understand the effect of dust on the vegetation. The purpose of this work was to perform comparative studies optical characteristics of leaves (reflectance, transmittance and absorbance) in response to different levels of dust deposition (from a cement mill) on the foliar surface of two mediterranean species from distinct functional groups: an evergreen sclerophyll (*Olea europaea*) and a semi-deciduous (*Cistus laurifolius*). The deposition of dust on the foliar surface seems to affect mainly the reflectance, since it increases with increasing deposition levels, causing a complementary decrease in light absorbance by the leaves of both species. As a consequence, the energy balance of the leaves and net photosynthesis may be altered, so that the productivity of the affected vegetation could be reduced. However, this effect seems to be more pronounced in *C. laurifolius* in comparison with *O. europaea*. This could mean that some species may be more susceptible to dust pollution. In this sense, one could expect an alteration on the specific composition of the vegetation of the affected areas, in response to dust pollution.

Keywords: Dust pollution, *Olea europaea*, *Cistus laurifolius*, optical properties, reflectance.

## INTRODUÇÃO

A extracção mineral e a produção de cimento são fontes importantes de poluição atmosférica. O aumento destas actividades ao longo do séc. XX, tem originado elevados níveis de deposição de poeira nas zonas envolventes. A deposição de poeira sobre a vegetação pode exercer efeitos directos, químicos ou físicos, na superfície foliar e assim afectar a fotossíntese, a respiração e a transpiração e agravar outros factores de stresse, tais como o stresse hídrico, ou permitir a entrada de poluentes fitotóxicos gasosos nas células vegetais (para revisão, ver FARMER, 1993).

De acordo com FARMER (1991) a cobertura das folhas com poeira poderá ter um efeito de sombra e, desta forma, originar as respostas clássicas à sombra, tais como a redução da taxa fotossintética, a alteração da concentração total e relativa de pigmentos e a redução da produtividade. A acumulação de poeira na superfície foliar pode alterar consideravelmente as propriedades de intercepção da luz incidente, de forma que o balanço energético das folhas poderá ser significativamente afectado (RICKS & WILLIAMS, 1974). De facto, as

propriedades foliares no que respeita à intercepção da luz são preponderantes quer nas relações energéticas, quer na actividade fotossintética das plantas (EHLERINGER, 1981). Acresce que o estudo das propriedades ópticas das folhas permite detectar reacções de stresse causadas por factores bióticos ou abióticos adversos, tais como doenças, poluição ou stresse hídrico (GAUSSMAN & QUISENBERRY, 1990). É importante ter em conta que as propriedades ópticas das folhas exibem grande heterogeneidade, dependendo não só da componente genética, mas também do estado nutricional e das adaptações ambientais das plantas. Contudo, as diferenças espectrais entre espécies poderão ser maiores do que as induzidas por agentes causadores de stresse (CLOUTIS *et al.*, 1996). Assim sendo, torna-se essencial clarificar o papel desempenhado pela poeira na superfície foliar, estudando o seu efeito na absorção foliar da luz e consequentemente na sua produtividade.

O objectivo do presente trabalho foi o de comparar o efeito de diferentes níveis de deposição de poeira nas propriedades ópticas de folhas de duas espécies mediterrânicas pertencentes a diferentes grupos funcionais (esclerófilas/semi-decíduas).

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foram seleccionadas duas espécies pertencentes a dois grupos funcionais distintos: uma esclerófila sempre verde - *Olea europaea* e uma semi-decídua de verão - *Cistus laurifolius*. As plantas foram obtidas num viveiro comercial e mantidas envasadas em estufa durante o período de estudo, que foi realizado no laboratório do Instituto di Biologia Agroambientale e Florestale (CNR) em Porano (Itália).

A deposição artificial da poeira, proveniente de uma pedreira de calcários da SECIL (Outão - Serra da Arrábida), foi realizada manualmente em folhas adultas destacadas, utilizando-se um crivo com cerca de 200  $\mu\text{m}$  de forma a obter um gradiente crescente de deposição. Foram obtidos 5 níveis distintos de deposição, através da aplicação de quantidades de poeira que variaram entre 0.25 e 0.70g, obtendo-se concentrações finais entre 1 e 20  $\text{mg}/\text{cm}^2$  (Fig. 1). A quantificação da deposição ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) foi feita com base na área foliar ( $\text{cm}^2$ ) e na quantidade de poeira efectivamente retida em cada folha (mg).

Mediu-se a reflectância ( $\rho$ ) e a transmitância ( $\tau$ ) da radiação entre os 400 e os 1000 nm da página superior das folhas assim tratadas. Foram utilizadas 6 a 8 folhas de idade semelhante destacadas de várias plantas de cada espécie, por nível de deposição. Utilizaram-se como controlo folhas sem poeira depositada. Estas medições foram efectuadas com uma Esfera Integradora (LI-COR 1800-12 External Integrating Sphere). A reflectância e a transmitância foram medidas separadamente na esfera integradora, usando como referência a reflectância do sulfato de bário. A absorvância ( $\alpha$ ) foi calculada como:  $\alpha = 1 - (\rho + \tau)$

## RESULTADOS

A variação da quantidade de poeira na superfície foliar em  $\text{mg}/\text{cm}^2$  das amostras incluídas em cada um dos 5 níveis de deposição, para as duas espécies estudadas, encontra-se representada na Fig. 1.

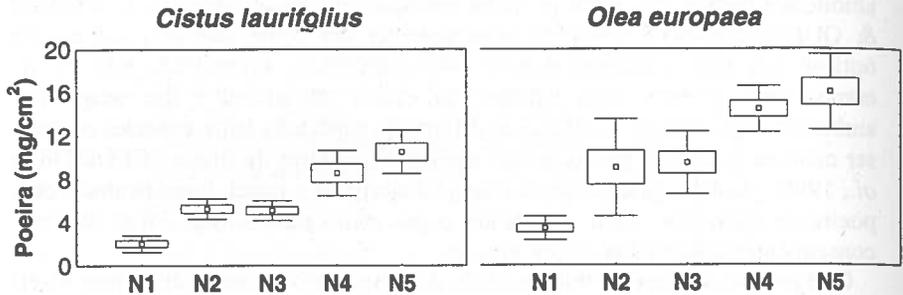


Figura 1. Variação da quantidade de poeira na superfície foliar ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) das amostras (6 a 8 por nível) incluídas em cada um dos 5 níveis de deposição (N1 a N5), para ambas as espécies estudadas. Média, erro e desvio padrão.

As diferenças observadas na quantidade foliar de poeira correspondente aos vários níveis de deposição entre as duas espécies, devem-se à aplicação, para cada nível, de quantidades semelhantes de poeira em folhas com áreas específicas distintas. Tal como era de esperar, as folhas de *O. europaea* têm no geral menor área foliar do que as de *C. laurifolius*, o que resulta em concentrações de poeira superiores, para o mesmo nível de deposição (Fig. 1).

A figura 2 representa a distribuição espectral de  $\rho$ ,  $\tau$  e  $\alpha$  em resposta à incidência da luz na página superior das folhas das espécies estudadas, face a níveis crescentes de deposição de poeira. A deposição de poeira na superfície foliar parece afectar fortemente a reflectância, sobretudo na região PAR (400-700 nm), uma vez que esta aumenta com o aumento dos níveis de deposição (Fig. 2 A, B), originando um decréscimo complementar na absorvância foliar da luz por parte de ambas as espécies (Fig. 2 E, F). A transmitância não parece ser significativamente afectada pelo tratamento com poeira, embora haja uma certa tendência para valores inferiores de  $\tau$  em consequência da deposição de poeira, sobretudo nas regiões do Infra-vermelho (700-800 nm) e no Infra-vermelho próximo (800-1000 nm) (Fig. 2 C, D). O espectro de absorvância foliar de ambas as espécies apresenta o mesmo padrão básico (Fig. 2 E, F), embora o valor absoluto de absorvância para dada quantidade de poeira seja distinto, uma vez que os níveis de deposição para as duas espécies correspondem a diferentes concentrações de poeira (Fig. 1).

As alterações da reflectância face ao tratamento com poeira na zona do espectro visível (400-700 nm) apresentam uma tendência para aumentar com o aumento do comprimento de onda, mais pronunciada para os níveis superiores de

deposição e para *C. laurifolius*, embora se verifique em ambas as espécies (Fig. 2, A e B). O facto de os níveis de deposição corresponderem a uma menor concentração foliar de poeira em *C. laurifolius*, em comparação com *O. europaea* (Fig. 1), está de acordo com a observação anterior.

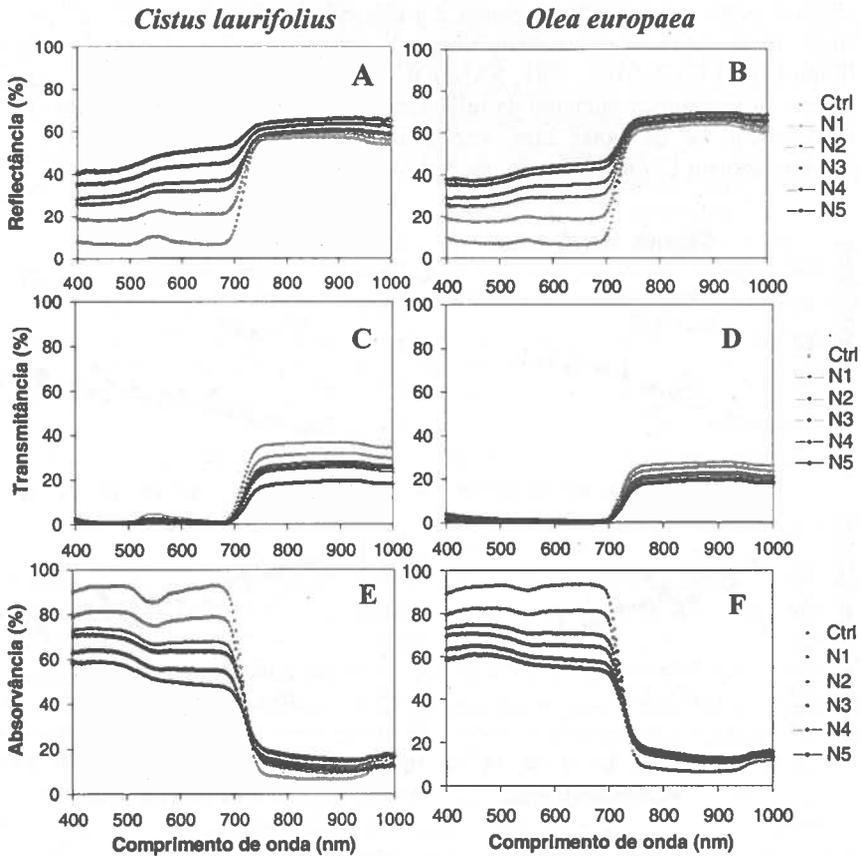


Figura 2. Reflectância -  $\rho$  (A, B), transmitância -  $\tau$  (C, D) e absorvância -  $\alpha$  (E, F) no intervalo de 400-1000 nm, para a superfície adaxial das folhas de ambas as espécies. São apresentados os valores médios ( $n = 6$  a  $8$ ) para o controlo e para cada um dos 5 níveis de deposição de poeira (N1 a N5).

Este padrão da reflectância é acompanhado de uma tendência similar nas alterações da absorvância, indicando uma possível alteração não só na quantidade, mas também na qualidade da luz incidente na superfície foliar, em consequência da deposição de poeira. Assumindo o acima exposto, implicaria

que as folhas com elevadas quantidades de poeira reflectiriam menos e, consequentemente, absorveriam relativamente mais nas regiões do azul (400-500 nm) e do verde (500-600 nm), do que na região do vermelho (600-700 nm), em comparação com as amostras controlo.

Tal como era de esperar face aos resultados anteriores, existe uma correlação negativa entre a deposição de poeira e a absorvância foliar nos 625 nm, que é muito aproximada da absorvância integrada para todo o espectro visível (400-700nm) (EHLERINGER, 1981; SANDQUIST & EHLERINGER, 1997), o que se deve ao acentuado aumento da reflectância foliar em ambas as espécies (Fig. 3). Contudo, é de notar uma vez mais que este efeito parece ser mais pronunciado em *C. laurifolius* do que em *O. europaea*.

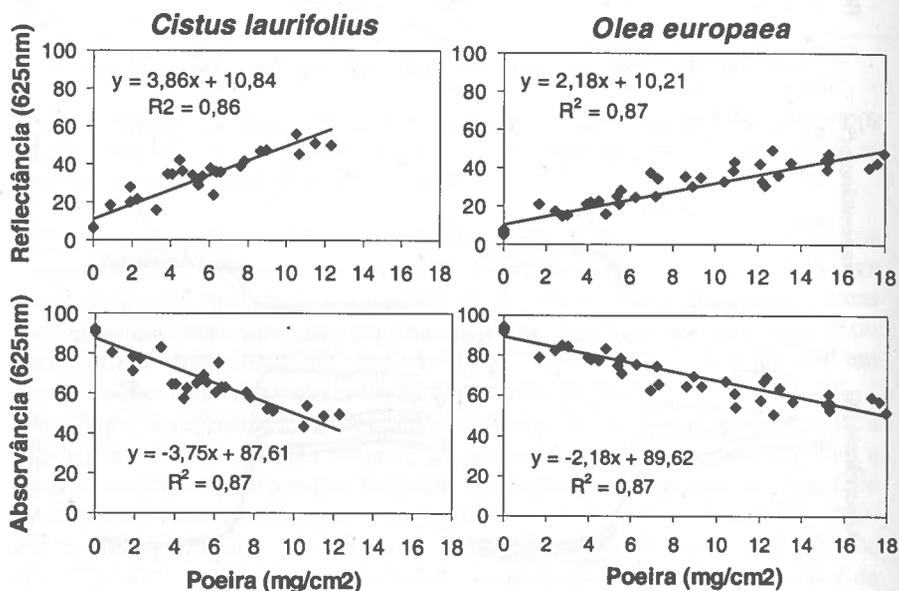


Figura 3. Correlação entre as propriedades ópticas foliares (reflectância -  $\rho$  e absorvância -  $\alpha$ ) para 625 nm e a concentração de poeira ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) para ambas as espécies.

De facto, para uma concentração de poeira de  $12 \text{ mg}/\text{cm}^2$ , por exemplo, dá-se um decréscimo de 50% e 25% na absorvância foliar de *C. laurifolius* e *O. europaea*, respectivamente (Fig. 3), o que é evidente pela comparação do declive de ambas as rectas ( $t=5.41$ ;  $p=0.05$ ;  $df=75$ ). No que respeita à transmitância, não foi encontrada uma correlação clara com a deposição foliar de poeira.

## DISCUSSÃO

A deposição e acumulação de poeira na superfície foliar pode alterar consideravelmente as propriedades de intercepção da luz incidente e, assim, afectar o balanço energético das folhas e, conseqüentemente, a actividade fotossintética e a produtividade das plantas. A reflectância e a absorvância foliares dependem essencialmente do tipo de folha, da espessura, da idade, do conteúdo hídrico, do conteúdo clorofilino e da morfologia da superfície foliar, assim como da existência de ceras ou outros produtos secundários acumulados à superfície das folhas (JONES, 1992). Os valores de reflectância medidos a 550 nm nas folhas controlo, de 10% e 8% para *Cistus laurifolius* e *Olea europaea*, respectivamente, são ligeiramente inferiores aos observados na maior parte das plantas verdes (EHLERINGER, 1981; JONES, 1992). No entanto, BALDINI *et al.* (1997) encontram valores igualmente baixos de reflectância para *Olea europaea*, atingindo valores próximos de 100% de absorvância foliar. Contudo, para níveis elevados de deposição de poeira (8 a 10 mg/cm<sup>2</sup>), a reflectância aumenta para 42% e 34% para *C. laurifolius* e *O. europaea*, respectivamente, valores comparáveis aos encontrados para espécies com folhas pubescentes de plantas de zonas desérticas (EHLERINGER, 1981). Deste modo, poderemos considerar que a deposição de poeira na superfície da folha poderá ter um papel semelhante ao da pubescência foliar, alterando as características espectrais das folhas, muito importantes na regulação do balanço energético e na fotossíntese.

Nos climas mediterrânicos o stresse hídrico é acompanhado muitas vezes por outros factores limitantes como a temperatura e o défice de pressão de vapor elevados, bem como a radiação. A combinação destes factores pode favorecer a fotoinibição ao nível foliar, limitando a capacidade fotossintética das plantas (BJORKMAN & POWLES, 1984; ANGELOPOULOS *et al.*, 1996; VALLADARES & PEARCY, 1997; KARAVATAS & MANETAS, 1999). A deposição de poeira na superfície das folhas pode reduzir significativamente a actividade fotossintética, tal como tem sido verificado por outros autores (THOMPSON *et al.*, 1984; VARDAKA *et al.*, 1995). De facto, uma vez que as plantas em estudo apresentam estomas apenas na página inferior e que a deposição de poeira se verifica essencialmente na página superior, esta não deve interferir na difusão dos gases ao nível foliar, i.e. na condutância estomática, mas poderá provavelmente afectar a fotossíntese através de um efeito de ensombramento e, conseqüentemente, causar uma diminuição na produtividade.

Contudo, uma maior deposição de poeira na superfície foliar, que conduz a uma menor absorvância da radiação pode, em certas situações extremas de stresse, funcionar como um mecanismo protector contra a fotoinibição do sistema fotossintético e a manutenção do balanço energético. De facto, tem sido referido por vários autores a existência de fotoinibição nestas espécies, devido a radiações elevadas, quando associadas a temperaturas mínimas durante o Inverno (LARCHER, 2000; OLIVEIRA & PENUELAS, 2000, 2002) ou a stresse hídrico acentuado (ANGELOPOULOS *et al.*, 1996; WERNER *et al.*, 1998, 1999;

ZUNZUNEGUI *et al.*, 1999), sendo de um modo geral as espécies semi-decíduas as mais afectadas. Nestas circunstâncias, a poeira poderia exercer um efeito benéfico, em especial para a espécie *Cistus laurifolius* (semi-decídua), uma vez que esta sofre uma redução mais efectiva da radiação absorvida.

O presente estudo fornece informação sobre a resposta, ao nível da folha, dos parâmetros ópticos de duas espécies mediterrânicas, à deposição foliar de poeira proveniente de uma pedreira-cimenteira. No entanto, a realização de medições *in loco* nas espécies consideradas e noutras é de todo o interesse na confirmação das diferenças encontradas entre espécies pertencentes a grupos funcionais distintos, face à deposição real de poeira verificada nas imediações da pedreira. De igual forma, a análise de pigmentos fotossintéticos e da morfologia foliar poderão dar um importante contributo no esclarecimento desta problemática, uma vez que as peculiaridades específicas da superfície foliar, bem como o conteúdo de pigmentos, desempenham um papel crucial na variabilidade dos parâmetros ópticos. Não obstante, os resultados obtidos são úteis para a clarificação do papel desempenhado pela poeira na superfície foliar e para a avaliação do seu efeito ao nível de toda a copa, bem como ao nível da comunidade, contribuindo para uma melhor compreensão da interacção entre a vegetação e o ambiente envolvente, neste contexto de poluição.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Acção de Cooperação Bilateral entre o CEBV (FCUL) e o ICCTI/CNR.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOPOULOS K., DICHIO B. & XILOYANNIS C. (1996) Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *Journal of Experimental Botany* 47: 1093-1100.
- BALDINI E., FACINI O., NEROZZI F., ROSSI F. & ROTONDI A. (1997) Leaf characteristics and optical properties of different woody species. *Trees Structure and Function* 12: 73-81.
- BJORKMAN O., POWLES S. B. (1984) Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* 161: 490-504.
- CLOUTIS E. A., CONNERY D. R., MAJOR D. J. & DOVER F. J. (1996) Airborne multi-spectral monitoring of agricultural crop status: effect of time of year, crop type and crop condition parameters. *Int J Remote Sensing* 13: 461-470.
- EHLERINGER J. (1981) Leaf Absorbances of Mohave and Sonoran Desert plants. *Oecologia* 49: 366-370.
- FARMER A. M. (1991) The effects of dust on vegetation and its consequences for nature conservation in Great Britain. CSD Note 57, Nature Conservancy Council, Peterborough.
- FARMER A. M. (1993) The effects of dust on vegetation - a review. *Environmental Pollution* 79: 63-75.

- GAUSMAN H. W., QUISENBERRY J. E. (1990) Spectrophometric detection of plant leaf stress. In: Katterman F (ed) Environmental injury to plants. Academic Press, San Diego, pp 257-279.
- JONES H. G. (1992) Plants and Microclimate – A quantitative approach to environmental plant physiology, 2nd ed. Cambridge University Press
- KARAVATAS S. & MANETAS Y. (1999) Seasonal patterns of photosystem 2 photochemical efficiency in evergreen sclerophylls and drought semi-deciduous shrubs under Mediterranean field conditions. *Photosynthetica* 3: 41-49.
- LARCHER W. (2000) Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* 134 (3): 279-295.
- OLIVEIRA G., PENUELAS J. (2000) Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L. ) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L. ) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica* 21 (2): 97-107.
- OLIVEIRA G., PENUELAS J. (2002) Comparative protective strategies of *Cistus albidus* and *Quercus ilex* facing photoinhibitory winter conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47: 281-289.
- RICKS G. R., WILLIAMS R. J. H. (1974) Effects of atmospheric pollution on deciduous woodland part 2: Effects of particulate matter upon stomatal diffusion resistance in leaves of *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. *Environmental Pollution* 6: 87-109.
- SANDQUIST D. R. & EHLERINGER J. R. (1997) Intraspecific variation of leaf pubescence and drought response in *Encelia farinosa* associated with contrasting desert environments. *New Phytolog.* 135: 635-644.
- THOMSON J. R., MUELLER P. W., FLUCKINGER W. & RUTTER A. J. (1984) The effect of dust on photosynthesis and its significance for roadside plants. *Environmental Pollution (Ser. A)* 34: 171-190.
- VALLADARES F. & PEARCY R. W. (1997) Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* 20: 25-36.
- VARDAKA E., COOK C. M., LANARAS T., SGARDELIS S. P. & PANTIS J. D. (1995) Effect of dust from a limestone quarry on the photosynthesis of *Quercus coccifera*, an evergreen sclerophyllous shrub. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 414-419.
- WERNER C., CORREIA O. A., RYEL R. J. & BEYSCHLAG W. (1998) Modelling whole-plant primary production of macchia species: assessing the effects of photoinhibition and foliage orientation. *Revista Biol. (Lisboa)* 16: 247-257.
- WERNER C., CORREIA O. & BEYSCHLAG W. (1999) Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica* 20 (1): 15-23.
- ZUNZUNEGUI M., BACO L. F., DIAZ BARRADAS M. C. & NOVO F. G. (1999) Seasonal changes in photochemical efficiency in leaves of *Halimium halimifolium*, a mediterranean semideciduous shrub. *Photosynthetica* 37 (1): 17-31.

## CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA E DIVERSIDADE DA VEGETAÇÃO DA PAISAGEM PROTEGIDA DA ARRIBA FÓSSIL DA COSTA DA CAPARICA

P. Silva<sup>1</sup>, P. Peyroteo<sup>3</sup>, A. I. Correia<sup>2</sup>, C. Branquinho<sup>1,3</sup> & O. Correia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Centro de Ecologia e Biologia Vegetal - CEBV, <sup>2</sup> Centro de Biologia Ambiental - CBA, Campo Grande, 1749-016 Lisboa (Portugal).

<sup>3</sup> Universidade Atlântica, Antiga Fábrica da Pólvora de Barcarena, 2745-615 Barcarena, Portugal.

Silva, P., Peyroteo, P., Correia, A. I., Branquinho, C. & Correia, O. (2004). Contributo para a caracterização da estrutura e diversidade da vegetação da Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 153-168.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a flora e vegetação da Reserva Botânica da Mata dos Medos incluída na Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica (PPAFCC). As comunidades vegetais desta Reserva, resultado de uma profunda e longínqua acção humana, são pinhais que se apresentam em diferentes estádios de sucessão de acordo com a época em que ocorreu fogo e/ou as condições ambientais do local.

Foram caracterizados 8 biótopos dos 13 que dominam o mosaico das comunidades identificadas. Esta caracterização cobre a maioria das manchas de vegetação da PPAFCC (Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica) e foi realizada em áreas de pinhal e áreas de matos resultantes de diferentes fogos e que apresentam uma evolução diferente de acordo com o habitat em questão.

Para cada uma das comunidades estudadas foi determinada a abundância das espécies presentes através de estudos de frequência e cobertura e foi analisada a riqueza específica e a diversidade.

Paralelamente a esta caracterização foi dada especial atenção às matas de pinheiros (*Pinus pinea*) e zimbros (*Juniperus phoenicea*) e às comunidades de camarinha (*Corema album*) da arriba, espécie endémica da Península Ibérica, que se encontra em regressão nos seus limites de distribuição geográfica. Foi efectuada um estudo da regeneração natural das espécies dominantes destas comunidades. Verificou-se que as populações das espécies dominantes apresentam pouca

regeneração natural, sendo constituídas essencialmente por indivíduos velhos, estando a sua sobrevivência no futuro provavelmente dependente de medidas de gestão e recuperação destes habitats.

Palavras-chave: Diversidade, Sucessão, Regeneração Natural, Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica.

Silva, P., Peyroteo, P., Correia, A. I., Branquinho, C. & Correia, O. (2004). Characterization of vegetation structure and diversity of the Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica. *Revista de Biol. (Lisboa)* 22: 153-168.

The aim of this study was to identify and characterize the vegetation of the Reserva Botânica da Mata dos Medos included in the Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica (PPAFCC). As the result of a long-term human action, the communities are pine tree woods or its successional stages, according to the fire events occurred in the past and the local ecological conditions.

The characterization of 8 of the 13 biotopes identified in the reserve were evaluated: 3 pine woods and 5 shrubland communities. In each community, species abundance, frequency and cover, species richness and diversity indexes were investigated.

A special attention were turned to pine (*Pinus pinea*) and juniper (*Juniperus phoenicea*) communities and also to *Corema album* shrublands, an endemic species of Iberian Peninsula whose populations were in regression in the limits of their geographical distribution gradient.

Simultaneously demographic studies on the regeneration and survival of 3 dominant species from these communities were conducted. These populations presented low regeneration and are mainly composed of old and large individuals and their survival depends on land management and habitat regeneration.

Key-words: Diversity, Ecological Sucession, Natural Regeneration, Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica.

## INTRODUÇÃO

A Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica (PPAFCC), foi constituída paisagem protegida em 1984, pelo Dec.-Lei 168/84 de 22 Maio, com a finalidade de preservar as características geomorfológicas e geológicas bem como as comunidades naturais existentes. Em 1971 por Decreto-Lei n.º. 444/71 de 23 de Outubro a Mata Nacional dos Medos já tinha sido constituída Reserva Botânica, devido ao seu grande interesse botânico e paisagístico. A partir daí,

sofreu vários fogos florestais e subsequentes reflorestações pelos serviços florestais, pelo que, actualmente se caracteriza por vários mosaicos de vegetação em diferentes estádios sucessionais.

A PPAFCC também foi incluída no inventário de sítios de especial interesse para a conservação da Natureza (Programa CORINE – Projecto Biótopos) tendo como motivações não só a importância geológica e geomorfológica como também a vegetação e existência de espécies raras. Esta área, está por sua vez incluída no Sítio de Interesse Comunitário – “Arriba e Medos de Albufeira”, definido na Rede Natura 2000. MATEUS *et al.* (1999), refere que a importância ecológica deste Sítio reside na presença de 3 estruturas paisagísticas peculiares: 1) uma vasta paleo-arriba, modelada por um mar transgressivo; 2) um sistema de “medos” de idade Holocénica, suspensos sobre a plataforma alta e 3) uma franja dunar recente, que condicionam a presença de 15 dos habitats constantes no Anexo I da Directiva Habitats (92/43/CEE).

Actualmente, para além da modelação provocada pelos fogos e outras condicionantes ambientais e pela pressão bioclimática (exposição, ventos predominantes, humidade e proximidade do mar), a pressão humana (caminhos pedonais, estacionamento de viaturas, lixo e fogueiras) tem vindo a aumentar constituindo mais um factor de pressão sobre estes ecossistemas.

Embora a inventariação da flora e vegetação de determinada região constitua o primeiro passo para a caracterização dos habitats, se não houver um conhecimento profundo não só dos diferentes componentes dos ecossistemas mas também da forma como eles interactivam e se interrelacionam, *i.e.* dos processos funcionais dos ecossistemas, será muito difícil prever a evolução destes sistemas e actuar em termos de gestão e conservação. A caracterização que propomos, se bem que não se pretenda exaustiva, cobre no entanto a maioria das manchas de vegetação da Plataforma da arriba fóssil da PPAFCC. É dada especial atenção às matas de pinheiros (*Pinus pinea*) e zimbros (*Juniperus phoenicea*) como parte integrante da Mata dos Medos e às comunidades de camarinha (*Corema album*) da arriba, que constituem uma das comunidades em regressão nos seus limites de distribuição geográfica na Península Ibérica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização, topografia, clima, geologia e solos

A PPAFCC desenvolve-se, mais exactamente, na região de Lisboa e Vale do Tejo entre a Costa da Caparica e a Lagoa de Albufeira ( 38° 32' 52,7" - 38° 38' 58,4" N e 9° 10' 12,4" - 9° 13' 44,5" W"), ocupa uma área de 1570 ha, ao longo de cerca de 13 km de costa atlântica.

A Reserva Botânica da Mata dos Medos, incluída na PPAFCC, situa-se no topo da Arriba Fóssil da Costa de Caparica, nos Concelhos de Almada e Sesimbra. Ocupa uma faixa de 5 km por 500 m de largura, ao longo da costa ocidental da Península de Setúbal, possuindo cerca de 338 hectares, subdivididos em 20 talhões, separados por aceiros de 10 a 15 m de largura (Fig. 1).

Geologicamente, a arriba é constituída por séries detríticas de idades miocénicas e pós-miocénicas, com estratificação sub-horizontal (MACEDO, 1988 in ARSENIO, 2003).

Em termos geomorfológicos, MATEUS *et al.* (1999) referem que “A geomorfologia do Sítio da Arriba e Medos de Albufeira é sobretudo marcada pela existência de uma plataforma alta afeiçoada no Pliocénico, truncada a Oeste pela transgressão marinha “Flandriana” que a modelou há cerca de 6 mil anos em arriba”. Essa Arriba está hoje “fossilizada” pela erosão continental, responsável pelo extensivo ravinamento do topo da falésia. Sobre esta plataforma Pliocénica desenvolveram-se dunas, que hoje se encontram mais ou menos erodidas constituindo os chamados “Medos”.

SALVADO (2000), caracteriza os solos predominantes desta área protegida como solos do tipo regossolos Psamíticos não húmicos, derivados de arenitos. São de textura ligeira com diferenciação insípiente e pedregosidade nula, sem afloramentos rochosos, com grande permeabilidade e fraco poder de retenção de água no solo devido à baixa acumulação de matéria orgânica. São solos com uma disponibilidade de nutrientes bastante baixa, poucas bases de troca e um pouco ácidos.

Localiza-se na região de bioclima Termomediterrâneo de ombroclima sub-húmido (RIVAS-MARTINEZ, 1993), com uma precipitação anual média de 778 mm e temperatura anual média de 16,7°C. Segundo a classificação bioclimática de Gaussen, com base no índice xerotérmico, calculado exclusivamente no período definido como seco, este clima será Mesomediterrâneo acentuado ou sub-húmido acentuado (índice xerotérmico de Gaussen calculado para a região de Lisboa,  $x = 85$ ) (ALCOFORADO, 1982).

### Metodologia

As áreas identificadas e delimitadas com base em ortofotomapas de 1998, cartografia já existente e avaliação em campo, foram divididas em dois tipos de vegetação, tendo sido caracterizadas e analisadas independentemente apenas 8 das 13 áreas identificadas: (i) áreas de pinhal e (ii) áreas de matos (Fig. 1).

Nas áreas de pinhal foram seleccionadas para o estudo apenas 3 áreas, designadas como Pinhal Original (com pinheiros de grande porte, sendo por isso provavelmente o mais antigo), Pinhal Norte e Pinhal Sul. Nas áreas de matos foram identificadas 5 áreas designadas de acordo com o tipo de vegetação dominante e o ano em que ocorreu o fogo (4, 10, 11, 12 e 13) (Tabela I).

A caracterização da vegetação foi realizada ao longo de transectos aleatórios tendo as amostragens sido efectuados em quadrados de 9 m<sup>2</sup>, separados entre si por 3 m de forma a cobrir toda a área. Em cada quadrado foram identificadas as espécies e quantificada a percentagem de cobertura. No caso das espécies de *Pinus* spp., *Juniperus* spp. e *C. album*, foi dada particular atenção à regeneração natural, tendo-se contabilizado todos os indivíduos jovens. Os dados recolhidos permitiram efectuar estudos de diferentes parâmetros: abundância, frequência e

cobertura, a riqueza específica e diversidade (KENT & COKER, 1992). O número de quadrados amostrados para cada área foi determinado de forma a garantir um valor mínimo de 75% de espécies amostradas em relação ao total estimado pelo índice de Jackknife ( $S_j = S_{yobs} + a(n-1/n)$ , em que "a" se refere ao número de espécies que aparecem em apenas 1 quadrado e "n" é o número total de quadrados).



Figura 1. Distribuição das actuais manchas de vegetação na Reserva Botânica da Mata dos Medos, delimitadas com base em fotografias aéreas digitais, utilizando os sistemas CAD (Microstation e AutoCAD). As áreas delimitadas de 1 a 13 encontram-se caracterizadas na Tabela I.

Tabela I – Caracterização das áreas identificadas.

Nº da área *	Tipo de comunidade	Área (ha)	Perímetro (m)
1	Pinhal Original	30,1	2794
2	Pinhal misto interior	26,65	2029
3	Pinhal recente - Fogo 1974	24,8	3089
4	Mato alto - Fogo 1974	9,21	1706
5	Mato baixo - Bateria da Raposa	13,9	1498
6	Pinhal Norte	49,10	3979
7	Pinhal Sul	35,21	3510
8	Pinhal misto exterior	22,6	4151
9	Pinhal recente - Fogo 1983	15,9	1982
10	Mato baixo interior - Fogo 1983	48,2	4521
11	Mato baixo exterior - Fogo 1983	32,2	4250
12	Mato alto - Fogo 1983	11,6	2766
13	Matos de <i>Corema album</i>	7,3	2363

\* - refere-se ao nº das diferentes comunidades indicadas na fotografia aérea (Fig.1).

Para cada quadrado foram também registados parâmetros relacionados com a caracterização do habitat, como a exposição da área e do quadrado, o declive, a proximidade a fontes de pressão externa (casas, caminhos, estradas, etc.) e indicadores biológicos como presença de pegadas, tocas, formigueiros, líquenes, etc..

Para as áreas de pinhal foi ainda aplicado um dos métodos das distâncias, o método do indivíduo mais próximo (MULLER-DOMBOIS & ELLENBURG, 1974, BARBOUR *et al.*, 1999). Ao longo de transectos estabelecidos ao acaso, de modo a cobrir toda a área a estudar, foram estabelecidos pontos de amostragem em cada 5 metros onde foram medidas a distância do ponto ao indivíduo mais próximo e o diâmetro à altura do peito (DAP) no caso das árvores ou na base no caso de espécies arbustivas. Foram determinados os seguintes parâmetros: Densidade total do povoamento por hectare, densidade específica por hectare, densidade relativa, área basal total por hectare, área basal específica por hectare, dominância relativa e importância das espécies. Nas áreas de pinhal, foi ainda determinado o DAP (diâmetro à altura do peito) e o índice de área foliar (LAI) através de medições da atenuação da radiação pelas copas, utilizando-se o LAI-2000 (LI-COR).

## RESULTADOS

## Caracterização dos pinhais

Nos três pinhais em estudo a espécie dominante é *Pinus pinea*, com uma dominância relativa que varia de 66% no P. Sul a 82% no P. Original. As características gerais dos pinhais estudados encontram-se resumidas nas Tabelas II e III.

TABELA II – Características gerais dos pinhais estudados

	P. Original (63)	P. Norte (102)	P. Sul (110)
Cobertura dos inventários (%)§	100	57	69
LAI (m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	4,07	2,05	1,96
DAP médio dos pinheiros (cm)*	54,7*	26,1*	43,6*
Área basal média /pinheiro (m <sup>2</sup> )	0,225/0,235*	0,077/0,053*	0,151/0,149*
Densidade total (nº/ha)	8361	12897	1515
Área basal total (m <sup>2</sup> /ha)	73	125	44

§ os valores de cobertura não incluem a cobertura do pinheiro manso, consideram apenas a cobertura das espécies do sub-coberto. LAI – índice de área foliar (área foliar total/área projectada no terreno). DAP – diâmetro à altura do peito, a 1,3m de altura. \*valores obtidos de uma amostragem ao acaso de 20 pinheiros em cada pinhal. Os números entre parêntesis referem-se ao número de pontos amostrados em cada área.

O P. Original é muito fechado, com uma cobertura vegetal arbustiva de 100%, e um índice de área foliar muito superior ao dos outros pinhais. A espécie mais importante é o carrasco (*Quercus coccifera*), cujos valores de densidade muito elevados contribuem para que esta espécie constitua praticamente todo o estrato arbustivo neste pinhal. O pinheiro-manso (*Pinus pinea*) aparece em segundo lugar de importância, com baixa densidade e valores de DAP médio mais elevados. O P. Norte é mais aberto e com menor ensombramento (LAI de 2,05 m<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>). Apresenta elevada densidade de espécies (12897 ind/ha), devido aos indivíduos do género *Rhamnus*. O P. Sul é mais próximo do anterior em termos de cobertura e ensombramento, apresenta, no entanto, menor densidade total relativamente às outras duas áreas. As espécies, em geral, apresentam menor densidade e maior área basal média. *P. Pinea* e *Juniperus phoenicea* são as espécies com maior importância neste pinhal. O pinheiro-manso apresenta uma densidade de 193 ind/ha enquanto *J. phoenicea* apresenta 468 ind/ha. É nesta área que é possível encontrar os exemplares de sabina-da-praia (*J. phoenicea*) com o melhor vigor e vitalidade. No P. Norte aparecem muitos indivíduos mortos ou senescentes desta espécie, o que se poderá dever à maior competição entre as espécies do estrato arbustivo, pela luz e recursos.

Tabela III – Caracterização dos 3 pinhais estudados através do método do indivíduo mais próximo. D – densidade absoluta, AB\* – área basal média, AB – área basal/hectare, Imp – importância.

	Pinhal Original				Pinhal Norte				Pinhal Sul			
	D (n°/ha)	AB* (cm <sup>2</sup> )	AB (m <sup>2</sup> /ha)	Imp.	D (n°/ha)	AB* (cm <sup>2</sup> )	AB (m <sup>2</sup> /ha)	Imp	D (n°/ha)	AB* (cm <sup>2</sup> )	AB (m <sup>2</sup> /ha)	Imp
<i>Q. coccifera</i>	3849	9,91	3,81	97	253	5,18	0,13	4	-	-	-	-
<i>P. pinea</i>	265	2253	59,80	88	1264	771,65	97,57	98	193	1508,15	29,09	92
<i>P. lentiscus</i>	1062	17,06	1,81	28	1517	10,58	1,55	25	179	31,5	0,56	25
<i>J. phoenicea</i>	1194	57,41	6,86	38	1644	104,51	17,18	39	468	287,27	13,45	93
<i>R. alaternus</i>	664	2,07	0,14	16	3920	6,52	2,56	63	14	4,68	0,01	2
<i>R. oleoides</i>	1194	4,79	0,57	29	4173	13,98	5,83	69	647	11,11	0,72	87
<i>A. longifolia</i>	133	2,87	0,04	3	-	-	-	-	14	8,78	0,01	2
<i>A. unedo</i>	-	-	-	-	126	0,32	0,00	2	-	-	-	-
TOTAL	8361		73	300	12897		125	300	1515		44	300

*Rhamnus oleoides*, *J. phoenicea* e *Pistacia lentiscus* apresentam uma distribuição relativamente homogênea nos três pinhais com um valor de importância considerável. Outras espécies aparecem no entanto preferencialmente mais numa ou outra área. *Rhamnus alaternus* parece estar mais associado ao P. Norte, estando ausente nos inventários do P. Sul. Outras espécies arbustivas, não amostradas por esta metodologia, como o sargaço (*Cistus salvifolius*) aparece nos pinhais Norte e Sul, sendo mais abundante e apresentando maior cobertura no P. Sul. É de salientar que o P. Original não apresenta estrato herbáceo, provavelmente devido ao ensombramento provocado pelo estrato arbustivo. *Arbutus unedo* e *Halimium calycinum* aparecem exclusivamente associados ao P. Norte, enquanto *Lavandula luisieri* e *Helichrysum italicum* var. *picardii* aparecem apenas no P. Sul.

### Caracterização dos Matos

Os valores de cobertura e de frequência das espécies mais frequentes nas 5 áreas de mato, encontram-se representados na Fig.2. Nas áreas de mato estudadas, as áreas 13 e 10 são as que apresentam menor cobertura, sendo a área 12 a de maior cobertura. Na generalidade das áreas de mato, a espécie dominante é *Carpobrotus edulis* (chorão), espécie exótica e de comportamento invasor. Surge com uma frequência média de 81%, ocorrendo em todas as áreas estudadas e com uma cobertura igualmente relevante em todas elas. É de salientar que na área 4, esta espécie aparece em apenas 52% dos inventários e com uma cobertura muito inferior à das restantes áreas. Nos matos de *Corema* (área 13) apesar desta espécie apresentar frequência elevada, é a *Corema album* que apresenta a maior cobertura.

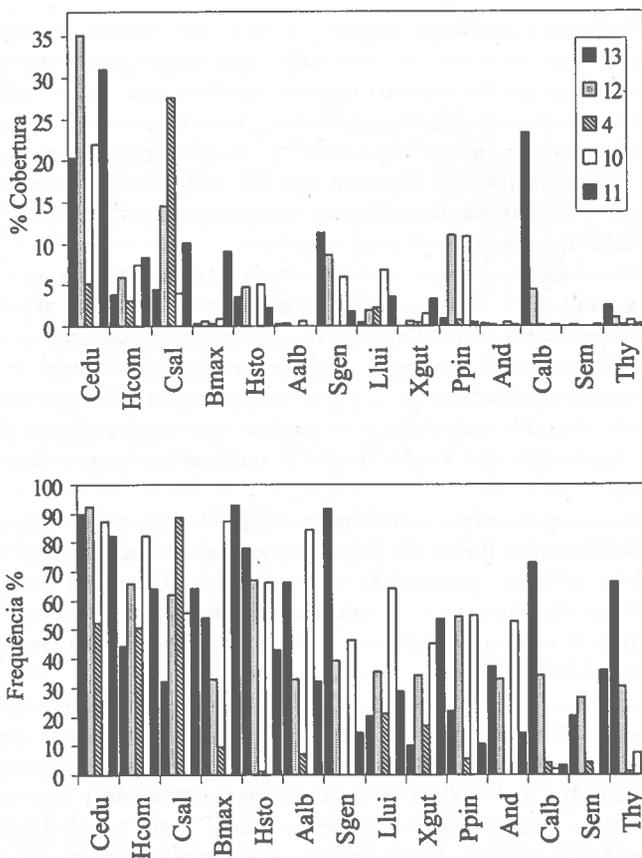


Figura 2. Percentagem de cobertura e frequência das espécies mais frequentes, nas 5 áreas de matos. Áreas: 13 – matos de *Corema*, 12 – mato alto (fogo 1983), 4 – mato alto (fogo 1974), 10 – mato baixo interior (fogo 1983), 11 – mato baixo exterior (fogo 1983). Espécies: Cedu – *Carpobrotus edulis*, Hcom – *Halimium calycinum*, Csal – *Cistus salvifolius*, Bmax – *Briza maxima*, Hsto – *Helichrysum italicum*, Aalb – *Arrhenaterum album*, Sgen – *Stauracanthus genistoides*, Llui – *Lavandula luisieri*, Xgut – *Xolanta guttata*, Ppin – *Pinus pinea*, And – *Andryala* sp., Calb – *Corema album*, Sem – *Senecio* sp., Thy – *Thymus* sp.

A área 4, mais distanciada das outras, faz fronteira a oeste com o P. Norte, e estende-se até à margem da arriba. Sofreu um fogo em 1974 e apresenta uma estrutura de matos esclerófilos perenifólios muito densos. Esta área diferencia-se ainda das restantes, apresentando maior número de espécies específicas, como: *Lonicera implexa*, *Q. coccifera*, *R. alaternus*, *R. oleoides*, *Ruscus aculeatus*, *Osyris alba*, *Asphodelus* sp., *Cytinus hypocistis*, *Centaurium majus*,

características dos matos esclerófilos mediterrânicos. A presença quase exclusiva de *A. unedo* nesta área, uma espécie com uma certa exigência em termos de humidade e a ausência de *H. italicum* espécie normalmente encontrada nas dunas, poderão ser indicadores da substituição das comunidades vegetais na área 4 por comunidades mais exigentes e portanto de estádios mais avançados da sucessão. Nesta área, as espécies *Rhamnus oleoides* e *Quercus coccifera* são espécies constantes ( $f > 80\%$ ), sendo também as espécies responsáveis pela maior percentagem de cobertura a seguir a *Cistus salvifolius*.

As espécies *Artemisia campestris* var. *maritima* e *Ononis natrix* surgem nas áreas de matos altos (12 e 4), sendo espécies características de dunas secundárias, são indicadoras de uma maior evolução e estabilidade destes matos onde a pressão do mar e ventos é menor. *C. salvifolius* aparece em todas as áreas com frequência média significativa (61%), apresentando uma cobertura bastante elevada em todas elas. *H. calycinum* é a espécie que surge, depois do *C. salvifolius*, com uma cobertura média de 5.8% nas várias áreas e com uma frequência elevada.

*L. luisieri* e *Xolanta guttata* aparecem nas áreas 12, 11 e 10, sendo estas áreas as que correspondem aos limites do fogo mais recente, estando a presença, frequência e cobertura destas espécies de acordo com o seu carácter pioneiro e dependente do fogo. As áreas 10 e 11 constituem matos baixos que sofreram também fogo em 1983, apresentando no entanto uma estrutura diferente de acordo com as espécies dominantes.

A área 13 caracterizada por matos de *Corema album* (camarinha) mais ou menos abertos situa-se na margem da arriba fazendo fronteira com a área 12 onde a existência de um substrato arenoso mais estabilizado permite a instalação dos matos esclerófilos muito densos e com menor influência dos ventos marinhos. Estas duas áreas, embora apresentem uma certa proximidade em termos de espécies i.e. espécies características dos sistemas dunares, também apresentam uma estrutura muito própria. Os matos de *Corema* (área 13) constituem uma estreita faixa no limite da falésia, esta área é dominada por *Corema album* (camarinha). Esta espécie aparece em 73% dos inventários, sendo responsável por uma cobertura de cerca de 23% num total de 77% de coberto vegetal. *Stauracanthus genistoides* apresenta uma distribuição semelhante à da camarinha, sendo também na área 13 que apresenta maior frequência e cobertura. A área 13 exhibe, em conjunto com a 12, uma série de espécies características de sistemas dunares com forte influência do mar e do vento como *Silene littorea*, *Ammophila arenaria* e *Thymus carnosus*. Neste estudo, embora esta última espécie apareça em todos os matos é mais frequente nas áreas 13 e 12.

A existência de 4 das 15 espécies endémicas da Península Ibérica citadas por (CARVALHO & MACEDO 1993), *Corema album*, *Stauracanthus genistoides*, *Thymus carnosus* e *Armeria pungens*, pode constituir uma forte indicação da importância ecológica e biogeográfica deste habitat, que sujeito a intensas pressões edafo-climáticas e antrópicas corre o risco de degradação acentuada.

Relativamente à diversidade, de um modo geral as áreas de matos apresentam maior diversidade que os Pinhais (Tabela IV).

Estes valores de diversidade e equitabilidade também são visíveis na curva de dominância - diversidade de Whittaker, (outra forma de analisar a diversidade das comunidades) (KENT & COKER, 1992), onde se representa a variação da cobertura relativa das espécies por ordem decrescente (Fig. 3). As curvas dos 3 pinhais, destacam-se das curvas das áreas de matos, com um declive muito acentuado indicando dominância de poucas espécies. Apresentam uma forma muito semelhante entre si, bem como o declive, indicador de equitabilidade semelhante, contudo o Pinhal Original destaca-se com uma linha incompleta, demonstrando menor nº de espécies (apenas 8 espécies). Por outro lado apresenta apenas duas espécies com um máximo de cobertura diminuindo muito rapidamente.

A dominância de 2 espécies, (o pinheiro e o carrasco) traduz-se numa grande competição, principalmente pela luz, para as outras espécies, podendo originar comunidades com menor diversidade e riqueza específica. Ao contrário do que acontece para as áreas de pinhal, as curvas das áreas de matos, surgem neste caso com um declive muito menos acentuado, demonstrando haver uma distribuição mais regular das espécies, no que diz respeito às coberturas, maior diversidade e equitabilidade. Destaca-se nas áreas de matos a área 10 das restantes áreas, numa situação intermédia entre os pinhais e as restantes áreas de matos. As áreas de matos altos (12 e 4) apresentam maiores índices de diversidade o que está de acordo com o seu grau de evolução.

Tabela IV – Índices de diversidade.  $S\gamma$  (nº total de espécies),  $S\alpha$  (diversidade  $\alpha = n^\circ$  total de espécies/nº de quadrados),  $S\beta$  (diversidade  $\beta = S\gamma / S\alpha - 1$ ),  $H'$  (índice de diversidade de Shannon-Wiener,  $H' = -\sum p_i \ln p_i$ , sendo  $p_i$  a proporção de cobertura média de cada espécie),  $J$  (índice de equitabilidade,  $J = H' / \ln S\gamma$ ),  $S_j$  – nº total de espécies estimado pelo índice Jackknife ( $S_j = S\gamma_{obs} + a(n-1/n)$ ).

	Pinhais			Áreas de Matos				
	Orig. (12)	Norte (38)	Sul (42)	4 (71)	10 (95)	11 (28)	12 (79)	13 (35)
$H'$	1,18	1,41	1,36	2,15	2,16	2,21	2,26	2,09
$J$	0,57	0,51	0,46	0,51	0,57	0,54	0,53	0,50
$S\alpha$	3,3	6,1	5,5	8,2	9,3	10,5	9,7	10,4
$S\gamma$	8	16	19	68	43	60	72	64
$S_j$	9	17	25	86	50	80	82	52
$(S\gamma/S_j)*100$	89	97	76	79	86	75	89	87
$S\beta$	1,4	1,6	2,5	7,3	3,6	4,7	6,6	3,8

Os números entre parêntesis indicam o número de quadrados utilizados na amostragem.  $S\gamma/S_j.100$  – proporção do nº de espécies observado relativamente ao estimado.

### Regeneração natural

Os estudos de regeneração natural indicam uma elevada mortalidade de *P. Pinea*, uma vez que esta espécie apresenta nalgumas comunidades valores elevados de regeneração (germinação) correspondentes a valores nulos de sobrevivência. É óbvia a raridade de juvenis que sobrevivem mais de um ano nas áreas de pinhal. Nos pinhais, com excepção do P. Original, o nº de sementes germinadas é muito mais elevado que nas áreas de matos não se verificando posteriormente juvenis desta espécie nos pinhais.

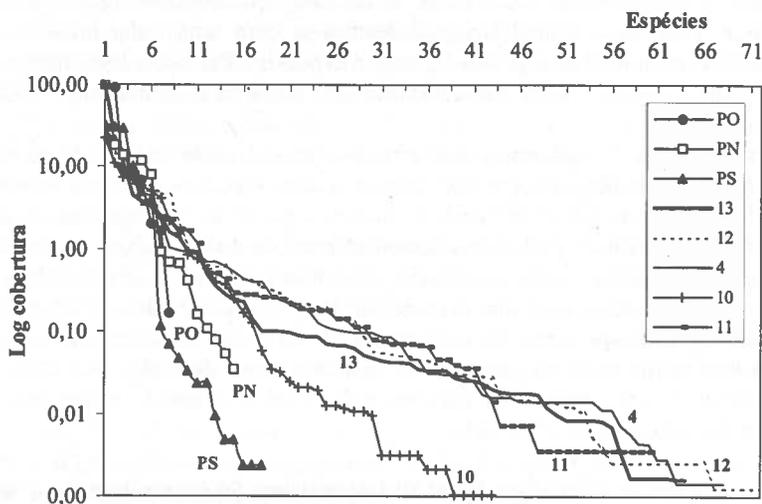


Figura 3. Curvas de dominância – diversidade de Whittaker. Variação das coberturas de cada espécie numa escala logarítmica, da espécie com maior cobertura para as espécies com menor cobertura. Pinhais: PO – Pinhal Original, PN – pinhal Norte, PS – pinhal Sul; Matos: Áreas 4, 10, 11, 12, 13.

É nas áreas de matos que se encontram alguns indivíduos juvenis com idade superior a 1 ano, indicador de que apesar da regeneração ser muito baixa encontram condições edafoclimáticas propícias à sua sobrevivência. (Tabela V). Para *J. phoenicea*, consideraram-se os registos por classes de tamanho para cada área amostrada (Tabela VI). Verifica-se ocorrer regeneração natural apenas nas áreas do P. Norte e na área 4 de matos esclerófilos perenifólios. Embora na área do P. Norte tenham sido encontrados juvenis de maior porte, considera-se que é na área 4 que a regeneração natural tem maior sucesso, tendo em conta que nesta área a sua frequência (10%) e cobertura (0,4%) são muito inferiores às do P. Norte (61% e 12% de frequência e cobertura respectivamente). Normalmente após um fogo só passados alguns anos, esta espécie volta a recolonizar as comunidades, estando a sua regeneração dependente da dispersão efectuada por

aves uma vez que após o fogo, esta espécie não regenera por rebentação epicórmica nem por germinação (CLEMENTE *et al.*, 1996).

Tabela V - Regeneração natural de *Pinus pinea*. Nº de juvenis por classe de idade. A densidade de germinação foi calculada para as plântulas no 1º ano de germinação e a densidade de sobrevivência para os juvenis que sobreviveram após a germinação e portanto que atingiram a classe mais avançada (>>1ano).

Classes	Pinhais			Matos				
	Orig.	Norte	Sul	13	12	4	10	11
< 1 ano	-	170	12	2	1	3	13	-
> 1 ano	-	-	-	-	3	-	2	-
>> 1 ano	-	-	-	4	5	1	3	2
Germinação n°/m <sup>2</sup>	0	0,497	0,032	0,006	0,001	0,005	0,015	0
Sobrevivência n°/m <sup>2</sup>	0	0	0	0,013	0,007	0,002	0,004	0,008

Tabela VI - Regeneração natural de *Juniperus phoenicea*. Número de juvenis para cada classe de tamanho para as zonas de pinhal e de mato estudadas.

Classes	Pinhais			Matos				
	Original	Norte	Sul	13	12	4	10	11
10-40	-	3	-	-	-	1	-	-
40-80	-	8	1	-	-	6	-	-
80-120	-	2	-	-	-	-	-	-
Total	0	13	1	0	0	7	0	0
Densidade n°/m <sup>2</sup>	0	0,038	0,0026	0	0	0,011	0	0

Relativamente a *C. album*, o estudo foi efectuado na área onde esta espécie é dominante, (área 13). Foi utilizado como classe de tamanho a cobertura da copa (obtida através dos diâmetros maior e menor) de todos os indivíduos amostrados e que se consideram representativos da população (Fig.4). Não foram registadas nenhuma plântulas e verifica-se haver um predomínio de indivíduos adultos relativamente a indivíduos juvenis indicando que esta população se encontra a evoluir para um estágio próximo da senescência, se entretanto não se alterarem as condições na zona que levem a um recrutamento de novos indivíduos.

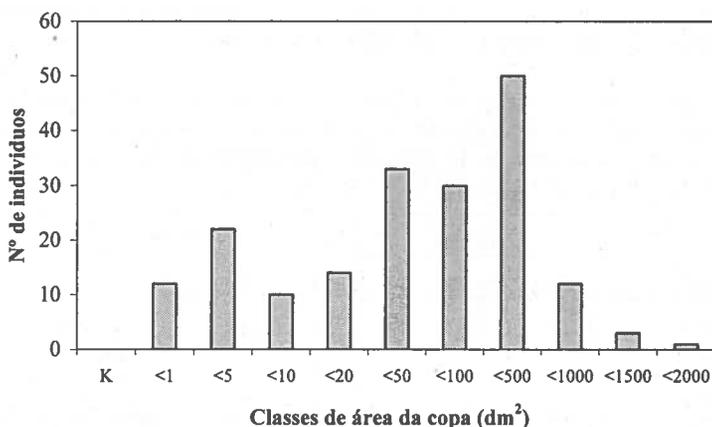


Figura 4. Distribuição do n.º de indivíduos de *Corema album* pelas diferentes classes de tamanho de área de projecção da copa determinada a partir do diâmetro maior e menor. Estas classes correspondem a diferentes classes de idade.

## CONCLUSÃO

Relativamente aos pinhais estudados apresentam-se estruturalmente muito diferentes, resultado de um estágio de evolução diferente ou de diferente tipo de intervenção humana. As espécies dominantes são *P. pinea* e *J. phoenicea*, apesar de nem sempre serem as com maior densidade. O P. Original e o P. Norte apresentam uma densidade total excessivamente elevada, devido à grande densidade de outras espécies de pequeno porte como o carrasco (*Q. coccifera*) no P. Original e as espécies de *Rhamnus* no P. Norte. O P. Sul apresenta uma distribuição mais homogénea do número de espécies. Salienta-se por apresentar espécies características de habitats mais xéricos como *L. luisieri* e *H. italicum*, sendo também aqui que *C. salvifolius* apresenta a sua maior frequência e cobertura. A sabina-da-praia, neste pinhal, apresenta uma dominância e densidade elevadas, indicando tratar-se de uma população em crescimento, ao contrário dos outros dois pinhais onde o número de indivíduos é baixo e se limita a indivíduos de grande porte e senescentes. Nestes pinhais a falta de regeneração das espécies que constituem a matriz estrutural actual destas formações - *P. pinea* e *J. phoenicea*, poderá estar condicionada pelas condições microclimáticas criadas pela implantação e evolução das próprias comunidades.

Relativamente às áreas de matos estudadas, estas apresentam-se estruturalmente e evolutivamente em diferentes estádios. Apresentam uma diversidade mais elevada que a dos pinhais. Verifica-se, contudo, a invasão de algumas destas manchas por *Carpobrotus edulis*. A área 4 encontra-se num estágio de sucessão pós-fogo posterior às restantes áreas ardidas, apresentando um desenvolvimento vegetal que permite controlar em certo grau a invasibilidade do chorão. Os matos de *C. album* estendem-se numa faixa muito estreita entre a

margem da arriba até às primeiras elevações, numa zona de depressão, onde a espécie encontra o seu óptimo ecológico. Esta espécie apresenta baixa probabilidade de regeneração, uma vez que está dependente de vectores animais (CALVIÑO, 2000) cada vez mais ausentes devido à acção antropogénica. Por outro lado, *Carpobrotus edulis*, que apresenta uma grande capacidade de regeneração quer por via vegetativa quer por semente, apresenta actualmente maior frequência que a camarinha, com tendência para aumentar a sua população nesta área num futuro próximo. CLAVIJO *et al.* 2002, num estudo recente sobre a caracterização das populações de *C. album*, realizado ao longo do gradiente da sua distribuição, verificaram que a fragmentação destas populações tem originado a sua senescência em muitos pontos do seu gradiente de distribuição e apontam para medidas de protecção e regeneração destes habitats. Estes autores verificaram igualmente que a ausência de regeneração destas populações está associada a sítios mais perturbados e ausência de animais, ao contrário do que verificaram nas zonas protegidas ou preservadas.

A dispersão e germinação das sementes e sobrevivência das plântulas, são factores cruciais na regeneração natural das populações vegetais. Nestas etapas, onde existe uma maior taxa de mortalidade, as condições ambientais são igualmente importantes (HARPER, 1977).

Tendo presente como objectivos a gestão e conservação destas áreas, nem sempre a dominância ou a diversidade elevadas poderão ser critérios suficientemente válidos para decidir sobre o tipo de gestão a aplicar. O conhecimento da estrutura etária das populações é um factor muito importante para a compreensão do estádio de evolução das comunidades. É necessário ter algum cuidado, relativamente às diferentes regiões ou comunidades e aos diferentes estádios de desenvolvimento, já que os diferentes estádios sucessionais vão alterando as condições do meio e portanto acabam por levar à substituição de umas espécies por outras mais tolerantes.

Este estudo parece sugerir que a disponibilidade de vectores animais e o microclima são factores chave na regeneração natural das populações de *Corema album* e de *Juniperus phoenicea*. Contudo muitos destes sistemas estão a sofrer uma pressão antropogénica crescente, fundamentalmente com fins urbanísticos e recreativos, o que origina que essa associação entre plantas e animais que actuam de agentes de dispersão esteja a desaparecer de forma alarmante.

No caso do *Pinus pinea* é a evolução das próprias comunidades, dos pinhais, que determina a persistência das populações através de regeneração e sobrevivência dos juvenis. Só nas áreas mais abertas de matos se verifica de facto a sobrevivência destes juvenis, uma vez que nos pinhais o ensombramento e competição pela própria espécie acabam por as eliminar.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do protocolo entre a Câmara Municipal de Almada e o Centro de Ecologia e Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências de Lisboa

(CEBV – FFCUL). Agradecemos igualmente a colaboração dos técnicos da PPAFCC e do seu director Eng. Ricardo Guerreiro.

## REFERÊNCIAS

- ALCOFORADO, M. J., ALEGRIA, M. F., PEREIRA, A. R. & SIRGADO, C. (1982). Domínios Bioclimáticos em Portugal definidos por comparação dos índices de Gaussen e de Emberger. Centro de Estudos Geográficos. INIC.
- ARSÉNIO, P. & ESPÍRITO SANTO, M. D. (2003). Flora e Vegetação da PPAFCC. ISA. Centro de Botânica Aplicada à Agricultura.
- BARBOUR, M. G., BURK, J. H., PITTS, W. D., GILLIAM, F. S. & SCHWARTZ, M. W. (1999). *Terrestrial Plant Ecology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Benjamin/ Cramming Pub. 634 pp.
- CALVIÑO M. (2000). Consumo de frutos y dispersión de semillas de la camarina (*Corema album*) em las Islas Ciés. I Congreso Ibérico de Ecología. Pp. 106.
- CALVIÑO M. (2002). Spatial patterns of seed dispersal and seedling recruitment in *Corema album* (Empetraceae): the importance of unspecialized dispersers for regeneration. *Journal of Ecology*, **90**: 775-784.
- CARVALHO, L. & MACEDO, M. (1993). Flora e Vegetação da Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica. Contributo para o plano de ordenamento. Ministério do Ambiente e dos Recursos Naturais. Lisboa. Ministério do Ambiente e dos Recursos Naturais. SNPRCN.
- CLAVIJO A., DÍAZ BARRADAS M. C., AIN-LHOUT F., ZUNZUNEGUI, M. & CORREIA, O. (2002). A fragmentação como causa principal da redução do habitat de *Corema album* na sua área de distribuição. *Revista de Biol. (Lisboa)*, **20**: 109-120.
- CLEMENTE, A. S., REGO, F. C. & CORREIA, O. (1996). Demographic patterns and productivity of post-fire regeneration in portuguese mediterranean maquis. *Int. J. Wildland Fire* **6** (1): 5-12.
- HARPER, J. L. (1977). *Population Biology of Plants*. Academic Press, London.
- KENT, M. & COKER, P. (1992). *Vegetation Description and Analysis*. John Wiley & Sons, New York.
- MATEUS, J., QUEIROZ, P. & REPAS, M. (1999). Habitats Naturais de Portugal - Sítio 49 : Caparica/Lagoa de Albufeira. MLJB. Universidade de Lisboa.
- MUELLER-DOMBOIS, D. & H. ELLENBURG. (1974). *Aims and Methods of Vegetation Ecology*. John Wiley & Sons, New York.
- RIVAS - MARTINEZ, S., LOUSÃ, M., DÍAZ, T. E., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ & COSTA, J. C. (1990). La vegetación del sur de Portugal (Sado, Alentejo e Algarve). *Itinera Geobotanica*, **3** : 5-126.
- RIVAS-MARTINEZ, S. (1993). Bases para una nueva clasificación bioclimática de la tierra. *Folia Botanica Matritensis* **10**: 2-23.
- SALVADO, J. (2000). Projecto de Intervenção Florestal na Mata Nacional dos Medos e na Mata da Ribeira da Foz do Rego. Relatório de Estágio. ICN.

## BENTHIC SUCCESSION ON AN ARTIFICIAL REEF IN THE SOUTH OF PORTUGAL – PRELIMINARY RESULTS

A. Moura<sup>1,\*</sup>, D. Boaventura<sup>2,3</sup>, J. Cúrdia<sup>1</sup>, S. Carvalho<sup>1</sup>, P. Pereira<sup>1</sup>, L. Cancela da Fonseca<sup>3,4</sup>, F. M. Leitão<sup>1</sup>, M. N. Santos<sup>1</sup> & C. C. Monteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (INIAP/IPIMAR), Centro Regional de Investigação Pesqueira do Sul (CRIPSul), Av. 5 de Outubro, 8700-305 Olhão, Portugal; <sup>2</sup>Escola Superior de Educação João de Deus, Avenida Álvares Cabral, 69, 1269-094 Lisboa, Portugal; <sup>3</sup>IMAR, Laboratório Marítimo da Guia, Estrada do Guincho, 2750 Cascais, Portugal; <sup>4</sup>FCMA, DCB, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal.

Corresponding author: Ana Moura, \* e-mail: [amoura@ipimar.ualg.pt](mailto:amoura@ipimar.ualg.pt)

Moura, A., Boaventura, D., Cúrdia, J., Carvalho, S., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Leitão, F. M., Santos, M. N. & Monteiro, C. C. (2004). Benthic succession on an artificial reef in the south of Portugal – preliminary results. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 169-181.

The present work aimed to characterise macrobenthic community succession patterns on the “Faro/Ancão” artificial reef, located off Faro (Algarve, southern Portugal), particularly on 2 adjacent artificial reef groups (groups A10 and A11). These reef modules were deployed in August 2002, at approximately 20m depth. The study of macrobenthic colonization was performed using 15 x 15cm cubic units made of the same concrete material of reef modules. These units were suspended in the reef blocks at the time of the reef immersion to ensure that the colonization patterns would be representative of the reef structure. Three replicate samples were collected by scuba diving on the third (November 2002) and sixth (February 2003) months after immersion. The different surfaces of the cubic samples were scraped for posterior analysis of the macrobenthic communities. For this study four out of the six faces (horizontal: top vs. bottom; vertical: inside vs. outside) were used to analyse the influence of surface orientation and time of immersion on benthic colonization. Bryozoans, hydroids, sponges, barnacles and ascidians were not quantified. On the “Faro/Ancão” artificial reef system, the mean abundance, number of species and diversity tended to increase with time of immersion. Both reef groups showed a similar colonization pattern. In general, the top surface of the cubic samples presented higher number of species and mean

abundance than the other surfaces in study. The inside and outside surfaces presented a similar faunal composition throughout the sampling period, whereas the horizontal surfaces were significantly different. Differences on exposure of each surface, namely to light, currents and sedimentation, may be the reason for the observed results. Time of submersion seems to be the main factor structuring these communities.

Key words: macrobenthos, colonization, artificial reefs.

Moura, A., Boaventura, D., Cúrdia, J., Carvalho, S., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Leitão, F. M., Santos, M. N. & Monteiro, C. C. (2004). Sucessão bentónica num recife artificial no Sul de Portugal – resultados preliminares. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 169-181.

O presente trabalho visou a caracterização dos padrões de colonização das comunidades macrobentónicas no recife artificial “Faro/Ancão”, localizado ao largo de Faro (Algarve, Sul de Portugal), particularmente em 2 grupos recifais adjacentes (grupo A10 e A11). Estes grupos recifais foram imersos em Agosto de 2002, aproximadamente a 20m de profundidade. Para o estudo da colonização e sucessão do substrato rochoso utilizaram-se cubos de betão (15x15cm de lado), de material idêntico ao da construção dos módulos recifais. Estas unidades foram suspensas nos módulos recifais aquando da imersão dos recifes, de modo assegurar que os padrões de colonização fossem representativos da estrutura recifal. As campanhas de recolha foram efectuadas por mergulho com escafandro autónomo, sendo recolhidos três replicados por local, após três e seis meses de imersão (Novembro de 2002 e Fevereiro de 2003, respectivamente). No laboratório procedeu-se à raspagem das faces dos cubos, para recolha dos organismos. Analisaram-se quatro das seis faces amostradas correspondendo à orientação horizontal: face superior vs. face inferior, e à orientação vertical: face interior vs. face exterior. Briozoários, hidrários, espongiários, cirrípedes e ascídeas não foram quantificados. No sistema recifal “Faro/Ancão” a abundância média, o número de espécies e a diversidade aumentaram com o tempo de imersão. Ambos os grupos recifais apresentaram padrões de colonização semelhantes. De um modo geral, na face superior dos cubos verificou-se o maior número de espécies e de abundância média. No que respeita à composição faunística, as superfícies de orientação vertical apresentaram uma composição similar, enquanto que as superfícies de orientação horizontal revelaram-se significativamente diferentes.

A diferente exposição destas faces nomeadamente à luz, correntes e sedimentação poderá estar na origem dos resultados obtidos. O tempo de imersão parece ser o factor determinante nos processos de sucessão destas comunidades.

Palavras chave: macrobentos, colonização, recifes artificiais.

## INTRODUCTION

Artificial reefs are submerged structures deployed on the sea bottom to provide a substratum, minimizing the scarcity of natural reefs (SVANE & PETERSEN, 2001). They have become an important resource enhancement technique to attract fish, to increase natural production of biological resources and also to improve fishing yields (BOHNSACK & SUTHERLAND, 1985). The deployment of artificial reefs has been associated not only with the exploitation of commercial fish resources, but also with the preservation and rehabilitation of marine habitats (GUILLÉN *et al.*, 1994; ALLEMAND *et al.*, 2000; BARNABÉ *et al.*, 2000). Although the importance of these systems is recognised worldwide, little information is available regarding their biological and ecological features (BOHNSACK & SUTHERLAND, 1985). To date, most of the studies undertaken on artificial reefs have been focused on the enhancement of fishing success (KEVERN *et al.*, 1986; POLOVINA, 1991; BOMBACE, 1995; LAMADRID *et al.*, 1995; SANTAELLA & REVENGA, 1995; SANTOS *et al.*, 1995; SANTOS & MONTEIRO, 1998; WALKER *et al.*, 2000). Quantitative data regarding biological communities associated to these systems is scarce, particularly concerning the study of benthic communities (BADALAMENTI *et al.*, 2000; D'ANNA *et al.*, 2000; RELLINI, 2000; RELLINI *et al.*, 1994).

Since 1990, seven artificial reef systems have been deployed off the south coast of the Algarve by the INIAP/IPIMAR (Portuguese Institute for Agriculture and Fisheries Research) (Figure 1). These multipurpose systems were deployed to enhance local fisheries. The potential increase of food resources and shelter may extend the nursery effect provided by estuarine-lagoon systems along the coast (MONTEIRO & SANTOS, 2000). In Portugal, research regarding these systems has been mainly focused on ichthyological fauna, especially on commercial species (SANTOS *et al.*, 1995; SANTOS & MONTEIRO, 1997, 1998). The spatial and temporal patterns of macrobenthic communities within artificial reef systems are an important goal of a multidisciplinary project undertaken by the INIAP/IPIMAR. These communities are of particular interest as they are an important food resource for most of the commercial fish species associated with the artificial reef systems. Succession of the macrobenthic communities in the Faro/Ancão reef system will be analysed over the next several years, since artificial reef submersion. This paper presents results on early macrobenthic colonization and succession within two artificial reef groups.

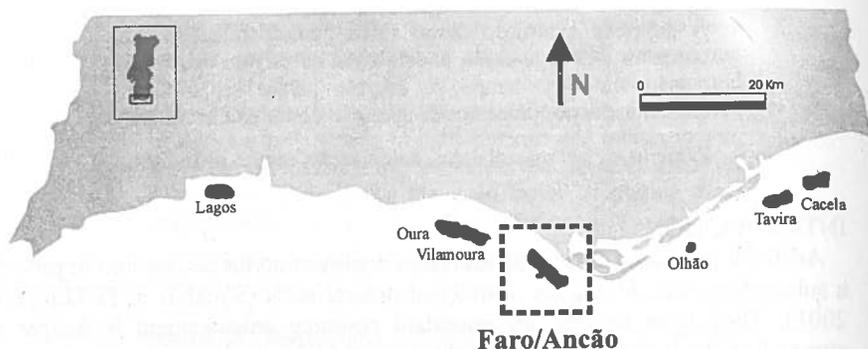


Figure 1. Study site. Artificial reefs on the southern coast of Portugal. The box indicates the Faro/Ancão reef where the study was conducted.

#### MATERIAL AND METHODS

The Algarve artificial reef systems consist of both small ( $2.7\text{m}^3$ ) and large concrete modules ( $174\text{m}^3$ ) (Figure 2). Both structures were deployed along four distinct parallel lines to the coast, where small modules were placed at lower depths (18-25m) and the large ones on deeper waters (30-40m). The present work was carried out on the "Faro/Ancão" artificial reef, located off Faro (Algarve, southern Portugal) (*cf.* Figure 1), particularly on 2 adjacent small artificial reef groups (groups A10 and A11) of 35 modules each. These reef modules were deployed in August 2002, at approximately 20m depth.

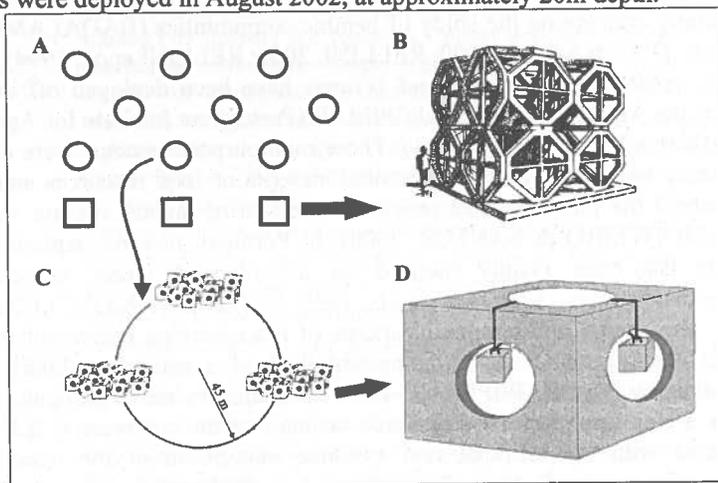


Figure 2. A -Faro/Ancão artificial reef system. B - Large module. C - Reef group with 3 groups of 35 small modules each. D - Small module detail with the cubic sample units used in this study.

The study of macrobenthic colonization was performed using 15 x 15cm cubic sample units made of the same concrete material of reef modules. These units were suspended on the reef blocks at the time of the reef immersion to ensure that the colonization patterns would be representative of those occurring throughout the reef modules (*cf.* Figure 2). Three replicate samples were retrieved by scuba diving 3 and 6 months after immersion (November 2002; February 2003). The different surfaces of the cubic samples were scraped to analyse macrobenthic colonization and succession. Four out of the six cube surfaces (horizontal: top and bottom; vertical: inside and outside) were compared during the study to analyse surface orientation role on benthic colonization. Horizontal and vertical surfaces are not compared together in the present study. This methodology ensures that only non-adjacent surfaces are compared, minimising contamination. Only a quarter of the material collected from each face was analysed in some of the samples. On those samples, extrapolated values for the total surface area are used. Bryozoans, hydroids, sponges, barnacles and ascidians were not quantified.

#### Data analysis

The community structure of the two artificial reef groups and on contrasting surfaces (horizontal and vertical) was evaluated throughout the sampling period using multivariate analyses. PRIMER v.5.0 software package was used for multivariate analyses (CLARKE & WARWICK, 1994). Similarity between faunal data was analysed by cluster and ordination techniques (non-metric multidimensional scaling - MDS) based on the Bray-Curtis similarity coefficient after fourth root transformation (CLARKE, 1993). The cluster analysis used the unweighted pair group average algorithm (UPGMA) (CLARKE & WARWICK, 1994). To test for statistically significant differences between the macrobenthic colonization on surface orientation and period of immersion, a two-way crossed ANOSIM test was performed using the same similarity matrix used for CLUSTER and MDS ordination. Species having the greatest contribution to dissimilarity among the pairs of surfaces, top *vs.* bottom and inside *vs.* outside, and period of immersion were determined using the similarity percentages routine (SIMPER) of the same statistical package.

#### RESULTS

To date, 126 *taxa* have been identified in the "Faro/Ancão" artificial reef. 52 from class Polychaeta, 30 from phylum Mollusca and 35 Crustacea. Although barnacles and colonial *taxa* such as bryozoans, hydroids, sponges and ascidians were not analysed in this study, they were also found to be present in all samples. Data analysis showed that in both reef groups (A10 and A11), the mean abundance and the total number of species were higher on the top than on bottom surfaces (Figure 3A and 4A). These parameters tend to increase with submersion time, particularly on the top surface. The mean abundance of the outside and inside surfaces showed similar colonization patterns for both reef groups (Figure 3B and 4B).

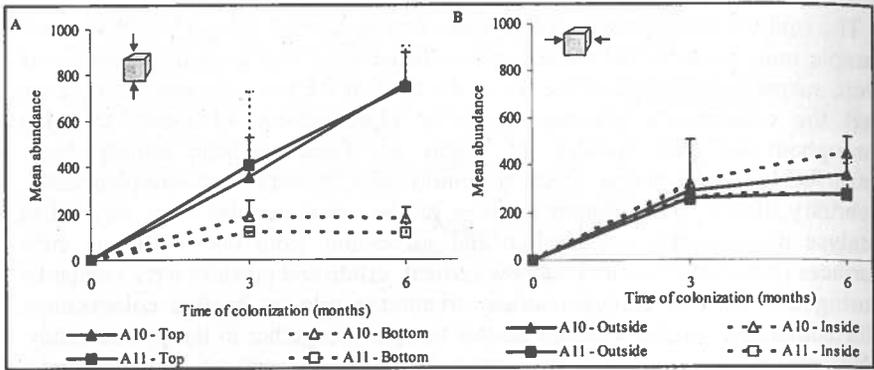


Figure 3. Mean abundance values ( $\pm$ SE) of the two studied reef groups (A10 and A11). A – Top vs. Bottom surfaces; B – Outside vs. Inside surfaces.

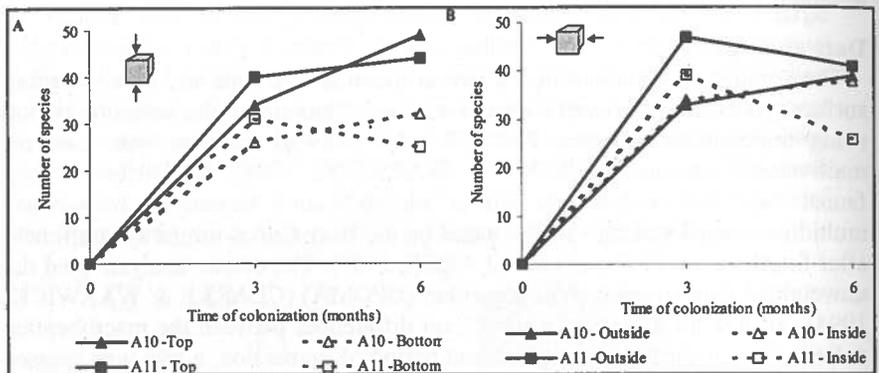


Figure 4. Number of species of the two studied reef groups (A10 and A11). A – Top vs. Bottom surfaces; B – Outside vs. Inside surfaces.

Diversity and evenness indices (Table I) increased with time in both groups studied and on all surfaces. The strongest increase in these indices occurred on the bottom surface. The A11 group generally presented higher diversity and evenness values than the A10 group.

Throughout the sampling period, bivalves, amphipods and polychaetes, dominated the top surface, whereas on the bottom surface, polychaetes and bivalves were the more important taxonomic groups (Figure 5A and B). Amphipods were always present throughout the sampling period on both vertical surfaces. In general, polychaetes were the most abundant group on both inside and outside surfaces, even though there was a dominance shift from polychaetes to bivalves 6 months after submersion (Figure 5C and D).

Table I. Species diversity ( $H'_{log_2}$  Shannon-Wiener index) and Pielou's evenness ( $J'$ ) values on the two studied reef groups (A10 and A11). Top vs Bottom surfaces; Outside vs. Inside surfaces.

Time (month)	$H'_{log_2}$				$J'$			
	All Top	A10 Top	All Bottom	A10 Bottom	All Top	A10 Top	All Bottom	A10 Bottom
3	3.5	3.3	3.2	3.0	0.7	0.6	0.6	0.6
6	3.9	3.7	4.0	4.0	0.7	0.7	0.9	0.8
Time (month)	All Outside	A10 Outside	All Inside	A10 Inside	All Outside	A10 Outside	All Inside	A10 Inside
	3	3.8	3.3	3.3	3.0	0.7	0.7	0.6
6	4.0	3.3	3.5	3.3	0.8	0.6	0.8	0.6

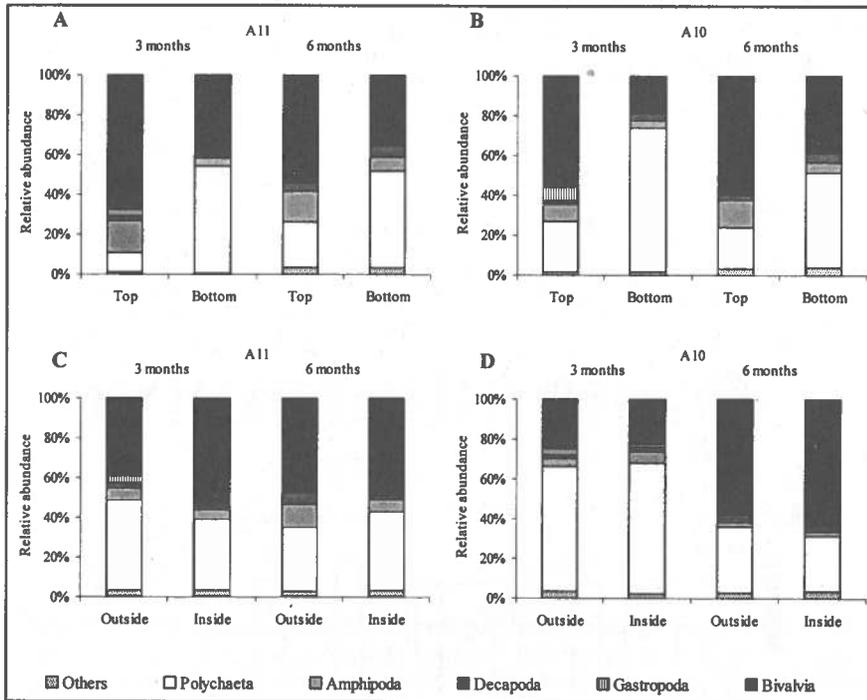


Figure 5. Relative abundance on the two studied reef groups (A10 and A11). A - Top vs. Bottom surfaces of the A11 reef group; B - Top vs. Bottom surfaces of the A10 reef group; C - Outside vs. Inside surfaces of the A11 reef group; D - Outside vs. Inside surfaces of the A10 reef group.

Cluster analysis (Figure 6A) individualised two main groups corresponding to the two sampling periods (3 and 6 months). Within both groups, the samples corresponding to each surface (top and bottom) cluster together, with no differentiation of the two reef groups. For vertical surfaces (inside and outside surfaces) only two groups were distinguished, corresponding to the different sampling periods (3 and 6 months) (Figure 6B). The configuration of the groups of samples obtained by MDS supported the results of the cluster analysis (Figures 7A and B). Thus, ordination and cluster diagrams for the macrofauna data suggests that differences on orientation and time of submersion were determinant for community composition. The results obtained with a two-way crossed ANOSIM showed that only the horizontal surfaces were significantly different ( $R = 0.74$ ;  $p = 0.001$ ), whereas for the vertical surfaces, the ANOSIM test showed no significant difference ( $R = 0.042$ ;  $p = 0.265$ ). The time of immersion was significant both for horizontal ( $R = 0.87$ ,  $p = 0.001$ ) and vertical surfaces ( $R = 0.89$ ;  $p = 0.001$ ).

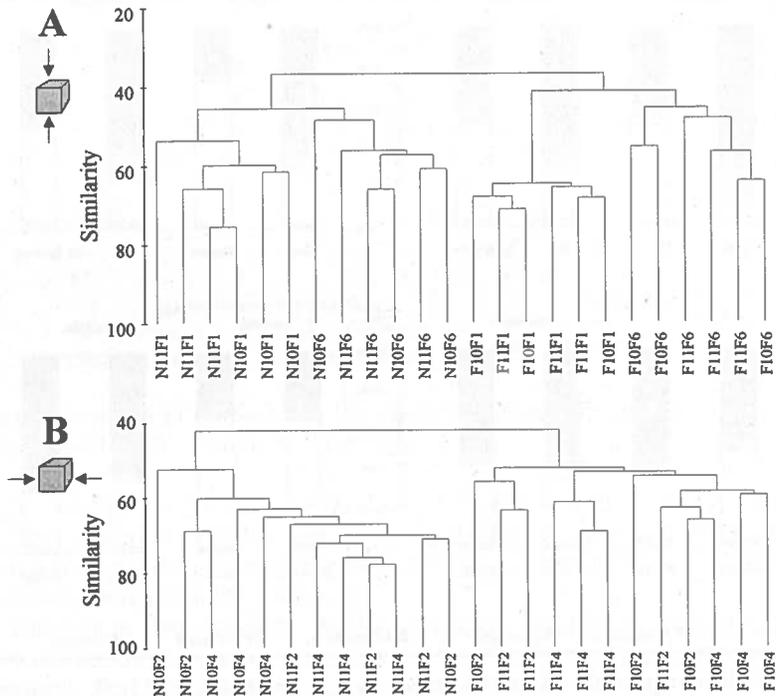


Figure 6. CLUSTER dendrograms of the fourth root transformed species-abundance data of the two studied reef groups (10 and 11). A – Top (F1) vs. Bottom (F6) surfaces, B – Outside (F2) vs. Inside (F4) surfaces, during sampling period (3 months – N; 6 months – F).

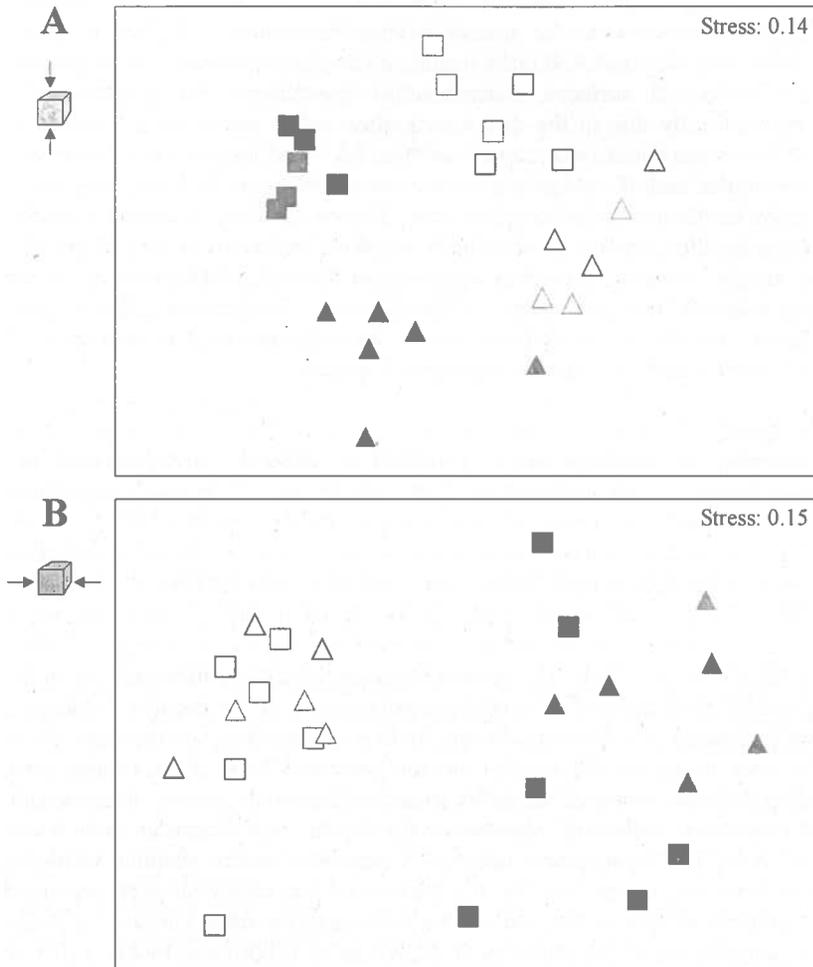


Figure 7. MDS ordination plots of the fourth root transformed species abundance data. Black symbols – A10 reef group; Grey symbols – A11 reef group; Non-filled symbols – 3 months of colonization; Filled symbols – 6 months of colonization. A – Top vs. Bottom surfaces; Square symbols – top surface; Triangles – bottom surface. B – Outside vs. Inside; Square symbols – outside surface; Triangles – inside surface.

Regarding horizontal surfaces, SIMPER analysis identified the bivalves *Hiatella arctica* (Linnaeus), *Musculus costulatus* (Risso), *Musculus* cf. *marmoratus* (Forbes) and undetermined Anomiidae, the amphipod *Microdeutopus versiculatus*

(Bate) and the serpulids [und. Serpulidae, *Pomatocerus triqueter* (Linnaeus), *P. lamarckii* (Quatrefages), *Serpula concharum* Langerhans and *Serpula vermicularis* Linnaeus], as the species having the greatest contribution to the MDS ordination plot and ANOSIM results. Although most species were present on both horizontal surfaces, macrobenthic assemblages were significantly different especially due to the differences observed in the relative abundance. Top surfaces were characterised by *H. arctica*, *M. costulatus*, *M. cf. marmoratus*, und. Anomiidae and *Microdeutopus versiculatus*. In bottom surfaces, polychaete serpulids were the most characteristic *taxa*. Vertical surfaces presented a similar faunal composition, clearly dominated by serpulids and by *H. arctica*, especially on the inside surface. With submersion time increase, different species are present, such as the polychaetes *Capitella* spp.. Furthermore, the average abundance increases on all surfaces, except for serpulids and the amphipod *M. versiculatus* that after six months, were less abundant.

## DISCUSSION

Biodiversity on artificial reefs is related to different environmental and structural factors, such as morphological complexity of the reef, substratum composition, depth and distance from natural reef areas (ARDIZZONE *et al.*, 1997). To evaluate the success of an artificial reef it is necessary to calculate its capacity as a feeding ground for demersal and rockfishes (ITOSU *et al.*, 1999). Thus, the efficiency of an artificial reef is related to biological colonization, particularly biomass, species richness, number of ecological niches and food webs (RELINI *et al.*, 1994). The present study on the colonization patterns of the "Faro/Ancão" artificial reef showed a general increase of the average abundance, number of species and diversity during the first six months of immersion. Three months after immersion the samples already presented 26-47 macrobenthic *taxa*, excluding colonial *taxa* and barnacles species. After sixth months of immersion 25-49 *taxa* were collected, whereas in the Loano reef (Ligurian sea, Italy), RELINI *et al.* (1995) reported only 57 species after twelve months, including colonial *taxa* and barnacles. The top surface of the cubic samples presented higher number of species and mean abundance than the other surfaces in study. Similar patterns were also found by D'ANNA *et al.* (2000) and by GLASBY & CONNELL (2001). According to several other authors (BAYNES *et al.*, 1989; ARDIZZONE *et al.*, 2000; RELINI, 2000) the different exposure of each surface namely to light, currents and sedimentation strongly influences settlement and evolution patterns of benthic communities, arguing in favour of the present results. Time of submersion, however, appeared to be the main factor influencing the succession of these communities, with both artificial reef groups showing a similar pattern.

Vertical and bottom surfaces of the cubic samples have a similar faunal composition, with a clear dominance by serpulids after three months. D'ANNA *et al.* (2000), observed that the early stages of the settlement are driven by

encrusting forms like the serpulid worm *Pomatocerus triqueter*, a common species encroaching on clear surfaces. In that study the development of significant colonies of encrusting filter feeders, such as serpulids occurred inside the reef structure and in shaded niches. These organisms abundance decreased with time of submersion, and *Hiatella arctica* becomes the dominant species. These taxonomical groups are common colonizers of artificial reefs in many other artificial reef structures (e.g. ARDIZZONE *et al.*, 2000; D'ANNA *et al.*, 2000).

Contrasting with the results obtained for other European reefs, macroalgae were not found to colonize the reef during these first six months of study. Other studies in progress on the Algarve artificial reef system, addressing the comparison between different artificial reef groups, depth and temporal variation will hopefully provide important data for understanding the patterns of benthic colonization on artificial substrata.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the INIAP/IPIMAR scientific diving team and research vessel crew for helping in fieldwork. The research work was supported by the project "Implantação e estudo integrado de sistemas recifais" of MARE programme.

#### REFERENCES

- ALLEMAND, D.; E. DEBERNARDI & W. SEAMAN, JR. (2000). Artificial reefs in the principality of Monaco: protection and enhancement of coastal zones. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 151-166.
- ARDIZZONE, G.; A. SOMASCHINI & A. BELLUSCIO (1997). Biodiversity of European artificial reefs. In *European artificial reefs research*. Proceedings of the 1<sup>st</sup> EARRN conference, Ancona, Italy, March 1996. Pub. Southampton Oceanography Centre: 39-59.
- ARDIZZONE, G.; A. SOMASCHINI & A. BELLUSCIO (2000). Prediction of benthic and fish colonization on the Fregene and other Mediterranean artificial reefs. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 113-128.
- BADALAMENTI, F.; G. D'ANNA & S. RIGGIO (2000). Artificial reefs in the Gulf of Castellammare (north-west Sicily): a case study. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 75-96.
- BARNABE, G.; E. CHARBONNEL; J-Y. MARINARO; D. ODY & P. FRANCOUR (2000). Artificial reefs in France: analysis, assessments and prospects. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 167-184.
- BAYNES, T. W. & A. M. SZMANT (1989). Effect of current on the sessile benthic community structure of an artificial reef. *Bull. Mar. Sci.*, 44 (2): 545-566.
- BOHNSACK, J. A. & D. L. SUTHERLAND (1985). Artificial reef research: a review with recommendations for future priorities. *Bull. Mar. Sci.*, 37(1): 11-39.
- BOMBACE, G. (1995). Le barriere artificiali nella gestione razionale della fascia costiera italiana. *Biol. Mar. Medit.*, 2 (1):1-14.

- CLARKE, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.*, **18**: 117-143.
- CLARKE, K. R. & R. M. WARWICK (1994). *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Natural Environment Research Council, Plymouth.
- D'ANNA, G.; F. BADALAMENTI & S. RIGGIO (2000). Artificial reefs in North-West Sicily: comparisons and conclusions. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 97-112.
- GLASBY, T. M. & S. D. CONNELL (2001). Orientation and position of substrata have large effects on epibiotic assemblages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **214**: 127-135.
- GUILLÉN, J. E.; A. A. RAMOS; L. MARTÍNEZ & J. L. SÁNCHEZ LIZASO (1994). Antitrawling reefs and the protection of *Posidonia oceanica* L. Delile meadows in the western Mediterranean Sea: demand and aims. *Bull. Mar. Sci.*, **55** (2-3): 645-650.
- ITOSU, C.; Y. KOMAI & H. SAKAI (1999). Estimation of food organism production on steel-made artificial reef. *Proceedings seventh international conference on artificial reefs (7<sup>th</sup> CARACH)*, Sanremo Italy, October 1999: 150-157.
- KEVERN, N. R.; W. E. BIENER; S. R. VANDERLAAN & S. D. CORNELIUS (1986). Preliminary evaluation of an artificial reef as a fishery management strategy in Lake Michigan. In *Artificial reefs - Marine and freshwater applications* (ed. F. M. D'Itri). 2<sup>nd</sup> Edition. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, USA: 443-458.
- LAMADRID, A. S.; V. ZARAGOZA & J. E. VIOQUE (1995). Stock enhancement of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. at south Atlantic Spanish coast. In *Ecoset'95. Proceedings of the international conference on ecological system enhancement technology for aquatic environments*. Tokyo, Japan, 2: 593-598.
- MONTEIRO, C. C. & M. N. SANTOS (2000). Portuguese artificial reefs. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 249-261.
- POLOVINA, J. J. (1991). Fisheries applications and biological impacts of artificial habitats. In *Artificial habitats for marine and freshwater fisheries* (ed. W. Seaman Jr. & L. M. Sprague). Academic Press Inc., San Diego, California, USA: 153-176.
- RELINI, G. (2000). The Loano artificial reef. In *Artificial reefs in European seas* (ed. A. C. Jensen; K. J. Collins & A. P. M. Lockwood). Kluwer Academics Publishers, London: 129-149.
- RELINI, G.; M. RELINI; G. TORCHIA; F. TIXI & C. NIGRI (1995). Coal ash tests in Loano artificial reef. In *Ecoset'95. Proceedings of the international conference on ecological system enhancement technology for aquatic environments*, **1**: 107-113.
- RELINI, G.; N. ZAMBONI; F. TIXI & G. TORCHIA (1994). Patterns of sessile macrobenthos community development on an artificial reef in the Gulf of Genoa (northwestern Mediterranean). *Bull. Mar. Sci.*, **55** (2-3): 745-771.
- SANTAELLA, E. & S. REVENGA (1995). Les récifs artificiels dans la politique de structures de la pêche en Espagne. *Biol. Mar. Médit.*, **2** (1): 95-98.
- SANTOS, M. N. & C. C. MONTEIRO (1997). The Olhão artificial reef system (south Portugal): fish assemblages and fishing yield. *Fish. Res.*, **30**: 33-41.
- SANTOS, M. N. & C. C. MONTEIRO (1998). Comparison of the catch and fishing yield from an artificial reef system and neighbouring areas off Faro (Algarve, south Portugal). *Fish. Res.*, **39**: 55-65.

- SANTOS, M. N.; C. C. MONTEIRO & K. ERZINI (1995). Comparison of natural and artificial reef fish assemblages in Algarve waters (south Portugal). In *Ecoset'95. Proceedings of the international conference on ecological system enhancement technology for aquatic environments*. Tokyo, Japan, 1: 210-214.
- SVANE, I. & J. K. PETERSEN (2001). On the problems of epibioses, fouling and artificial reefs, a review. *P.S.Z.N.: Mar. Ecol.*, 22(3): 169-188.
- WALKER, B. K.; B. HENDERSON & R. E. SPIELER (2002). Fish assemblages associated with artificial reefs of concrete aggregates or quarry stone offshore Miami Beach, Florida, USA. *Aquat. Living Resour.*, 15: 95-105.

## DINÂMICA INICIAL DAS COMUNIDADES DE MACROFAUNA BENTÓNICA NUMA PISCICULTURA EM REGIME SEMI-INTENSIVO

S. Carvalho<sup>1\*</sup>, A. Moura<sup>1</sup>, M. Falcão<sup>1</sup>, P. Pereira<sup>1</sup>, L. Cancela da Fonseca<sup>2,3</sup>,  
M. T. Dinis<sup>4</sup> e P. Pousão-Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INIAP/IPIMAR, Av. 5 de Outubro, 8700-305 Olhão

<sup>2</sup>Universidade do Algarve, FCMA-DCB, Campus de Gambelas, P-8005-139 Faro

<sup>3</sup>IMAR, Laboratório Marítimo da Guia, Estrada do Guincho, P-2750-642 Cascais

<sup>4</sup>Universidade do Algarve, CCMAR-FCMA, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro

\*Autor para correspondência: scarvalho@ipimar.ualg.pt

Carvalho, S., Moura, A., Falcão, M., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Dinis, M. T. & Pousão-Ferreira, P. (2004). Dinâmica inicial das comunidades de macrofauna bentónica numa piscicultura em regime semi-intensivo. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 183-198.

A dinâmica das comunidades de macrofauna bentónica foi analisada durante três meses numa piscicultura semi-intensiva. A amostragem foi realizada no reservatório de água, em dois tanques de terra, um com produção e um tanque controlo (sem cultivo), e no tanque de decantação, 7, 23, 54 e 93 dias após o enchimento pela primeira vez dos tanques de terra (26 de Maio de 2003). Os padrões de colonização e sucessão foram estudados recorrendo a análises uni- e multivariadas. Do ponto de vista biológico e geoquímico, o reservatório apresentou, em termos gerais, condições semelhantes às verificadas na Ria Formosa, enquanto o tanque de decantação apresentou indícios acentuados de perturbação intensa. Nos tanques de terra recém criados a colonização processou-se de uma forma lenta, o que poderá dever-se, quer ao facto do habitat a colonizar se encontrar isolado da população colonizadora, quer às elevadas dimensões da área perturbada, ou, ainda, à inexistência de condições propícias ao estabelecimento de potenciais colonizadores. Após três meses de cultivo, a carga orgânica resultante da produção piscícola não aparenta ter um efeito nefasto nas comunidades de macrofauna bentónica do tanque de produção. Comparativamente ao tanque controlo, o tanque de produção apresenta valores de diversidade e de equitabilidade usualmente superiores, o que poderá estar relacionado com maior disponibilidade alimentar. Contudo, ao nível da estrutura da comunidade, os povoamentos do tanque de produção parecem apresentar uma tendência para se associarem aos do tanque de decantação.

Palavras-chave: Macrofauna bentónica, Sucessão ecológica, Aquacultura, Tanques de terra.

Carvalho, S., Moura, A., Falcão, M., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Dinis, M. T. & Pousão-Ferreira, P. (2004). Short-term dynamics of macrobenthic communities within a semi-intensive fish farm. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 183-198.

The temporal and spatial variability of macrobenthic communities within a marine fish farm was analysed for the water reservoir, a production earth pond and a pond without production, as well as for the settling pond. Sampling was performed 7, 23, 54 and 93 days after the production ponds have been filled up for the first time (26<sup>th</sup> of May, 2003). Colonisation and early succession patterns were studied by a combination of uni- and multivariate analyses. Generally, macrobenthic communities from the water reservoir were rich and abundant, presenting a faunal composition similar to the Ria Formosa lagoon. The settling pond showed signs of perturbation. Within the newly created earth ponds, the macrobenthic communities presented a low colonisation rate, which can be due to the isolation of the disturbed habitat from the colonizing population, to the large defaunated area or to the unsuitable sediment conditions for the establishment of potential colonisers. After three months of production, the organic matter resulting from fish production does not seem to have a negative effect on macrobenthic communities from the production pond. When compared to the control pond, the production area usually presented higher diversity and evenness values that can reflect higher food availability. However, at the level of community structure, the benthic assemblages from the production pond tend to resemble those from the settling tank.

Keywords: Macrobenthic communities, Succession, Aquaculture, Earth ponds.

## INTRODUÇÃO

A aquacultura extensiva é uma actividade com grande tradição em Portugal, praticada, quer em tanques construídos especificamente para este fim, quer em reservatórios de água de salinas. Na zona sul de Portugal, à semelhança do que se verifica um pouco por toda a costa portuguesa, as salinas têm vindo a ser abandonadas para dar lugar a tanques de piscicultura (AMARAL & COSTA, 1999). No entanto, a criação dos tanques de piscicultura pode implicar a dragagem dos antigos tanques de produção de sal, alterando o substrato inicial. A criação destes habitats permite que se avalie a sucessão ecológica em substratos virgens.

Os tanques de cultivo de terra podem ser comparados a meios lagunares de comunicação esporádica com o mar, proporcionando uma grande variabilidade de condições ambientais que condiciona a existência de qualquer organismo

(CANCELA DA FONSECA, 1989). Durante um ciclo de produção intensiva ou semi-intensiva, são geradas grandes quantidades de compostos orgânicos e inorgânicos, nomeadamente excedentes de ração e produtos de excreção, que tendem a acumular-se no fundo dos tanques (MACHADO & CANCELA DA FONSECA, 1997). Esta acumulação de matéria orgânica propicia, entre outros, a estimulação da actividade microbiana e o consumo de oxigénio, podendo mesmo atingir-se condições de anóxia (HOLMER, 1991; MORRISEY *et al.*, 2000). Assim, à semelhança do que acontece nas lagunas, também estes tanques têm tendência a tornar-se eutrofizados (BARNES, 1980; KELLY & NAGUIB, 1984). Desta forma, parece relevante o estudo das comunidades de macrofauna bentónica nos tanques de cultivo, quer por desempenharem um papel importante nos ciclos de vários nutrientes (VALIELA, 1984), quer por contribuírem para a reoxigenação dos sedimentos, por bioturbação, e por estarem na base da alimentação de diferentes espécies piscícolas de interesse comercial (GAMITO, 1997). Por outro lado, dada a sua mobilidade reduzida, longevidade normalmente superior a um ano e sensibilidade a acções antropogénicas, estas comunidades são consideradas bons indicadores da qualidade ambiental, uma vez que reflectem as condições do meio em que se encontram (REES *et al.*, 1990; DIAZ, 1992).

O presente trabalho pretende analisar a dinâmica das comunidades de macrofauna bentónica numa piscicultura semi-intensiva, com especial ênfase para o estabelecimento e sucessão destas comunidades em tanques de terra recém criados. Os resultados preliminares apresentados correspondem aos primeiros três meses de colonização destas comunidades em diferentes compartimentos de uma piscicultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

O presente trabalho foi desenvolvido na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, localizada no Parque Natural da Ria Formosa (Algarve, Fig. 1). Esta piscicultura à escala industrial é constituída por dez tanques de terra para engorda em regime semi-intensivo com cerca de 1920m<sup>2</sup> de área na crista do talude e 1,5 a 2m de profundidade, abastecidos por água bombeada a partir de um reservatório que enche com as marés. Adicionalmente, existem outros sete tanques, de menores dimensões (cerca de 734m<sup>2</sup>), com a mesma profundidade e abastecidos da mesma forma, onde decorreram estas experiências. Cada um dos tanques possui sistemas individualizados de entrada e saída de água, comunicando com uma conduta central que conduz a água de cada um dos tanques de produção ao tanque de decantação (Fig. 1). O reservatório apresenta uma elevada diversidade sedimentar, variando de sedimentos vasosos a areias grosseiras. O tanque de decantação é, maioritariamente, dominado por areias médias, bem como os tanques de produção e controlo.

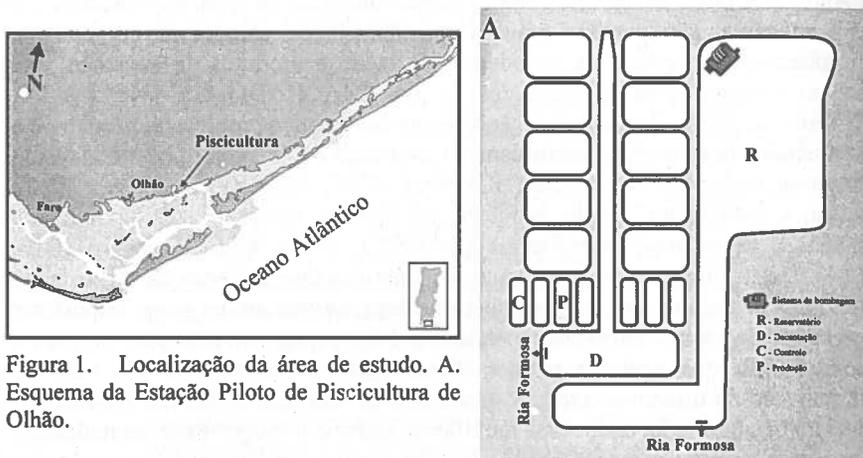


Figura 1. Localização da área de estudo. A. Esquema da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão.

### Estratégia Experimental

O presente trabalho foi realizado em dois tanques de terra, um com produção de sargo (*Diplodus sargus*) e outro sem cultivo de qualquer espécie (controlo). Em cada um dos tanques, a entrada de água está localizada no lado oposto ao do alimentador e da comporta de saída. Para evitar a influência directa de cada uma destas estruturas, a área de amostragem restringiu-se à zona mais central de cada um dos tanques. Paralelamente, amostraram-se o reservatório de água e o tanque de decantação. O primeiro será utilizado como referência das espécies que entram no sistema a partir da laguna, enquanto o tanque de decantação permite avaliar o impacto da produção numa estação de piscicultura, já que representa o estado final do sistema antes de contactar novamente com a laguna.

Em todos os tanques, a qualidade da água foi monitorizada semanalmente com uma sonda, determinando os seguintes parâmetros: temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido e pH. A temperatura e a salinidade foram medidas com uma sonda YSI, modelo 30, enquanto o oxigénio foi medido com uma sonda YSI, modelo 55. O pH foi medido no laboratório, numa amostra de água recolhida de cada um dos tanques, com uma sonda HI, modelo 8418.

Por período de amostragem, seleccionaram-se, aleatoriamente, três locais (replicados) na zona central de cada um dos tanques, nos quais se recolheram, por intermédio de um corer, amostras para o estudo das comunidades de macrofauna bentónica ( $0,02\text{m}^2$ , por replicado). Estas amostras foram lavadas sobre um crivo de  $0,5\text{mm}$  de malha, por forma a eliminar o sedimento mais fino. O material retido no crivo foi guardado em caixas plásticas, devidamente etiquetadas, e conservado em formol a 10%, neutralizado com carbonato de cálcio, ao qual foi adicionado o corante vital Rosa de Bengal. Paralelamente, foram ainda recolhidos três replicados com vista à determinação dos parâmetros geoquímicos do sedimento, carbono e azoto orgânico, congelados até à realização das análises. A colheita das amostras foi realizada por mergulho com escafandro autónomo e com a seguinte periodicidade: 7, 23, 54 e 93 dias, após o enchimento pela primeira vez dos tanques de produção (26 de Maio de 2003).

Esta data corresponde, igualmente, ao início da produção na piscicultura, ainda que à data do início das experiências, quer o reservatório, quer o tanque de decantação já estivessem com água desde Dezembro de 2002.

### **Análises laboratoriais**

#### *Amostras biológicas*

As amostras de macrofauna bentónica foram lavadas em água corrente sobre um crivo com 0,5mm de malha, de modo a eliminar a solução de formol e os sedimentos finos ainda presentes. O material retido no crivo foi triado, separando os animais em grandes grupos taxonómicos, posteriormente conservados em etanol a 70%. A identificação foi realizada em lupas binoculares, de uma forma geral até ao nível da família.

#### *Parâmetros geoquímicos*

Os parâmetros geoquímicos foram determinados na camada superficial (0-2cm). Para a determinação dos teores de carbono (C) e azoto (N) ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) no sedimento, as amostras foram previamente secas a 80°C, maceradas até à obtenção de um pó fino e pesadas para a determinação do carbono e azoto total. Outra parte das amostras secas e maceradas foi incinerada a 450°C para a determinação do carbono e azoto inorgânico. O carbono e azoto orgânico (Corg e Norg, respectivamente) antes e após a incineração a 450°C. Posteriormente, foram colocadas em micro-cápsulas de estanho e passadas através de uma coluna de oxidação com enchimento de: lâmina de níquel, óxido de crómio(III) ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) e óxido de cobalto e prata ( $\text{Co}_3\text{O}_4+\text{Ag}$ ), a 1000°C, num analisador CHN "Carlo-Elba" Mod. 1106, com padrão de acetinilida ( $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$ ) (BYERS *et al.*, 1978).

### **Análise Estatística**

Os padrões de colonização e sucessão foram estudados recorrendo a análises uni- e multivariadas. Para cada tanque amostrado e período de amostragem, calcularam-se os valores relativos às variáveis biológicas primárias: número total de *taxa* e respectiva abundância. Foram igualmente calculados os índices de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ), em logaritmo de base 2 (SHANNON & WEAVER, 1963).

A matriz de abundância por tanque e período de amostragem foi submetida a técnicas de análise multivariada. Aos dados não transformados aplicou-se uma análise de classificação, recorrendo ao coeficiente de similaridade de Bray-Curtis e ao método aglomerativo das ligações médias. Realizou-se, igualmente, uma análise de ordenação por MDS. As análises multivariadas foram realizadas recorrendo ao programa PRIMER v5.0 (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research).

## **RESULTADOS**

Durante o período de amostragem, verificou-se uma tendência generalizada em todos os tanques para uma diminuição dos valores de oxigénio dissolvido e pH, ao longo do período de amostragem, acompanhados pela subida dos valores da

temperatura da água (Tabela 1). De salientar que os valores de oxigénio dissolvido, nunca foram inferiores a 5,5mg/l.

Tabela 1. Valores médios de temperatura (T), pH, salinidade (S) e oxigénio dissolvido (O<sub>2</sub>) para cada um dos tanques analisados durante o período de amostragem. R – reservatório; C – tanque controlo; P – tanque de produção; D – tanque de decantação.

	7 dias				23 dias			
	R	C	P	D	R	C	P	D
T	25,0	25,0	24,7	23,0	26,5	26,2	26,2	26,2
pH	8,5	8,6	8,5	8,1	8,9	8,9	8,9	8,3
S	37,4	36,5	36,8	36,1	38,0	38,4	38,4	38,4
O <sub>2</sub>	6,5	7,5	7,3	5,6	6,2	6,6	6,5	5,6
	54 dias				93 dias			
	R	C	P	D	R	C	P	D
T	26,4	26,0	25,9	25,9	27,1	27,3	27,1	27,2
pH	7,9	7,9	8,0	7,6	8,0	7,9	7,9	7,7
S	37,4	38,1	37,9	38,2	37,3	38,6	37,6	37,9
O <sub>2</sub>	5,8	5,8	6,3	5,5	5,8	5,9	5,9	5,5

A razão entre a concentração de carbono orgânico (C) e de azoto orgânico (N) no sedimento e a temperatura da água apresentou uma tendência semelhante no reservatório e no tanque de produção (Fig. 2). Ao longo do período de amostragem a razão C/N decresceu de cerca de 500 para valores próximos de 15. No tanque de decantação a razão C/N manteve-se praticamente constante e bastante elevada (variando entre 383 e 656) até ao final do período de amostragem. No que respeita ao tanque controlo, a tendência foi inversa à verificada no reservatório e no tanque de produção, aumentando com o decorrer do período de amostragem (Fig. 2).

No presente trabalho foram identificados 15932 organismos repartidos por 46 taxa. A evolução temporal do número de taxa apresentou o mesmo padrão nos tanques de controlo e de produção (Fig. 3).

Após 7 dias de colonização, em qualquer um dos tanques de terra ainda não tinha sido detectado qualquer organismo. No tanque de decantação verificou-se, em geral, um decréscimo do número de taxa com o tempo, particularmente acentuado dos 54 para os 93 dias de colonização. Por outro lado, o reservatório apresentou uma tendência para um aumento dos valores deste parâmetro. Em geral, apresentou valores superiores aos verificados em qualquer um dos outros tanques. Em relação à abundância média, salienta-se o pico observado no reservatório em Julho (54 dias) (Fig. 4).

O tanque de produção apresentou sempre valores de abundância média muito reduzidos, verificando-se um aumento acentuado dos 54 para os 93 dias de colonização. No que respeita aos índices de diversidade e de equitabilidade (Fig.

5), nos tanques controlo e de decantação observa-se um decréscimo destes valores ao longo do tempo, enquanto que o reservatório e o tanque de produção apresentaram valores mais elevados e sem uma tendência definida.

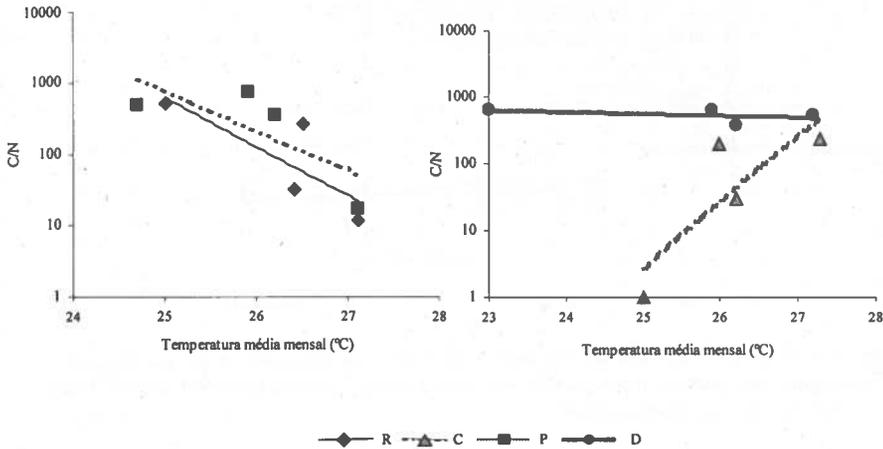


Figura 2. Variação da razão carbono orgânico/azoto orgânico (C/N) com a temperatura da água nos tanques analisados. R – reservatório; P – tanque de produção; C – tanque controlo; D – tanque de decantação.

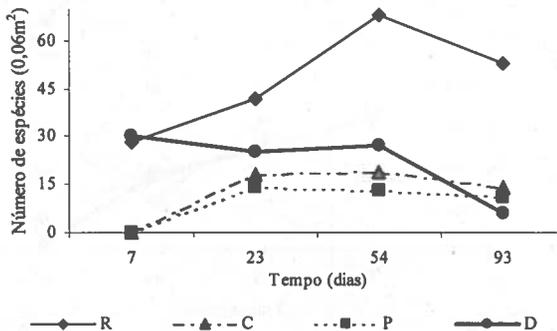


Figura 3. Variação do número de taxa ao longo do período de amostragem nos tanques analisados. R – reservatório; P – tanque de produção; C – tanque controlo; D – tanque de decantação.

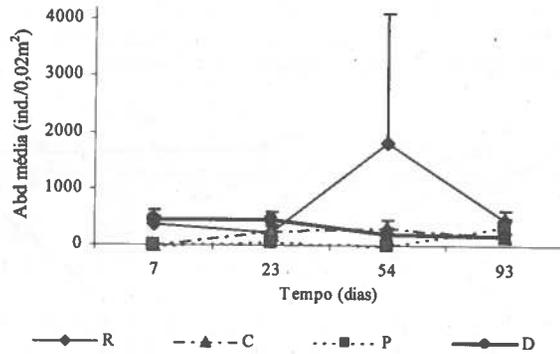


Figura 4. Variação da abundância média ( $\pm$  desvio-padrão) ao longo do período de amostragem nos tanques analisados. R – reservatório; P – tanque de produção; C – tanque controle; D – tanque de decantação.

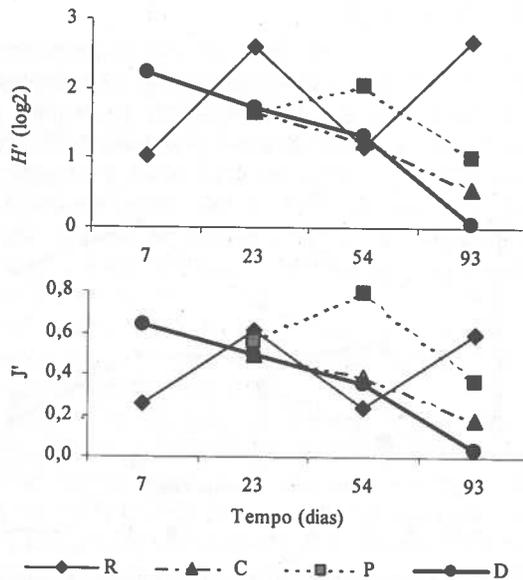


Figura 5. Variação dos índices de diversidade (A) e de equitabilidade (B) ao longo do período de amostragem nos tanques analisados. R – reservatório; P – tanque de produção; C – tanque controle; D – tanque de decantação.

No presente trabalho, as larvas de Insecta, as famílias da classe Polychaeta, (Spionidae e Capitellidae) e os anfípodes da família Aoridae foram os grupos dominantes (Tabela 2).

Tabela 2. Lista dos *taxa* amostrados e respectiva abundância média (ind./0,02m<sup>2</sup>) para cada um dos tanques amostrados e período de amostragem. R – reservatório; C – tanque controlo; P – tanque de produção; D – tanque de decantação.

	7 dias				23 dias				54 dias				93 dias				Total
	R	C	P	D	R	C	P	D	R	C	P	D	R	C	P	D	
CNIDARIA	0,7								25,0				62,0				87,7
PLATHYELMINTES													1,0				1,0
NEMERTINI					1,3	2,0	1,0		2,3	1,0	7,0						14,7
PHORONIDA									0,3	0,3			1,0				1,7
OLIGOCHAETA				125,0													125,0
POLYCHAETA																	
Orbiniidae									1,0				1,0				2,0
Paraonidae											0,3						0,3
Spionidae	4,7		21,0		91,7	10,7	22,3	7,3	149,3	1,0	5,0	4,0	301,0	18,0	346,0	2,0	984,0
Capitellidae	6,3		147,3		17,3		273,7		7,7		152,3		66,0	2,0	676,0	536,0	1884,7
Maldanidae									0,3								0,3
Opheliidae					1,7	0,3											2,0
Phyllodocidae									1,0				1,0				2,0
Hesionidae					2,0	0,7	0,7		8,7		0,3		36,0		1,0		49,3
Nereidae			27,3				92,3				26,0						145,7
Glyceridae									1,0		0,0		2,0				3,0
Nephtyidae											0,3						0,3
Onuphidae					0,3				2,3				6,0				8,7
Dorvilleidae			1,0														1,0
Ampharetidae											0,3		1,0				1,3
Pectinariidae					0,3		0,3										0,7
Terebellida	0,3																0,3
Terebellidae	0,3				1,0				2,3				3,0				6,7
Sabellinae			4,0				7,3		1,3	1,3							14,0
Serpulidae	1,0				6,7	0,7	0,7		26,0	5,3			88,0	7,0			135,3
Spirorbidae					0,3				2,0								2,3
NEMATODA	0,7		1,7				3,7				0,7						6,7
GASTROPODA																	
Opisthobranchia						0,3			1,0				7,0				8,3
Rissoidae					2,0				1,0	0,7							3,7
Hydrobiidae	0,3				0,7				7,0				51,0				59,0
Cerithiidae													12,0	3,0			15,0
Nassariinae															1,0		1,0

Tabela 2. Continuação.

	7 dias				23 dias				54 dias				93 dias				Total
	R	C	P	D	R	C	P	D	R	C	P	D	R	C	P	D	
BIVALVIA																	
Bivalvia	1,7			0,3	5,7	13,3		0,3	5,3	1,0	1,3	1,3	20,0	2,0		1,0	53,3
Cardiidae	1,7				20,3	97,3	3,3	1,0	58,0	161,0	2,0	1,0	37,0	3,0		7,0	392,7
Corbulidae	0,7																0,7
Solenidae	0,3								3,3								3,7
INSECTA	292,7			131,0	57,3	117,3	27,0	61,7	1507,3	149,7	4,7	5,0	5,0	458,0		1,0	2817,7
COPEPODA	49,7			4,3	14,7	2,7	1,0	8,3	2,0	0,3	0,3	1,3		2,0		1,0	87,7
AMPHIPODA																	
Ischyroceridae					0,3												0,3
Aoridae				3,3	3,0			2,3	10,0				579,0				597,7
Dexaminidae									0,3				2,0				2,3
Melitidae									1,3				4,0				5,3
Gammaridae									0,3				39,0				39,3
Amphipoda sp. A					0,3												0,3
MYSIDACEA									1,3				2,0				3,3
OSTRACODA								0,3	0,3								0,7
UROCHORDATA	0,7																0,7

No que respeita à repartição da abundância média pelos principais grupos taxonómicos identificados, verificou-se que, em geral, o grupo Polychaeta foi o grupo dominante em todos os tanques, excepto no controlo, onde os insectos (larvas) dominaram (Fig. 6). No reservatório, este grupo também apresentou alguma predominância, mas em Agosto (93 dias) os anfípodos e os gastrópodos apresentaram um máximo de abundância, minimizando a expressão dos insectos. Salienta-se o elevado recrutamento inicial de bivalves, maioritariamente juvenis de *Cerastoderma edule*, nos tanques de controlo e produção. No tanque de decantação destaca-se a predominância crescente dos poliquetas face aos restantes grupos amostrados do primeiro para o último período de amostragem, tendo sido a família Capitellidae claramente dominante (Tabela 2). Uma tendência semelhante foi observada no tanque de produção.

Do ponto de vista da estrutura dos povoamentos macrobentónicos, verifica-se que o tanque de produção tende, com o tempo, a assemelhar-se ao tanque de decantação. Por outro lado, o tanque controlo apresenta uma composição biológica mais semelhante à encontrada no reservatório (Fig. 7).

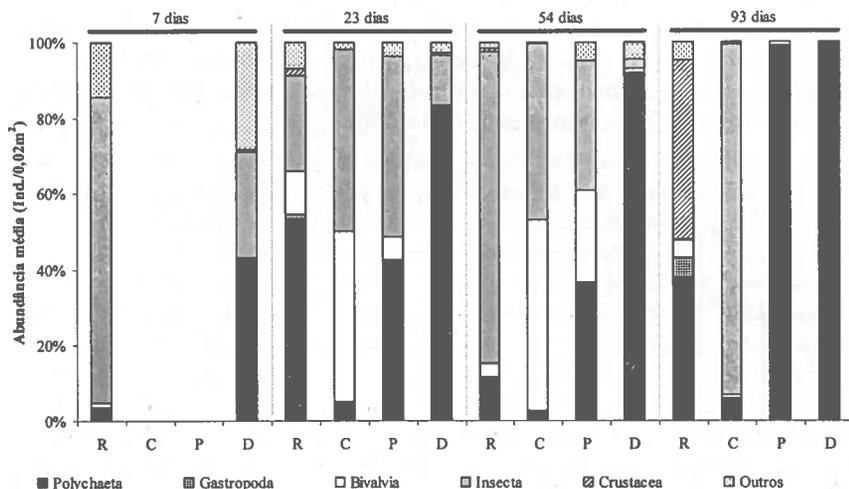


Figura 6. Abundância média relativa dos principais grupos taxonômicos encontrados para cada um dos tanques, ao longo do período de amostragem. R – reservatório; P – tanque de produção; C – tanque controle; D – tanque de decantação.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho pretende avaliar a dinâmica das comunidades de macrofauna bentônica numa piscicultura semi-intensiva, com especial ênfase para o estabelecimento e primeiros estádios de sucessão destas comunidades em tanques de terra recém criados.

Ao longo do período de amostragem observaram-se diferenças na evolução das comunidades macrobentônicas dos diferentes tanques amostrados.

Dos quatro tanques analisados, e de uma foram geral, o reservatório foi o que apresentou valores de abundância média e composição faunística mais elevados. Este resultado era esperado, já que o reservatório é a fonte de água que alimenta os restantes tanques da piscicultura, estando a colonização destes condicionada, entre outros factores, pela capacidade de dispersão das espécies presentes no reservatório e da respectiva resistência à turbulência e aos filtros do sistema de bombagem. Resultados semelhantes foram obtidos por MACHADO & CANCELA DA FONSECA (1997) e por GAMITO (1989), no primeiro caso numa piscicultura em Olhão e no segundo em reservatórios de água de salinas na Ria Formosa. Este tanque reflectiu as condições de uma zona natural, neste caso da Ria Formosa, evidenciando uma composição faunística e dinâmica populacional semelhante à observada por outros autores para esta laguna (GAMITO, 1989; CALVÁRIO, 1995; MACHADO & CANCELA DA FONSECA, 1997). Esta observação é evidenciada, nomeadamente, pelos picos de abundância e número de *taxa* verificados em Julho, como resultado do recrutamento primaveril, característicos destes sistemas lagunares (CALVÁRIO, 1995). Com o aumento da temperatura da água, o reservatório evidenciou uma tendência de aproximação à situação óptima da razão C/N = 8 (TIAN *et al.*,

1993), o que poderá, igualmente, ter favorecido a proliferação das comunidades macrobentônicas com o período de amostragem. Pelo contrário, no tanque de decantação observou-se um estado de distrofia elevada e sensivelmente constante ao longo do tempo (C/N variando entre 383 e 656).

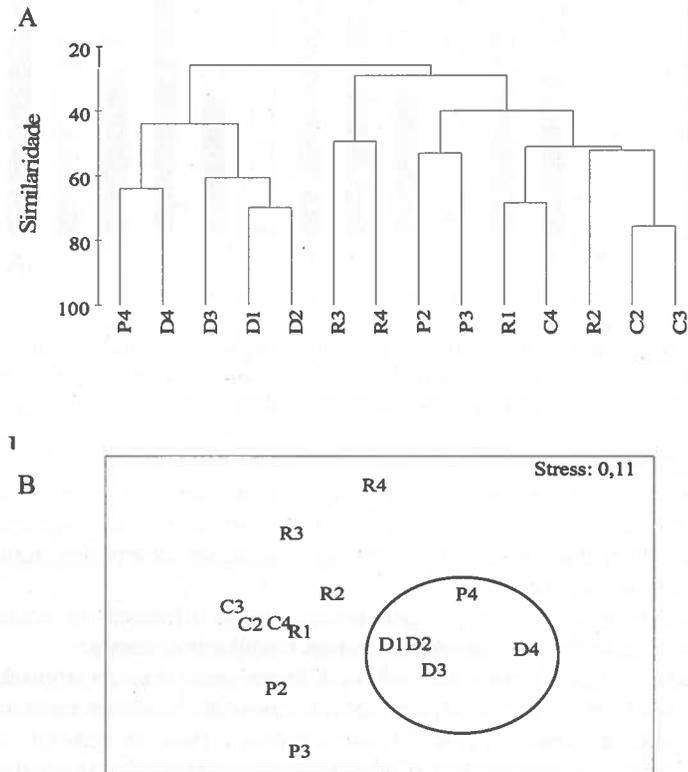


Figura 7. A. Dendrograma resultante da análise de classificação efectuada pelo método das ligações médias e usando o índice de similaridade de Bray-Curtis. B. Diagrama de ordenação (MDS). R – reservatório; C – tanque de controle; P – tanque de produção; D – tanque de decantação. 1, 2, 3 e 4 – períodos de amostragem, respectivamente 7, 23, 54 e 93 dias. P1 e C1 não estão representados, pois apresentaram abundância nula.

Neste caso, o constante *input* de carga orgânica, resultante da produção piscícola, parece sobrepor-se aos processos de remineralização da matéria orgânica no sedimento. Do ponto de vista biológico, verificou-se um decréscimo, quer do número de *taxa*, quer de abundância média do primeiro para o último período de amostragem, atingindo-se neste último valores de diversidade (índice de Shannon-Wiener) e de equitabilidade de Pielou cerca de zero. O tanque de decantação apresentou, assim, uma situação de perturbação intensa, evidenciada

pela dominância crescente dos poliquetas da família Capitellidae (essencialmente *Capitella* spp.) e pelo decréscimo ou mesmo desaparecimento de vários *taxa*, tais como os poliquetas das famílias Spionidae, Nereidae, de bivalves indeterminados e de anfípodes da família Aoridae.

Relativamente aos tanques de produção e controlo, e ao contrário do que se verifica na maioria dos trabalhos já realizados em colonização de áreas desprovidas de fauna, no presente estudo a colonização processou-se de uma forma mais lenta. Com efeito, na amostragem relativa aos 7 dias de colonização não foi recolhido qualquer organismo nos tanques de engorda. Por exemplo, num estudo desenvolvido em Ceuta utilizando caixas experimentais para testar a influência da granulometria do sedimento na recolonização de espécies bentónicas, GUERRA-GARCÍA (2001) observou um elevado número de espécies de crustáceos e de poliquetas após apenas 3 dias de colonização. Os resultados discordantes obtidos no presente estudo parecem dever-se a três factores preponderantes: (1) neste trabalho a colonização é condicionada pelo sistema de bombagem da água do reservatório para os tanques de produção, estando o habitat perturbado isolado da população colonizadora. Na maioria dos estudos de sucessão de comunidades realizados, as zonas a colonizar encontram-se nas imediações de zonas com comunidades estabelecidas e, como tal, são passíveis de serem ocupadas mais rapidamente, quer por via larvar, quer por migração de juvenis e adultos. No entanto, no presente caso, as espécies sem fase larvar e/ou com reduzida mobilidade na coluna de água deverão ter menos possibilidades de colonizar os tanques de produção; (2) por outro lado, a área de colonização no presente estudo é bastante superior à maioria das áreas usualmente utilizadas em experiências desta natureza.

Estudos recentes desenvolvidos baseados nesta temática sugerem que respostas de colonização mais rápidas devem ocorrer em áreas perturbadas numa pequena escala (< 1m<sup>2</sup>) (LEVIN *et al.*, 1996; GUERRA-GARCÍA, 2001; ZAJAC & WHITLATCH, 2003). De facto, pequenas áreas perturbadas são passíveis de serem colonizadas mais rapidamente por deslocação lateral de adultos recolonizadores da zona envolvente do que áreas maiores, onde a chegada de organismos (larvas e/ou adultos) através da coluna de água começa a ser mais importante (GUERRA-GARCÍA, 2001); (3) uma hipótese adicional para a lenta, e inclusive, inexistente colonização de algumas espécies de macrofauna bentónica no presente trabalho pode ser a ausência de condições adequadas para que potenciais colonizadores possam desenvolver-se nos tanques artificiais. No presente estudo, os primeiros estádios de colonização envolveram, primordialmente, o recrutamento de poliquetas oportunistas das famílias Spionidae e Capitellidae, larvas de Insecta (principalmente Chironomidae) e bivalves, especialmente juvenis de *Cerastoderma edule*. A dominância dos grupos Polychaeta, Insecta e Bivalvia foi, igualmente, registada por SHISHEHCHIAN *et al.* (2001) em tanques de produção para o cultivo de camarão. Os requisitos de determinadas espécies, tais como o teor em matéria orgânica no sedimento e o tipo de sedimento, podem ainda não ser favoráveis ao desenvolvimento de alguns *taxa*, ainda que o tanque de produção evidencie uma tendência; no que respeita à razão carbono/azoto, de aproximação à situação

ótima para zonas costeiras de  $C/N = 8$ . Pelo contrário, o tanque controlo apresentou uma tendência ao longo do tempo para uma situação de distrofia, por deficiência de azoto. Esta tendência é inversa à observada no tanque de produção, onde os sedimentos estão a sofrer um processo de maturação mais rápido, imposto pela carga orgânica resultante do cultivo de peixe (excesso de ração e produtos de excreção).

Até à data, após cerca de 3 meses de cultivo de sargo, a carga orgânica resultante da produção piscícola não aparenta ter, ainda, um efeito nefasto nas comunidades de macrofauna bentónica do tanque de produção. Pelo contrário, parece estar a funcionar como estimulante ao estabelecimento destas comunidades. De facto, quando comparado com a situação de controlo, o tanque de produção apresenta valores, quer de diversidade, quer de equitabilidade, normalmente superiores, o que poderá estar relacionado com uma maior disponibilidade alimentar. No entanto, ao nível da estrutura da comunidade, os povoamentos do tanque de produção parecem apresentar uma tendência para se assemelharem aos do tanque de decantação, onde se verifica uma situação de perturbação intensa. Esta tendência observada para o tanque de produção é igualmente sustentada pela dominância dos poliquetas das famílias Capitellidae e Spionidae, consideradas como características de zonas enriquecidas organicamente (PEARSON & ROSENBERG, 1978; ZAJAC & WHITLATCH, 1982a; ZAJAC & WHITLATCH, 1982b). Evidências de uma tal perturbação foram, igualmente, referenciadas por POUSÃO *et al.* (1995) e por MACHADO & CANCELA DA FONSECA (1997) em estudos referentes ao desenvolvimento de comunidades bentónicas em tanques de produção piscícola.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à técnica Maria de Lurdes Inácio e à Dra Cristina Martins pela realização das análises químicas. A participação dos Drs Francisco Leitão, Miguel Gaspar, Hugo Saldanha, Ana Silva, Paulo Vasconcelos e de João Guerra nas campanhas de amostragem, bem como dos técnicos da estação de piscicultura na alimentação dos peixes foi também de primordial importância para o presente trabalho. Agradece-se, igualmente, ao Dr João Cúrdia pela elaboração do mapa e esquema apresentados. A presente investigação insere-se no projecto "Novas Tecnologias de Produção Aquícola" do programa MARE e é co-financiada por uma bolsa de doutoramento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/8521/2002).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M. J. & COSTA, M. H. 1999. Macrobenthic communities of salt pans from the Sado estuary (Portugal). *Acta Oecol.*, 20: 327-332.
- BARNES, R. S. K. 1980. *Coastal lagoons*. Cambridge University Press, Cambridge: 106 pp.
- BYERS, S. C., MILLS, E. L. & STEWART, L. 1978. A comparison of methods of determining organic carbon in marine sediments, with suggestions for a standard method. *Hydrobiologia*, 58: 43-47.
- CALVÁRIO, J. R. O 1995. *Estrutura e dinâmica das comunidades macrobênticas da Ria Formosa (Ria Faro-Olhão)*. Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve, Portugal: 337 pp + anexos.

- CANCELA DA FONSECA, L. 1989. *Estudo da influência da "abertura ao mar" sobre um sistema lagunar costeiro: a lagoa de Santo André*. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa, Portugal: 355 pp.
- DIAZ, R. J. 1992. Ecosystem assesment using estuarine and marine benthic community structure. In *Sediment Toxicity Assessment*, G. A. Burton Jr (ed.). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan: 67-85.
- GAMITO, S. 1989. The benthic macrofauna of some water reservoirs of salt-pans from Ria Formosa (Portugal). *Sci. Mar.*, 53(2-3): 639-644.
- GAMITO, S. 1997. Sustainable management of a coastal lagoonal system (Ria Formosa, Portugal): an ecological model for extensive aquaculture. *International Journal of Salt Lake Research*, 6: 145-173.
- GUERRA-GARCÍA, J. M. 2001. *Análisis integrado de las perturbaciones antropogénicas en sedimentos del Puerto de Ceuta. Efecto sobre las comunidades macrobentónicas e implicaciones ambientales*. Tese de Doutoramento. Universidad de Sevilla: 346pp.
- HOLMER, M. 1991. Impacts of aquaculture on surrounding sediments: generation of organic-rich sediments. In *Aquaculture and the environment*, N. D. Pauw & J. Joyce (eds.), Belgium. European Aquaculture Society Special Publication, 16: 155-176.
- KELLY, M. & NAGUIB, M. 1984. Eutrophication in coastal marine areas and lagoons: a case study of "Lac de Tunis". Unesco reports in Marine Sciences, 29: 1-28.
- LEVIN, L. A., TALLEY, D. & THAYER, G. 1996. Succession of macrobenthos in a created salt marsh. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 141: 67-82.
- MACHADO, M. & CANCELA DA FONSECA, L. 1997. Nota sobre o macrozoobentos de uma instalação de piscicultura semi-intensiva (Olhão, Portugal). *Actas do 9º Congresso do Algarve (7-9 de Março)*, Vilamoura, Portugal: 907-919.
- MORRISEY, D. J., GIBBS, M. M., PICKMERE, S. E. & COLE, R. G. 2000. Predicting impacts and recovery of marine-farm sites in Stewart Island, New Zealand, from the Findlay - Watling model. *Aquaculture*, 185: 257-271.
- PEARSON, T. H. & ROSENBERG, R. 1978. Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol., Annu. Rev.*, 16: 229-311.
- POUSÃO, P.; MACHADO, M.; CANCELA DA FONSECA, L., 1995. Marine pond culture in southern Portugal: present status and future perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 16: 21-30.
- REES, H. L., MOORE, D. C., PEARSON, T. H., ELLIOTT, M., SERVILE, M., POMFRET, J. & JOHNSON, D. 1990. Procedures for the monitoring of marine benthic communities at UK Sewage Sludge Disposal Sites. *Dep. Agriculture and Fisheries for Scotland. Scottish Fisheries Information Pamphlet*, 18: 1-79.
- RODRÍGUEZ, S. R., OJEDA, F. P. & INESTROSA, N. C. 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 97: 193-207.
- SHANNON, C. E. & WEAVER, W. 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana Illinois: 117 pp.
- SHISHEHCHIAN, F., YUSOFF, F. M. & SHARIFF, M. 2001. The effects of commercial bacterial products on macrobenthos community in shrimp culture ponds. *Aquaculture International*, 9: 429-436.
- TIAN, R. C., HU, F. X. & MARTIN, J. M. 1993. Summer nutrient frons in the Changjiang (Yantze River) estuary. *Est. Coast. Shelf Sci.*, 37: 27-41.
- VALIELA, I. 1984. *Marine Ecological Processes*. Springer-Verlag, New York: 546 pp.
- ZAJAC, R. N. & WHITLATCH, R. B. 1982a. Responses of estuarine infauna to disturbance. I. Spatial and temporal variation of initial recolonization. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 10: 1-14.

- ZAJAC, R. N. & WHITLATCH, R. B. 1982b. Responses of estuarine infauna to disturbance. II. Spatial and temporal variation of succession. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 15-27.
- ZAJAC, R. N. & WHITLATCH, R. B. 2003. Community and population-level responses to disturbance in a sandflat community. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 294: 101-125.

## DINÂMICA DE UMA COMUNIDADE DE *CISTUS SALVIIFOLIUS* L., APÓS INTERVENÇÃO EXPERIMENTAL. EVOLUÇÃO DO COBERTO VEGETAL

C. Pinto-Cruz<sup>1</sup>, M. P. Simões<sup>1</sup>, L. Gazarini<sup>1</sup> & M. D. Espírito-Santo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Biologia/ICAM, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

<sup>2</sup>DPPF, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

E-mail: [ccruz@uevora.pt](mailto:ccruz@uevora.pt)

Pinto-Cruz, C., Simões, M. P., Gazarini, L. & Espírito-Santo, M. D. (2004). Dinâmica de uma comunidade de *Cistus salviifolius* L., após intervenção experimental. Evolução do coberto vegetal. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 199-209.

Estudou-se, durante 3 anos, a resposta de regeneração da vegetação, após corte, com incorporação, deposição e extracção da biomassa vegetal, numa comunidade arbustiva do sul de Portugal, em sistema de montado. O objectivo principal deste estudo consistiu na caracterização da dinâmica do agroecossistema montado, quando sujeito às tradicionais práticas de manejo, tendo em vista a conservação da diversidade biológica e o seu uso sustentado.

O estudo da evolução da flora foi efectuado através de levantamentos florísticos periódicos, em quadrados permanentes, com avaliação das percentagens relativas de cobertura, riquezas específicas e valores de biodiversidade, assim como, as percentagens relativas dos tipos fisionómicos presentes.

Observou-se a regeneração da comunidade por processos de autossucção, tendo os valores mais elevados de riqueza e diversidade específica sido registados dois anos após as intervenções. Quando se estabeleceu a dominância das espécies arbustivas, estes valores diminuíram. Decorridos três anos, verificou-se que já não existiam diferenças significativas, quer em relação à situação inicial, quer entre os diferentes tratamentos.

Palavras-chave: Monitorização, Regeneração, Biodiversidade, "Montado".

Pinto-Cruz, C., Simões, M. P., Gazarini, L. & Espírito-Santo, M. D. (2004). Dynamics of a *Cistus salviifolius* L. community after experimental disturbances. Plant cover evolution. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 199-209.

The vegetation regeneration as a response to experimental ploughing, mulching and mowing was studied for a three year period, in a shrub community of a "montado" ecosystem.

The main objective of this study was to describe the "montado" agroecosystem dynamics, towards the biodiversity conservation and its sustainable use.

Vegetation change was studied by periodical surveys in permanent plots. The cover values, species richness and plant diversity were estimated, as well as, the relative percentage of the physiognomic types.

The community tended to recover by auto succession processes and the highest cover and biodiversity values were observed two years after the experimental disturbances, decreasing afterwards as shrubs became dominant. No significant differences were registered after three years, either between the experimental treatments as in relation to the initial stage.

Keywords: Monitoring, Regeneration, Biodiversity, "Montado".

## INTRODUÇÃO

O montado constitui o sistema agro-silvo-pastoril predominante na região sul de Portugal, sendo a manutenção desta paisagem dependente do uso tradicional do solo. O conhecimento da dinâmica deste agroecossistema, quando sujeito às tradicionais práticas de manejo é, por isso, primordial. O estudo dos ecossistemas típicos da bacia do Mediterrâneo também se reveste de particular importância, pois esta área é considerada como uma das áreas "hotspot" prioritárias para a conservação (MYERS *et al.*, 2000).

Actualmente, os montados são áreas de produção florestal cuja gestão se prende com a optimização da produtividade e a minimização das perdas, quer por incêndio florestal, quer por excesso de mato que possa competir por água e nutrientes com as árvores. A sustentabilidade e conservação do montado só podem, assim, ser conseguidas através dum equilíbrio adequado entre a exploração arbórea e o estrato herbáceo ou arbustivo.

As práticas de manejo usadas tradicionalmente influenciam a biodiversidade, constituindo a conciliação das práticas agro-pastoris tradicionais com a conservação da biodiversidade o modelo ideal. De facto, onde as actividades tradicionais cessam, a diversidade animal e vegetal pode decair (GONZÁLEZ BERNÁLDEZ, 1991 e NAHEV, 1994 *in* HEYWOOD & WATSON, 1995), assim como a susceptibilidade a certas perturbações como o fogo pode aumentar. Para além disso, a homogeneização da paisagem, com os subsequentes efeitos negativos na biodiversidade, pode ser resultante do abandono agrícola ou pastorícia tradicional (FERNÁNDEZ-ALÉS *et al.*, 1992 *in* HEYWOOD & WATSON, 1995).

Neste contexto, o objectivo deste estudo foi a caracterização da dinâmica de comunidades arbustivas, em sistema de montado, através da análise da interacção entre as actividades humanas e o ecossistema, incluindo a recuperação ecológica do mesmo e a identificação das práticas de manejo que conciliam a conservação da biodiversidade, numa perspectiva de gestão sustentável e de conservação dos habitats naturais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais desenvolvidos decorreram no Centro de Estudos e Experimentação da Mitra (C. E. E. M.), da Universidade de Évora (38° 32' N, 8° 01' W, 220 m.s.m.). Para a elaboração deste estudo foi seleccionada uma comunidade de *Cistus salviifolius* L. sob montado. A área experimental encontra-se vedada desde Julho de 1991 para impedir perturbações externas.

Segundo a aproximação bioclimática de RIVAS-MARTÍNEZ *et al.* (1999), a área de estudo insere-se no bioclima Mediterrânico pluviestacional-oceânico, andar bioclimático Mesomediterrânico inferior de ombrotipo seco a sub-húmido.

Biogeograficamente e de acordo com COSTA *et al.* (1998) a Herdade da Mitra está situada no Superdistrito Alto Alentejano, Subsector Araceno-Pacense, Sector Mariânico-Monchiquense, Província Luso-Extremadurensis, Região Mediterrânica do Reino Holártico.

A área experimental enquadra-se numa zona caracterizada pela ocorrência de um complexo de Litossolos dos Climas de Regime Xérico de gnaisses e de Solos Litólicos Não Húmicos Pouco Insaturados Normais de gnaisses (AGUIAR & GRILO, 1975).

Os tratamentos experimentais, efectuados em Junho de 1998, tiveram como intuito simular as práticas tradicionais de manejo do sistema de montado, com o objectivo de avaliar comparativamente a regeneração da comunidade vegetal. Os tratamentos aplicados às parcelas experimentais foram: incorporação (I), deposição (D) e extracção (E) da biomassa vegetal.

No tratamento de incorporação a biomassa vegetal foi cortada por corta-matos e incorporada no solo através de gradagem, realizada a 20 cm de profundidade, com uma grade de discos. No tratamento extracção, após o corte, a biomassa foi retirada do terreno tendo este sido posteriormente gradado pelo mesmo processo referido acima. Finalmente, no tratamento deposição após o corte efectuado por corta-mato, o material vegetal foi depositado à superfície do solo. Como parcela testemunha (T), para posterior controle no tempo, foi preservada uma parcela onde a estrutura original foi evoluindo natural e independentemente.

Cada tratamento encontra-se replicado aleatoriamente por três faixas (50 x 14 m). Em cada tratamento elegeram-se ao acaso cinco quadrados de 2 m x 2 m que foram marcados permanentemente, para repetição da amostragem ao longo do tempo.

A monitorização da evolução da flora foi efectuada através de levantamentos florísticos trimestrais, em quadrados permanentes, com avaliação da

percentagem relativa de cobertura, durante 3 anos. O tempo 1 (Maio de 1998) constitui a situação inicial de pré-intervenção e as diferenças que se observam entre este tempo e os subsequentes são resultado de aplicação dos tratamentos experimentais.

Para o cálculo dos valores de diversidade recorreu-se ao índice de Shannon ( $H'$ ), considerando também os seus componentes, riqueza específica (número de espécies) e equitabilidade ( $E$ ) (MAGURRAN, 1988; VAN DER MAAREL, 1997).

Como método de ordenação utilizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP), aplicando o programa CANOCO 4 (TER BRAAK, 1998). Para o estudo da estrutura das comunidades recorreu-se à classificação dos tipos fisionómicos dos *taxa* presentes com base no sistema de RAUNKJAER (1934). No tratamento estatístico destes dados utilizou-se o teste de independência  $G$  e o teste de proporções  $z$  (SOKAL & ROHLF, 1995).

## RESULTADOS

A recuperação da percentagem total de cobertura, após os tratamentos, foi lenta, parecendo existir uma convergência entre as parcelas tratadas e a testemunha apenas decorridos 2 anos (Fig. 1). De um modo geral e relativamente às parcelas tratadas, os valores de cobertura foram ligeiramente inferiores na parcela da deposição, nos primeiros 2 anos.

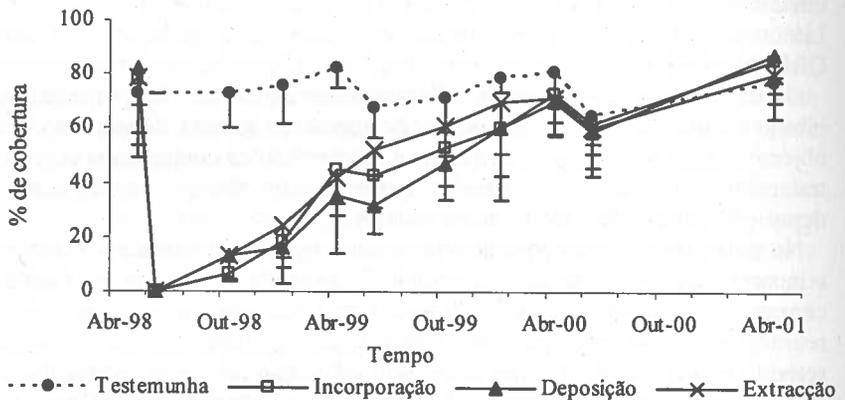


Figura 1 – Evolução das percentagens de cobertura total na área experimental. Médias + limites inferiores de confiança a 95% ( $n=5$ ).

A riqueza específica máxima observou-se um ano após as intervenções (Abril de 1999) devido, principalmente, ao aparecimento de espécies herbáceas nas parcelas tratadas (Fig. 2). Consequentemente, o índice de diversidade específica também apresentou valores muito elevados, no primeiro ano.

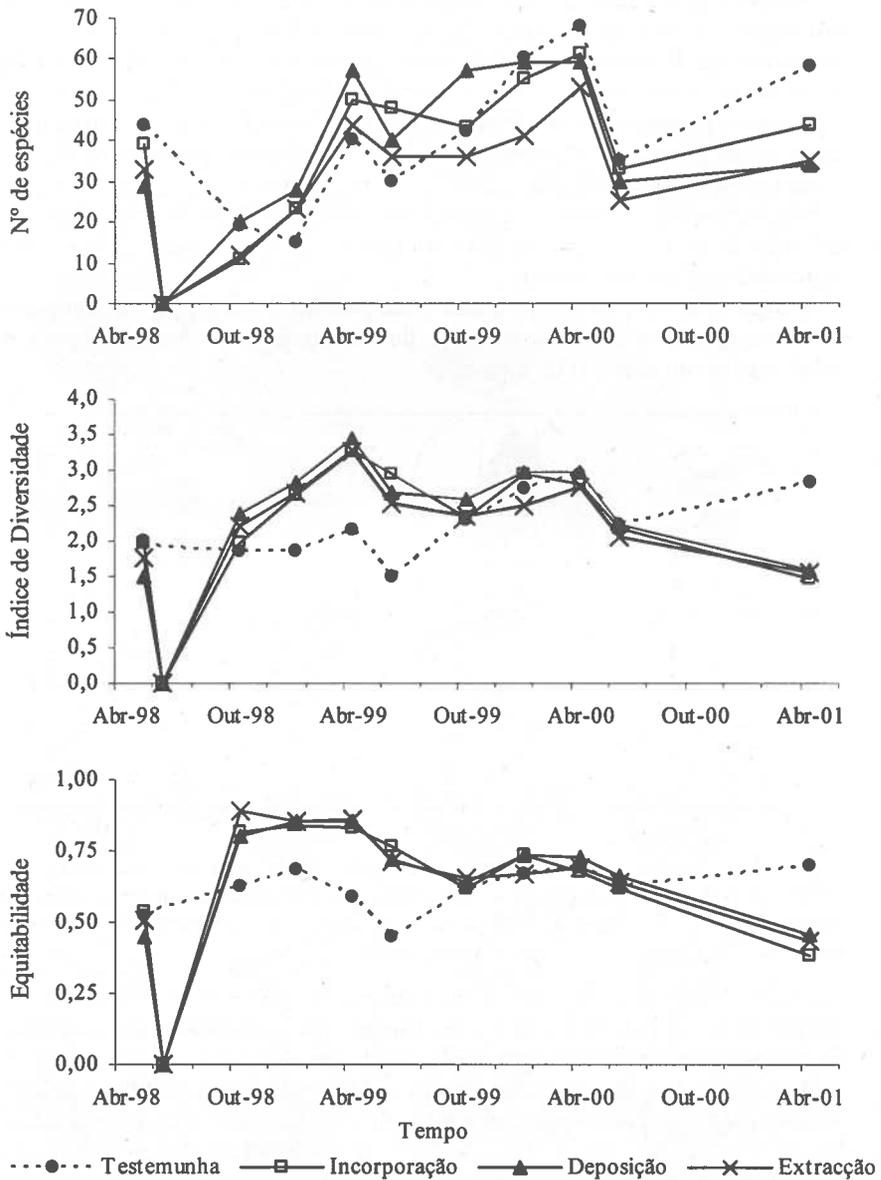


Figura 2 – Evolução dos valores de riqueza específica, índice de biodiversidade (H') e equitabilidade (E) na área experimental.

Dois anos após a aplicação dos tratamentos, ocorreu uma diminuição dos valores do índice de diversidade (Fig. 2), que são influenciados pelos valores de equitabilidade. Este decréscimo foi causado pelo aumento de dominância de *Cistus salvifolius*, que desequilibrou a igualdade de valores da abundância específica.

Na parcela testemunha, a tendência geral verificada ao longo do tempo é a de aumento progressivo dos valores de riqueza e diversidade específicas, bem como dos de equitabilidade (Fig. 2).

Nos tempos 5 e 9, respectivamente Junho de 1999 e 2000, existiu sempre uma inflexão da tendência de evolução do gráfico, devido a estes valores serem respeitantes ao período estival.

Através da análise de componentes principais verificou-se, de um modo geral, uma segregação nítida dos períodos de amostragem da parcela testemunha relativamente ao eixo 1 (Fig. 3).

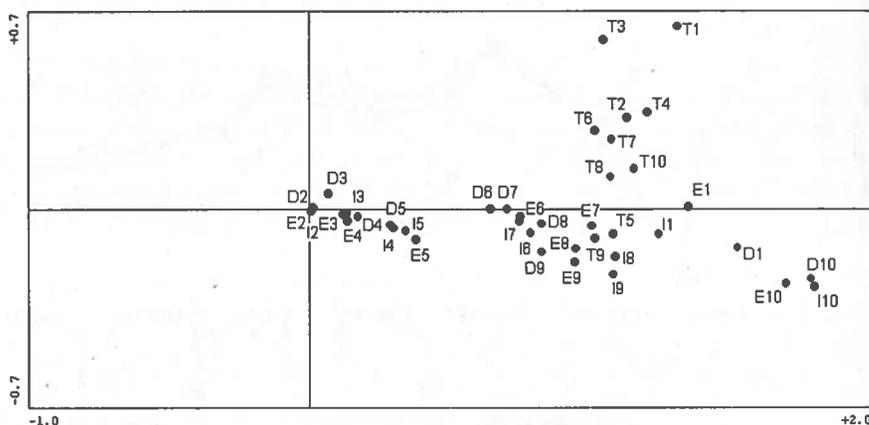


Figura 3 - Análise de componentes principais obtida para os tratamentos (T - Testemunha, I - Incorporação, D - Deposição, E - Extracção) segundo os tempos de amostragem (1 a 10, Maio de 1998 a Abril de 2001, respectivamente). (Componentes principais Eixo 1 e Eixo 2: 97% da variância total).

Relativamente aos tratamentos, os 3 grupos formados são constituídos pelos tempos 2, 3, 4 e 5; 6, 7, 8 e 9; 1 e 10. Este tipo de segregação parece ser função da evolução temporal das parcelas, em termos de composição florística (Fig. 3).

O agrupamento formado pelos tempos 1 (Maio de 1998) e 10 (Abril de 2001), sugere que a comunidade presente no tempo 10 terá sido a mais semelhante à inicial. Este facto indicia que o período de recuperação destas comunidades arbustivas será de cerca de três anos.

Analisando a evolução da estrutura da comunidade, com base nas percentagens relativas dos tipos fisionómicos (Fig. 4), verificaram-se diferenças muito significativas ( $P < 0,001$ ) nos tempos 2, 3, 4, 5 e 10, entre todos os tratamentos e a testemunha, devido à proporção de nanofanerófitos (NF) e terófitos (T).

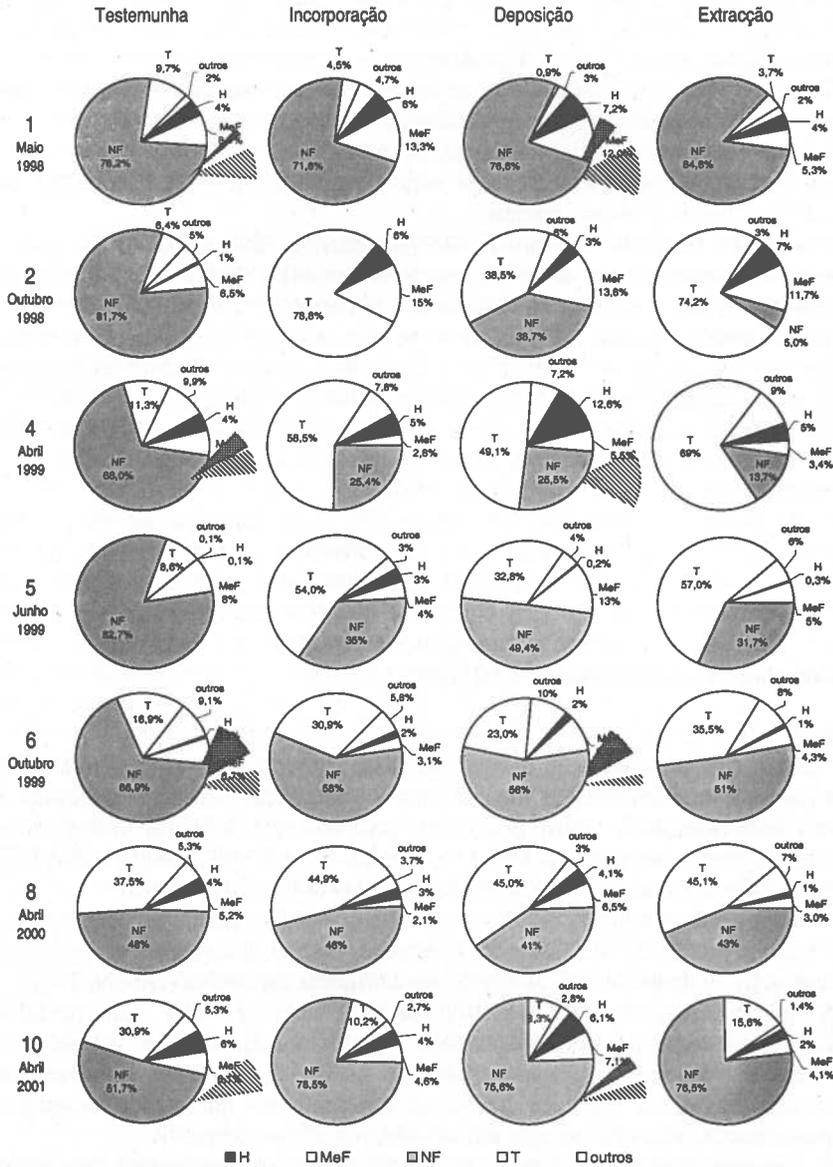


Figura 4 - Representação proporcional dos tipos fisionômicos das espécies, segundo os tratamentos experimentais e os tempos de amostragem (1 a 10). H - Hemicriptófitos, MeF - Mesofanerófitos, NF - Nanofanerófitos, T - Terófitos.

Fazendo a comparação entre os tratamentos para os tempos em que existem diferenças significativas, verifica-se que estas são principalmente devidas às percentagens relativas de tipos fisionómicos registadas para a parcela testemunha, em relação a todos os tratamentos experimentais.

Nos tempos 2 e 5, a parcela de deposição foi, das parcelas tratadas, a que apresentou menor percentagem de terófitos ( $P < 0,05$ ).

O desenvolvimento inicial de *Cistus salviifolius* foi, comparativamente, mais lento na parcela de extracção, pois esta apresentou menor percentagem de nanofanerófitos nos tempos iniciais.

A partir do tempo 6 (Outubro de 1999), inclusive, onde deixaram de existir diferenças significativas entre as parcelas tratadas, todos os tratamentos apresentaram uma percentagem relativa de nanofanerófitos acentuadamente mais elevada, sendo o *Cistus salviifolius* a espécie dominante. Foi também neste tempo que deixou de se verificar uma distinção significativa entre as parcelas tratadas e a testemunha, voltando a existir esta distinção no tempo 10 ( $P < 0,05$ ).

Em Abril de 2001, decorridos 3 anos, as parcelas tratadas, em comparação com a testemunha, apresentaram significativamente maior percentagem relativa de nanofanerófitos e menor de terófitos ( $P < 0,001$ ).

A comparação da evolução dos valores dos tipos fisionómicos, na parcela testemunha, ao longo do tempo traduz uma diferença entre a primeira fase do estudo (tempos 2, 3, 4, 5 e 6) e a última fase do mesmo. Com base nos teste z, de comparação de duas proporções, conclui-se que essa diferença é devida a uma diminuição dos nanofanerófitos presentes e consequente aumento das herbáceas anuais, ou seja, de terófitos ( $P < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

A análise da recolonização das parcelas não intervencionadas (testemunha) e das parcelas intervencionadas mostrou que a perturbação aumentou a riqueza e diversidade específica, a curto prazo. Este resultado está de acordo com estudos anteriores, de regeneração pós fogo (TRABAUD & LEPART, 1980; PIGNATTI, 1983; ALONSO *et al.*, 1994; ESPÍRITO-SANTO & CAPELO, 1998).

O conjunto de resultados obtidos comprova que a diversidade específica, após um incremento inicial declinou gradualmente, com o decorrer do tempo após intervenção, juntamente com as alterações da riqueza específica (DEGN, 2001).

A percentagem de terófitos foi sempre mais elevada nas parcelas intervencionadas, pois a eliminação dos arbustos reduziu o efeito competitivo dos mesmos sobre a vegetação herbácea (CALVO *et al.*, 1998). Nas parcelas intervencionadas, as espécies herbáceas apresentaram um rápido desenvolvimento inicial, seguindo-se uma diminuição, por efeito competitivo com o estrato arbustivo. A eliminação dos matos e o seu crescimento mais lento permitiu a germinação das espécies herbáceas (terófitos) nas fases iniciais do processo de regeneração. Tal facto coincide com resultados obtidos noutros estudos, nos quais se evidencia uma invasão por espécies pioneiras nos primeiros

estádios sucessionais, que são posteriormente suplantadas pelas espécies perenes próprias da comunidade (CALVO *et al.*, 1992; TRABAUD, 1992; ALONSO *et al.*, 1994).

À semelhança do observado por outros autores (CALVO *et al.*, 2000), o *Cistus salviifolius* apresentou boa regeneração após o corte, tendo as intervenções aplicadas favorecido um aumento pronunciado dos valores de cobertura, atingindo-se valores superiores aos da situação inicial. A regeneração desta espécie foi efectuada por germinação, tal como referido por TARREGA *et al.* (2001).

A parcela de deposição apresentou, inicialmente, percentagens de cobertura mais baixas do que as dos outros tratamentos, nomeadamente no que diz respeito à percentagem relativa de terófitos. Possivelmente, o ensombramento da biomassa cortada e depositada sem a realização de uma gradagem no solo influenciaram negativamente a sua germinação, uma vez que a gradagem, ao descompactar e criar arejamento no solo, promove a germinação das sementes (BELO, 1993).

A parcela testemunha apresentou uma evolução independente, na qual se verificou uma tendência geral de aumento progressivo dos valores de riqueza e diversidade específicas, bem como dos de equitabilidade, ao longo do tempo (Fig. 2), devido ao aumento relativo da percentagem de terófitos (Fig. 4). Este facto está de acordo com os resultados obtidos por ESPÍRITO SANTO *et al.* (1997), que estudando a acção do fogo sobre a vegetação verificaram que as espécies de *Cistus* spp., nomeadamente *Cistus salviifolius*, se tornam dominantes nos primeiros anos de evolução, para passar a decrescer e quase desaparecer ao fim de 10 anos.

Não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos, 3 anos após a sua aplicação. Tal como neste estudo, KAHMEN *et al.* (2002) verificou uma semelhança evolutiva de parcelas sujeitas a corte com extracção e parcelas em que o material cortado foi deixado no terreno (deposição). Esta semelhança pode ser particularmente interessante em termos conservacionistas, uma vez que o processo em que existe deposição é consideravelmente menos dispendioso, pois o material não tem de ser removido, apresentando ainda a vantagem de permitir o retorno de nutrientes ao sistema, através da decomposição do material vegetal.

Em termos dos parâmetros analisados neste estudo, verificou-se a regeneração da comunidade, que se aproximou da situação inicial, 3 anos após a intervenção. Contudo, é de salientar que a biomassa e estrutura iniciais dos arbustos ainda não tinham completado a recuperação, 5 anos depois da intervenção (SIMÕES *et al.*, 2003).

Em termos da gestão destes ecossistemas deverá também ser equacionada a relação benefício/custo da conservação da paisagem intacta e da manutenção das actividades tradicionais do uso do solo, como sistema de manutenção da biodiversidade. A não utilização permitirá a evolução progressiva da comunidade, com o estabelecimento, a longo prazo, de matos ou matagais. Por

seu lado, a existência moderada das actividades humanas proporciona a manutenção da paisagem característica do montado, com grande valor cultural e tradicional. Estas comunidades, apesar de maioritariamente constituídas por espécies vegetais vulgares, correspondem a habitats extremamente ricos em termos de biodiversidade. A estrutura típica destes habitats proporciona também condições óptimas para o estabelecimento de muitas espécies animais, cuja sobrevivência depende da conservação mesmos.

Os resultados obtidos permitem concluir que a ocorrência periódica de perturbações, em escala moderada, permite a manutenção da diversidade ecológica, a longo prazo, sendo o factor perturbação largamente reconhecido como importante na manutenção da diversidade (PEET *et al.*, 1983; WOOD, 2001).

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto PAMAF nº 8004/97

#### BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, F. B. & GRILO, J. T. 1975. *Memória Descritiva da Carta de Solos da Herdade da Mitra*. Univ. de Évora. (não publicado)
- ALONSO, I., CALABUIG, E. L. & TÁRREGA, R. 1994. Cambios en la Estructura de la Comunidad en Jarales Sometidos a Perturbaciones Experimentales. *Studia Oecologica*, X-XI: 281-287.
- BELO, A. 1993. Dinâmica do banco de sementes do solo. *Trabalho de fim de curso Eng. Agrícola*. Univ. de Évora.
- CALVO, L., TÁRREGA, R. & LUIS, E. 1992. The effect of human factors (cutting, burning and uprooting) on experimental heathland plots. *Pirineos*, 140: 15-27.
- CALVO, L., TÁRREGA, R. & LUIS, E. 1998. Twelve years of Vegetation Changes After Fire in a *Erica australis* Community. *Fire Management and Landscape Ecology*. International Association of Wildland Fire, Washington. 123-136.
- CALVO, L., TÁRREGA, R. & LUIS, E. 2000. Quince Anos de Sucesión Después de Corta Experimental en Brezales de *Erica australis* L. en la Provincia de León (España). *Pirineos*, 155: 75-90.
- COSTA, J. C., AGUIAR, C., CAPELO, J. H., LOUSÁ, M. & NETO, C. (1998) Biogeografia de Portugal Continental. *Quercetea*. 0. 56 p.
- DEGN, H. J. 2001. Succession from farmland to heathland: a case for conservation of nature and historic farming methods. *Biological Conservation*, 97: 319-330.
- ESPÍRITO-SANTO, M. D., CAPELO, J. H., COSTA, J. C., LOUSÁ, M. & REGO, F. 1997. Fogo e Fitodiversidade no PNSAC. Efeitos na Composição e Estrutura das Comunidades e Paisagem. *Res. do 2º Encontro Nacional de Ecologia*. SPECO.
- ESPÍRITO-SANTO, M. D & CAPELO, J. H. 1998. Ten Years of Observation After Wildfire on Permanent Plots in Central Mediterranean Portugal. *Fire Management and Landscape Ecology*. International Association of Wildland Fire, Washington. 87-101.
- HEYWOOD, V. H. & WATSON, R. T. 1995. *Global Biodiversity Assesment*. Cambridge Univ. Press, Great Britain. 25-743.

- KAHMEN, S., POSCHLOD, P. & SCHREIBER, K.-F. 2002. Conservation management of calcareous grassland. Changes in plant species composition and response of functional traits during 25 years. *Biological Conservation*, **104**: 319-328.
- MAGURRAN, A. E. 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Chapman & Hall. 179 p.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, Vol. **403**: 853 - 858.
- PEET, R. K., GLENN-LEWIN, D. C. & WALKER WOLF, J. 1983. *Man's Impact on vegetation*. Edited by HOLZNER, W., WERGER, M. J. A. & IKUSIMA, I. Dr. W. Junk Publishers, London. 41-54.
- PIGNATI, S. 1983. *Man's Impact on vegetation*. Edited by HOLZNER, W., WERGER, M. J. A. & IKUSIMA, I. Dr. W. Junk Publishers, London. 151- 161.
- RAUNKJAER, C. 1934. *The Life Forms of Plants and Statistical Geography*. Oxford. 62 p.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S., SÁNCHEZ-MATA, D. & COSTA, M. 1999. North American Boreal and Western Temperate Forest Vegetation. *Itinera Geobotanica* **12**: 5-316.
- SIMÕES, M. P., PEREIRA, I. P., PINTO-CRUZ, C. & GAZARINI, L. 2003. Dinâmica de uma comunidade de *Cistus salviifolius* L., após perturbações experimentais. Padrões de regeneração da estrutura e biomassa. *Res. do 8º Encontro Nacional de Ecologia. SPECO*.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd. Ed. W. H. Freeman and Company, U. S. A. 887 p.
- TÁRREGA, R., LUIS-CALABUIG, E. & VALBUENA, L. 2001. Eleven years of recovery dynamic after experimental burning and cutting in two *Cistus* communities. *Acta Oecologica* **22**: 277-283.
- TER BRAAK, C. J. F. 1998. CANOCO, a FORTRAN Program for Canonical Community Ordination by Direct Gradient Analysis. *Ecology*, **67**: 1167-1179.
- TRABAUD, L. 1992. Influence du régime des feux sur les modifications à court terme et la stabilité à long terme de la flore d'une garrigue de *Quercus coccifera*. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, **47**: 209-230.
- TRABAUD, L. & LEPART, J. 1980. Diversity and Stability in Garrigue Ecosystems After Fire. *Vegetatio*, Vol. **43**: 49-57.
- VAN DER MAAREL 1997. *Biodiversity: from Babel to Biosphere Management*. Opulus Press, Uppsala. 60 p.
- WOOD, B. 2001. Maintaning vegetation diversity on reserves: the relationship between persistence and species richness. *Biological Conservation*, **97**: 199-205.

## O USO DE GRANDES BARRAGENS PELA LONTRA NO ALENTEJO

Nuno Pedroso<sup>1</sup>, Margarida Santos-Reis<sup>1</sup> & Lia Vasconcelos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biologia Ambiental, Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed. C2, 3º Piso, Campo Grande, 1749-016 Lisboa  
e-mail: nmpedroso@fc.ul.pt.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, Monte de Caparica, 2829-516 Caparica.

Pedroso, N., Santos-Reis, M. & Vasconcelos, L. (2004). O Uso de Grandes Barragens pela Lontra no Alentejo. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 211-224.

As barragens são frequentemente consideradas como um dos factores responsáveis pelo declínio das populações de lontra Europeia (*Lutra lutra*), uma vez que não oferecem condições óptimas para a espécie. O uso de lagos artificiais pela lontra já foi alvo de monitorização em Portugal (Barragem da Agueira), mas os resultados não podem ser extrapolados para outros sistemas lênticos. No trabalho que agora se apresenta foram estudadas 12 grandes barragens no Alentejo, tendo sido efectuados 102 transectos para pesquisa de indícios de presença tanto nos sistemas lênticos como lóticos. Todas as barragens revelaram utilização por parte da lontra e apenas 13,7% do total dos transectos foram negativos. Não foram observadas diferenças significativas na intensidade de marcação entre as 12 barragens. Verificou-se que a disponibilidade de locais de marcação, o perímetro da barragem e a abundância de vegetação nas margens estão positivamente relacionados com a presença de lontra. Concluiu-se assim que a aparente elevada abundância de lontras em Portugal, ao contrário do verificado da maioria dos restantes países da Europa, promove a ocupação de habitats sub-óptimos, como as grandes barragens, essencialmente devido à elevada disponibilidade de presas e a proximidade de sistemas lóticos com boas condições de refúgio. No entanto, apesar desta capacidade, existem indícios que sugerem que o facto da lontra usar as grandes barragens não é indicador de que a implementação destas estruturas seja benéfico para a espécie, pois o cenário pré-barragem deveria ser mais favorável para a lontra do que a situação actual.

Palavras chave: grandes barragens, lontra *Lutra lutra*, uso do habitat, conservação.

Pedroso, N., Santos-Reis, M. & Vasconcelos, L. (2004). Otter Use of Large Dams in Alentejo. *Revista Biol. (Lisboa)* 22: 211-224.

Dams are often referred as responsible for the decline of the otter (*Lutra lutra*) in Europe, since these do not provide optimal conditions for the species. The current scenario is therefore of great concern in conservation terms. The use of artificial lakes by otters was already monitored in Portugal (Aguieira dam), but results can not be extrapolated to other lentic systems. In this study we use data collected in 12 large dams in the Alentejo region, resulting from a total of 102 transects conducted in the lentic systems and in the adjacent lotic systems. All dams showed positive signs of the otter presence and only 13.7% of the total transects were negative. No significant differences were observed in marking intensity in the 12 dams. We found that availability of marking places, dam perimeter and vegetation abundance in the margins were positively related to otter presence. We concluded that it is possible that under favourable population conditions, such as those that seem to occur in Portugal, otters can occupy suboptimal habitats, like large dams due essentially to prey availability and proximity to lotic systems with good refuges. However, in spite of this adaptation capacity, there are evidences that the implementation of large dams is not beneficial for the otter, since the conditions for the species decrease compared to the pre-dam situation.

Keywords: large dams, otter *Lutra lutra*, habitat use, conservation.

## INTRODUÇÃO

As barragens são frequentemente consideradas como um dos factores responsáveis pelo declínio das populações de lontra (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) (MACDONALD & MASON, 1984; RUIZ-OLMO, 2001), mas poucos são os estudos dedicados a este tema. Os reservatórios das barragens são corpos de água, largos, profundos e com margens na sua maioria de acentuada inclinação, que não oferecem condições óptimas para a espécie, por dificultarem a captura de presas (HOUSTON & MCNAMARA, 1994; KRUUK, 1995; MACDONALD & MASON, 1994) e reduzirem as possibilidades de refúgio, por a constante flutuação do nível da água resultar numa faixa desprovida de vegetação (e.g. BAS *et al.*, 1984; LUNNON & REYNOLDS, 1991; MACDONALD & MASON, 1982; PRENDA & GRANADO-LORENCIO, 1995). Mais ainda, o

paredão da barragem e o volume da massa de água poderão representar um factor de fragmentação populacional (MICHELOT & BENDELÉ, 1995).

O estudo apresentado insere-se no âmbito de uma linha de investigação em ecologia aplicada, promovida pelo Centro de Biologia Ambiental da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, com o objectivo de avaliar a influência de grandes infra-estruturas hidráulicas na presença e ecologia da lontra. A intenção é adquirir conhecimentos de forma a entender se as condições de sobrevivência das lontras são postas em causa pela presença de barragens ou se, quando em condições populacionais favoráveis como aquelas que parecem subsistir em Portugal (FOSTER-TURLEY *et al.*, 1990; TRINDADE *et al.*, 1998), a espécie ocupa habitats considerados sub-óptimos, como as grandes barragens. A abordagem efectuada neste trabalho assume grande importância devido ao elevado número de empreendimentos já construídos e planeados em Portugal e Espanha. Segundo a Comissão Nacional Portuguesa das Grandes Barragens, presentemente existem 157 grandes barragens (altura de 15m ou mais ou altura entre 5 e 15m mas com um reservatório maior do que 3 milhões m<sup>3</sup>) em Portugal, estando prevista a construção de mais 13 a 15 empreendimentos nos próximos anos. A acrescentar, a Barragem de Alqueva (o maior lago artificial da Europa) está em fase de enchimento e importantes impactes ambientais foram já identificados para a lontra (SANTOS-REIS *et al.*, 2003). O cenário actual é assim de grande preocupação em termos de conservação da espécie.

O primeiro empreendimento hidráulico seleccionado para esta linha de investigação foi a Barragem da Aguieira (Rio Mondego). Este estudo decorreu entre 1996 e 1999, onde se concluiu que o perímetro da barragem da Aguieira foi usado pela lontra durante todo o ano; que o reservatório representa uma importante e permanente fonte de alimento para as lontras, e que a lontra parece usar complementarmente o reservatório, que lhe providencia alimento, e os tributários, que providenciam abrigo e favorecem a reprodução (PEDROSO, 1997; SALES-LUÍS, 1998). No entanto estes resultados, dado referirem-se a um único sistema e cujos maiores impactes enfrentados pela lontra remontam à época da sua construção e passagem de sistema lótico a lético (1981), não são passíveis de ser extrapolados para outras barragens, sendo necessário dar continuidade aos estudos no âmbito desta temática. Assim, no presente trabalho pretendeu-se avaliar o uso, por parte da lontra, de outras barragens em Portugal, e identificar causas desse uso caso este se viesse a verificar.

## MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo escolhida foi o Alentejo, e concretamente um conjunto de barragens localizadas em duas bacias hidrográficas desta região: Sado (Pego do Altar, Alvito, Fonte Cerne, Roxo, Monte da Rocha, Campilhas, Vale do Gaio e Odivelas) e Guadiana (Caia, Luçefecit, Vigia e Monte Novo) (Fig. 1). A 1ª fase da metodologia (Março a Maio de 2002) consistiu na visita às barragens seleccionadas e na caracterização do habitat num "buffer" de 1000m delimitado

em torno do perímetro de cada barragem. Para tal foram utilizados cartas de ocupação de solo disponíveis (Centro Nacional de Informação Geográfica) validadas no terreno.



Figura 1. Grandes barragens das bacias dos rios Sado e Guadiana (Alentejo) amostradas.

Procedeu-se ainda à selecção de um conjunto de estações de amostragem em cada barragem localizadas da seguinte forma: no paredão; nos sistemas lóticos (tributários) adjacentes (uma a jusante, outra a montante e pelo menos mais uma num outro pequeno tributário); e nas margens do sistema lêntico (reservatório) sendo as estações de amostragem em número variável (para uma amostragem adequada do perímetro), escolhidos ao longo do perímetro de acordo com o habitat dominante e outras características da margem (vegetação, inclinação, solo, acessibilidade, etc.), e espaçados entre si 5 a 6 km para minimizar os efeitos de autocorrelação (Fig. 2). Dos trabalhos de PEDROSO (1997) e SALES-LUÍS (1998) na barragem da Agueira resultou que as duas variáveis com maior influência no número de indícios de lontra encontrados eram a pluviosidade e o nível de água da barragem, mascarando a influência das outras variáveis. Para

evitar esse efeito, o trabalho de campo neste estudo foi efectuado no mais curto espaço de tempo e no Verão, minimizando assim o factor precipitação (quase ausente nesta época) e garantindo, em todos os reservatórios, a presença de uma vasta área descoberta (área inundável) por o nível de água ser baixo.

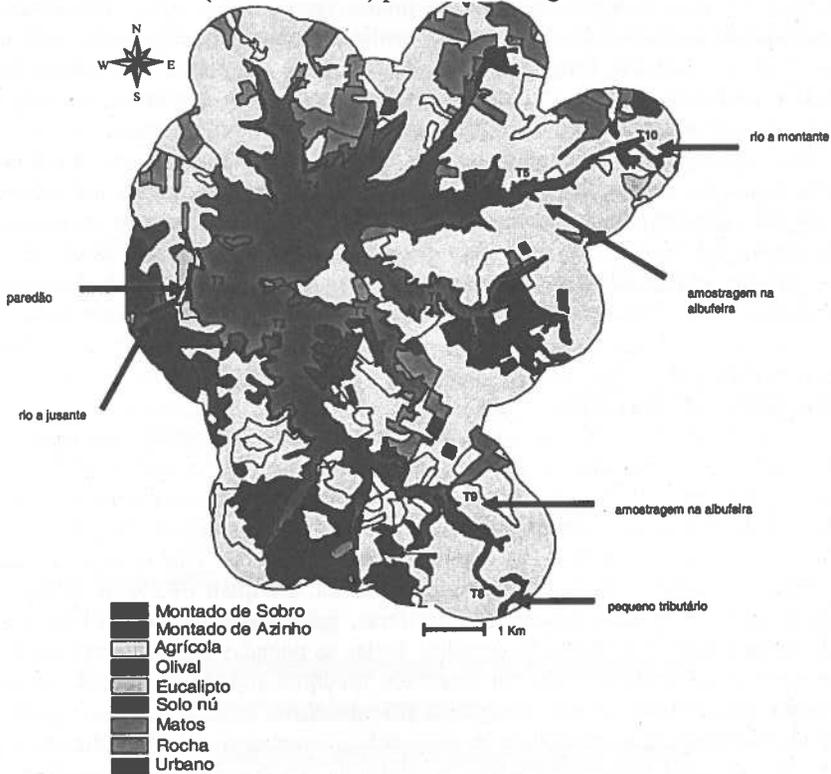


Figura 2. Localização das estações de amostragem (T=10) na barragem do Roxo e respectivo enquadramento paisagístico (“buffer” de 1000m.).

As prospeções para procura de indícios de lontra (2ª fase da metodologia) decorreram assim entre Julho e Setembro 2002 (para garantir condições ambientais tão homogêneas quanto possível), tendo sido efectuada apenas uma campanha para prospeção de indícios em cada barragem e nos sistemas lóticos adjacentes. Ao longo de transectos de 200m (extensíveis para 600m quando necessário comprovar ausências) foram recolhidos parâmetros físicos e do habitat relacionados com refúgio/vegetação, morfologia da margem, disponibilidade alimentar (avaliada com recurso a bibliografia – FERREIRA *et al.*, 1999 – e recolha de dados no campo através de censos visuais em cada transecto percorrido, para a ictiofauna, lagostim e herpetofauna) e tipo e grau de

impactes, os quais foram posteriormente (Outubro 2002 a Março 2003) analisados através de procedimentos estatísticos. Para testar a existência de diferenças significativas entre a intensidade de marcação nas 12 barragens recorreu-se ao teste de Kruskal-Wallis. De forma a tentar interpretar quais os parâmetros que poderão ser mais ou menos responsáveis pelas diferenças na intensidade de marcação optou-se por realizar Análises de Regressão Múltipla (Método de Selecção Progressiva por Passos) onde a variável dependente foi o Índice Quilométrico de Abundância (IQA - razão entre o número de indícios encontrados no transecto e a dimensão do transecto em quilómetros).

Numa primeira análise apenas se utilizaram 11 variáveis de ocupação de solo resultantes da análise dos "buffers" de habitat. A segunda análise foi realizada com 22 variáveis físicas ou descritivas de habitat (e.g. Inclinação da margem; Refúgios potenciais na área inundável). Previamente foram avaliadas as correlações entre cada par de variáveis independentes (correlação de Pearson) e realizaram-se regressões univariadas entre cada uma destas e a variável IQA.

## RESULTADOS

### Intensidade de Marcação

De uma forma geral as áreas circundantes das barragens estudadas são dominadas por montados de azinho com algum sobre (dominantes nas barragens da Vigia, Monte da Rocha, Lucefécit e Campilhas) complementados com zonas de pseudo-estepes e campos agrícolas, que podem mesmo ser dominantes em termos de área de ocupação (barragens do Roxo, Odívelas, Vale do Gaio e Caia).

Detectou-se um total de 681 vestígios de lontra, dos quais 89,3% (n=608) eram dejectos, 3,7% (n=25) marcações odoríferas, 3,2% (n=22) rastros, 3,1% (n=21) restos de presas e 0,7% (n=5) pegadas. Todas as pegadas apresentaram medidas de indivíduos adultos e não foi detectado qualquer indício de juvenil ou cria. Foram encontradas apenas duas tocas (Monte Novo e Vale do Gaio) perto da água evidenciando a sua utilização como refúgio mas nenhuma foi indiciadora de ter sido utilizada para reprodução. Da leitura da tabela 1 é possível verificar que todas as barragens prospectadas revelaram a presença de lontra e na maior parte dos transectos realizados.

Tabela 1. Número e percentagem de estações de amostragem positivas por barragem.

	Caia	Lucefécit	Vigia	M. Novo	Alvito	P. Altar
Sistemas	8 em 8	5 em 6	5 em 6	7 em 7	6 em 7	9 em 9
Lênticos	100%	83%	83%	100%	86%	100%
Sistemas	2 em 2	2 em 2	2 em 2	2 em 2	3 em 3	1 em 1
Lóticos	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	V. Gaio	Odívelas	Roxo	F. Cerne	Campilhas	M. Rocha
Sistemas	6 em 9	3 em 6	7 em 7	3 em 3	2 em 3	5 em 5
Lênticos	67%	50%	100%	100%	67%	100%
Sistemas	2 em 2	3 em 3	2 em 3	0 em 1	2 em 3	2 em 3
Lóticos	100%	100%	67%	0%	100%	67%

De um total de 102 estações de amostragem apenas 13,7% foram negativas em termos de presença de lontra (14,5% em sistemas lânticos e 11,5% em sistemas lóticos). As barragens do Caia, Monte Novo, Pego do Altar, Roxo, Fonte Cerne e Monte da Rocha apresentaram 100% de estações positivas no sector lântico. A barragem de Odivelas foi a que, proporcionalmente, resultou em mais estações negativas no reservatório (50%). No entanto, uma maior variação foi detectada na intensidade de marcação, sendo os valores comparados em termos de IQA.

O IQA de cada barragem está definido na figura 3, sendo que as estações de amostragem nos sistemas lóticos não foram utilizadas pois, como oportunamente referido, apenas servem para verificar a presença da lontra na área adjacente à barragem e para verificar se existe um contínuo de distribuição da espécie a montante e a jusante da barragem. As barragens de Pego do Altar e Roxo, e as de Lucefécit e Odivelas são, respectivamente, as que apresentam os maiores e menores IQA. Considerando a média das barragens por bacia hidrográfica, a Bacia do Sado tem um IQA ligeiramente superior (28,8 para 26,4 na bacia do Guadiana). Apesar do aparente aumento do IQA em função do aumento do perímetro da barragem, o resultado da aplicação do teste de Kruskal-Wallis demonstrou que as diferenças de IQA entre as 12 barragens não são significativas ( $H=16,55$ ;  $df=11$ ;  $p=0,122$ ).

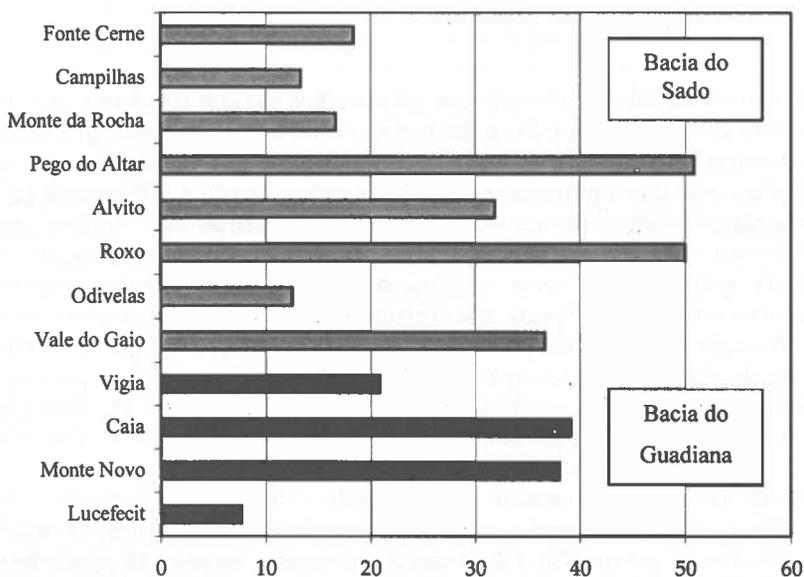


Figura 3. Índice Quilométrico de Abundância de lontra das barragens prospectadas.

Da análise da figura 4, resulta uma grande variação do IQA por transecto dentro de cada barragem (e.g. Vale do Gaio apresenta o transecto com o valor mais elevado – 170 indícios/km – e igualmente dois transectos negativos).

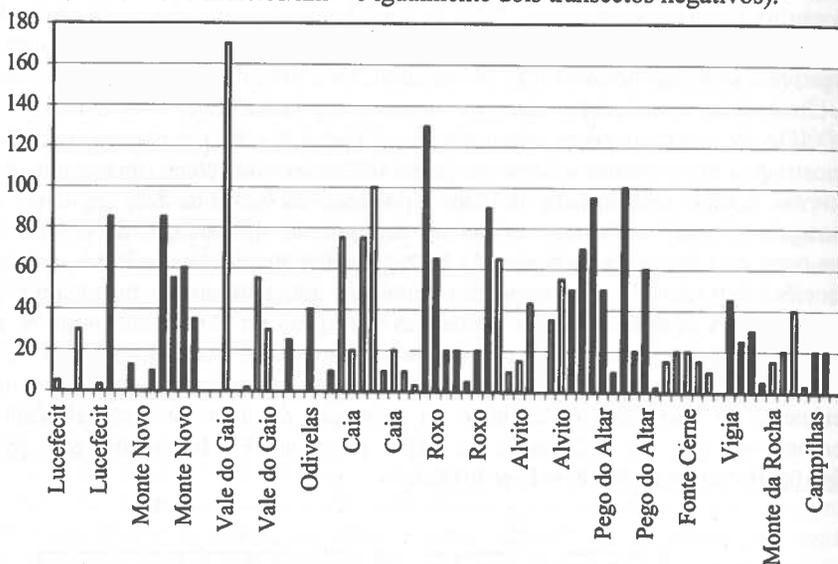


Figura 4. Índice Quilométrico de Abundância/transecto nas barragens prospectadas

Devido a esta falta de consistência optou-se por analisar o conjunto dos 102 transectos amostrados em todas as 12 barragens, de forma a permitir uma análise mais robusta. Esta abordagem foi igualmente utilizada nas análises de regressão múltipla, sendo que a primeira revelou que a marcação não é influenciada pelas percentagens relativas de ocupação dos habitats presentes nos "buffers", pois nenhum foi seleccionado para entrar nas equações uni ou multivariada. Na segunda análise (após testar e eliminar algumas das variáveis altamente correlacionadas), as variáveis que foram seleccionadas para a equação de regressão foram LMARC (Locais de marcação), PER (Perímetro) e VEG (Disponibilidade de vegetação total), todas relacionadas positivamente com o IQA:  $IQA = -62,435 + 13,227 LMARC + 17,862 PER + 11,871 VEG$  ( $R^2=0,272$ ;  $F(3,8)=8,497$ ;  $p<0,001$ ).

#### Efeito da Presença do Paredão

A altura do paredão das barragens prospectadas variou entre 23 metros (Lucefécit) e 63 metros (Pego do Altar). Os transectos no paredão (a montante) foram limitados a 4 barragens (Lucefécit, Pego do Altar, Roxo e Vale do Gaio), das quais apenas um foi negativo (Vale do Gaio). Nas barragens em que a estrutura do paredão não permitiu a sua realização, os transectos foram efectuados nas margens da albufeira imediatamente ao lado do paredão (à

excepção da barragem de Odivelas que não apresentava condições de prospecção devido ao coberto vegetal) e foram todos positivos. As prospecções efectuadas imediatamente a jusante do paredão, foram todas positivas (não foi possível realizar qualquer prospecção a jusante do paredão na barragem de Fonte Cerne), à excepção do Monte da Rocha, embora este resultado seja, eventualmente, mais uma consequência das grandes dificuldades de prospecção neste local do que uma ausência real da lontra. Finalmente, os transectos efectuados a montante do reservatório de cada barragem (foi efectuado um em cada barragem à excepção de Pego do Altar por impossibilidade de acesso) revelaram-se na sua maioria positivos (apenas Roxo e Fonte Cerne foram negativos). Verifica-se assim, na maioria das barragens, a presença da lontra, quer a jusante, quer a montante das barragens estudadas, bem como um uso da grande maioria dos paredões (se bem que o IQA neste tipo de local seja inferior -18,7 indícios/km - quando comparado com média geral - 28 indícios/km).

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados, bem como as ilações deles retiradas, devem ter em consideração o facto das amostragens terem sido concentradas na época seca. Durante esta época, devido ao carácter intermitente dos cursos de água no Alentejo, os reservatórios constituem um "ponto de atracção" para as lontras (quer em termos de presença de água, quer em termos de disponibilidade de presas). Este facto poderá ter influenciado os resultados, pelo que os mesmos necessitam de corroboração na chamada época húmida (época pluviosa).

A elevada percentagem de transectos positivos revela um importante uso destes sistemas nesta altura do ano. As amostragens negativas verificadas nos sistemas lóticos deverão ser resultado precisamente do carácter intermitente destes sistemas (uma vez que correspondem essencialmente a ribeiras secas aquando da amostragem), pelo que não representam locais preferenciais de alimentação para as lontras, excepto se tiverem pegos, que podem constituir locais de captura de lagostim e peixe.

Foi determinado que a composição do habitat presente na área circundante à barragem não influencia a presença da espécie. No entanto, a incorporação da disponibilidade de vegetação total (VEG) revelou-se um importante resultado da necessidade da existência de refúgio para a lontra. O tipo de coberto nas margens acima da área inundável não deverá permitir, na sua maioria, mais do que a presença ocasional da lontra, uma vez que são essencialmente zonas de subcoberto associadas ao montado e algumas zonas de afloramento rochoso, não garantindo refúgio para a espécie e pondo em causa a sua capacidade de reprodução nesta área. No entanto, dado que não foi efectuada prospecção acima da área inundável, esta hipótese carece de confirmação. O perímetro da barragem (PER) resultou como importante mas esta relação deverá ser apenas resultado de um artefacto estatístico: a barragem do Lucefecit, que tem o reservatório mais pequeno (19 km de perímetro) foi igualmente a que menor IQA apresentou (6,9

indícios/km). Isto pode dever-se ao facto desta ter um nível muito reduzido de água e manter os sistemas lóticos adjacentes em condições favoráveis (ribeiras que não secam e que continuam a ter recursos alimentares), o que se traduz numa menor dependência da barragem. Esta hipótese só poderá ser comprovada com amostragens na época húmida, embora pareça ser a mais consistente porque, ao retirar esta barragem da análise, **PER** não voltou a ser seleccionada. Finalmente, o último aspecto que parece influenciar a marcação da lontra e de uma forma mais determinante é a presença de locais adequados para marcação (**LMARC**). A importância dos **LMARC** é conhecida da bibliografia, especialmente neste tipo de habitats (PEDROSO, 1997; SALES-LUÍS, 1998), pois sendo um animal territorial usa locais de marcação proeminentes para colocar os seus indícios. Dado o reduzido nível da água dos reservatórios na altura da prospecção, a área inundável era elevada, pelo que existiam numerosos locais adequados para marcação (essencialmente afloramentos rochosos e pedras isoladas). Tal como já referido, não se observaram diferenças de marcação acentuadas entre barragens. No entanto, da análise das variáveis referidas nos transectos negativos ou menos marcados, é possível afirmar que de uma forma geral a maioria dos transectos negativos aparece associado a zonas com poucos locais de marcação, assim como locais com pouca qualidade para refúgio. Em contrapartida, os transectos de IQA mais elevado são caracterizados por terem abundantes locais de marcação.

No que diz respeito à influência do paredão das barragens, a zona do paredão apresenta sinais de marcação (ou na própria base quando a inclinação é pouco acentuada, ou nas margens imediatamente adjacentes). Igualmente, a linha de água a jusante apresentou marcação. É possível dizer então que existe um aparente contínuo de uso nas barragens, a montante e a jusante do paredão. Por outro lado, não é possível afirmar que esse contínuo seja da responsabilidade de um mesmo indivíduo ou se na realidade, o obstáculo que a estrutura constitui fomenta a separação de indivíduos ou mesmo populações. A capacidade da lontra ultrapassar o obstáculo representado pelo paredão deverá depender do tipo de paredão (tamanho e inclinação), da existência de caminhos paralelos que permitam a deslocação da lontra entre o paredão e a linha de água a jusante, e da distância a essa linha de água. Como balanço é possível sugerir, apesar da superficialidade deste tipo de análise (uma vez que todo este raciocínio é desenvolvido através da observação das características do paredão e da sua área envolvente e da presença de marcação pela lontra), que a lontra deverá ser capaz de ultrapassar o paredão em cerca de 33% das barragens estudadas (Lucefécit, Roxo, Campilhas e Alvito), enquanto que em 33% das barragens (Odivelas, Pego do Altar, Vale do Gaio e Monte Novo) o mesmo será intransponível. Nas restantes quatro barragens, não é possível prever o comportamento da lontra face à presença do paredão, sem recorrer a outras metodologias (e.g. radio-seguimento) para além da simples observação de indícios de presença. Apesar da lontra parecer apresentar uma capacidade razoável de se deslocar em ambiente

terrestre (comprovado pelo facto de terem sido encontrados indícios de presença a alguma distância das linhas de água na envoltória do paredão), parece que nos casos já referidos (Odivelas, Vale do Gaio, Pego do Altar e Monte Novo), o paredão constitui efectivamente um obstáculo intransponível, com todas as consequências negativas ao nível de isolamento populacional.

Estes resultados, essencialmente baseados no número de indícios encontrados, devem ser analisados com alguma precaução pois deve ser tido em conta que o número de dejectos varia com factores como a idade, sexo e condição física do indivíduo, entre outros (MELQUIST & HORNOCKER, 1979; KRUIK *et al.*, 1986; KRUIK & CONROY, 1987). Assim, embora regularmente o IQA seja usado como indicador das preferências de habitat, deve-se sempre ter em conta que pode não retractar essas preferências de uma forma totalmente real.

Ficou comprovado que a lontra utiliza todas as barragens durante a época de amostragem, ao contrário do que seria de esperar tendo em conta a maioria da bibliografia internacional, descrita na introdução. No entanto, com o conhecimento adquirido no estudo da Barragem da Agueira, estes resultados não são inesperados, vindo mesmo a comprovar a hipótese colocada após esse trabalho de que as barragens, em Portugal, são utilizadas pela lontra.

De forma a entender qual será a explicação para este facto, desenvolveu-se um raciocínio com base nas condições óptimas de habitat definidas como áreas com: coberto vegetal de qualidade e presença de tocas e refúgios potenciais (e.g. MACDONALD & MASON, 1982; BAS *et al.*, 1984; reduzida poluição aquática e perturbação humana (e.g. LUNNON & REYNOLDS, 1991; ROBITAILLE & LAURENCE, 2002), e elevada disponibilidade de presas (e.g. KRUIK *et al.*, 1993; BEJA, 1996). As duas primeiras condições não se verificam. A primeira dada as características da área inundável, que pode durante a época seca ter mais de 50 metros, e as características do habitat circundante, pobre em refúgios. A segunda essencialmente porque se verificam actividades que causam perturbação, mas também porque a qualidade da água é reduzida especialmente na época seca. O grau de perturbação humana inclui a criação de estradas e carreiros nas margens, intensa circulação de embarcações devido à pesca desportiva e à realização de desportos náuticos, criação e pastoreio de gado, campismo selvagem, entre outras. Assim, o factor determinante para o uso das barragens pela lontra deverá ser a disponibilidade alimentar (à semelhança do que tinha já sido avançado no trabalho da Agueira – PEDROSO, 1997; SALES-LUÍS, 1998). Os reservatórios fornecem alimento à lontra durante todo o ano, ao contrário da maioria dos cursos de água associados à barragem que, para além de não serem muito numerosos, secam durante parte do ano, constituindo uma fonte irregular de alimento. Nas barragens estudadas, as espécies chave na alimentação da lontra parecem ser o lagostim (*Procambarus clarkii*), a carpa (*Cyprinus carpio*), e em menor grau, a perca (*Lepomis gibbosus*) e o achigã (*Micropterus salmoides*) durante a época seca. No entanto, não se pode afirmar que a lontra leva a cabo todo o seu ciclo de vida nas margens da barragem, não tendo sido

encontrado indícios que permitem pôr a hipótese de que a reprodução desta espécie possa ter ocorrido neste espaço.

De uma forma geral, é possível que a lontra utilize quer os reservatórios das barragens, que lhe fornecem o alimento, quer os cursos de água adjacentes, que lhe proporcionam melhores condições de refúgio por o coberto vegetal ser mais diverso e estruturado do que nas margens artificializadas da barragem. Durante a época seca, a importância destes sistemas léticos aumenta correlativamente com a diminuição das condições nos sistemas lóticos adjacentes. Este cenário só pode ser confirmado através da captura de indivíduos e seguimento por telemetria, ou por recurso a análises moleculares que permitam a identificação individual a partir de dejectos. Só assim será possível obter informações sobre o uso do espaço e do tempo, a configuração dos territórios e os parâmetros populacionais. A abordagem referida também permitirá obter um melhor entendimento de até que ponto a presença do paredão da barragem constitui um obstáculo à livre circulação de lontras, contribuindo ou não para o isolamento genético e fragmentação das populações.

Assim, como conclusão principal, é possível afirmar que a aparente elevada abundância de lontras em Portugal promove a ocupação de habitats sub-óptimos por parte desta espécie, como as grandes barragens, essencialmente devido à elevada disponibilidade de presas e à proximidade de sistemas lóticos com boas condições de refúgio.

No entanto, as implicações conservacionistas destes resultados devem ser discutidas num contexto mais global. Paralelamente à implementação do Empreendimento de Fins Múltiplos de Alqueva (EFMA), associado ao Programa de Minimização para o Património Natural da Área de Regolfo de Alqueva e Pedrógão, decorreram estudos de monitorização de algumas espécies chave. Um desses estudos monitorizou a lontra nessa área (1999-2003) (SANTOS-REIS *et al.*, 2003). O que se verificou foi que a desmatação/desarborização (que precedeu o enchimento) promoveu a destruição de vastas áreas de habitats de utilização preferencial criando uma situação de elevada instabilidade populacional com a necessidade de deslocamento para outras áreas mais favoráveis. O enchimento teve efeitos ainda mais perturbadores do que a desmatação/desarborização, pois para além de as condições de refúgio serem inexistentes, a capacidade de captura das presas por parte da lontra foi reduzida (SANTOS-REIS *et al.*, 2003). Dada a sua densidade populacional favorável na área de estudo (18 indivíduos capturados em 40 dias e em 11 linhas de água principais) (PEDROSO & SALES-LUÍS, *com. pess.*), é previsível que, a longo prazo, a lontra repovoe a barragem e torne a estabilizar a sua densidade populacional, embora a capacidade de suporte do meio anterior à implementação da barragem fosse certamente superior à que se virá a registar a longo prazo (SANTOS-REIS *et al.*, 2003). O exemplo de Alqueva, bem como o facto de ter ficado provado neste estudo, e no anterior realizado na Aguieira (PEDROSO, 1997), que nem todo o perímetro das barragens estudadas é usado pela lontra deve assim ser indicador

do que é fundamental retirar em termos de conclusão: o facto da lontra usar as grandes barragens, demonstrando uma evidente capacidade de adaptação a estes habitats, não é indicador de que a implementação destas estruturas seja benéfico para a espécie, pois o cenário pré-barragem deveria ser mais positivo, por representar uma maior disponibilidade de habitat (em termos de sistemas lóticos) com condições de refúgio e de reprodução. A presença de uma grande barragem poderá representar um incremento da disponibilidade de presas, mas este não será tão benéfico se esta vier substituir sistemas já com boas condições de disponibilidade de presas, especialmente porque não oferece qualidade de refúgio.

Embora os trabalhos desenvolvidos já permitam responder a algumas questões, ainda existem perguntas sem resposta e aspectos que carecem de uma análise mais aprofundada. Para além das questões já referidas acima, é fundamental estudar a situação nas outras estações do ano, para verificar a reacção da espécie a condições diferentes (como a presença de água, e conseqüente maior abundância de presas, nos sistemas lóticos), para uma análise temporal integrada do uso dos sistemas lênticos e dos sistemas lóticos associados. A um nível mais geral, é ainda importante alargar este tipo de estudo a barragens localizadas noutras regiões do país e com diferentes características estruturais (e.g. barragem que se assemelham mais a um rio com elevado caudal, como são algumas barragens do Douro ou do Tejo, onde se prevê que os efeitos do paredão sejam mais drásticos e as comunidades ícticas são diferentes).

#### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Dr.<sup>a</sup> Teresa Sales-Luís pelo apoio prestado no trabalho de campo, bem como à Dr.<sup>a</sup> Paula Matono pela cedência de bibliografia para a análise das comunidades piscícolas.

#### REFERÊNCIAS

- BAS, N., JENKINS, D. & ROTERY, P. (1984). Ecology of otters in the Northern Scotland. V: The distribution of otter (*Lutra lutra*) faeces in relation to bankside vegetation on the river Dee in summer 1981. *J. Appl. Ecol.* 21:507-513.
- BEJA, P. (1996). An analysis of otter *Lutra lutra* predation on introduced American crayfish *Procambarus clarkii* in Iberian streams. *J. Appl. Ecol.* 33:1156-1170.
- FERREIRA, M. T., DIAS, M. J. & GODINHO, F. N. (1999). *A pesca de competição em Portugal. 1ª parte – bacias do Guadiana, Sado, Mira, Arade e Ribeiras do Alentejo*. Departamento de Engenharia Florestal do Instituto Superior de Agronomia/Direcção Geral das Florestas.
- FOSTER-TURLEY, P., MACDONALD, S. & MASON, C. (1990). *Otters: an action plan for their conservation*. IUCN Species Survival Commission. Gland. Switzerland.
- HOUSTON, A. I. & MCNAMARA, J. M. (1994). Models of diving and data from otters: comments on Nolet *et al.* (1993). *J. Anim. Ecol.* 63:1004-1006.
- KRUUK, H. (1995). *Wild otters predation and population*. Oxford University Press.

- KRUUK, H. D., CARSS, N., CONROY, J. W. . & DURBIN, L. (1993). Otter (*Lutra lutra*) numbers and fish productivity in two rivers in north-east Scotland. *Symposia of the Zoological Society of London* 65:171-191.
- KRUUK, H. & CONROY, J. W. (1987). The use of spraints to survey populations of otters *Lutra lutra*. *Biol. Conserv.* 35:187-194.
- KRUUK, H., CONROY, J. W., GLIMMERVEEN, U. & OUWERKERK, E. J. (1986) - The use of spraints to survey populations of otters *Lutra lutra*. *Biol. Conserv.* 35: 187-194.
- LUNNON, R. M. & REYNOLDS, J. D. (1991). Distribution of the otter *Lutra lutra* in Ireland, and its value as an indicator of habitat quality. Pp. 435-443 in *Bioindicators and Environmental Management*. D. W. Jeffrey & B. Madden, eds. Academic Press Limited. London.
- MACDONALD, S. M. & MASON, C. F. (1982). The otter *Lutra lutra* in central Portugal. *Biol. Conserv.* 22: 207-215.
- MACDONALD, S. M. & MASON, C. F. (1984). Otters in Marroco. *Oryx* 18: 157-159.
- MACDONALD S. M. & MASON, C. F. (1994). Status and conservation needs of the otter (*Lutra lutra*) in the western Palaearctic. Council of Europe Press. *Nature and Environment* 67:1-54.
- MELQUIST, W. E. & HORNOCKE, M. G. (1979). *Methods and techniques for studying and censusing river otter populations*. United States, Forest, Wildlife and Range Experiment Station. Technical Report 8: 1-17.
- MICHELOT, J. L. & BENDELÉ, R. (1995). Statut de la loutre dans le bassin du Rhône et le département de l'Ardèche. *Cah. Ethol.* 15 (2-3-4): 223-232.
- PEDROSO, N. M. (1997). *A lontra (Lutra lutra Linnaeus, 1758) na barragem da Aguieira*. Relatório de Estágio Profissionalizante. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- PRENDA, J. & GRANADO-LORENCIO, C. (1995). The relative influence of riparian habitat structure and fish availability on otter *Lutra lutra* L. sprainting activity in a small Mediterranean catchment. *Biol. Conserv.* 76:9-15.
- ROBITAILLE, J. F. & LAURENCE, S. (2002). Otter, *Lutra lutra*, occurrence in Europe and in France in relation to landscape characteristics. *Animal Conservation* 4: 337-344.
- RUIZ-OLMO, J. (2001). *Pla de Conservació de la Llúdriga a Catalunya: Biologia i Conservació*. Generalitat de Catalunya. Departament de Medi Ambient.
- SALES-LUÍS, T. (1998). Análise comparativa da utilização dos recursos de uma barragem e seus tributários pela lontra: barragem da Aguieira. Relatório de Estágio. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- SANTOS-REIS, M., FERREIRA, J. P., PEDROSO, N., BALTAZAR, C., MATOS, H., PEREIRA, I., GRILLO, C., SALES-LUÍS, T., SANTOS, M. J., CÂNDIDO, A. T., SOUSA, I. & RODRIGUES, M. (2003). *Projectos de Monitorização de Mamíferos. Monitorização de Carnívoros. Relatório Final. 2ª Fase de Monitorização. (Programa de Minimização para o Património Natural)*. Centro de Biologia Ambiental (FCUL) e Centro de Estudos da Avifauna Ibérica (CEAI). 207 págs.
- TRINDADE, A., FARINHA, N. & FLORÊNCIO, E. (1998). *A Distribuição da lontra Lutra lutra em Portugal. Situação em 1995*. Instituto da Conservação da Natureza/Divisão de Espécies Protegidas/Programa Life.

## ÍNDICE POR AUTORES

- Carvalho, S., Moura, A., Falcão, M., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Dinis, M. T. & Pousão-Ferreira, P. - Dinâmica inicial das comunidades de macrofauna bentónica numa piscicultura em regime semi-intensivo. 183
- Clemente, A.S., Rego, F.C. & Correia, O. - Padrões de sobrevivência de sementes em grupos funcionais de resposta ao fogo. 123
- Cruz, M. J., Andrade, P., Pascoal, S. & Rebelo, R. - Colonização de charcos temporários pelo lagostim-vermelho-americano, *Procambarus clarkii*. 79
- Custódio, L., Fernandes, N., Carneiro, M. F., Romano, A. - Criopreservação de micrósporos de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.). 7
- Gonçalves, S., Romano, A., Nolasco, G. & Fonseca, F. - Variabilidade genética em populações algarvias de *Drosophyllum lusitanicum*. 21
- Luz, E., Mendes, M. L. & Romano, A. - Multiplicação *in vitro* de *Ruscus aculeatus* L. 133
- Maia, H. & Valente, A. - Biology of the roach (*Chondrostoma macrolepidotus*) population in the Protected Area of the Lagoons of Bertandos and of São Pedro de Arcos (Northern Portugal). 65
- Martins, M. D., Almeida, R. & Romano, A. - Influência do tipo de explantado e dos reguladores de crescimento na indução de rebentos em *Rhododendron ponticum* subsp. *baeticum*. 43
- Moura, A., Boaventura, D., Cúrdia, J., Carvalho, S., Pereira, P., Cancela da Fonseca, L., Leitão, F. M., Santos, M. N. & Monteiro, C. C. - Benthic succession on an artificial reef in the south of Portugal - preliminary results. 169
- Nunes, A., Brugnoli, E., Máguas, C. & Correia, O. - Efeito da deposição de poeiras calcárias na absorvância foliar de espécies mediterrânicas. 143
- Oliveira, G. & Peñuelas, J. - Respostas morfológicas e fisiológicas das folhas de duas espécies mediterrânicas a factores ambientais durante o Inverno. 53
- Pedroso, N., Santos-Reis, M. & Vasconcelos, L. - O Uso de Grandes Barragens pela Lontra no Alentejo. 211
- Pinto-Cruz, C., Simões, M. P., Gazarini, L. & Espírito-Santo, M. D. - Dinâmica de uma comunidade de *Cistus salviifolius* L., após intervenção experimental. Evolução do coberto vegetal. 199

- Ribeiro, A. R., Moura, I., Carneiro, M. F. & Romano, A. - Crioconservação de ápices vegetativos de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. 31
- Santos, J., Schreck Reis, C., Gonçalves, M. T. & Freitas, H. - Micorrizas em *Ammophila arenaria* – comparação entre dois sistemas dunares. 101
- Silva, P., Peyroteo, P., Correia, A. I., Branquinho, C. & Correia, O. - Contributo para a caracterização da estrutura e diversidade da vegetação da Paisagem Protegida da Arriba Fóssil da Costa da Caparica. 153
- Simões, M. P., Pereira, I. P., Pinto-Cruz, C. & Gazarini, L. - Dinâmica de uma comunidade de *Cistus salviifolius* L., após intervenção experimental. Padrões de regeneração da estrutura e biomassa. 91
- Vilaça, E. & Correia, O. - Contributo para a caracterização da vegetação da Mata do Bombarral. 109

**Endereço para pedido ou envio de publicações.**  
*Address for order or publication sending.*

Biblioteca  
Jardim Botânico (M.N.H.N.)  
Universidade de Lisboa  
Rua da Escola Politécnica, 58  
1250-102 LISBOA  
PORTUGAL

TELEf.: / PHONE: ++.351.213921801  
FAX: ++.351.213921841  
E-MAIL: [jbbiblio@fc.ul.pt](mailto:jbbiblio@fc.ul.pt)

BACKFILE ISSUES  
of this journal are available on  
35 MM MICROFILM  
University Microfilms

A Xerox Company Ann Arbor, Michigan 48106  
Write for catalog and complete information.