



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

ESTUDOS BIOTECNOLÓGICOS EM *DROSOPHYLLUM LUSITANICUM* L. COM VISTA À SUA CONSERVAÇÃO

Tese para a obtenção do grau de Doutor no ramo de Biologia, especialidade de Biotecnologia

SANDRA MARISA GOMES GONÇALVES

Orientador: Doutora Anabela Maria Lopes Romano
Professora Associada com Agregação da Universidade do Algarve

Constituição do júri:

Presidente: Doutor João Pinto Guerreiro
Professor Catedrático e Reitor da Universidade do Algarve

Vogais: Doutora Helena Maria de Oliveira Freitas
Professora Catedrática da Universidade de Coimbra
Doutora Olinda da Conceição Pinto Carnide
Professora Catedrática da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão
Professor Catedrático da Universidade do Algarve
Doutora Anabela Maria Lopes Romano
Professora Associada com Agregação da Universidade do Algarve
Doutora Maria Margarida Moutinho Girão de Oliveira Barroso
Professora Auxiliar com Agregação da Universidade de Lisboa
Doutora Filomena Maria Coelho Guerra da Fonseca
Professora Auxiliar da Universidade do Algarve

FARO
2007



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

ESTUDOS BIOTECNOLÓGICOS EM *DROSOPHYLLUM LUSITANICUM* L. COM VISTA À SUA CONSERVAÇÃO

Tese para a obtenção do grau de Doutor no ramo de Biologia, especialidade de Biotecnologia

SANDRA MARISA GOMES GONÇALVES

Orientador: Doutora Anabela Maria Lopes Romano
Professora Associada com Agregação da Universidade do Algarve

Constituição do júri:

Presidente: Doutor João Pinto Guerreiro
Professor Catedrático e Reitor da Universidade do Algarve

Vogais: Doutora Helena Maria de Oliveira Freitas
Professora Catedrática da Universidade de Coimbra

Doutora Olinda da Conceição Pinto Carnide
Professora Catedrática da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão
Professor Catedrático da Universidade do Algarve

Doutora Anabela Maria Lopes Romano
Professora Associada com Agregação da Universidade do Algarve

Doutora Maria Margarida Moutinho Girão de Oliveira Barroso
Professora Auxiliar com Agregação da Universidade de Lisboa

Doutora Filomena Maria Coelho Guerra da Fonseca
Professora Auxiliar da Universidade do Algarve

FARO
2007

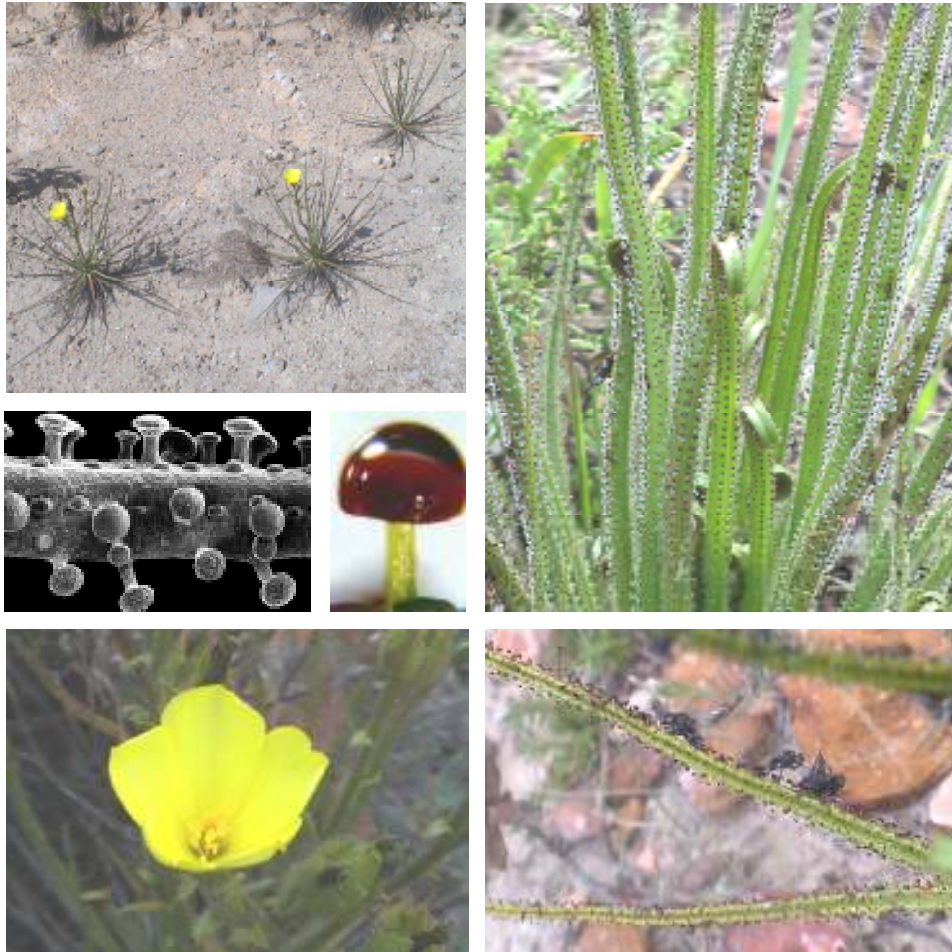
DECLARAÇÃO

Na presente dissertação apresentam-se resultados que foram, ou serão, alvo de publicação em colaboração com A Romano, JMF Nogueira, T Grevenstuk, J Jesus, M Ferraz, C Quintas, MN Gaspar, F Fonseca, G Nolasco, MA Gonçalves, O Ameixa.

A autora declara que interveio na concepção e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos enviados para publicação.

Faro, Julho de 2007

Sandra Marisa Gomes Gonçalves



Drosophyllum lusitanicum (L.) Link

“...o primeiro nome botânico desta magnífica carnívora foi *chamaeleontioides*, por causa da forma circinada da pré-folheação, enrolada em báculo, que se assemelha à extremidade em espiral da cauda dos camaleões. Clusius, chamou-lhe *Ros solois lusitanicus foliis asphodeli minoris*. ...o botânico alemão H.F. Link criou o género *Drosophyllum* que significa “folha de orvalho”

Catarino *et al.* (1997)
Jardim Botânico da Universidade de Lisboa
Museu de História Natural

Aos meus queridos Pais e Irmã
Ao Mahomed

DEDICO

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho

À Prof. Doutora Anabela Romano agradeço o desafio que me colocou no início deste trabalho, a orientação científica e todos os meios colocados à disposição para o seu desenvolvimento no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Algarve. Agradeço todos os conhecimentos que me transmitiu, todas as críticas e, constantes palavras de incentivo e confiança que tanta força me deram ao longo destes anos. Agradeço, ainda, a total disponibilidade dedicada na correcção desta dissertação e todas as oportunas críticas e sugestões. Por tudo, mas em especial, pela amizade com que sempre me rodeou o meu Muito Obrigada!

Ao Prof. Doutor Gustavo Nolasco e à Prof. Doutora Filomena Fonseca agradeço as condições materiais colocadas à disposição para a realização dos estudos de biologia molecular.

À Prof. Doutora Filomena Fonseca quero expressar os meus sinceros agradecimentos pela paciência e disponibilidade, por todos os ensinamentos práticos e teóricos que me transmitiu que foram de importância vital para a realização deste trabalho. Agradeço-lhe ainda a preciosa ajuda no tratamento e análise dos dados de diversidade genética de populações e na correcção de parte desta dissertação.

À Prof. Doutora Célia Quintas e à Prof. Doutora Nelma Gaspar agradeço as condições materiais colocadas à minha disposição para a realização dos ensaios microbiológicos, todos os ensinamentos que me transmitiram e, todo o entusiasmo e disponibilidade com que sempre me receberam. Agradeço à Prof. Doutora Teresa Gonçalves da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela cedência das estirpes de leveduras isoladas clinicamente.

À Prof. Doutora Albertina Gonçalves agradeço toda a ajuda prestada e as condições colocadas à disposição na elaboração dos ensaios de avaliação da capacidade insecticida no Laboratório de Protecção Integrada da Universidade do Algarve. Agradeço à Eng.^a Olga Ameixa a ajuda na realização destes ensaios, em especial na cultura dos insectos.

Ao Prof. Doutor José Nogueira agradeço a ajuda e os meios colocados à disposição para a análise química dos extractos por GC-MS no Laboratório de Cromatografia e Electroforese Capilar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Os meus agradecimentos à Prof. Doutora Lia Ascensão por me ter recebido com tanta simpatia e disponibilidade no Laboratório de Citologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e pela valiosa ajuda na realização e tratamento das fotografias à lupa e Microscópio Electrónico de Varrimento.

Ao meu amigo Jorge Jesus, grande responsável pelo início deste trabalho, agradeço a ajuda na localização das populações Algarvias de *D. lusitanicum*. Ao Doutor Fernando Ojeda da Universidade de Cádiz agradeço a localização da população Espanhola de *D. lusitanicum* estudada neste trabalho. Agradeço também ao Jardim Botânico da Universidade de Lisboa pela cedência do material vegetal das espécies *Drosera binata* e *Drosera capensis*.

À Ana Luísa Escapa, ao Marco Ferraz e ao Tomás Grevenstuk agradeço a ajuda na realização de alguns dos trabalhos experimentais. Ao Tomás Grevenstuk agradeço ainda a revisão rigorosa desta dissertação.

À Doutora Luísa Custódio à Eng.^a Rosália Almeida agradeço o companheirismo, o incentivo e a amizade durante estes anos de convívio no laboratório.

Aos meus amigos e companheiros de todos os dias, Carla Santos, Filomena Fonseca, Gonçalo Silva, Márcia Vicente e Xoan Fuentes, agradeço pelo apoio e incentivo mas,

principalmente, pela companhia e boa disposição. À minha amiga Mafalda Gomes agradeço pelas constantes palavras de incentivo, em especial pela célebre frase "tu és forte tu consegues", nas alturas de desânimo. Agradeço-lhe acima de tudo pela Amizade!

Agradeço o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia sob a forma de uma bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/19850/2004).

Ao Mahomed agradeço o apoio e incentivo constantes mas, acima de tudo, a enorme paciência nos momentos críticos.

Aos meus Pais e à minha irmã, creio não ser possível expressar por palavras todo o meu agradecimento. Agradeço-lhes por toda a força, confiança, palavras de incentivo e compreensão pelos momentos de mau humor e pelas ausências prolongadas. A eles o meu mais profundo Obrigado por tudo mas, acima de tudo, por todo o Amor com que sempre me rodearam.

Os meus agradecimentos a todos, que embora não mencionados, tenham de algum modo contribuído para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

μ A	microampère
AFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ANOVA	análise de variância
APS	persulfato de amónio
ATCC	“american type culture collection”
atm	atmosfera
BA	benziladenina
bp	pares de bases
BP	bandas polimórficas
BSA	albumina sérica bovina
CFU	unidades formadoras de colónias
D	distâncias genéticas entre pares de populações
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	tetra-acetato de etileno diamina
EUA	extracção assistida por ultra-sons
<i>g</i>	força gravitacional
g, mg, μ g, ng	grama, miligrama, micrograma, nanograma
GA ₃	ácido giberélico
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
Gst	coeficiente de diferenciação
h	coeficiente de heterozigocidade de Nei (1973)
h, min, s	hora, minuto, segundo
He	coeficiente de heterozigocidade de Nei (1987)
HR	humidade relativa
Hs	diversidade média entre populações
Ht	diversidade genética total
I	índice de Shannon
IAA	ácido indol 3-acético
IBA	ácido indol 3-butírico
ISSR	sequências simples repetidas inter-passadas
ITS	espaçador interno transcrito
Kin	6-furfurilaminopurina (= cinetina)
l, ml, μ l	litro, mililitro, microlitro
LB	meio de cultura “Luria Bertani”
m, cm, mm, nm	metro, centímetro, milímetro, nanómetro
M, mM	molar, milimolar
MEGA	“molecular evolutionary genetics analysis”
MHA	meio de cultura “Mueller Hinton Agar”
MHB	meio de cultura “Mueller Hinton Broth”
MIC	concentração mínima inibitória
MS	meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)
na	número de alelos observado por locus
NAA	ácido α -naftaleno 1-acético
NCCLS	“national committee for clinical laboratory standards
ne	número efectivo de alelos por locus

Nm	nível de fluxo genético
°C	grau centígrado
P	probabilidade estatística
p/v	peso/volume
PCA	Meio de cultura “Plat Count Agar”
PCR	reação em cadeia da polimerase
POPGEN	“population genetics”
RAPD	DNA polimórfico amplificado ao acaso
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
rpm	rotações por minuto
SEM	microscopia electrónica de varrimento
SPSS	“statistical package for the social sciences”
SSCP	polimorfismos conformacionais monocatenários
TAE	tris – acetato - EDTA
TBE	tris – borate - EDTA
TDZ	tidiazurão
TEMED	n,n,n',n', tetrametilendiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TSA	meio de cultura “Tryptone Soya Broth”
Tween 20	polioxietileno sorbitano monolaurato
UPGMA	“unweighted pair group method of arithmetic mean”
UV	radiação ultravioleta
V, kV	volt, kilovolt
v/v	volume/volume
VNTR	número variável de repetições em tandem
X-Gal	5-bromo-4 cloro-3 indolyl-β-D-galactopiranósido
Zea	zeatina

NOME: Sandra Marisa Gomes Gonçalves

FACULDADE: Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

ORIENTADOR: Prof. Doutora Anabela Romano

DATA: Julho de 2007

TÍTULO: Estudos biotecnológicos em *Drosophyllum lusitanicum* L. com vista à sua conservação

RESUMO

Este trabalho centrou-se na espécie ameaçada de extinção *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Drosophyllaceae), uma planta insectívora endémica do Oeste da Península Ibérica e Norte de Marrocos. Com este trabalho pretendeu-se aumentar o conhecimento científico nesta espécie e contribuir para a implementação de estratégias para a sua conservação. No Capítulo II estudou-se a germinação *in vitro* de sementes e a partir dos germinantes obtidos desenvolveu-se um protocolo de micropropagação, com vista à produção de plantas em larga escala. No Capítulo III estudou-se a variabilidade genética de populações Algarvias desta espécie e uma população localizada no Sul de Espanha, efectuou-se a comparação da variabilidade genética de indivíduos adultos e plântulas provenientes da germinação de sementes, obtendo-se informações importantes para a aplicação de estratégias de conservação para esta espécie. Foram estudadas duas técnicas para conservar germoplasma de *D. lusitanicum*, a criopreservação de sementes e a conservação de rebentos *in vitro* em condições mínimas de crescimento (Capítulo IV). A actividade antimicrobiana e insecticida, e os efeitos alelopáticos de extractos de *D. lusitanicum* foram comprovados no Capítulo V. Os extractos foram analisados por GC-MS, identificando-se a naftoquinona plumbagina como sendo o composto maioritário. A extracção deste composto foi optimizada, no sentido de aumentar a sua recuperação para futuras aplicações.

Palavras-chave: actividade biológica; conservação de germoplasma; diversidade genética; germinação *in vitro*; micropropagação; marcadores ISSR.

TITLE: Biotechnological studies in *Drosophyllum lusitanicum* L. for its conservation.

ABSTRACT

This work was focused on the endangered species *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Drosophyllaceae), an insectivorous plant endemic to the western Iberian Peninsula and northern Morocco. The general purposes of this work were to increase scientific knowledge in this species and to contribute for the implementation of strategies for its conservation. In Chapter II the *in vitro* germination of seeds was studied and a protocol to micropropagate this species was developed having in mind the plant production in large scale. In Chapter III the genetic variability of populations from the Algarve region and one population from the South of Spain was analysed and the genetic variability of adults and seedlings was compared. These studies supplied important information for the application of conservation strategies for this species. Two techniques were studied for *D. lusitanicum* germplasm conservation, cryopreservation of seeds and *in vitro* minimal growth conservation of shoots (Chapter IV). The antimicrobial and insecticidal activities and the allopathic effects of *D. lusitanicum* extracts were demonstrate in Chapter V. The extracts were analysed by GC-MS and the naphthoquinone plumbagin was the major compound found. The extraction of this compound was optimized to improve its recovery for further application.

Key-words: biological activity; germplasm conservation; genetic diversity; *in vitro* germination; ISSR markers; micropropagation.

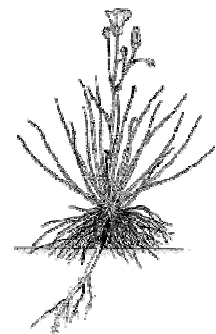
Agradecimentos	ix
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. Capítulo I: Introdução geral	1
1.1. Os recursos genéticos e o seu valor.....	3
1.1.1. Biodiversidade.....	3
1.1.2. Os recursos genéticos vegetais.....	5
1.2. <i>Drosophyllum lusitanicum</i>	7
1.2.1. Aspectos taxonómicos.....	7
1.2.2. Distribuição geográfica.....	8
1.2.3. Aspectos morfológicos e botânicos.....	10
1.2.4. Ecologia e necessidade de conservação.....	15
1.3. Objectivos do trabalho.....	16
1.4. Referências bibliográficas.....	17
Estampa 1.1.....	21
Estampa 1.2.....	23
2. Capítulo II: Propagação <i>in vitro</i> de <i>D. lusitanicum</i>	25
2.1. Introdução.....	27
2.1.1. Aspectos gerais da propagação de plantas <i>in vitro</i>	27
2.1.2. Fases do processo de micropropagação.....	29
2.1.3. O porquê de propagar <i>in vitro</i> <i>D. lusitanicum</i>	33
2.1.4. Objectivos.....	35
2.2. Materiais e métodos.....	36
2.2.1. Material vegetal.....	36
2.2.2. Germinação de sementes <i>in vitro</i>	37
2.2.3. Multiplicação dos rebentos.....	39
2.2.4. Enraizamento dos rebentos e aclimatização das plântulas.....	40
2.2.5. Meios de cultura.....	41
2.2.6. Manipulação do material vegetal.....	42
2.2.7. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados.....	42
2.2.8. Estudos de ultraestrutura por Microscopia Electrónica de Varrimento.....	42
2.3. Resultados e discussão.....	43
2.3.1. Germinação de sementes <i>in vitro</i>	43
2.3.2. Multiplicação dos rebentos.....	50
2.3.3. Enraizamento dos rebentos e aclimatização das plântulas.....	54
2.4. Conclusões.....	63
2.5. Referências bibliográficas.....	65
Estampa 2.1.....	73
Estampa 2.2.....	75
Estampa 2.3.....	77
Estampa 2.4.....	79
3. Capítulo III: Estudos de diversidade genética em <i>D. lusitanicum</i>: implicações para a sua conservação	81
3.1. Introdução.....	83
3.1.1. Variabilidade e estrutura genética de populações vegetais.....	83
3.1.2. Estrutura genética de populações de <i>D. lusitanicum</i> na região do Algarve.....	85
3.1.3. Utilização de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética.....	87

3.1.4. Objectivos.....	90
3.2. Materiais e métodos.....	91
3.2.1. Amostragem e extracção de DNA.....	91
3.2.2. ITS.....	93
3.2.2.1. Amplificação da região ITS do rDNA por PCR.....	93
3.2.2.2. Análise do produto de amplificação por electroforese.....	93
3.2.2.3. Análise de polimorfismo da conformação de cadeia simples (SSCP).....	94
3.2.2.3.1. Desnaturação do produto de amplificação por PCR.....	94
3.2.2.3.2. Electroforese.....	94
3.2.2.3.3. Coloração dos géis com nitrato de prata.....	95
3.2.2.4. Clonagem dos produtos de PCR.....	95
3.2.2.5. Amplificação, electroforese e SSCPS das colónias transformadas.....	98
3.2.2.6. Cálculo do coeficiente de heterozigocidade.....	98
3.2.2.7. Extracção do DNA do plasmídeo em pequena escala (“miniprep”).....	99
3.2.2.8. Alinhamento das sequências obtidas e construção de dendrogramas.....	100
3.2.3. Análise de marcadores cloroplastidiais por PCR-RFLP.....	100
3.2.3.1. Material vegetal.....	100
3.2.3.2. Amplificação por PCR.....	100
3.2.3.3. Restrição com endonucleases.....	102
3.2.4. Análises ISSR.....	103
3.2.4.1. Material vegetal.....	103
3.2.4.2. Amplificação PCR-ISSR.....	104
3.2.4.3. Análises do produto de amplificação por electroforese.....	104
3.2.4.4. Análise estatística.....	105
3.3. Resultados e discussão.....	106
3.3.1. Análise da região ITS do rDNA.....	109
3.3.1.1. Coeficiente de heterozigocidade.....	109
3.3.1.2. Análise da sequências nucleotídicas.....	113
3.3.2. Análise de marcadores cloroplastidiais por PCR-RFLP.....	116
3.3.3. ISSR.....	119
3.3.3.1. Variabilidade genética intrapopulacional.....	119
3.3.3.2. Diferenciação genética das populações.....	129
3.3.4. Implicações para a conservação.....	137
3.4. Conclusões.....	139
3.5. Referências bibliográficas.....	141
4. Capítulo IV: Conservação <i>ex situ</i> de germoplasma de <i>D. lusitanicum</i>.....	149
4.1. Introdução.....	151
4.1.1. Estratégias de conservação de recursos fitogenéticos.....	151
4.1.2. Conservação <i>in vitro</i>	157
4.1.3. Objectivos.....	161
4.2. Materiais e métodos.....	161
4.2.1. Conservação de rebentos <i>in vitro</i> em condições mínimas de crescimento.....	161
4.2.2. Criopreservação de sementes.....	162
4.2.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados.....	163
4.3. Resultados e discussão.....	164
4.3.1. Conservação de rebentos <i>in vitro</i> em condições mínimas de crescimento.....	164
4.3.2. Criopreservação de sementes.....	168
4.4. Conclusões.....	172
4.5. Referências bibliográficas.....	173
Estampa 4.1.....	179
Estampa 4.2.....	181
5. Capítulo V: Avaliação da actividade biológica de extractos de <i>D. lusitanicum</i>.....	183
5.1. Introdução.....	185

5.1.1. Importância dos compostos de origem vegetal.....	185
5.1.2. Propriedades biológicas de <i>Drosophyllum lusitanicum</i>	188
5.1.3. Objectivos.....	189
5.2. Materiais e métodos.....	190
5.2.1. Material vegetal.....	190
5.2.2. Análise química dos extractos por GC-MS.....	191
5.2.3. Avaliação da capacidade antimicrobiana.....	192
5.2.3.1. Microrganismos.....	192
5.2.3.2. Método de difusão em agar.....	193
5.2.3.3. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC).....	195
5.2.3.4. Avaliação da actividade antimicrobiana do extracto de rebentos de <i>D. lusitanicum</i> a crescer <i>in vitro</i>	196
5.2.4. Avaliação da capacidade insecticida.....	196
5.2.4.1. Ensaio de contacto.....	197
5.2.4.2. Ensaio de ingestão.....	197
5.2.4.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados.....	198
5.2.5. Efeito alelopático de extractos aquosos de <i>D. lusitanicum</i>	198
5.2.5.1. Preparação de extractos aquosos.....	198
5.2.5.2. Efeito dos extractos na germinação de sementes de alface e trigo.....	199
5.2.5.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados.....	200
5.2.6. Optimização da extracção de plumbagina.....	200
5.3. Resultados e discussão.....	202
5.3.1. Análise química dos extractos.....	202
5.3.2. Avaliação da capacidade antimicrobiana.....	205
5.3.3. Avaliação da capacidade insecticida.....	211
5.3.4. Efeitos alelopáticos de extractos aquosos de <i>D. lusitanicum</i>	215
5.3.5. Optimização da extracção de plumbagina.....	223
5.4 Conclusões.....	227
5.5. Referências bibliográficas.....	229
Estampa 5.1.....	237
Estampa 5.2.....	239
Conclusões gerais.....	241
Anexos.....	247

Capítulo I

Introdução geral



1.1. OS RECURSOS GENÉTICOS E O SEU VALOR

1.1.1. Biodiversidade

O termo e o conceito de biodiversidade têm adquirido largo uso entre biólogos, ambientalistas, líderes políticos e cidadãos em geral desde 1986. A biodiversidade refere-se à variedade de vida na Terra, incluindo a variedade genética dentro das populações e espécies, a variedade de espécies da flora, da fauna, de fungos macroscópicos e de microrganismos, a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas; e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas formados pelos organismos (Wilson, 1992). Refere-se tanto ao número de diferentes categorias biológicas quanto à abundância relativa dessas categorias e inclui variabilidade ao nível local, complementaridade biológica entre habitats e variabilidade entre paisagens. Assim, a biodiversidade inclui a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes. Embora não haja uma definição consensual, a biodiversidade pode ser considerada a medida da diversidade relativa entre organismos presentes em diferentes ecossistemas. Esta definição inclui diversidade dentro da espécie, entre espécies e diversidade comparativa entre ecossistemas. Biodiversidade pode também ser definida como a totalidade dos genes, espécies e ecossistemas de uma região. Esta definição unifica os três níveis tradicionais de diversidade entre seres vivos: diversidade genética (diversidade dos genes numa espécie), diversidade de espécies (diversidade entre espécies) e diversidade de ecossistemas (inclui todos os níveis de variação desde o genético).

De uma maneira geral, a biodiversidade pode ser considerada como sinónimo de "Vida na Terra", resultado de mais de 3 mil milhões de anos de evolução. O número exacto de espécies actualmente existente é desconhecido, no entanto, estimativas recentes

apontam para um mínimo de 5 milhões e um máximo de 100 milhões, dos quais foram identificados apenas 1,7 milhões. Para além da grande diversidade de espécies de plantas e animais existentes, devemos também considerar que dentro de cada espécie ou população cada indivíduo é geneticamente diferente. Assim, a diversidade genética é geralmente definida como sendo a quantidade de variabilidade genética entre indivíduos de uma variedade, ou população de uma espécie. Ela resulta das diferenças genéticas entre indivíduos e pode ser manifestada em diferenças nas sequências de DNA, nas características bioquímicas, nas propriedades fisiológicas ou nos caracteres morfológicos. Podemos distinguir quatro componentes da diversidade genética, o número de diferentes formas (alelos) encontradas em diferentes populações, a sua distribuição e, o efeito que têm na performance e distinção entre diferentes populações (Rao & Hodgkin, 2002). A variação que sustenta a diversidade genética surge através de mutações e recombinação. A selecção, deriva genética e fluxo genético actuam nos alelos presentes em diferentes populações para causar variação na sua diversidade. A selecção pode ser natural ou artificial, como é o caso da maioria da variação presente nas espécies cultivadas.

De acordo com dados da 2006 IUCN *Red List of Threatened Species*, 784 espécies estão oficialmente extintas e 16119 estão ameaçadas de extinção. Apesar da extinção das espécies constituir uma parte natural do processo de evolução, as espécies e os ecossistemas estão hoje mais ameaçados do que em qualquer outro período histórico. As perdas de diversidade ocorrem tanto nas florestas tropicais (onde estão presentes 50 a 90% das espécies já identificadas), como nos rios, lagos, desertos, florestas mediterrâneas, montanhas e ilhas. As estimativas mais recentes prevêm que, às taxas actuais de desflorestação, 2 a 8% das espécies venham a desaparecer nos próximos 25 anos. Para além da tragédia ambiental estas extinções têm profundas implicações no

desenvolvimento económico e social. A espécie humana depende da diversidade biológica para a sua própria sobrevivência, dado que pelo menos 40% da economia mundial e 80% das necessidades dos povos dependem dos recursos biológicos. Para além disso, quanto mais rica é a diversidade biológica, maior é a oportunidade para novas descobertas no âmbito da medicina, da alimentação, do desenvolvimento económico, e para serem encontradas respostas adaptativas às alterações ambientais. Manter a diversidade da vida é uma medida de segurança.

1.1.2. Os recursos genéticos vegetais

Os recursos fitogenéticos são a soma das combinações de genes resultantes da evolução de uma espécie, abrangendo desde espécies silvestres até genes clonados. As plantas constituem a base da alimentação, complementam a maioria das necessidades (incluindo vestuário e habitação), utilizam-se na indústria para fabricar combustíveis, medicamentos, fibras, borracha, como fonte de energia e outros produtos. Os recursos fitogenéticos são a base da subsistência da humanidade e são de importância fundamental para muitos domínios de investigação científica, para a agricultura, e para um número cada vez maior de sectores industriais, nomeadamente a biotecnologia, indústria farmacêutica e fitofarmacêutica, a horticultura e a cosmética. Estes sectores industriais já utilizam uma ampla gama de recursos genéticos e alguns deles fazem investimentos consideráveis em actividades de prospecção biológica a fim de descobrir novas aplicações dos recursos genéticos. O termo recursos genéticos implica que o germoplasma tem ou pode ter valor económico ou utilitário, actual ou futuro, sendo especialmente importante o que contribui para a segurança alimentar (IBPGR, 1991). Uma vez que lhe são úteis, o homem aproveita os recursos fitogenéticos e para isso deve conhecê-los, geri-los, mantê-los e utilizá-los racionalmente.

Os recursos genéticos vegetais estão seriamente ameaçados, principalmente pelo uso inadequado que deles fazemos e pela destruição dos seus habitats (Hawkes *et al.*, 2002). Ao analisarmos as espécies, combinações genéticas e alelos, verificamos que há uma grande concordância quanto à sua redução, ou mesmo perda da diversidade genética nas plantas, que chega a ser catastrófica. A sua perda afectará cada um de nós e porá em perigo as gerações vindouras. A falta de capacidade para conservar e utilizar, de uma forma racional, estes recursos irá pôr em causa as soluções para a segurança alimentar e para o desenvolvimento sustentável.

O processo de erosão genética será, provavelmente, cada vez maior e mais grave no futuro. Desse modo, a conservação da fitodiversidade é de grande importância pelos benefícios directos dos quais a humanidade faz uso, resultantes da sua exploração em novas cultivares, pelo desenvolvimento de produtos medicinais e, pela função central das plantas no funcionamento de todos os sistemas naturais. Se não houver um controlo atempado das rápidas perdas na diversidade vegetal, as consequências económicas, políticas e sociais serão devastadoras face ao presente crescimento populacional. A importância destes aspectos para a humanidade é sublinhada no Art.1 da CDB (Convenção sobre a Diversidade Biológica) (UNCED, 1992): “Os objectivos desta convenção... são a conservação da diversidade biológica, o uso sustentável das suas componentes e a partilha equitativa e justa dos benefícios emergentes da utilização dos recursos genéticos...”.

1.2. *DROSOPHYLLUM LUSITANICUM*

1.2.1. Aspectos taxonómicos

Drosophyllum lusitanicum (L.) Link é uma planta insectívora vulgarmente conhecida por pinheiro-baboso ou erva pinheira orvalhada. Esta espécie tem sido incluída na família Droseraceae. No entanto, dados morfológicos e anatómicos não sustentam a sua integração nesta família. Estes dados são a placentação basal, a presença de câmbio funcional, a circinação reversa das folhas, a anatomia das glândulas secretoras de mucilagem localizadas na face abaxial das folhas, o mecanismo passivo de captura de insectos (Lloyd, 1942; Juniper *et al.*, 1989), características polínicas (Chanda, 1965), o padrão de germinação (Conran *et al.*, 1997) e dados citogenéticos (Behre, 1929; Hoshi & Kondo, 1998). Além disso, estudos filogenéticos baseados na sequenciação do gene *rbcL* (Albert *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1994; Fay *et al.*, 1997; Lledo *et al.*, 1998) e *matK* (Meimberg *et al.*, 2000) também não apoiam a sua integração na família Droseraceae. Desta forma, a exclusão do género *Drosophyllum* desta família e a sua inclusão na nova família monotípica Drosophyllaceae Chrtek & Studnicka (Chrtek *et al.*, 1989; Chrtek & Slavikova, 1996) é sustentada não só por dados morfológicos e anatómicos, mas também por dados moleculares. Na classificação das plantas com flor, actualizada em 2003, *D. lusitanicum* é incluída na família Drosophyllaceae (APG, 2003).

A actual classificação taxonómica de *D. lusitanicum* é então:

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Caryophyllales
Família	Drosophyllaceae
Género	<i>Drososphyllum</i>
Espécie	<i>Drosophyllum lusitanicum</i>

1.2.2. Distribuição geográfica

D. lusitanicum é uma espécie endémica de Portugal, Espanha e Norte de Marrocos (França, 1921; Quintanilha, 1926; Lloyd, 1942; Silvestre, 1987; Correia & Freitas, 2002; Garrido *et al.*, 2003) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Mapa de distribuição de *D. lusitanicum*. Adaptado de Ortega-Olivencia *et al.* (1995).

Em Portugal distribui-se ao longo da costa Atlântica, desde o Norte até ao Algarve (Figura 1.1). Relativamente à distribuição no Algarve, a documentação existente praticamente restringe a sua distribuição à Serra de Monchique, onde em 2001 Müller & Deil localizaram 21 populações. No entanto, ao longo deste trabalho foram localizadas populações desta espécie em três outras regiões do Algarve, nomeadamente nas

proximidades de Barranco do Velho, Algoz e Albufeira. Em Espanha, a grande densidade de populações é encontrada no Campo de Gibraltar e em Marrocos restringe-se à Península de Tanger (Müller & Deil, 2001). Algumas populações desta espécie aparecem também no interior de Portugal, na Serra de São Mamede, estendendo-se até à zona da Estremadura em Espanha (Müller & Deil, 2001).

D. lusitanicum desenvolve-se em solos secos, ácidos e com pouca disponibilidade de nutrientes (Harshberger, 1925; Lloyd, 1942; Slack, 1969; Lecoufle, 1989; Garrido *et al.*, 2003). Além das condições edáficas extremas, esta espécie está também exposta a clima extremo com temperaturas por vezes superiores a 43 °C, radiação superior a 109,000 Lux e humidade relativa muito baixa durante o dia (Garrido *et al.*, 2003; Adlassnig *et al.*, 2006). Na literatura têm sido discutidas teorias controversas acerca da capacidade que esta espécie tem para sobreviver nestas condições extremas (Juniper *et al.*, 1989; Adlassnig *et al.*, 2006). Chegou a defender-se que *D. lusitanicum* morria durante o Verão. No entanto, foram observadas plantas túrgidas, a produzir elevada quantidade de mucilagem e a capturar elevado número de insectos durante aquela estação (Adlassnig *et al.*, 2006), o que foi também observado ao longo deste trabalho. Este facto reveste-se de alguma curiosidade uma vez que a planta não tem órgãos de reserva (Adlassnig *et al.*, 2006) e a produção de mucilagem requer um suplemento constante de água. Esta espécie tem um sistema radicular muito desenvolvido comparativamente com as outras plantas carnívoras (França, 1925; Garrido *et al.*, 2003; Adlassnig *et al.*, 2005) o que pode facilitar a absorção da água mesmo nos solos secos onde se encontra. No entanto, Adlassnig *et al.* (2006) em estudos recentes concluem que as plantas de *D. lusitanicum* conseguem manter-se activas durante o Verão em clima extremo utilizando o orvalho nocturno como suplemento de água.

1.2.3. Aspectos morfológicos e botânicos

D. lusitanicum é um caméfito, glanduloso, lenhoso na base, podendo atingir até 90 cm de altura (Correia & Freitas, 2002) (Estampa 1.1A e Estampa 1.2A,B). Possui folhas sésseis, opostas e marcescentes (Estampa 1.1B). Esta espécie destaca-se por possuir prefoliação circinada reversa (Estampa 1.1D), que é caracterizada pelos primórdios foliares se disporem circinados sobre a face abaxial da folha (Miranda *et al.*, submetido). Possui três feixes vasculares na base do pecíolo e não apresenta qualquer tipo de tricoma, quer seja no pecíolo quer seja no limbo foliar (Miranda *et al.*, submetido). As folhas de *D. lusitanicum* possuem na sua superfície emergências glandulares, que ao contrário dos tricomas, que são formados por apenas tecido epidérmico (Theobald *et al.*, 1979), são constituídas por tecidos epidérmico e subepidérmico, sendo estruturas vascularizadas (Seine & Barthlott, 1993; Miranda & Sago, 2000). Dois tipos de glândulas são encontrados na face abaxial das folhas de *D. lusitanicum*, as pediculadas e as sésseis (Estampa 1.1D-F). As glândulas pediculadas produzem uma intensa mucilagem com um odor adocicado sendo uma poderosa armadilha para os insectos. O insecto, ao ser atraído, ou pela cor vermelha das glândulas (Slack, 1969; Joel *et al.*, 1985), pelo brilho da mucilagem ou pelo odor das secreções (Meyer & Dewèvre, 1894; Quintanilha, 1926; Slack, 1969), pousa na folha e lá fica preso (Estampa 1.1B,C). Este evento estimula as glândulas sésseis a produzir enzimas digestivas que decompõem as substâncias orgânicas da presa em moléculas mais simples, que são absorvidas, compensando a deficiência do solo em nutrientes. Esta espécie possui uma armadilha passiva, ou seja desprovida de resposta sensorial mecânica, não apresentando movimento durante o processo de captura das presas. Apesar disso é, comparativamente com outras plantas insectívoras, mais eficiente em termos de capacidade de captura de insectos.

O período de floração de *D. lusitanicum* estende-se de Março a Agosto, sendo o pico da floração em Abril (Ortega-Olivencia, 1995). No entanto, factores como a temperatura podem condicionar o padrão de floração (Sedgley & Griffin, 1989). Cada roseta de folhas produz um escape floral, conseqüentemente o número de inflorescências produzidas depende do número de rosetas existentes por planta (Figura 1.2). Este está, por sua vez, indirectamente relacionado com a idade da planta, ou seja, quanto mais velha a planta maior o número de rosetas (Figura 1.2C,D).

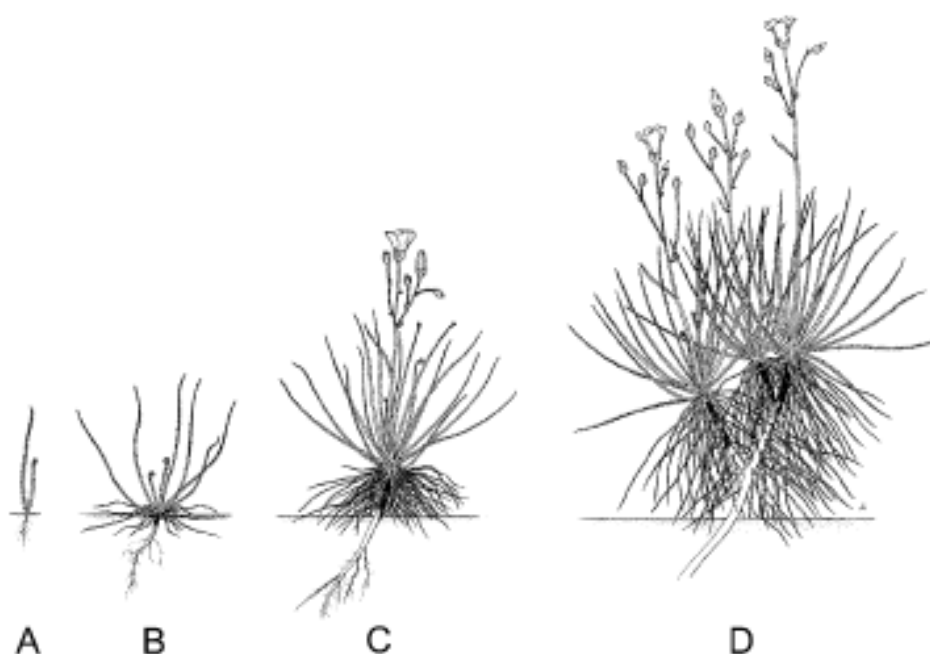


Figura 1.2. Aspecto de plantas de *D. lusitanicum* em diferentes estádios de desenvolvimento. (A) germinante; (B) planta sub-adulta ainda sem haste floral; (C) planta adulta em floração pela primeira vez, só com uma roseta de folhas e conseqüentemente uma só haste floral; (D) planta mais velha, ramificada com várias rosetas de folhas e várias hastes florais. Fonte: Garrido *et al.* (2003)

As flores têm uma cor amarela muito atractiva (Estampa 1.2) e possuem entre 2 e 5 cm de diâmetro quando totalmente abertas. As flores são hermafroditas, actinomórficas e em geral pentâmeras (Maire, 1976; Slack, 1979), podendo, no entanto, ocorrer variações no número de pétalas e sépalas, assim como no número de estames e carpelos (Ortega-

Olivencia *et al.*, 1995). Apresentam, em geral, entre 10 e 20 estames inteiros livres, distribuídos em duas alturas diferentes, e cinco carpelos (Miranda *et al.*, submetido). O ovário é súpero (Maire, 1976; Slack, 1979), no entanto parece haver controvérsia relativamente à placentação. Segundo Correia & Freitas (2002) esta é parietal, mas recentemente aparece referida como basal (Miranda *et al.*, submetido). As inflorescências são racemosas ou indeterminadas e paniculadas (Maire, 1976; Slack, 1979).

O número médio de inflorescências por planta é $2,62 \pm 2,17$ e o número médio de flores por inflorescência é $5,05 \pm 2,16$ (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995). No entanto, o número de flores abertas ao mesmo tempo por inflorescência é em média de $1,7 \pm 0,95$, estando esta variável correlacionada com o número de inflorescências por planta (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995).

O extenso período de floração, e o reduzido número de flores abertas em simultâneo (Estampa 1.2C,D), podem representar tentativas para controlar os recursos disponíveis para a floração e frutificação (Bawa, 1983), uma estratégia importante para assegurar o sucesso reprodutivo face a flutuações ambientais (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995).

O pólen está viável desde a pré-antese (Estampa 1.2E) até praticamente à senescência da flor, estando, no entanto, mais viável na pré-antese e antese (Estampa 1.2F). Por sua vez, os estigmas estão receptivos nas fases de pré-antese e antese, com uma maior receptividade na antese (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995).

De acordo com Ortega-Olivencia *et al.* (1995; 1998) há evidências claras de que as flores de *D. lusitanicum* usam a auto-polinização desde os primeiros momentos da formação da flor. Flores ainda na fase de pré-antese já têm vários grãos de auto-pólen, com capacidade germinativa nos estigmas. O auto-pólen atinge o estigma, não só como

resultado do contacto directo entre os carpelos e o estigma na fase de antese, mas também pela forma tipo tubo que a corola apresenta na fase de pré-antese. Além disso, a auto-polinização nesta espécie também se deve aos repetidos movimentos de fecho e abertura da corola em resposta à luz. À partida, a polinização nesta espécie não parece estar dependente dos polinizadores (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995).

Dois argumentos parecem suportar a ideia da predominância da auto-polinização em relação à polinização cruzada. Na altura em que, presumivelmente, os polinizadores estão mais activos, as flores de *D. lusitanicum* contêm grandes quantidades de auto-pólen, parte dele já germinado. Por outro lado, a polinização cruzada pode estar limitada pelo número, eficiência e comportamento inespecífico dos polinizadores. Provavelmente, os insectos que despendem mais tempo a visitar uma flor são mais importantes para a auto-polinização do que para a polinização cruzada. Além disso, os principais polinizadores desta espécie, *Homaloptia ruricola* (Coleóptera) e *Panurgus* sp. (Hymenoptera), preferem polinizar outras espécies tais como, *Cistus ladanifer* e espécies da família *Asteraceae* que florescem ao mesmo tempo que *D. lusitanicum* Ortega-Olivencia *et al.* (1995)

De acordo com estudos de Ortega-Olivencia *et al.* (1998) vários tipos de auto-polinização ocorrem simultaneamente em *D. lusitanicum*: auto-polinização sem a intervenção de agentes externos, que pode ocorrer antes, durante e após a antese; auto-polinização facilitada por insectos; geitonogâmica (transferência de pólen entre flores da mesma planta que é dependente do número de flores abertas ao mesmo tempo na mesma planta) e em alguns casos cleistogâmica (autopolinização numa flor não aberta). Todos estes tipos de auto-polinização são eficientes em termos de produção de fruto e sementes. A taxa de germinação do pólen e o desenvolvimento do tubo polínico, não é superior no pólen proveniente de outra planta relativamente ao auto-pólen.

É, no entanto, difícil de explicar a clara importância da auto-polinização nesta espécie, quando apresenta um período de floração tão alargado, com poucas flores por inflorescência, que parecem ser uma adaptação para reduzir a geitonogamia e aumentar a xenogamia. Este comportamento fenológico, bem como as flores atractivas que possui, podem ser vestígios de uma maior importância da polinização cruzada no passado.

Após a polinização, dá-se o desenvolvimento da cápsula e das sementes. Depois de maduras, as sementes libertam-se da cápsula passivamente, quer pela força da gravidade quer por auxílio de movimentos causados por agentes externos (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995). Em alguns casos as sementes mantêm-se agarradas à planta-mãe. Ortega-Olivencia *et al.* (1995) e Müller & Deil (2001) constataram que o número de sementes por fruto é um parâmetro constante nas populações estudadas em Portugal e Espanha. No entanto, observaram diferenças significativas entre as duas áreas, com cerca de 10 sementes por fruto em Portugal e 14 em Espanha. A semente é ovada e possui uma superfície caracterizada pela presença de cristas longitudinais formadas pelas células do tegumento externo (Miranda *et al.*, submetido). Embora a produção de sementes seja, em geral, bem sucedida (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995), ainda não foi observado o transporte de sementes a longas distâncias (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995; 1998; Garrido *et al.*, 2003), o que pode comprometer a disseminação da espécie. Por outro lado, de acordo com Correia & Freitas (2002) as sementes desta espécie têm reduzida probabilidade de germinação quando plantas adultas da mesma espécie estão a crescer na mesma área, porque, provavelmente, as plantas estabelecidas segregam fitotoxinas que inibem a germinação e o crescimento de outras plantas desta espécie, evitando a competição entre plantas estabelecidas.

1.2.4. Ecologia e necessidade de conservação

As zonas abertas com pouca vegetação circundante parecem facilitar o estabelecimento e regeneração de *D. lusitanicum* (Müller & Deil, 2001). Talvez por isso, a maioria das populações conhecidas desta espécie se localize em locais sujeitos a intensa pressão humana e urbanística, em especial nas zonas costeiras (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995; Correia & Freitas, 2002). De acordo com Müller & Deil (2001), *D. lusitanicum* tem um carácter pioneiro, colonizando zonas perturbadas quer por intervenção humana quer por agentes naturais. Isto vem suportar o predomínio da autogamia nesta espécie, que é muito comum em espécies com carácter pioneiro.

Em 1926 Quintanilha referenciava que as populações de *D. lusitanicum* ocupavam, em geral, apenas alguns metros quadrados. Por sua vez, em 1979 Slack considerava esta espécie rara. Em Espanha foi incluída na *Andalusian Red List of Threatened Plants* (Boja, 1994; Valdés, 1996; Ocaña *et al.*, 2000) e a maioria das populações encontra-se localizada no Parque Natural “Los Alcornocales”. Em Marrocos é também considerada uma espécie rara (Fennane & Ibn Tattou, 1998). Em Portugal, Caldas *et al.* (1996) consideraram-na uma espécie ameaçada e Müller & Deil (2001) como potencialmente ameaçada por ocorrer em populações isoladas e com poucos indivíduos. Mais tarde Correia & Freitas (2002) analisaram a distribuição Portuguesa desta espécie e compararam-na com dados de herbário, tendo concluído que ocorreu uma regressão na sua distribuição nos últimos 60 anos. Em 2003 Garrido *et al.* (2003) estudaram várias populações de *D. lusitanicum* ao longo de toda a sua área de distribuição e reforçaram que as populações desta espécie se encontram em declínio. Estes autores recomendam a utilização urgente de estratégias de conservação tais como, a necessidade 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).

Apesar de até ao momento *D. lusitanicum* não constar da base de dados da 2006 IUCN *Red List of Threatened Species*, os dados existentes demonstram a necessidade urgente de elaborar estratégias de conservação para esta espécie.

1.3. OBJECTIVOS DO TRABALHO

D. lusitanicum é uma espécie endémica da Península Ibérica e Norte de Marrocos com uma biologia muito peculiar e com características singulares, sendo uma das poucas espécies da região Mediterrânica pertencente a uma família monotípica. Apesar do seu interesse, esta espécie tem sido pouco estudada sendo os trabalhos existentes relativamente recentes. Alguns deles reportam a presença de compostos biologicamente activos, tornando aliciante a sua exploração a nível médico e/ou agro-químico. No entanto, diversos trabalhos de ecologia de populações consideram a espécie em declínio e recomendam a implementação urgente de estratégias que visem a sua conservação. Com este trabalho pretende-se contribuir para aumentar o conhecimento científico desta espécie ao nível da diversidade genética e da avaliação da actividade biológica, e contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia de conservação *ex situ* para esta espécie utilizando métodos biotecnológicos. Para atingir estes objectivos pretende-se:

i) desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* para esta espécie, a partir de germinação de sementes, com vista à produção de plantas para utilizar em estratégias de conservação e exploração das suas potencialidades fitoquímicas;

- ii) analisar a diversidade e estrutura genética de populações Algarvias e de uma população do Sul de Espanha, tendo em vista a obtenção de informações úteis para a sua conservação;
- iii) conservar germoplasma desta espécie mediante a conservação de rebentos *in vitro*, em condições mínimas de crescimento, e a criopreservação de sementes;
- iv) avaliar as propriedades antimicrobiana, insecticida e alelopática de extractos desta espécie.

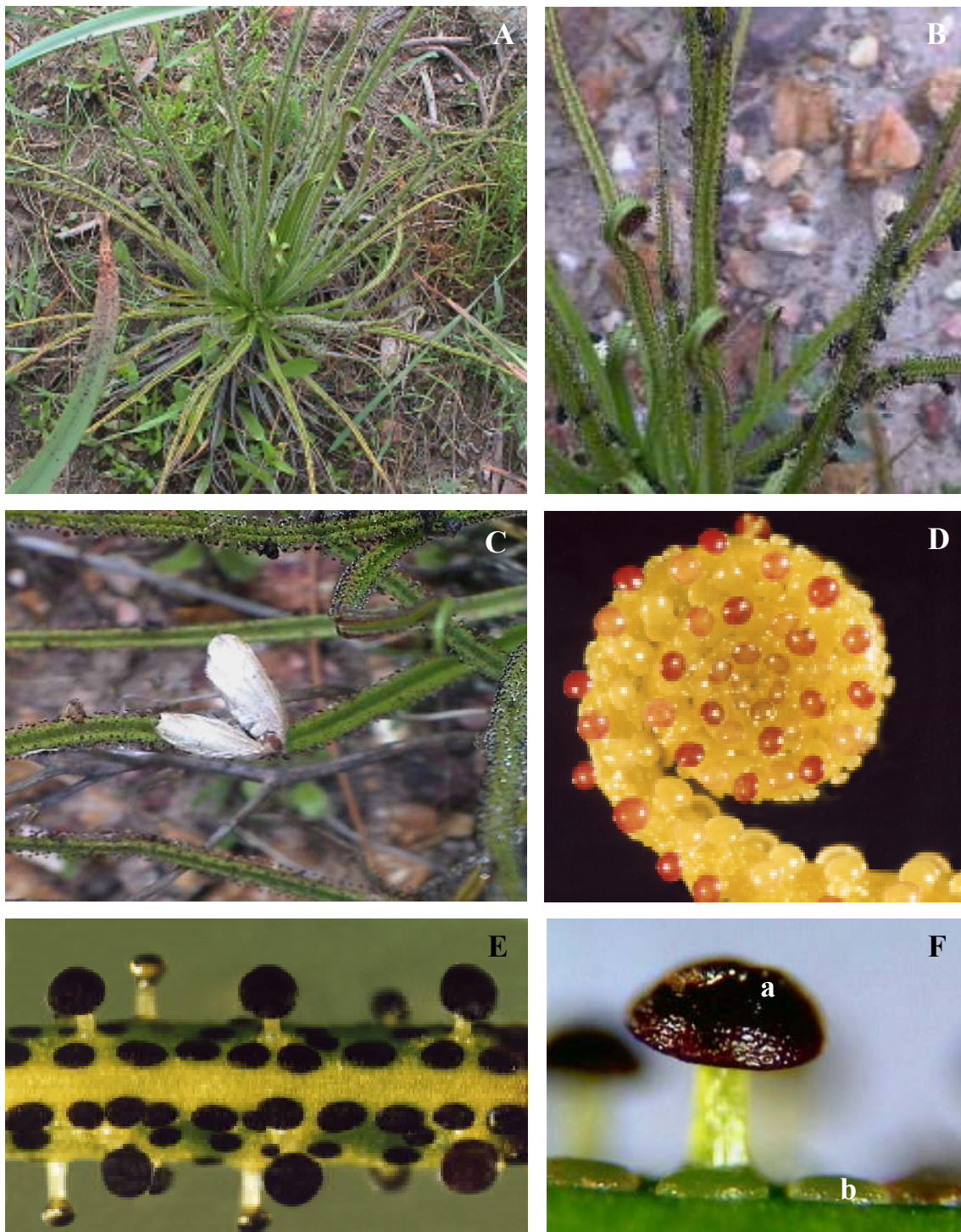
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlassnig W, Peroutka M, Eder G, Pois W, Lichtscheidl IK 2006. Ecophysiological observations on *Drosophyllum lusitanicum*. *Ecological Research* 21: 55-262
- Albert VA, Williams SE, Chase MW 1992. Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution. *Science* 257: 1491-1495
- Bawa KS 1983. Patterns of flowering in tropical plants. Em: Jones CE, Little RJ (eds.), *Handbook of experimental pollination biology*, Scientific and Academic Editions, New York
- Behre K 1929. Physiologische und zytologische Untersuchungen über *Drosera*. *Planta* 7: 208-306
- 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 Andalucía, Sevilla
- Caldas FB, Séneca AM, Almeida da Silva R, Carvalho ACH, Aguiar Branco H, Alves, HN, Honrado JJ 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
- Chanda S 1965. The pollen morphology of Droseraceae with special reference to taxonomy. *Pollen et Pores* 73: 509-528

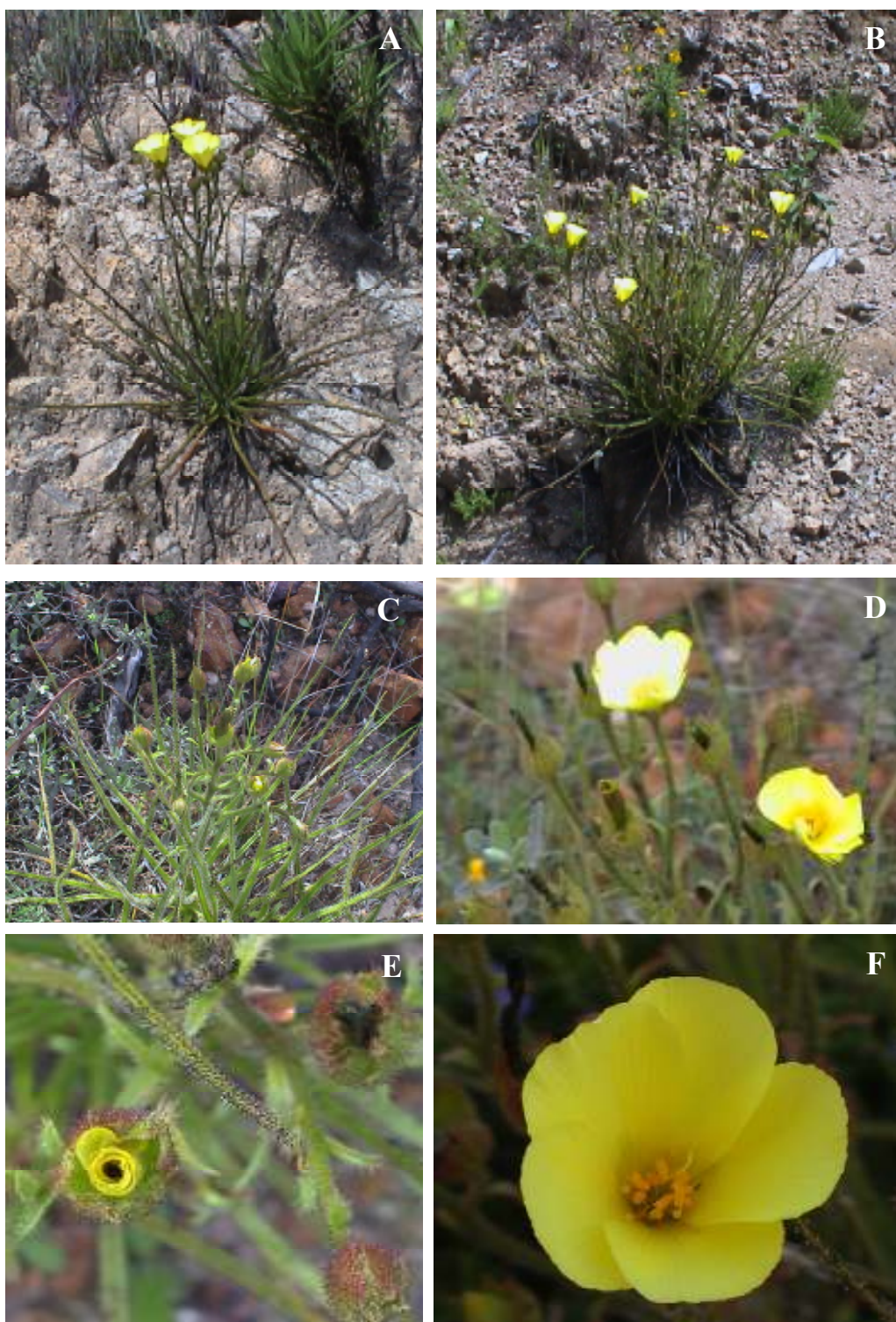
- Chrtek J, Slavikova Z 1996. Comments on the families Droseraceae and Droseraceae. *Casopis Narodniho Muzea Rada Prirodovedna* 165: 139-141
- Chrtek S, Slavikova Z, Studnicka M 1989. Contribution to petal venation of selected carnivorous plants. *Preslia* 61: 107-124
- Conran JG, Jaudzems VG, Hallam ND 1997. Droseraceae germination patterns and their taxonomic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 123: 211-223
- Correia E, Freitas H 2002. *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediterranean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 383-390
- Fay MF, Cameron KM, Prance GT, Lledó MD, Chase MW 1997. Familial relationships of *Rhabdodendron* (Rhabdodendraceae): Plastid *rbcL* sequences indicate a caryophyllid placement. *Kew Bull* 52: 923-932
- Fennane M, Ibn Tattou M 1998. Catalogue des plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. *Bocconea* 8: 1-243
- França C 1921. Recherches sur le '*Drosophyllum lusitanicum* Link' et remarques sur les plantes carnivores. *Archives Portugaises des Sciences Biologiques* 1: 1-30
- França C 1925. Recherches sur les plantes carnivores. II. *Utricularia vulgaris*. *Arquives Portugaises des Sciences Biologiques* 1: 11-37
- 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). *Diversity and Distributions* 9: 335-350
- Harshberger JW 1925. Notes on the Portuguese insectivorous plant, *Drosophyllum lusitanicum*. *Proceedings of the American Philosophical Society* 64: 51-54
- Hawkes JG, Maxted N, Ford-Lloyed BV 2000. The *ex situ* conservation of plant genetic resources. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Hoshi Y, Kondo K 1998. A chromosome phylogeny of the Droseraceae by using CMA-DAPI fluorescent banding. *Cytologia* 63: 329-339
- IBPGR 1991. Elsevier's dictionary of plant genetic resources, Elsevier Science Publishers BV, The Netherlands

- Joel DM, Juniper BE, Dafni A 1985. Ultraviolet patterns in the traps of carnivorous plants. *New Phytologist* 101: 585-593
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM 1989. *The carnivorous plants*, Academic Press, London
- Lecoufle M 1989. *Comment choisir et cultiver vos plantes carnivores*. Bordas, Paris
- Lledo MD, Crespo MB, Cameron KM, Fay MF, Chase MW 1998. Systematics of Plumbaginaceae based upon analysis of *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 23: 21-29
- Lloyd FE 1942. *The carnivorous plants*, The Ronald Press Company, New York
- Maire R 1976. *Flore de l'Afrique du Nord* 14, Lechevalier, Paris
- Meimberg 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 Biology* 2: 218-228
- Meyer A, Dewèvre A 1894. Über *Drosophyllum lusitanicum*. *Botanical Centralblatt* 60: 33-41
- Miranda VFO, Sajo MG 2000. Aspectos morfo-anatômicos de três espécies de *Drosera* durante o desenvolvimento pós-seminal. *Acta Botanica Brasilica* 14: 185-195
- Miranda VFO, Bacci Júnior M, Furlan A, Martins VG. Aspectos morfo-anatômicos de espécies de Droseraceae e Drosophyllaceae e suas implicações sistemáticas. *Acta Botanica Brasilica* (submetido, referido com autorização do autor)
- Müller J, Deil U 2001. Ecology and structure of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link populations in the south-western of the Iberian Peninsula. *Acta Botanica Malacitana* 26: 47-68
- Ocaña ME, Valdés B, Moreno Socías E, Parra R 2000. *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link. Em: Blanca G, Cabezudo B, Hernández-Bermejo JE, Herrera CM, Muñoz J, Valdés B (eds.) *Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía*. Tomo II. Especies Vulnerables. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía, Sevilla
- Ortega-Olivencia A, Claver JPC, Alcaraz JAD 1995. Floral and reproductive biology of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Droseraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 118: 331-351

- Ortega-Olivencia A, Paredes JAL, Rodríguez-Riaño T, Devesa JA 1998. Modes of self-pollination and absence of cryptic self-incompatibility in *Drosophyllum lusitanicum*. *Botanica Acta* 111: 474-480
- Quintanilha A 1926. O problema das plantas carnívoras. Estudo citofisiológico da digestão no '*Drosophyllum lusitanicum*'. *Boletim Sociedade Broteriana* 2a Sér. 4: 44-129
- Rao VR, Hodgkin T 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 1-19
- Sedgley M, Griffin AR 1989. Sexual reproduction of tree crops, Academic Press, London
- Seine R, Barthlott W 1993. On the morphology of trichomes and tentacles of Droseraceae Salisb. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 67: 345-366
- Silvestre S 1987. *Drosophyllum*. Em: Valdés B, Talavera S, Fernández-Galiano E (eds.), *Flora vascular de Andalucía Occidental*, 1, Ketres, Barcelona
- Slack A 1969. Carnivorous plants, MIT Press, Cambridge
- Slack A 1979. Carnivorous plants, Ebury Press, London
- The Angiosperm Phylogeny Group 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436
- Theobald WL, Krahulik JL, Rollins RC 1979. Trichome description and classification. Em: Metcalfe CR, Chalk L (eds.), *Anatomy of Dicotyledons*, Clarendon Press, Oxford
- UNCED 1992. Convention on Biological Diversity, United Nations Conference on Environment and Development, Geneva
- Valdés B 1996. El elemento endémico en el Campo de Gibraltar. *Almoraima* 15: 13-33
- Williams SE, Albert VA, Chase MW 1994. Relationships of Droseraceae: a cladistic analysis of *rbcL* sequence and morphological data. *American Journal of Botany* 81: 1027-1037
- Wilson 1992. The diversity of life. Allan Lane, Penguin, Cambridge



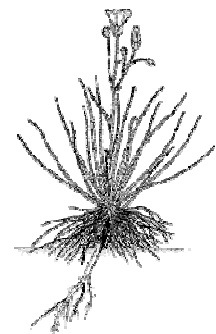
Estampa 1.1. Vários aspectos da planta *D. lusitanicum*. (A) Planta inteira; (B e C) pormenor das folhas e da captura de insectos pela planta; (D) aspecto do enrolamento de uma folha jovem observado à lupa (ampliação: 40×); (E) secção foliar corada com vermelho neutro e observada à lupa, realçando os dois tipos de glândulas (ampliação: 40×); (F) pormenor de uma glândula pediculada (a) e várias glândulas sésseis (b) observadas ao microscópio óptico (ampliação: 100×).



Estampa 1.2. Vários aspectos de plantas de *D. lusitanicum* em fase de floração. (A) planta só com uma roseta e uma haste floral; (B) planta com mais que uma roseta e haste floral; (C e D) plantas com flores em diferentes fases de desenvolvimento na mesma haste floral; (E) pormenor do botão floral e da flor em fase de pré-antese; (F) flor completamente aberta em fase de antese.

Capítulo II

Propagação *in vitro* de *D. lusitanicum*



2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Aspectos gerais da propagação de plantas *in vitro*

A cultura de células vegetais teve origem no conceito de totipotência, que postula que cada célula possui a informação genética necessária para a formação de uma planta completa, sendo as células autónomas e, em princípio, capazes de dar origem a uma nova planta.

A propagação *in vitro* de plantas através da técnica de cultura de tecidos é designada de micropropagação, que é um método de propagação assexuada em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando recipientes de plástico ou vidro, com manipulação em condições assépticas. A regeneração de plantas pode ser efectuada através da cultura de meristemas, embriões, órgãos, células, *calli*, protoplastos, entre outras (Pierik, 1987). A proliferação a partir de gemas axilares ou apicais tem sido o método mais usado, pela sua simplicidade em termos práticos, devido às elevadas taxas de multiplicação obtidas e por garantir maior estabilidade genética das culturas (Pierik, 1987).

A micropropagação pode ser desenvolvida a partir de sistemas de alongamento de gemas apicais e/ou axilares, organogénese e por embriogénese somática. Os dois primeiros métodos envolvem o desenvolvimento de rebentos caulinares e respectivo sistema radicular em fases distintas de acordo com as diferentes fases do processo de micropropagação (Murashige, 1974; Debergh & Maene, 1981). A diferença reside no facto do alongamento axilar consistir na promoção do desenvolvimento de um meristema já previamente definido para originar uma estrutura caulinar e o segundo, obrigar a uma formação de novo desta estrutura caulinar a partir de tecidos que não estavam previamente determinados para tal, isto é, formação de rebentos caulinares

adventícios (George & Sherrington, 1984). A formação e desenvolvimento dos rebentos caulinares de origem axilar ou adventícia, é induzida utilizando meios suplementados com citocininas ou citocininas e auxinas e, posteriormente, os rebentos são induzidos a diferenciar um sistema radicular por acção de auxinas originando assim uma planta completa, que será posteriormente aclimatizada e transferida para condições ambientais naturais.

A micropropagação via embriogénese somática envolve a formação de embriões bipolares *in vitro* a partir de células somáticas com competência embriogénica. Este sistema permite a obtenção de plântulas num único passo, que envolve o desenvolvimento em simultâneo de um pólo apical e de um pólo radicular, à semelhança do que acontece nos embriões de origem zigótica (Thorpe *et al.*, 1991).

De entre as vantagens que a micropropagação oferece, relativamente aos processos de propagação convencionais, destacam-se a maior rapidez do processo, a possibilidade de multiplicar espécies difíceis ou mesmo impossíveis de propagar *in vivo*, o facto do espaço necessário para a cultura e armazenamento ser muito reduzido, a ausência de agentes contaminantes e a eliminação do efeito de sazonalidade (Pierik, 1987). Além destas vantagens, a aplicação das técnicas de cultura *in vitro* permite o estabelecimento de bancos de germoplasma e grandes avanços nas áreas da manipulação genética e obtenção de plantas transformadas.

Embora já existam muitas espécies vegetais cuja regeneração completa é possível de obter *in vitro*, nem todas as espécies são susceptíveis de serem regeneradas, continuando muitas delas a comportar-se como recalcitrantes. Isto deve-se à fraca capacidade de regeneração; à tendência para a exsudação de substâncias tóxicas para o meio de cultura, como compostos fenólicos; à baixa taxa de multiplicação; ciclos de dormência durante os quais o desenvolvimento dos meristemas é muito difícil; frequente

ocorrência de topófise; desinfecção superficial difícil e dificuldade no enraizamento dos rebentos (George & Sherrington, 1984; Pierik, 1987; Bonga & Von Aderkas, 1992). Além disso, podem referir-se outras limitações como sejam, o facto de as taxas de multiplicação não serem as necessárias para tornar o processo rentável; a indução de um sistema radicular adventício funcional nem sempre ser conseguida; a ocorrência de elevadas taxas de mortalidade quando as plantas são transplantadas para condições *ex vitro*; a possibilidade de ocorrerem alterações genéticas devido ao elevado número de subculturas; e o facto de o processo em si ser oneroso (Pierik, 1987; Bonga & Von Aderkas, 1992).

2.1.2. Fases do processo de micropropagação

Em 1974, Murashige propunha que o processo de micropropagação se dividisse em três fases: Fase I: Estabelecimento de culturas assépticas; Fase II: Multiplicação das culturas; Fase III: Preparação para o restabelecimento das plântulas no solo. Mais tarde em 1981 esta divisão foi adaptada à micropropagação de plantas lenhosas por Debergh & Maene, que definem cinco fases: Fase 0: Preparação da planta-mãe; Fase 1: Iniciação e estabelecimento das culturas; Fase 2: Multiplicação das culturas; Fase 3: Alongamento e enraizamento dos rebentos; Fase 4: Aclimatização das plântulas.

A fase de preparação da planta-mãe envolve todas as manipulações do material vegetal, desde a recolha até ao estabelecimento *in vitro*. O objectivo desta fase passa pela resolução de problemas de contaminação que ocorrem no estabelecimento de espécies lenhosas, sendo mais eficiente no que respeita à redução de contaminações por fungos que por bactérias (Debergh & Maene, 1981). Nesta fase torna-se necessário o controlo de factores como a idade e o estado fisiológico e sanitário da planta-mãe, idade e

posição do tecido ou órgão na planta, constituição genética, entre outros (Debergh & Red, 1991).

A fase de iniciação e estabelecimento das culturas visa a iniciação e estabelecimento das culturas em condições de assepsia, eliminando infecções e assegurando um número razoável de explantados com viabilidade de crescimento. Nesta fase existem diversos factores a ter em conta como sejam, a escolha do explantado inicial (tipo e estado de desenvolvimento), a idade da planta-mãe, o tamanho e a altura do ano da colheita do explantado, o método de desinfecção superficial utilizado, o meio base e os reguladores de crescimento utilizados. Durante esta fase utilizam-se geralmente como reguladores de crescimento as citocininas, que têm como objectivo quebrar a dormência e promover o crescimento dos gomos axilares (Pierik, 1987).

Na fase de multiplicação das culturas pretende-se a multiplicação de órgãos ou outras estruturas que possam ulteriormente regenerar a planta a propagar sem perda de estabilidade genética, bem como assegurar material em quantidade suficiente para prosseguir o processo de multiplicação (Murashige, 1974). Para o sucesso desta fase são importantes alguns factores, nomeadamente, factores físicos e ambientais (luz, fotoperíodo e temperatura), factores inerentes aos tecidos vegetais como o genótipo, idade e condições fisiológicas, e também a constituição do meio de cultura, o tipo de reguladores de crescimento e as suas concentrações (Pierik, 1987). Os reguladores de crescimento usados durante esta fase são principalmente as citocininas, podendo usar-se igualmente combinações destas e auxinas.

Durante a fase de alongamento e enraizamento dos rebentos é induzida a formação de raízes adventícias, *in vitro* ou *ex vitro*, podendo haver necessidade de uma fase prévia de alongamento dos rebentos obtidos na fase de multiplicação. A presença de auxinas é normalmente essencial nesta fase para a maioria das espécies, pelo menos durante a fase

inicial do processo, podendo nas fases posteriores ser dispensável ou até inibitória (Boollmark & Eliasson, 1986; de Klerk *et al.*, 1999). O tipo de auxina, a sua concentração, o modo de aplicação e a duração do período de exposição à auxina influenciam este processo. As auxinas induzem a formação de um meristema radicular, divisões e alongamento das células, induzindo assim a formação de primórdios radiculares (de Klerk, 2002). Embora a indução de enraizamento seja principalmente controlada pelas auxinas, outros factores endógenos e exógenos influenciam o sucesso deste processo. São de referir factores químicos, como o meio de cultura e o estado hormonal do rebento; factores biológicos, como a idade da planta-mãe e o tamanho do rebento; factores ambientais, como a humidade, luz e temperatura; e outros como o substrato de enraizamento e o recipiente de cultura (McCown, 1988).

Trabalhos recentes têm demonstrado que no processo de enraizamento se podem distinguir diversas etapas, as quais se podem distinguir com base em observações histológicas e moleculares (Lovell & White 1986; de Klerk *et al.*, 1999), através de caracterização fisiológica e analisando a sensibilidade aos reguladores de crescimento (de Klerk *et al.*, 1999).

No enraizamento *in vitro* todo o processo decorre em condições assépticas, desde a indução, que pode ser feita com a presença de auxinas no meio de cultura, ou por imersão basal dos rebentos em solução concentrada de auxina, seguida de cultura em meio sem auxinas até ao final da expressão radicular. As auxinas mais utilizadas são o ácido indol 3-butírico (IBA), o ácido α -naftaleno 1-acético (NAA) e o ácido indol 3-acético (IAA) (Gaspar & Coumans, 1987). O enraizamento *in vitro* é geralmente melhor sucedido, tendo ainda a vantagem de se tratar de material vegetal asséptico, e como tal, sem necessidades de ser submetido a períodos de quarentena. Contudo, este sistema implica elevados custos em mão-de-obra e meios de cultura (Debergh & Read, 1991).

Os restos de agar são muitas vezes de difícil remoção, o que torna as plântulas vulneráveis ao ataque de fungos aquando da sua colocação no substrato de aclimatização (McCown, 1988). Uma outra desvantagem do enraizamento *in vitro* é a ocorrência de deficiências anatómicas e histológicas nas raízes, as quais são menos frequentes em raízes formadas *ex vitro*, o que leva a uma diminuição das taxas de sobrevivência durante a aclimatização (McClelland *et al.*, 1990). Por sua vez, no enraizamento *ex vitro*, enraizamento e aclimatização ocorrem simultaneamente, o que reduz o tempo do processo, para além das vantagens económicas que daí advêm (McCown, 1988; Zimmerman, 1988; Thorpe *et al.*, 1991; Bonga & Von Aderkas, 1992).

No final da fase de enraizamento a maioria das plantas micropropagadas requer um período de aclimatização às condições *ex vitro*, com vista a assegurar que um número suficiente de plantas sobrevive e cresce vigorosamente quando transferidas para as condições exteriores (Preece & Sutter, 1991). As plântulas *in vitro* estão sujeitas a um ambiente caracterizado por elevada humidade relativa (HR), concentração de CO₂ variável, concentrações de etileno superiores às normais (de Proft *et al.*, 1985; Kozai, 1991), baixa densidade do fluxo fotónico fotossintético e ainda diferenças ao nível do espectro luminoso e duração do fotoperíodo (Economou & Read, 1987; Fujiwara & Kozai, 1995). Também o facto de as culturas se desenvolverem em meio de cultura contendo quantidades de hidratos de carbono e nutrientes suficientes para crescimento heterotrófico, é um factor que condiciona as características fisiológicas do material vegetal desenvolvido *in vitro* (Preece & Sutter, 1991). A interacção de todos os factores acima referidos conduz à formação de plantas com deficiências anatómicas, morfológicas e fisiológicas.

A transferência das plântulas micropropagadas para ambiente com HR baixa pode provocar elevadas taxas de transpiração, que podem conduzir a severos défices hídricos de difícil recuperação (Preece & Sutter, 1991). Desta forma, as plantas micropropagadas têm que passar por um período de aclimatização durante o qual a HR é gradualmente reduzida. Durante esta fase de transição, as plantas reajustam e readquirem processos fisiológicos que lhes permitem a passagem das condições heterotróficas para condições de autotrofia e desenvolvem adaptações anatómicas e fisiológicas às novas condições de cultura (Donnelly *et al.*, 1984).

2.1.3. O porquê de propagar *in vitro* *Drosophyllum lusitanicum*

O reforço de populações vegetais naturais, utilizando indivíduos produzidos *ex situ* é considerada uma medida válida para reduzir o risco de extinção de espécies ou populações ameaçadas (Bowes, 1999), como é o caso de *D. lusitanicum* (Correia & Freitas, 2002; Garrido *et al.*, 2003, Adlassnig *et al.*, 2006). Para tal é necessária a propagação de plantas da espécie a conservar, a qual deve ser feita preferencialmente por via seminal, uma vez que a diversidade genética é maximizada (Fay & Muir, 1990; Fay, 1992; Benson *et al.*, 2000). No entanto, cada espécie tem requisitos particulares para a germinação das suas sementes, que no caso das plantas silvestres são em geral desconhecidos, particularmente para espécies raras e/ou endémicas em que as sementes são difíceis de obter (Cerabolini *et al.*, 2004).

Existem sementes que mesmo viáveis não germinam, embora as condições de humidade, gases e temperatura sejam aparentemente adequadas. Estas sementes são denominadas dormentes e precisam de tratamentos especiais para germinar. A dormência pode ser devida a vários factores, tais como impermeabilidade do tegumento à água e a gases, imaturidade do embrião, presença de inibidores ou ausência de

promotores de germinação, ou exigências especiais de luz ou temperatura (Bewley & Black, 1982).

Em algumas sementes dormentes são necessárias alterações morfológicas para se iniciar a germinação, enquanto que para outras, são necessárias mudanças fisiológicas. Em condições naturais essas alterações ocorrem naturalmente com as flutuações sazonais de arejamento, humidade, temperatura e luz. Em condições artificiais as sementes dormentes são induzidas a germinar através da manipulação dessas condições. A maioria das espécies responde melhor às condições estéreis *in vitro*, que podem incluir a utilização de um meio de cultura rico com ou sem suplemento de reguladores de crescimento e o uso de condições de cultura controladas em câmara de crescimento (Fay, 1992; Pence, 1999). Além disso, os germinantes assim obtidos podem ser utilizados como explantados para a propagação *in vitro*. Esta técnica, para além de permitir a propagação de espécies difíceis ou impossíveis de propagar por métodos convencionais (Sudharsan *et al.*, 2003) permite, em geral, obter elevadas taxas de multiplicação a partir de um explantado inicial produzindo plantas em larga escala. Assim, a produção de elevada quantidade de plantas em reduzido tempo pode contribuir para a conservação de recursos genéticos de espécies raras (Fay, 1992; Hawkes *et al.*, 2002). As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* têm sido usadas para propagar diversas plantas em vias de extinção (Sudha *et al.*, 1998; Benson *et al.*, 2000; Iankova *et al.*, 2001; Bhatia *et al.*, 2002a; Malik *et al.*, 2005; Chandra *et al.*, 2006), nomeadamente utilizando sementes como explantado inicial (Kawiak *et al.*, 2003; Malá & Bylinský, 2004; Kauth *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006).

A propagação vegetativa de *D. lusitanicum* pelas técnicas convencionais não está descrita. Segundo vários autores, esta espécie só pode ser propagada pela via seminal (Tilbrooke, 1988; D'Amato, 2000; Ortega-Olivencia *et al.*, 1995; Correia & Freitas,

2002). No entanto, *D. lusitanicum* apresenta baixas taxas de germinação por esta via (Correia & Freitas, 2002), possivelmente porque as sementes necessitam de requisitos específicos para germinar devido a problemas de dormência. As sementes desta planta possuem uma cutícula espessa, fruto da evolução, que protege o embrião dos agentes externos. No entanto, ao mesmo tempo que protege o embrião, esta cutícula também dificulta a sua germinação (Baskin & Baskin, 1998), a qual ocorre normalmente após um período de chuvas que ocasiona o seu amolecimento. É também possível que ocorra naturalmente a erosão da cutícula quando a semente é levada por ventos ou arrastada pela água das chuvas, tornando-a mais fina e assim facilitando a germinação.

Até à data não existem trabalhos que visem a propagação e conservação de *D. lusitanicum*, apesar das recomendações nesse sentido (Correia & Freitas, 2002; Garrido *et al.*, 2003). Dadas as vantagens da utilização das técnicas de cultura *in vitro* na conservação de espécies raras, a sua aplicação à espécie *D. lusitanicum* facilitando a germinação de sementes e permitindo a propagação rápida de plantas a partir dos germinantes obtidos, é do maior interesse. As plantas assim produzidas poderão ser utilizadas para restaurar as populações naturais em maior risco. Além disso, a aplicação destas técnicas permitirá a utilização das culturas *in vitro* ou das plantas micropropagadas de *D. lusitanicum* para extracção de compostos com propriedades farmacológicas e insecticidas (Capítulo V), à semelhança do que tem sido efectuado em outras espécies medicinais ameaçadas de extinção.

2.1.4. Objectivos

Tendo em conta que, de acordo com dados recentes, a maioria das populações de *D. lusitanicum* se encontra em declínio, é urgente a elaboração de estratégias de

conservação para esta espécie. Uma importante medida a incluir numa estratégia global de conservação para esta espécie é o reforço das populações naturais através da re-introdução de plantas produzidas *ex situ*.

Além de poder contribuir para a sua conservação, a propagação *ex situ* de plantas desta espécie tornaria também possível a exploração das suas propriedades medicinais e agro-químicas, impossíveis de explorar em plantas *in situ*. Assim, o principal objectivo deste capítulo foi avaliar as potencialidades da aplicação das técnicas de cultura *in vitro* à propagação de plantas de *D. lusitanicum*. Pretendeu-se: i) germinar *in vitro* sementes de *D. lusitanicum*; e a partir dos germinantes obtidos ii) estabelecer um sistema de micropropagação simples e rápido (multiplicação das culturas, enraizamento dos rebentos e aclimatização das plântulas).

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

A micropropagação de *D. lusitanicum* efectuou-se utilizando como explantados iniciais rebentos obtidos a partir de germinantes. Assim, a primeira fase da propagação *in vitro* desta espécie foi o estudo de diferentes tratamentos para induzir a germinação *in vitro* das sementes. Para tal, utilizaram-se sementes maduras (Estampa 2.1A) recolhidas em populações naturais de *D. lusitanicum* localizadas no Algarve nas proximidades de Algoz, Barranco do Velho e Albufeira, e três populações localizadas na Serra de Monchique (próximo de Alferce, Casais e Chilrão). As sementes, ainda agarradas à cápsula da planta, foram recolhidas em plantas seleccionadas aleatoriamente ao longo de toda a cobertura da população, de forma a obter uma amostra mais representativa da mesma. As sementes foram levadas para o laboratório e armazenadas à temperatura

ambiente até à realização dos ensaios de germinação. Dado o reduzido número de plantas nas populações estudadas, o número de sementes recolhidas em algumas dessas populações foi reduzido. Por este motivo neste trabalho optou-se por misturar as sementes das diferentes populações em iguais proporções e efectuar os testes de germinação com o lote de sementes assim obtido, permitindo realizar um maior leque de tratamentos de germinação.

2.2.2. Germinação de sementes *in vitro*

Em qualquer dos tratamentos de germinação efectuados o primeiro passo foi a desinfecção das sementes com uma solução de lixívia comercial a 15% (v/v) (contendo 5% de cloro activo), durante 15 minutos, seguindo-se três lavagens com água estéril.

Num primeiro ensaio as sementes foram embebidas em água estéril e sujeitas a um tratamento de frio (5 °C) durante 2, 3 ou 4 dias. Passado este período, procedeu-se à escarificação de metade das sementes retirando parte do tegumento em condições assépticas. Testou-se também o efeito do tratamento de calor na germinação das sementes. Para tal as sementes previamente desinfectadas foram mergulhadas em água estéril a ferver durante 30 s. Testou-se também os efeitos de um período de frio (5 °C) de 1 mês e da imersão das sementes durante 12 h numa solução de GA₃ (ácido giberélico) a 1 mg l⁻¹. Após tratamento, as sementes foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo 2% (p/v) de sacarose e suplementado com 0,5 mg l⁻¹ de BA (benziladenina) e 0,1 mg l⁻¹ de GA₃, e incubadas em condições controladas a 25 ± 2 °C, metade no escuro e outra metade sob fotoperíodo de 16 h (60 μmol m⁻² s⁻¹).

Posteriormente, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios anteriores realizou-se um segundo conjunto de tratamentos resumidos na Tabela 2.1. Após a realização dos respectivos tratamentos as sementes foram inoculadas em meio 1/4MS (meio MS com os macronutrientes reduzidos para 1/4) sem reguladores de crescimento, com vista à redução da formação de *calli*, e incubadas em condições controladas a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e sob fotoperíodo de 16 h ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tabela 2.1. Alguns dos tratamentos testados para indução de germinação de sementes de *D. lusitanicum in vitro* em meio de cultura 1/4MS.

Ensaio	Tratamento
G1	Embebição em água estéril e armazenamento a 5°C durante 1 mês
G2	Tratamento com H_2SO_4 a 20% durante 20 min
G3	Escarificação manual com bisturi
G4	Escarificação com lixa estéril
G5	Escarificação com areia estéril
G6	Imersão em água fervente durante 30 s
G7	Imersão numa solução de GA_3 1 mg l^{-1} durante 12 h
G8	Escarificação manual com bisturi seguida de Embebição em água estéril e armazenamento a 5°C durante 4 dias
G9	Embebição em água estéril e armazenamento a 5°C durante 4 dias seguido de escarificação manual com bisturi
G10	Embebição em água estéril e armazenamento a 5°C durante 4 dias seguido de escarificação com lixa
G11	Embebição em água estéril e armazenamento a 5°C durante 4 dias seguido de escarificação com areia
G12	Embebição em água estéril e armazenamento a 5°C durante 4 dias seguido de imersão numa solução de GA_3 1 mg l^{-1} durante 12h

Em todos os tratamentos foi realizado um ensaio controlo em que as sementes foram inoculadas no respectivo meio de cultura, logo após desinfeção sem sofrerem qualquer tipo de tratamento.

Para a realização dos ensaios de germinação utilizaram-se como recipientes de cultura tubos de vidro (25 × 160 mm) contendo 10 ml de meio de cultura, sendo inoculada uma semente por tubo. Para cada combinação de tratamentos efectuados testaram-se no mínimo 50 sementes. A percentagem de germinação foi avaliada semanalmente durante 2 meses.

2.2.3. Multiplicação dos rebentos

Para otimizar o meio de cultura para multiplicação *in vitro* de rebentos de *D. lusitanicum* utilizaram-se segmentos nodais retirados de rebentos provenientes da germinação das sementes. Inicialmente, utilizou-se como meio base para estes ensaios o meio MS com 2% (p/v) de sacarose. Foram testadas quatro citocininas (zeatina - Zea, BA, tidiazurão - TDZ e cinetina - Kin) e duas concentrações das mesmas (0,1 e 0,2 mg l⁻¹). Efectuou-se também um ensaio controlo em meio MS sem citocininas.

Após seleccionar a Zea como a citocinina mais adequada para a multiplicação de rebentos, estudou-se um leque maior de concentrações de Zea (0,5; 1; 2 e 3 mg l⁻¹) em meio MS. Posteriormente, estudou-se a influência da concentração de sais durante esta fase, testaram-se duas modificações do meio MS (diluindo os macronutrientes para 1/2 ou 1/4), suplementado com 0,2 mg l⁻¹ de Zea.

Nos ensaios de multiplicação inocularam-se 5 rebentos por balão Erlenmeyer de 500 ml contendo 80 ml de meio de cultura. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento em condições controladas a 25 ± 2 °C e sob fotoperíodo de 16 h (60 μmol m⁻² s⁻¹). Após 6 semanas avaliou-se a taxa de multiplicação (número de rebentos produzidos por cada explantado inicial) e o comprimento do maior rebento, bem como o aspecto das culturas. Nos ensaios de multiplicação, para cada meio basal

(MS, 1/2MS, 1/4MS), citocinina (Zea, BA, TDZ e Kin) e concentração (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 e 3 mg l⁻¹) foram testados 30 rebentos, sendo cada ensaio repetido duas vezes.

2.2.4. Enraizamento dos rebentos e aclimatização das plântulas

Para o enraizamento de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum* testou-se o enraizamento *in vitro* e o enraizamento *ex vitro*. Para realização destes ensaios utilizaram-se rebentos no final da fase de multiplicação em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ de Zea com cerca de 6 cm de comprimento.

Para o enraizamento *in vitro* testou-se como meio basal o meio MS, 1/2MS e 1/4MS. A formação de raízes foi, inicialmente, induzida pela incorporação de auxinas no meio de cultura, tendo-se testado três auxinas (IAA, IBA e NAA) e duas concentrações das mesmas (1 e 2 mg l⁻¹). Após a análise dos resultados, testaram-se outras concentrações de NAA (0,2 e 0,5 mg l⁻¹), IAA e IBA (0,1; 0,2; 0,5 e 3 mg l⁻¹), adicionadas ao meio MS, 1/2MS e 1/4MS. Posteriormente, testou-se o efeito da imersão basal dos rebentos em solução auxínica (IAA, NAA, e IBA), a diferentes concentrações (0,2; 0,5 e 1 mg l⁻¹), durante 1 ou 2 min, seguida da inoculação em meio de cultura sem reguladores de crescimento. Em todos os ensaios de enraizamento *in vitro* inocularam-se 5 rebentos por balão Erlenmeyer de 500 ml contendo 80 ml de meio de cultura. As culturas foram mantidas nas condições atrás descritas e 5 semanas após indução do enraizamento, contabilizou-se a frequência de enraizamento, o número de raízes desenvolvidas por rebento e o comprimento da raiz mais longa. Para cada tratamento foram efectuadas no mínimo 3 repetições com 10 rebentos cada.

Para induzir o enraizamento em condições *ex vitro*, a base dos rebentos foi imersa durante 2 min em solução de IBA ou NAA na concentração de 0,5 ou 1 g l⁻¹ (Estampa 2.3A). Os rebentos foram de seguida colocados em vasos de 350 ml de capacidade,

contendo uma mistura de turfa e vermiculite (3:1, v/v) (Estampa 2.3B,C) e transferidos para câmara de cultura com controlo de luz e HR. O fotoperíodo foi de 16 h e a intensidade luminosa ao nível das plantas foi regulada para $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na primeira semana de aclimatização e $124 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nas restantes semanas (lâmpadas fluorescentes Gro-Lux F18W/GRO). A HR foi controlada por higrómetro com um sensor colocado no interior da câmara e foi regulada para o valor inicial de 90%, tendo sido reduzido para 80% na terceira semana e 70% na quarta semana, valor mantido até final do ensaio (6 semanas). No interior do estufim a temperatura foi de $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 6 semanas contabilizou-se a percentagem de sobrevivência, a percentagem de rebentos que desenvolveu raízes, o número de raízes desenvolvidas por rebento e o comprimento da raiz mais longa desenvolvida por rebento. Foram testados 10 rebentos por ensaio e cada ensaio repetido pelo menos 3 vezes.

Os rebentos enraizados *in vitro* com pelo menos 2 raízes bem desenvolvidas, após remoção do meio de cultura e lavagem do sistema radicular em água corrente, para remover os restos de agar, foram transplantados, individualmente, para vasos de plástico com 350 cm^3 de capacidade, contendo substrato constituído por uma mistura de turfa e vermiculite 3:1 (v/v). Após envasamento as plântulas foram pulverizadas com água e colocadas em câmara de aclimatização nas condições descritas para o enraizamento *ex vitro*. Após 6 semanas contabilizou-se a percentagem sobrevivência.

2.2.5. Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados a partir de soluções-mãe. Após adição de 20 g l^{-1} de sacarose e 7 g l^{-1} de agar, o pH foi ajustado a 5,75 (com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M). A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclavagem a 1 atm, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min.

2.2.6. Manipulação do material vegetal

Todas as manipulações do material vegetal, excepto no caso dos ensaios *ex vitro*, decorreram em condições de assepsia em câmara de fluxo laminar vertical, sobre caixas de petri esterilizadas. Todos os utensílios de corte e manuseamento, durante as operações, foram esterilizados em esterilizador de bancada a 250 °C aproximadamente. A zona de trabalho foi previamente desinfectada com etanol.

2.2.7. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados

O delineamento e tratamento estatístico dos dados são referidos para cada ensaio. Na elaboração das bases de dados foi utilizado o programa Microsoft Excel para Windows. Os dados foram tratados estatisticamente utilizando o programa SPSS para Windows versão 11.0, através de análise de variância. Para valores de F significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Os dados apresentados sob a forma de percentagens foram transformados em arco seno da raiz quadrada da percentagem / 100, antes de serem submetidos à análise estatística. Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão, sendo os valores significativamente diferentes assinalados com letras diferentes. Para elaboração gráfica utilizou-se o programa Sigma Plot Versão 8.

2.2.8. Estudos de ultraestrutura por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Segmentos de folhas retirados de plantas de *D. lusitanicum* a crescer no ambiente natural (Serra de Monchique, Algarve) ou de rebentos a crescer *in vitro* em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ de Zea, foram fixados em gluteraldeído a 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2, durante 4 h a 4 °C. Após três lavagens de

20 min cada com o mesmo tampão, o material foi desidratado numa série crescente de acetonas, permanecendo 15 min em cada uma das soluções. O material foi seco pelo método do ponto crítico utilizando CO₂ líquido (Bio-Rad), montado em suportes e metalizado com uma fina camada de ouro (500 µm de espessura) (Polaron E5300). As observações foram realizadas em Microscópio Electrónico de Varrimento JEOL T220 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) a 15 kV e registadas em película Kodak TMX 100 preto e branco.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Germinação de sementes *in vitro*

Neste trabalho, não se obteve germinação de sementes não tratadas, ou seja inoculadas logo após desinfecção sem qualquer tratamento. Assim, tudo indica que as sementes de *D. lusitanicum* são dormentes e necessitam de pré-tratamento para germinar. No primeiro conjunto de ensaios de germinação testou-se o efeito de um período de frio de 1 mês, da imersão numa solução de GA₃ 1 mg l⁻¹ durante 12 h, do efeito de vários dias (2, 3 e 4) de Embebição em água a 5 °C e da combinação deste tratamento com a escarificação manual. Testou-se ainda o efeito da luz durante o período de germinação. Da análise dos resultados verificou-se que a escarificação é essencial para a germinação de sementes de *D. lusitanicum*, não se tendo verificado germinação de sementes não escarificadas. Assim, as sementes desta espécie parecem possuir dormência do tegumento, que o torna impermeável à água e/ou a gases, impedindo a germinação do embrião (Bhat *et al.*, 1994; Egerton, 1998). Segundo Baskin & Baskin (1998) algumas estruturas que cobrem o embrião, como o endosperma, podem também impedir a sua germinação. Ocasionalmente a dormência é também causada por uma inibição química

na epiderme ou nas membranas interiores adjacentes. Nas sementes com este tipo de dormência são, geralmente, necessárias alterações morfológicas para se iniciar a germinação. Em condições naturais estas sementes permanecem no solo sem germinar o tempo necessário para permitir a penetração de água, as trocas gasosas ou a neutralização ou desinibição química, que, dependendo da espécie e das condições ambientais, pode levar vários anos. As sementes de algumas espécies só germinam por exemplo depois de sujeitas ao fogo. No laboratório, as sementes dormentes são induzidas a germinar através do manuseamento dessas condições.

Vários tratamentos podem ser utilizados para quebrar a dormência de sementes impermeáveis, tais como o uso de solventes orgânicos (álcool e acetona), que removem a camada cerosa da semente, ou ácidos fortes, como o ácido sulfúrico concentrado, que é efectivo para sementes de testa rija. Também é bastante comum a utilização de água fervente e aquecimento a seco para reduzir a impermeabilidade das sementes. A escarificação mecânica (que consiste na abrasão do tegumento das sementes) é talvez o método mais usado, tendo sido utilizado com sucesso por vários autores para induzir a germinação de sementes dormentes (Abrie & Staden, 2001; Bringmann *et al.*, 2002; Medina-Sánchez & Lindig-Cisneros, 2005; Zida *et al.*, 2005).

Na Figura 2.1 pode observar-se o efeito da luz e do período de Embebição a 5 °C na germinação (%) das sementes de *D. lusitanicum*. O incremento do período de Embebição em água a 5 °C de 2 para 4 dias traduziu-se num aumento significativo ($P < 0,05$) da taxa de germinação. Isto poderá indicar que, para além da dormência do tegumento, as sementes desta espécie poderão também apresentar dormência interna. A taxa de germinação mais elevada (77%) ($P < 0,05$) foi observada quando as sementes permaneceram durante 4 dias a 5 °C e foram expostas à luz durante o período de germinação *in vitro* (Figura 2.1). A dormência interna é em geral causada por condições

fisiológicas que impedem a germinação, sendo a estratificação fria o método mais comum para quebrar este tipo de dormência, que em alguns casos pode ser substituída por tratamentos químicos. A quebra da dormência das sementes por tratamento de frio tem sido referenciada para várias espécies (Hoque *et al.*, 2001; Iankova *et al.*, 2001; Kulkarni *et al.*, 2005), inclusivamente de plantas carnívoras (Jang & Park, 1999; Baskin *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2003). Os resultados obtidos parecem indicar que as sementes de *D. lusitanicum* possuem dormência do tegumento e dormência interna, pelo que a combinação de tratamentos, como a escarificação e a estratificação fria, que quebram estes dois tipos de dormência, respectivamente, traduziu-se num incremento da taxa de germinação.

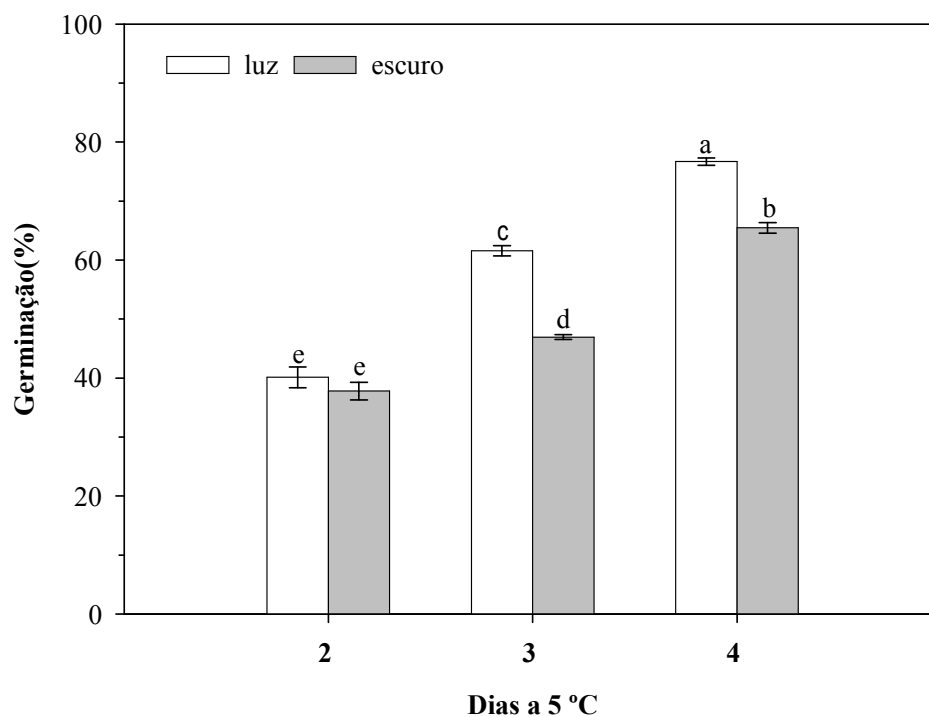


Figura 2.1. Influência de diferentes períodos de Embebição em água a 5 °C antes da escarificação manual, e da luz (fotoperíodo de 16 h, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ou escuro durante a germinação de sementes de *D. lusitanicum* inoculadas em meio de cultura MS suplementado com $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de GA_3 . Os valores representam médias \pm erros-padrão de 5 repetições com 10 sementes cada. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Para qualquer um dos períodos de frio testados (2, 3 e 4 dias), a percentagem de germinação mais elevada verificou-se quando as sementes foram expostas à luz durante o período de germinação *in vitro*. Também em *Drosera anglica*, espécie insectívora, se verificou que a luz é favorável durante o período de estratificação e incubação das sementes (Baskin *et al.*, 2001).

Apesar das taxas de germinação obtidas nos ensaios atrás descritos serem satisfatórias, observou-se a formação de *calli* na base dos rebentos resultantes da germinação das sementes (Estampa 2.1B,C). Posteriormente verificou-se a regeneração de novos rebentos a partir deste *calli*, o que pode aumentar o risco de variação somaclonal. Os métodos de cultura de tecidos que possam induzir variação somaclonal devem ser evitados uma vez que a manutenção da integridade genética é essencial em programas de conservação (Benson *et al.*, 2000). Assim, na tentativa de evitar o desenvolvimento de *calli* realizou-se um segundo conjunto de ensaios de germinação utilizando o meio de cultura 1/4MS sem reguladores de crescimento. Uma vez que os melhores resultados de germinação foram obtidos em sementes embebidas em água a 5 °C durante 4 dias e colocadas a germinar à luz (fotoperíodo de 16 h, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), todas as sementes dos ensaios seguintes foram submetidas a essas condições. Os resultados obtidos estão resumidos na Figura 2.2. Para os restantes ensaios (G1, G2, G5-G7, G11 e G12, Tabela 2.1) a percentagem de germinação foi nula.

À semelhança do que aconteceu nos ensaios anteriores não se obteve germinação nas sementes não sujeitas a qualquer tratamento (controlo), nas sementes sujeitas a 1 mês de frio e nas sementes imersas em GA₃ durante 12 h (com e sem período de Embebição a 5 °C).

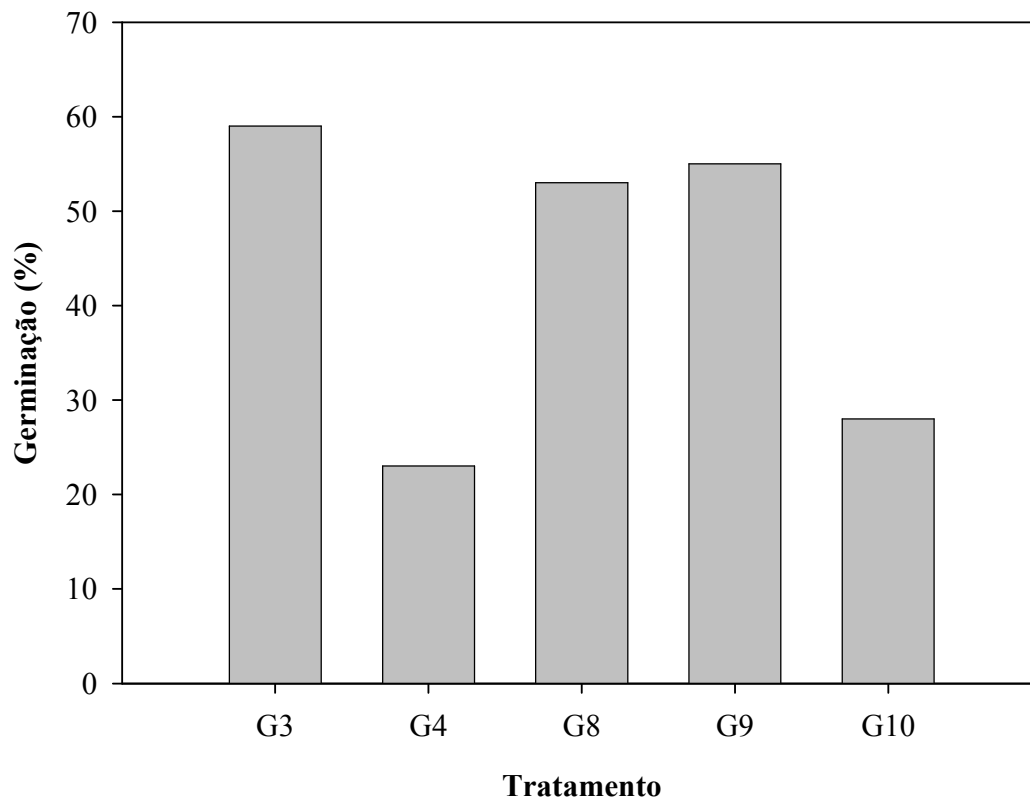


Figura 2.2. Germinação (%) *in vitro* de sementes de *D. lusitanicum* sujeitas a diferentes tratamentos (Tabela 2.1) e inoculadas em meio 1/4MS. Os valores representam a percentagem de germinação de um ensaio único com 50 sementes.

Mais uma vez se confirmou que a escarificação é essencial para a germinação de sementes desta espécie. No entanto, não se obteve germinação nas sementes escarificadas com areia ou com ácido sulfúrico. O banho de areia e a escarificação química com ácido sulfúrico são os processos vulgarmente utilizados para escarificar sementes de um grande número de espécies. Provavelmente as condições utilizadas nestes tratamentos não foram suficientemente fortes para escarificar as sementes de *D. lusitanicum* e precisam de ser ainda optimizadas. A escarificação com recurso a uma lixa e a escarificação manual com pinça e bisturi permitiram obter 23 e 59% de sementes germinadas, respectivamente. Surpreendentemente, a taxa de germinação não foi incrementada quando se combinou a escarificação manual com um período de Embebição em água a 5 °C durante 4 dias, como tinha acontecido no ensaio anterior.

Apenas se observou um ligeiro incremento (de 23 para 29%) combinando o tratamento de 4 dias de frio com a escarificação com lixa.

Analisando as curvas de germinação ao longo de várias semanas de sementes submetidas a diferentes tratamentos (Figura 2.3A) verifica-se algumas diferenças em termos de velocidade de germinação.

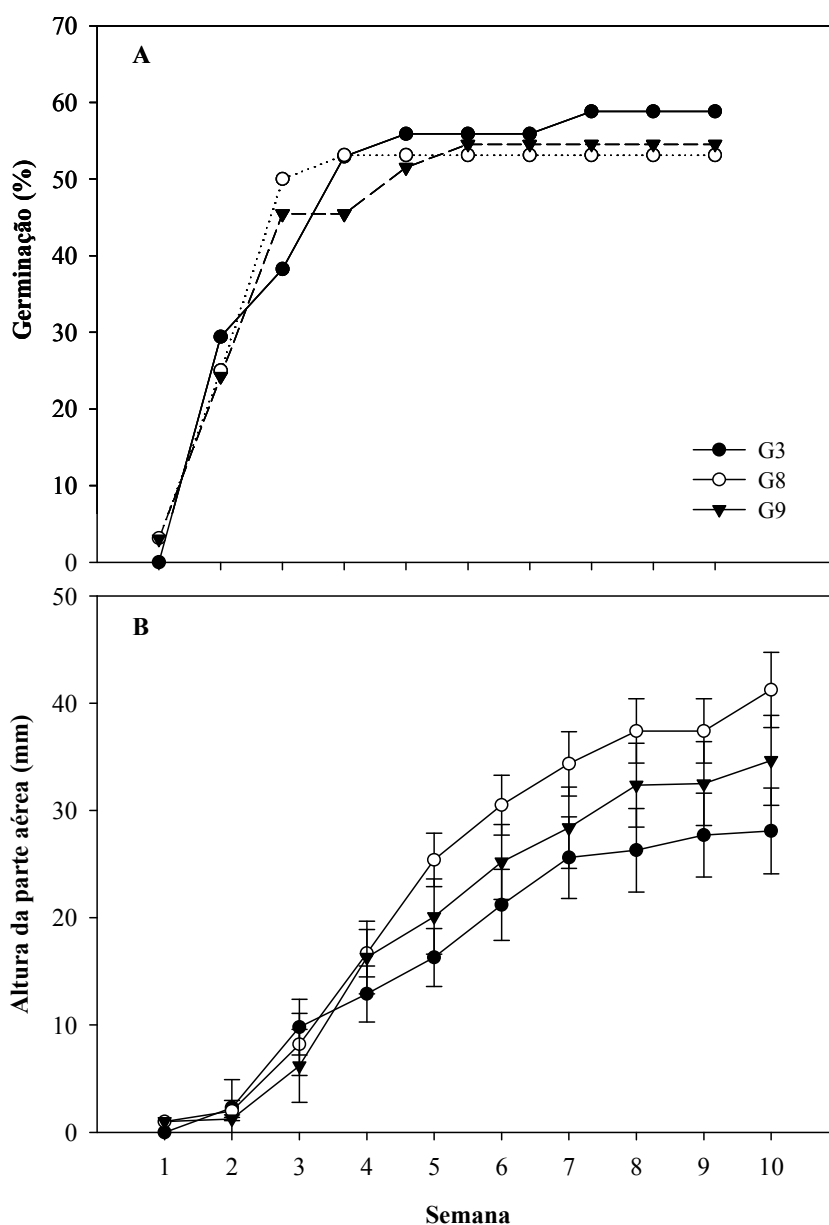


Figura 2.3. Taxas de germinação (relativas a 50 sementes) (A) e altura da parte aérea das plântulas (B), ao longo de 10 semanas após inoculação, de sementes de *D. lusitanicum* submetidas a diferentes tratamentos (Tabela 2.1) e germinadas *in vitro* em meio 1/4MS. Os valores de altura da parte aérea das plântulas representam médias \pm erros-padrão.

As sementes submetidas ao frio após escarificação (G8) germinaram mais rapidamente e de uma forma mais sincronizada que as restantes. Relativamente à altura média da parte aérea das plântulas obtidas (Figura 2.3B), observou-se que a partir da quarta semana este parâmetro foi superior para sementes submetidas ao frio após escarificação (G8). Ao contrário, a parte aérea das plântulas resultantes de sementes submetida apenas a escarificação (G3) foi inferior.

Neste trabalho não se verificou germinação quando as sementes foram submetidas a um tratamento de imersão em água fervente, embora para a mesma espécie Correia & Freitas (2002) tenham obtido 75% de germinação *in vivo* após este tratamento. Visto que a dormência das sementes é afectada por factores ambientais, pelas condições de armazenamento e pelo estado fisiológico da planta-mãe (Baskin & Baskin, 1998; Koornneef *et al.*, 2002), as diferenças na resposta ao tratamento de calor poderão ser explicadas pela diferente proveniência das sementes.

Embora a taxa de germinação das sementes no meio 1/4MS seja inferior ao obtido no meio MS suplementado com BA e GA₃, o primeiro permitiu eliminar o desenvolvimento de *calli* basal e permitiu um melhor alongamento dos rebentos (Estampa 2.1D-F). Assim, este meio mostrou ser o mais adequado para germinar *in vitro* sementes de *D. lusitanicum*, com vista à posterior multiplicação dos germinantes obtidos. No entanto, será do maior interesse tentar incrementar a germinação *in vitro* das sementes desta espécie, especialmente utilizando outros métodos de escarificação. Por outro lado, o efeito da estratificação fria na germinação precisa ainda de ser melhor esclarecido. Será interessante testar temperaturas de incubação das sementes diferentes, nomeadamente 15 e 20 °C, uma vez que temperaturas inferiores a 25 °C são normalmente indicadas para a germinação de espécies Mediterrâneas (Baskin & Baskin, 1998; Doussi & Thanos, 2002).

Devido ao reduzido número de sementes disponível e no sentido de otimizar os resultados testando vários ensaios, não se fez distinção entre as sementes das populações amostradas o que não permitiu detectar a variabilidade intrapopulacional. Face aos resultados obtidos neste estudo será possível efectuar estudos comparativos entre sementes provenientes de diferentes populações partindo de um número relativamente menor de sementes.

2.3.2. Multiplicação dos rebentos

A fase de multiplicação é de grande importância durante o processo de micropropagação, uma vez que o seu objectivo é a produção rápida de órgãos ou outras estruturas que possam ulteriormente regenerar novas plantas (Murashige, 1974). Este processo é normalmente conseguido adicionado citocininas ao meio de cultura (Debergh & Read, 1991). Para multiplicar *in vitro* rebentos de *D. lusitanicum* provenientes de germinação de sementes, foi inicialmente testado o meio de cultura MS suplementado com 0,1 ou 0,2 mg l⁻¹ de BA, Kin, TDZ ou Zea. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 2.2, expressos sob a forma de taxas de multiplicação e comprimento do maior rebento desenvolvido. Todas as citocininas testadas induziram a formação de rebentos, sendo a taxa de multiplicação significativamente afectada pelo tipo de citocinina ($P < 0,001$), sua concentração ($P < 0,001$) e interacção entre ambas ($P < 0,05$). O comprimento do maior rebento foi da mesma forma afectado significativamente pelas citocininas ($P < 0,001$), pela concentração ($P < 0,05$) e pela interacção citocinina e concentração ($P < 0,001$). Independentemente da concentração a BA foi a citocinina menos eficaz em termos de número de rebentos desenvolvidos e comprimento dos mesmos. Relativamente às restantes citocininas, embora não se

tenham verificado diferenças significativas para o número de rebentos, o comprimento do maior rebento foi superior nos meios de cultura suplementados com Kin e Zea.

Analisando os resultados obtidos tendo em conta o tipo de citocinina e a concentração, verificou-se que o número de rebentos desenvolvido foi significativamente superior ($P < 0,05$) nos meios suplementados com 0,2 mg l⁻¹ de Kin, TDZ e Zea. Por outro lado, o comprimento do maior rebento foi superior no meio sem citocinina (controlo), com 0,1 e 0,2 mg l⁻¹ de Kin e com 0,2 mg l⁻¹ de Zea.

Tabela 2.2. Efeito das citocininas (Zea, BA, TDZ e Kin) e sua concentração (0,1 e 0,2 mg l⁻¹) no número de rebentos desenvolvidos por rebento e no comprimento do maior rebento (mm).

Citocinina	Concentração (mg l ⁻¹)	Média do número de rebentos	Comprimento do maior rebento (mm)
Controlo	-	3,2 ± 0,3 cd	57,8 ± 3,4 ab
Zea	0,1	2,8 ± 0,2 d	53,3 ± 3,3 b
Zea	0,2	4,2 ± 0,2 a	63,3 ± 2,4 a
BA	0,1	2,8 ± 0,2 d	27,8 ± 2,2 d
BA	0,2	2,7 ± 0,2 d	23,2 ± 2,3 d
TDZ	0,1	3,5 ± 0,2 bc	40,9 ± 2,2 c
TDZ	0,2	4,0 ± 0,2 ab	25,2 ± 2,4 d
Kin	0,1	3,2 ± 0,2 cd	63,0 ± 2,2 a
Kin	0,2	3,8 ± 0,2 ab	59,7 ± 2,3 ab

Análise ANOVA bi-factorial

Citocinina (A)	***	***
Concentração (B)	***	*
A × B	**	***

Os valores representam médias ± erros-padrão de 2 repetições com 30 rebentos cada. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test). ns, *, **, ***: não significativo, significativo para $P < 0,05$, significativo para $P < 0,01$ e significativo para $P < 0,001$, respectivamente (Análise ANOVA bi-factorial).

Os rebentos desenvolvidos nos meios sem citocinina, suplementados com Zea ou Kin, eram vigorosos e apresentavam morfologia normal (Estampa 2.1H). Contrariamente, os desenvolvidos nos meios suplementados com BA e TDZ apresentavam sintomas de hiperhidricidade (Estampa 2.1G), o que se reflectiu no seu reduzido alongamento. Este fenómeno tem sido frequentemente associado à presença destas citocininas no meio de multiplicação (Nobre, 1996; Cuenca & Amo-Marco, 2000; Paek & Hahn, 2000) e é caracterizado essencialmente por alterações anatómicas, fisiológicas e morfológicas nas culturas, em especial nas folhas (folhas espessas, alongadas, translúcidas, com menor conteúdo em clorofila, entre outras), provocando uma diminuição da capacidade de multiplicação, de enraizamento e aclimatização (Ziv, 1991).

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com estudos anteriormente efectuados noutras plantas carnívoras, comprovando uma melhor resposta das culturas em presença das citocininas Kin e Zea. Em *Dionaea muscipula* Ellis, a Zea foi a citocinina mais efectiva na indução de rebentos (Minocha, 1985). Mais recentemente Jang *et al.* (2003) descreveram um protocolo de micropropagação para a planta carnívora vulgarmente conhecida por “Venus fly trap” (*Dionaea muscipula* Ellis) a partir de sementes, sendo a Kin na concentração de 0,5 mg l⁻¹ a citocinina mais eficaz para a multiplicação das culturas.

Com base nos resultados anteriores optou-se por testar um leque mais alargado de concentrações de Zea com vista à optimização desses resultados. Os resultados obtidos mostram que a taxa de multiplicação aumenta com o aumento da concentração desta citocinina e que o alongamento dos rebentos é inibido em meios suplementados com elevadas concentrações de Zea (Tabela 2.3). Uma vez que a taxa de multiplicação se mantém a partir da concentração de 0,2 mg l⁻¹ de Zea esta foi seleccionada para multiplicar culturas de *D. lusitanicum*.

Tabela 2.3. Efeito da concentração de Zea, quando adicionada ao meio MS total, na multiplicação *in vitro* de rebentos de *D. lusitanicum*.

Zea (mg l ⁻¹)	Média do número de rebentos	Comprimento do maior rebento (mm)
0	3,2 ± 0,3 b	57,8 ± 3,4 a
0,1	2,8 ± 0,2 b	53,3 ± 3,3 ab
0,2	4,2 ± 0,2 a	63,3 ± 2,4 a
0,5	4,6 ± 0,3 a	61,0 ± 2,3 a
1	4,2 ± 0,3 a	43,3 ± 2,2 b
3	4,6 ± 0,3 a	27,6 ± 1,7 c

Os valores representam médias ± erros-padrão de 2 repetições com 30 rebentos cada. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test)

Selecionada a Zea como a melhor citocinina, foi estudar-se o seu efeito quando adicionada a meios de cultura 1/2MS e 1/4MS, uma vez que os meios mais diluídos em sais têm sido referenciados como vantajosos para multiplicação *in vitro* de rebentos de outras plantas carnívoras (Minocha, 1985; Jang *et al.*, 2003; Kawiak *et al.*, 2003; Kim & Jang, 2004). No entanto, neste trabalho o meio MS mostrou-se mais efectivo que as suas diluições na multiplicação de rebentos de *D. lusitanicum* ($P < 0.05$) (Tabela 2.4), observando-se uma redução da taxa de multiplicação e do comprimento do maior rebento com a diminuição da concentração em sais do meio MS.

Tabela 2.4. Efeito da concentração do meio MS, suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea, na multiplicação de rebentos de *D. lusitanicum*.

Meio basal	Média do número de rebentos	Comprimento do maior rebento (mm)
MS	4,2 ± 0,2 a	63,3 ± 2,4 a
1/2MS	3,4 ± 0,2 b	28,5 ± 2,6 b
1/4MS	2,2 ± 0,2 c	13,3 ± 2,8 c

Os valores representam médias ± erros-padrão de 2 repetições com 30 rebentos cada. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test).

Os resultados obtidos mostram que a multiplicação de rebentos de *D. lusitanicum* é influenciada pela concentração de sais do meio de cultura, pelo tipo de citocinina utilizada e sua concentração. O meio MS total suplementado com 0,2 ou 0,5 mg l⁻¹ de Zea mostrou ser o mais adequado para a multiplicação de culturas desta espécie, uma vez que permitiu obter simultaneamente maior número de rebentos desenvolvidos, maior alongamento e melhor aspecto dos rebentos.

2.3.3. Enraizamento dos rebentos e aclimatização das plântulas

Para induzir o enraizamento *in vitro* de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum*, testaram-se os meios MS total, 1/2MS e 1/4MS, e as auxinas IAA, IBA e NAA a 1 e 2 mg l⁻¹ (Figura 2.4). De uma maneira geral as percentagens de enraizamento não foram muito elevadas, tendo-se obtido os melhores resultados em meio 1/2MS suplementado com 1 e 2 mg l⁻¹ de NAA (47 e 57%, respectivamente) ($P < 0,05$) (Figura 2.4). O NAA foi a auxina mais eficaz em termos de frequência de enraizamento independentemente do meio de cultura utilizado. No entanto, os rebentos enraizados com esta auxina apresentavam elevada formação de *calli* basal o que pode impedir o normal desenvolvimento das raízes, quer bloqueando fisicamente o desenvolvimento dos primórdios radiculares, quer comprometendo a continuidade vascular entre as raízes e o caule (Thorpe *et al.*, 1991). De facto, embora não se tendo verificado diferenças consideráveis em termos de número de raízes desenvolvidas nos diferentes meios de cultura, as raízes desenvolvidas em meio contendo NAA apresentaram menor comprimento (Tabela 2.5) ($P < 0,05$).

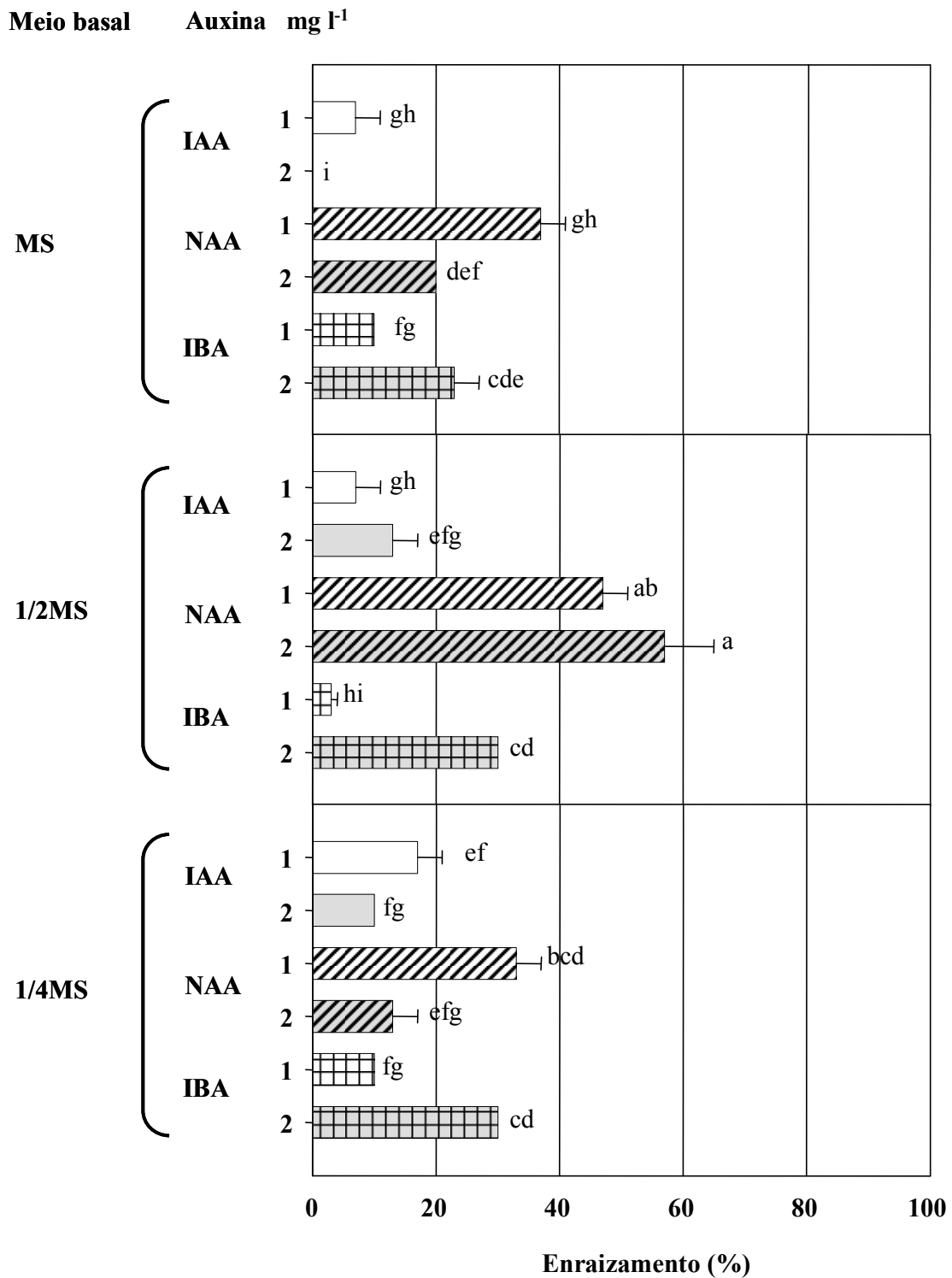


Figura 2.4. Efeito do meio basal (MS, 1/2MS e 1/4MS), das auxinas (IAA, NAA, IBA) e da sua concentração (1 e 2 mg l⁻¹), na frequência de enraizamento de rebentos de *D. lusitanicum* 5 semanas após indução. As barras horizontais representam os erros-padrão de 3 repetições com 10 rebentos cada, por meio basal, auxina e concentração. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

A resposta ao NAA durante o enraizamento *in vitro* varia de acordo com a espécie. Chua & Henshaw (1999) e Zhou *et al.* (2000) referenciam o NAA e os meios menos concentrados em sais como os mais eficazes no enraizamento de outras espécies de plantas carnívoras. Por outro lado, Hutchinson (1984) e Jang *et al.* (2003) descrevem que o NAA é inibitório para o enraizamento de rebentos da planta carnívora *Dionaea muscipula*.

Tabela 2.5. Efeito do meio basal (MS, 1/2MS e 1/4MS), das auxinas (IAA, NAA, IBA) e da sua concentração (1 e 2 mg l⁻¹) no número de raízes desenvolvidas por rebento e no comprimento da raiz mais longa (mm).

Meio basal	Auxina	Concentração de auxina (mg l ⁻¹)	Média do número de raízes	Comprimento da raiz mais longa (mm)
MS	IAA	1	3,5 ± 0,7 abc	27,5 ± 3,5 a
		2	-	-
	NAA	1	9,7 ± 2,3 a	4,6 ± 0,7 efg
		2	6,0 ± 1,3 abc	4,2 ± 0,5 efg
	IBA	1	4,7 ± 1,5 abc	6,0 ± 0,7 defg
		2	2,3 ± 0,6 bc	7,6 ± 2,3 cdef
1/2MS	IAA	1	1,0 ± 0,0 c	9,0 ± 4,0 bcde
		2	3,8 ± 0,7 abc	13,8 ± 3,1 b
	NAA	1	6,3 ± 1,0 abc	4,4 ± 0,6 efg
		2	6,9 ± 1,4 abc	3,3 ± 0,3 fg
	IBA	1	1,0 ± 0,0 abc	14,1 ± 3,1 b
		2	6,1 ± 1,6 abc	9,5 ± 1,7 bcde
1/4MS	IAA	1	3,2 ± 0,4 abc	14,0 ± 2,7 b
		2	3,3 ± 0,4 abc	10,7 ± 2,9 bcd
	NAA	1	9,0 ± 1,6 ab	4,5 ± 0,5 efg
		2	3,0 ± 0,5 abc	2,0 ± 0,1 g
	IBA	1	3,0 ± 0,5 abc	12,7 ± 4,6 bc
		2	4,4 ± 0,5 abc	10,4 ± 1,7 bcd

Os valores representam médias ± erros-padrão de 3 repetições com 10 rebentos cada. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

O IAA e o IBA, nas concentrações testadas, permitiram um maior alongamento das raízes formadas ($P < 0,05$) (Tabela 2.5), no entanto, as baixas taxas de enraizamento obtidas limitam a sua utilização. Assim, com o intuito de reduzir a formação de *calli* na base dos rebentos e aumentar o alongamento das raízes nos meios suplementados com NAA, testou-se a redução da concentração desta auxina para 0,5 e 0,2 mg l⁻¹. No entanto, a formação de *calli* manteve-se e verificou-se num decréscimo da frequência de enraizamento (10-50%), o que permite concluir que esta auxina não é adequada para enraizar *in vitro* rebentos de *D. lusitanicum*.

Comprovada a ineficácia do NAA testaram-se os mesmos meios de cultura (MS, 1/2MS e 1/4MS) suplementados com diferentes concentrações de IAA e IBA. No entanto, o IAA continuou a não se mostrar efectivo na indução de raízes. Uma possível explicação para este resultado é o facto de esta auxina ser muito instável sendo a maior parte removida por oxidação fotoquímica e/ou enzimática logo nos primeiros dias de cultura (de Klerck *et al.*, 1999).

Os ensaios com IBA, quando adicionado ao meio 1/4MS, permitiram obter os melhores resultados de enraizamento *in vitro*, 83% de frequência de enraizamento em meio suplementado com 0,2 mg l⁻¹ de IBA (Tabela 2.6). O número de raízes desenvolvidas por rebento e o comprimento da raiz mais longa não foram influenciados pela concentração desta auxina ($P \geq 0,05$) (Tabela 2.6). É de realçar que o enraizamento em meios de cultura com IBA, independentemente da concentração testada, permitiram enraizamento sem a formação de *calli*. Meios pouco concentrados em sais suplementados com baixas concentrações de IBA foram usados com sucesso no enraizamento de rebentos de *Dionaea muscipula* Ellis (Minocha, 1985; Jang *et al.*, 2003).

Tabela 2.6. Efeito da concentração de IBA, quando adicionado ao meio 1/4MS, na frequência de enraizamento (%), na média do número de raízes e no comprimento da raiz mais longa (mm) desenvolvida por rebento de *D. lusitanicum*.

IBA (mg l ⁻¹)	Enraizamento (%)	Média do número de raízes	Comprimento da raiz mais longa (mm)
0	0 e	-	-
0,1	30 ± 0 c	1,7 ± 0,4 a	11,0 ± 2,7 a
0,2	83 ± 4 a	3,3 ± 0,5 a	11,8 ± 1,7 a
0,5	67 ± 2 b	3,3 ± 0,4 a	10,9 ± 1,5 a
1,0	10 ± 0 d	3,0 ± 0,7 a	12,7 ± 4,6 a
2,0	30 ± 0 c	4,4 ± 0,5 a	10,4 ± 1,7 a
3,0	23 ± 4 c	2,7 ± 0,7 a	6,9 ± 1,7 a

Os valores representam médias ± erros-padrão de 3 repetições com 10 rebentos cada. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

Neste trabalho foi também testada a imersão basal dos rebentos em solução auxínica, antes da inoculação em meio de cultura sem reguladores de crescimento, na indução de enraizamento. Apesar de se terem testado várias auxinas (IAA, NAA, e IBA) a diferentes concentrações (0,2; 0,5 e 1 mg l⁻¹) e dois períodos de imersão basal (1 e 2 min) este método não se mostrou eficaz no enraizamento *in vitro* de rebentos de *D. lusitanicum*. Nestes ensaios, além de as percentagens de enraizamento serem muito baixas ou nulas, a totalidade dos rebentos apresentava necrose apical no final do período de enraizamento.

Ultrapassadas algumas dificuldades iniciais, o enraizamento *in vitro* de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum* mostrou-se um processo eficaz em meio de cultura 1/4MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ de IBA, permitindo obter 83% de rebentos enraizados (Estampa 2.2A-D). À semelhança do que acontecia na fase de multiplicação, observou-se uma certa preferência desta espécie pelas baixas concentrações de reguladores de crescimento. Por outro lado, contrariamente ao que aconteceu durante a

multiplicação, os meios menos concentrados em sais foram mais favoráveis para o enraizamento à semelhança do que tem sido observado em diversas espécies.

As plântulas enraizadas *in vitro* foram aclimatizadas às condições *ex vitro*, observando-se elevada percentagem de mortalidade, apenas 50% das plantas sobreviveram nestas condições (Figura 2.5) (Estampa 2.2E). As condições de cultura *in vitro* resultam frequentemente no desenvolvimento de plantas com deficiências quer ao nível morfológico quer ao nível anatómico e fisiológico. As folhas são os órgãos mais afectados, com reduções da área foliar, decréscimo da dimensão e número de células do mesófilo, aumento do número de espaços intercelulares, pouca diferenciação ao nível dos tecidos vasculares, revestimento epidérmico deficiente, estomas com alterações na morfologia, distribuição, frequência e funcionalidade, entre outras (Preece & Sutter, 1991).

As observações de Microscopia Electrónica de Varrimento mostraram que, em comparação com as plantas de campo, as folhas de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum* apresentam algumas diferenças morfológicas (Estampa 2.4). Essas diferenças são notórias ao nível das glândulas pediculadas e sésseis que estão presentes em menor número nos rebentos (Estampa 2.4A,B). É de realçar a maior densidade de estomas nos rebentos, o facto de estes estarem abertos e de as células da epiderme possuírem menos estrias cuticulares, provavelmente por estarem menos cutinizadas. Estas características podem resultar em deficiente controlo da transpiração por parte das plantas produzidas *in vitro*, conduzindo à sua desidratação, e por vezes à sua morte.

Os resultados obtidos neste trabalho não nos permitem avaliar qual, ou quais, as causas responsáveis pela morte das plantas durante a aclimatização, mas o facto de morrerem durante as primeiras duas semanas de aclimatização, leva a admitir a falta de funcionalidade radicular ao nível da absorção ou ao nível da translocação raiz/caule. A

funcionalidade do sistema radicular adventício é condição essencial para a sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização, bem como para o seu crescimento e desenvolvimento (Mohammed *et al.*, 1992; Van Telgen *et al.*, 1992; Díaz-Pérez *et al.*, 1995). O enraizamento *in vitro* além de ser um método caro e trabalhoso, é um método em que as raízes formadas são muitas vezes frágeis, difíceis de serem transplantadas e geralmente pouco funcionais, com pêlos radiculares insuficientes e com poucas conexões com o caule (Zimmerman, 1988). A baixa concentração de oxigénio no meio agarificado possivelmente contribui para o crescimento anormal das raízes (Newell *et al.*, 2003).

As baixas taxas de sobrevivência obtidas na aclimatização de plântulas enraizadas *in vitro* e os resultados positivos obtidos com o enraizamento *ex vitro* de outras espécies, levaram a que se estudasse o enraizamento *ex vitro* de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum*. Durante o período de enraizamento *ex vitro*/aclimatização das plântulas foi possível observar duas fases distintas: um período de adaptação (até à segunda semana), em que não ocorreu crescimento dos rebentos e se deu a emergência das raízes, seguido de um período de crescimento activo das raízes e da parte aérea (a partir da segunda semana). Todos os tratamentos testados permitiram a indução de enraizamento em condições *ex vitro* (Figura 2.5). Tal como observado anteriormente no enraizamento *in vitro* a resposta de enraizamento *ex vitro* foi fortemente influenciada pelo tipo de auxina e sua concentração.

O IBA foi a auxina mais efectiva na indução de raízes, tendo-se mostrado mais favorável na concentração mais elevada (1 g l^{-1}). Este tratamento permitiu obter 85% de rebentos enraizados (Figura 2.5), enquanto que para o NAA na mesma concentração se observou apenas 33% de frequência de enraizamento. As diferentes respostas observadas entre as duas auxinas, quer *in vitro* quer *ex vitro*, possivelmente reflectem

diferentes afinidades para os receptores auxínicos, diferenças na sua tomada, transporte e metabolismo (de Klerk *et al.*, 1999).

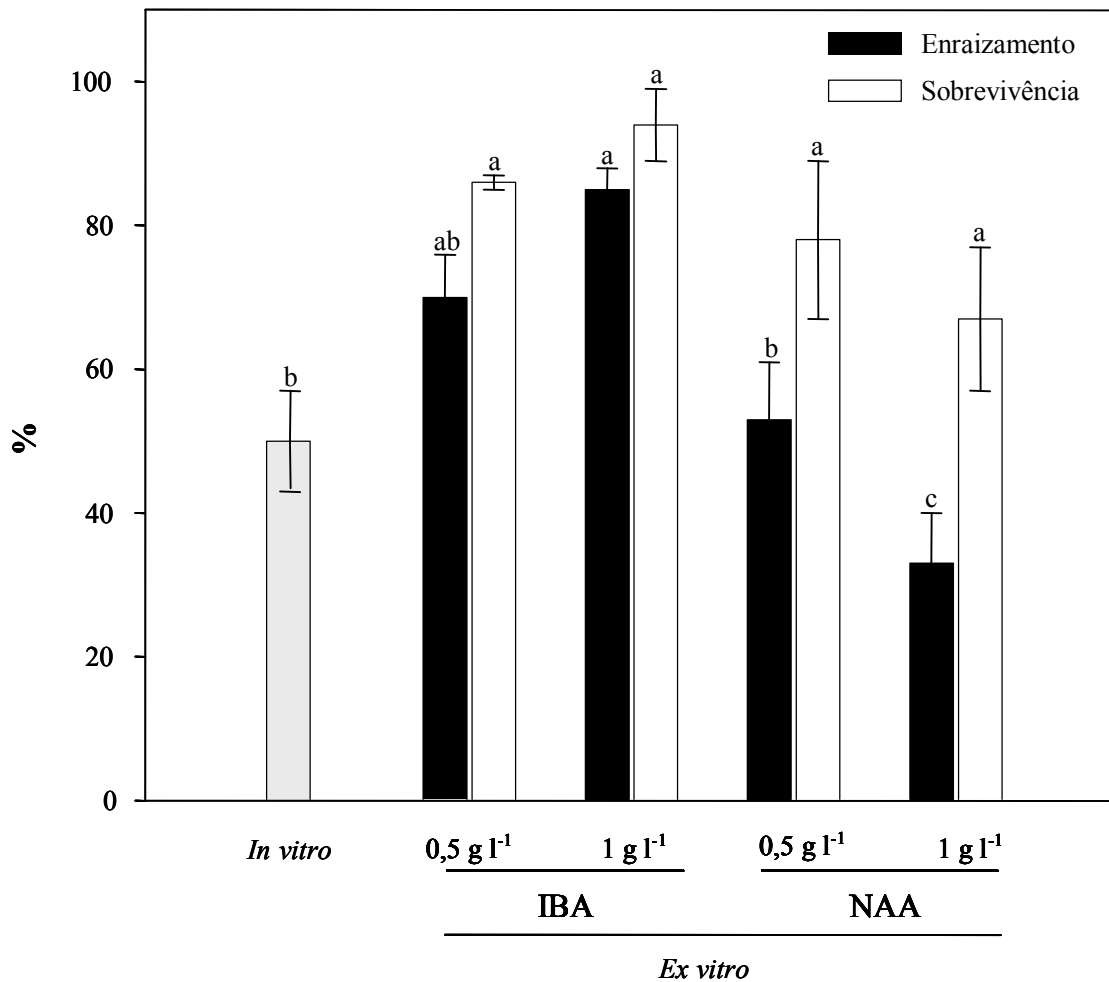


Figura 2.5. Percentagem de sobrevivência das plântulas enraizadas *in vitro* e efeito das auxinas (IBA e NAA) e sua concentração (0,5 e 1 g l⁻¹) no enraizamento *ex vitro* e sobrevivência de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum*. As barras verticais representam o erro-padrão de pelo menos 3 repetições com 10 rebentos cada. Para cada variável valores com letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test).

A média do número de raízes e o seu comprimento foram significativamente afectados pela interacção entre o tipo de auxina e a sua concentração ($P < 0,01$) (Tabela 2.7). O número de raízes mais elevado foi obtido quando se utilizou IBA a 1 g l⁻¹ (Tabela 2.7). Independentemente da concentração de auxina aplicada, os rebentos enraizados com

IBA desenvolveram raízes mais longas comparativamente aos tratados com NAA (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Efeito do tipo de auxina (IBA e NAA) e sua concentração (0,5 e 1 g l⁻¹) no número de raízes e comprimento da raiz mais longa (cm) de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum* enraizados *ex vitro*.

Auxina	Concentração (g l ⁻¹)	Média do número de raízes	Comprimento da raiz mais longa (mm)
IBA	0,5	3 ± 0,27 bc	3,14 ± 0,20 a
	1	5 ± 0,31 a	3,31 ± 0,23 a
NAA	0,5	4 ± 0,61 ab	2,61 ± 0,49 ab
	1	3 ± 0,20 c	1,90 ± 0,37 b

Análise ANOVA bi-factorial

Auxina (A)	ns	**
Concentração (B)	ns	ns
A × B	**	**

Os valores representam médias ± erros-padrão de 3 repetições com 10 rebentos. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). ns, **, não significativo ou significativo para $P < 0,01$, respectivamente (ANOVA bi-factorial)

Todas as combinações testadas nos ensaios de enraizamento *ex vitro* permitiram obter percentagens de sobrevivência superiores (67-94%, Figura 2.5) ($P < 0,05$) às obtidas durante a aclimatização de plantas enraizadas *in vitro* (50%). As taxas de sobrevivência obtidas não foram estatisticamente influenciadas pelo tratamento auxínico a que foram sujeitos os rebentos ($P \geq 0,05$) (Figura 2.5).

A sobrevivência das plântulas depende da formação de um sistema radicular bem desenvolvido, sendo este influenciado pelas características físicas do ambiente de enraizamento (Gonçalves *et al.*, 1998). De acordo com observações visuais, as raízes desenvolvidas *ex vitro* apresentavam melhor desenvolvimento, com elevado número de

raízes laterais, mais ramificadas e cobertas por pêlos radiculares (Estampa 2.3D,E), comparativamente às raízes formadas *in vitro* (Estampa 2.2D). Os pêlos radiculares têm um papel importante na rizosfera porque aumentam a superfície de contacto das raízes sendo a tomada de água mais efectiva na sua presença (Isutsa, 2004). Assim, a maior sobrevivência das plantas enraizadas *ex vitro* pode dever-se ao desenvolvimento de um sistema radicular mais eficiente destas plântulas.

Quando o enraizamento é efectuado em condições *ex vitro* o enraizamento e a aclimatização ocorrem simultaneamente, o que reduz a duração do processo de micropropagação e os custos inerentes. O enraizamento *ex vitro* foi utilizado com sucesso para enraizar várias espécies (Gonçalves *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Borkowska, 2001; Isutsa, 2004) incluindo plantas raras (Babu *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2002b; Martin, 2003; Almeida *et al.*, 2005).

As plantas micropropagadas foram transferidas com sucesso para o exterior, apresentando desenvolvimento normal, sem aparentes anomalias morfológicas (Estampa 2.3F,G). A propagação *in vitro* não afectou a capacidade insectívora das plantas, uma vez que quando colocadas em ambiente exterior era visível o elevado número de insectos capturados (Estampa 2.3G).

2.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo estudaram-se pela primeira vez diversos factores relacionados com a propagação *in vitro* da espécie insectívora *D. lusitanicum* a partir de sementes. O primeiro passo foi o estudo da germinação *in vitro* de sementes desta espécie. Os resultados obtidos permitiram verificar que a escarificação das sementes é essencial para a sua germinação, possivelmente pelo facto de as sementes possuírem dormência

do tegumento. As percentagens de germinação podem, possivelmente, ser melhorados através da aplicação de outros tratamentos às sementes. No entanto, os resultados obtidos com a escarificação manual com bisturi permitiram iniciar com sucesso culturas *in vitro* desta espécie que foram posteriormente utilizadas para estudar as restantes fases da propagação *in vitro*. O meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ de Zea mostrou ser o mais adequado para a multiplicação *in vitro* das culturas. O enraizamento dos rebentos *in vitro* mostrou ser muito dependente do tipo de auxina utilizada, influenciando não só a frequência de enraizamento como o normal desenvolvimento das raízes. Após a realização de vários ensaios de enraizamento o meio 1/4MS com 0,2 mg l⁻¹ de IBA mostrou-se o mais efectivo em termos de percentagem de enraizamento e desenvolvimento das raízes. A passagem das plântulas enraizadas *in vitro* para condições *ex vitro* foi a fase mais crítica da propagação desta espécie, verificando-se que apenas 50% da plântulas sobreviveram nas condições *ex vitro*. Estas dificuldades foram ultrapassadas com a utilização do método de enraizamento *ex vitro*, que não só permitiu obter elevadas frequências de enraizamento, como aumentar o número de plântulas sobreviventes. Assim, com base nos resultados obtidos e dadas as vantagens deste método relativamente ao enraizamento *in vitro*, será o mais vantajoso para produzir plantas desta espécie em larga escala.

Os resultados obtidos mostram que as técnicas de cultura *in vitro* de tecidos vegetais podem ser aplicadas com sucesso para produzir *ex situ* plantas de *D. lusitanicum* a partir de sementes. Não descurando possíveis diferenças de resposta a nível interpopulacional, o protocolo aqui elaborado poderá ser aplicado para produzir plantas a partir de sementes recolhidas em populações seleccionadas. As plantas assim produzidas poderão ser utilizadas para restaurar ou reforçar as populações mais ameaçadas desta espécie. Além disso, como se pode verificar no Capítulo IV, a cultura *in vitro* é um

complemento importante para a manutenção de germoplasma de *D. lusitanicum*. As elevadas taxas de multiplicação, permitindo a propagação em massa de plantas, poderão ainda tornar possível a exploração das suas potencialidades medicinais e agro-químicas, comprovadas no Capítulo V.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrie AL, van Staden J 2001. Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. *Plant Growth Regulation* 33: 19-23
- Adlassnig W, Peroutka M, Eder G, Pois W, Lichtscheidl IK 2006. Ecophysiological observations on *Drosophyllum lusitanicum*. *Ecological Research* 21: 55-262
- Almeida R, Gonçalves S, Romano A 2005. *In vitro* propagation of the endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity and Conservation* 14: 1059-1069
- Babu KN, Anu A, Remashree AB, Praveen K 2000. Micropropagation of curry leaf tree. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61: 199-203
- Baskin CC, Baskin JM 1998. Seeds, ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, New York
- Baskin CC, Milberg P, Andersson L, Baskin JM 2001. Seed dormancy-breaking and germination requirements of *Drosera anglica*, an insectivorous species of the Northern Hemisphere. *Acta Oecologica* 22: 1-8
- Benson EE, Danaher JE, Pimbley IM, Anderson CT, Wake JE, Adams LK 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation* 9: 711-726
- Bewley JD, Black M 1982. Viability and longevity. Em: *Physiology and biochemistry of seeds - in relation to germination*. Vol. II. Springer Verlag
- Bhat SR, Bhat KV, Chandel KPS 1994. Studies on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. *Seed Science and Technology* 22: 637-640

- Bhatia NP, Bhatia NP, Ashwath N 2002a. *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): a rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biodiversity and Conservation* 11: 1469-1477.
- Bhatia NP, Bhatia P, Ashwath N 2002b. *Ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *Stackhousia tryonii*. *Biologia Plantarum* 45: 441-444
- Bollmark M, Eliasson L 1986. Effects of exogenous cytokinins on root formation in pea cuttings. *Physiologia Plantarum* 68: 662-666
- Bonga J, Von Aderkas P 1992. *In Vitro* culture of trees, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Borkowska B 2001. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. *Scientia Horticulturae* 89: 195-206
- Bowes BG 1999. A colour atlas of plant propagation and conservation, Manson Publishing Ltd, London
- Bringmann G, Noll T, Rischer H 2002. *In vitro* germination and establishment of tissue cultures of *Bulbine caulescens* and of two *Kniphofia* species (Asphodelaceae). *Plant Cell Reports* 21: 125-129
- Cerabolini B, de Andreis R, Ceriani RM, Pierce S, Raimondi B 2004. Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*. *Biological conservation* 117: 351-356
- Correia E, Freitas H 2002. *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediterranean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 383-390
- Chandra B, Palini LMS, Nandi SK 2006. Propagation and conservation of *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth.: an endangered Himalayan medicinal herb of high commercial value. *Biodiversity and Conservation* 15: 2325-2338
- Chua LSL, Henshaw G 1999. *In vitro* propagation of *Nepenthes macfarlanei*. *Journal of Tropical Forest Science* 11: 631-638

- Cuenca S, Amo-Marco JB 2000. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud multiplication. In *Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 36: 225-229
- D'Amato P 2000. Savage garden: Slack-Potting the dewy pine. *Carnivorous Plants Newsletter* 29: 101-102
- de Klerk G-J, van der Krieken W, de Jong JC 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 35: 189-199
- de Klerk GT 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. In *Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 38: 415-422
- de Proft MP, Maene LJ, Debergh P 1989. Carbon dioxide and ethylen evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 65: 375-379
- Debergh PC, Maene LJ 1981. A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticultural* 14: 335-345
- Debergh PC, Read PE 1991. Micropropagation. Em: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.), *Micropropagation, Technology and Application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Diáz-Pérez JC, Shackel KA, Sutter EG 1995. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *Journal American Society for Horticultural Science* 120: 435-440
- Donnelly DJ, Vidaver WE, Colbow K 1984. Fixation of $^{14}\text{CO}_2$ in tissue cultured red raspberry prior and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 4: 43-50
- Doussi MA, Thanos CA 2002. Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes. 1. *Muscari* spp. *Seed Science Research* 12: 193-201
- Economu AS, Read PE 1987. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience* 22: 751-754

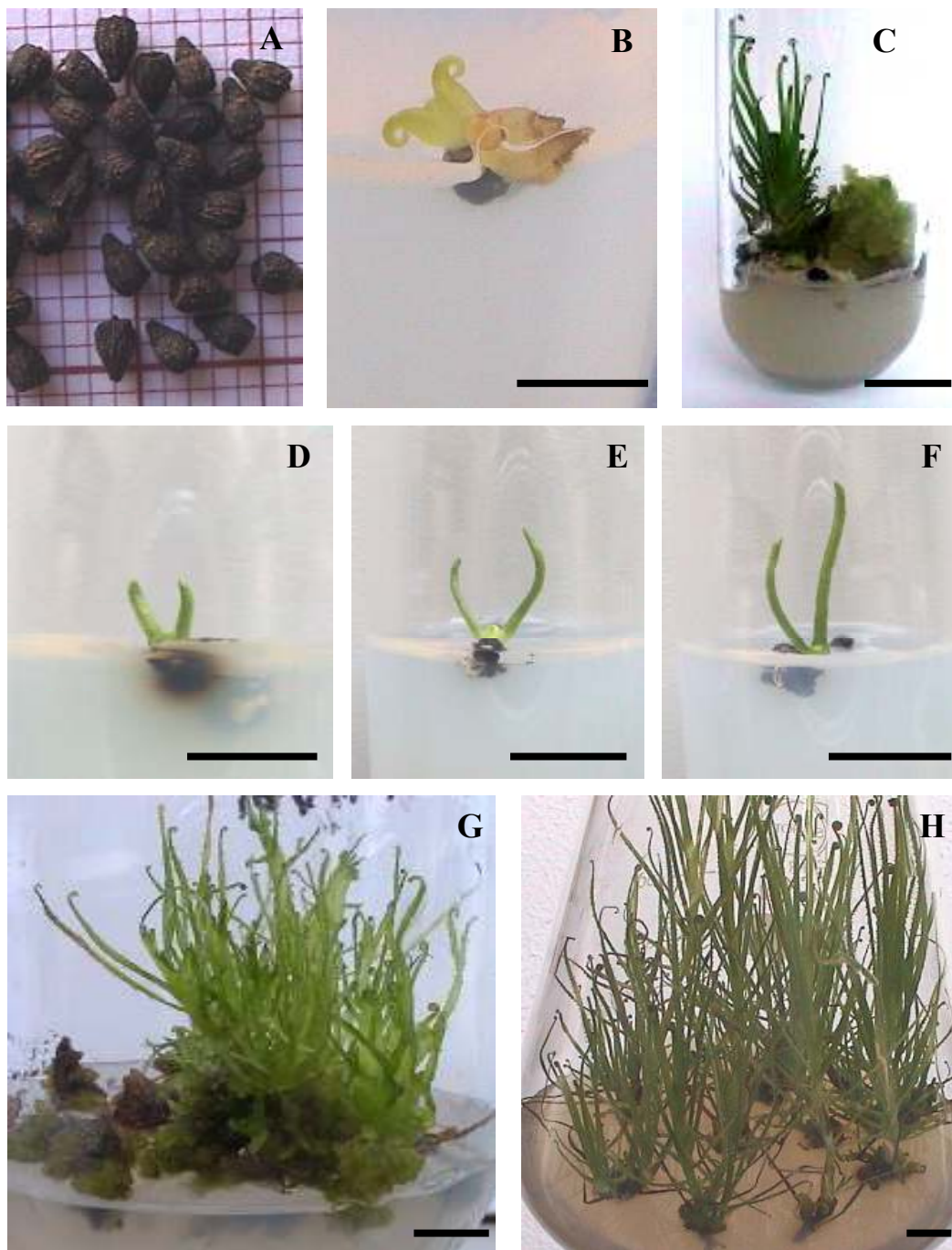
- Egerton WLM 1998. A smoke-induced alteration of the sub-testa cuticle in seeds of the post-fire recruiter, *Emmenanthe penduliflora* benth. (Hydrophyllaceae). *Journal of Experimental Biology* 49: 1317-1327
- Fay M 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Plant Cellular Developmental Biology* 28: 1-4
- Fay MF, Muir HJ 1990. The role of micropropagation in the conservation of European plants. Em: Hernández Bermejo JE, Clemente M, Haywood V (eds.), *Conservation techniques in botanic gardens*, Koeltz Scientific Books, Koenigstein
- Fujiwara K, Kozai T 1995. Physical microenvironment and its effects. Em: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith ML (eds.), *Automation and environmental control in plant tissue culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 319-369
- 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). *Diversity and Distributions* 9: 335-350
- Gaspar T, Coumans M 1987. Root formation. Em: Bonga JM, Durzan DJ (eds.), *Cell and tissue culture in forestry*, 2, Martins Nijhoff Publishers, Dordrecht
- George E, Sherrington P 1984. *Plant propagation by tissue culture - Handbook and directory of commercial laboratories*, Exegetics Ltd, England
- Gonçalves JC, Diogo G, Amâncio S 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. Crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 72: 265-275
- Hawkes JG, Maxted N, Ford-Lloyed BV 2000. *The ex situ conservation of plant genetic resources*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Hoque A, Rahman SM, Arima S, Takaigi Y 2001. Efficient *in vitro* germination and shoot proliferation of chilling-treated water chestnut (*Trapa japonica* flerov) embryonal explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 369-374
- Hutchinson JF 1984. *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus Fly Trap). *Scientia Horticulturae* 22: 189–194

- Iankova E, Cantos M, Liñan J, Robeva P, Troncoso A 2001. *In vitro* propagation of *Angelica pancicii* Vauds., an endangered plant species in Bulgaria. *Seed Science and Technology* 29: 477-482
- Isutsa DK 2004. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. *Scientia Horticulturae* 99: 395-400
- Jang GW, Kim KS, Park RD 2003. Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72: 95-98
- Jang GW, Park RD 1999. Mass propagation of sundew, *Drosera rotundifolia* L. through shoot culture. *Journal of Plant Biotechnology* 2: 97-100
- Kauth PJ, Vendrame WA, Kane ME 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87: 212-222
- Kawiak A, Królicka A, Lojkowska E 2003. Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 175-178
- Kim K-S, Jang G-W 2004. Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77: 211-214
- Kim MS, Klopfenstein NB, Cregg BM 1998. *In vitro* and *ex vitro* rooting of micropropagated shoots using green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) clones. *New Forests* 16: 43-57
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 33-36
- Kozai T 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. Em: Debergh P, Zimmerman R (eds.), *Micropropagation, technology and application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Kulkarni MG, Sparg SG, van Staden J 2005. Seed germination of valuable high-altitude medicinal plants of southern Africa. *South African Journal of Botany* 71: 173-178
- Lovell PH, White J 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. Em: Jackson MB (eds.), *New root formation in plants and cuttings*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht

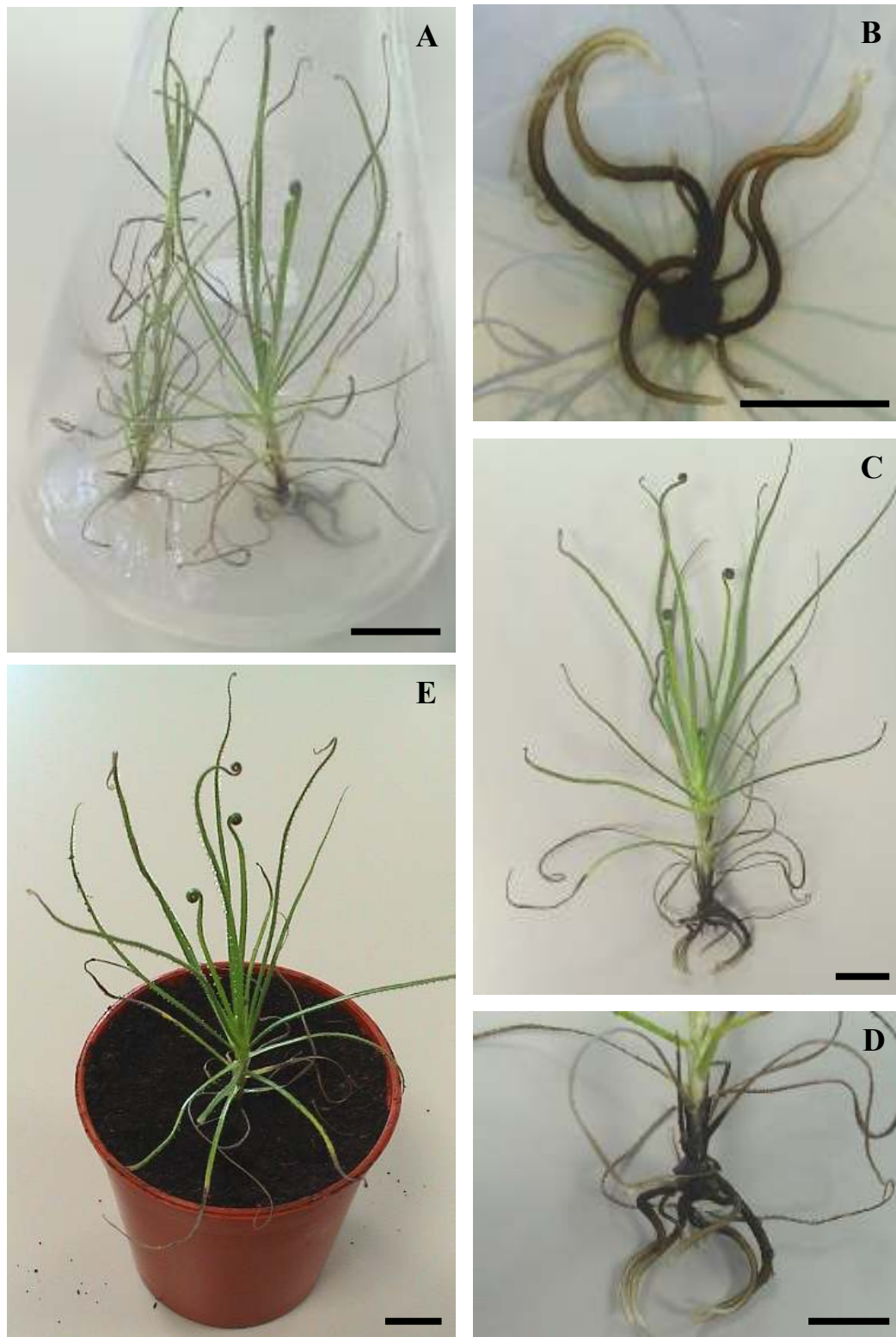
- Malá J, Bylinský V 2004. Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. *Biologia Plantarum* 48: 633-636
- Malik SK, Chaudhury R, Kalia RK 2005. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae* 106: 539-553
- Martin KP 2003. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. *Plant Cell Reports* 21: 415-420
- McClelland M, Smith M, Carothers Z 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on the subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23: 115-123
- McCown B 1988. Adventitious rooting of tissue cultured plants. Em: Davis T, Haissig B, Sankhla N (eds.), *Adventitious root formation in cuttings*, Dioscorides Press, Portland, Oregon
- Medina-Sánchez,E, Lindig-Cisneros R 2005. Effect of scarification and growing media on seed germination of *Lupinus elegans* H.B.K. *Seed Science and Technology* 33: 237-241
- Minocha SC 1985. *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula*. *HortScience* 20: 216-217
- Mohammed GH, Gillies SL, Vidaver WE 1992. *Ex vitro* photosynthetic in plantlets of tissue-cultured Douglas-fir. *Tree Physiology* 10: 403-410
- Murashige T 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Newell C, Growns D, McComb J 2003. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75: 131-142
- Nobre J 1996. *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 151-155

- Ortega-Olivencia A, Claver JPC, Alcaraz JAD 1995. Floral and reproductive biology of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Droseraceae). Botanical Journal of the Linnean Society 118: 331-351
- Paek K-Y, Hahn E-J 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affected organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (raf.) Shinn]. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 36: 128-132
- Pence VC 1999. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. Em: Benson EE (ed.), Plant Conservation Biotechnology, Chapter 15, Taylor and Francis, London
- Pierik RLM 1987. *In vitro* culture of higher plants, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht
- Preece JE, Sutter EG 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. Em: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.), Micropropagation, technology and application, Kluwer Academic publishers, Dordrecht
- Sudha CG, Krishnan PN, Pushpahadan P 1998. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 34: 57-63
- Sudharsan C, AboEl-Nil M, Hussain J 2003. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. Journal of Arid Environments 54: 133-147
- Thorpe T, Harry F, Kumar P 1991. Application of micropropagation to forestry. Em: Debergh P, Zimmerman RH (eds.), Micropropagation, technology and application, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Tilbrooke RD 1988. Scape and axil cuttings of *Drosophyllum*. Carnivorous Plants Newsletter 17: 106
- Van Telgen H, Van Mil A, Kunneman B 1992. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants. Acta Botanica Neerlandica 41: 261-267

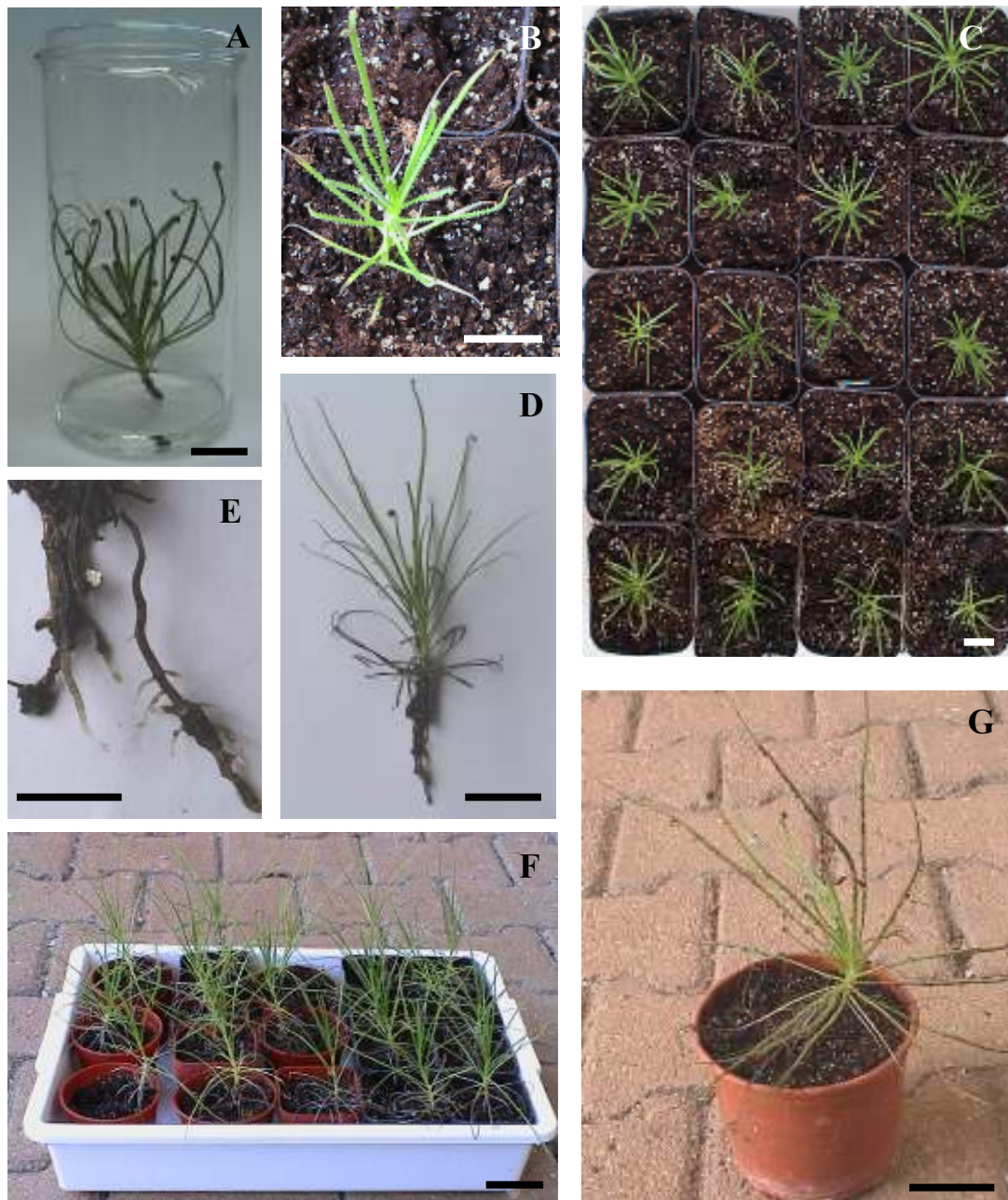
- Yan N, Hu H, Huang J, Xu K, Wang H, Zhou Z 2006. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 114-118
- Zhou K, He SL, Deng F, Xia B 2000. Tissue culture of carnivorous plants *Dionaea muscipula* Ellis. *Journal of Plant Resources and Environment* 9: 63-64
- Zida D, Tigabu M, Sawadogo L, Oden PC 2005. Germination requirements of seeds of four woody species from the Sudanian savanna in Burkina Faso, West Africa. *Seed Science and Technology* 33: 581-593
- Zimmerman RH 1988. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. *Acta Horticulturae* 227: 489-499
- Ziv M 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. Em: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.), *Micropropagation, technology and application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht



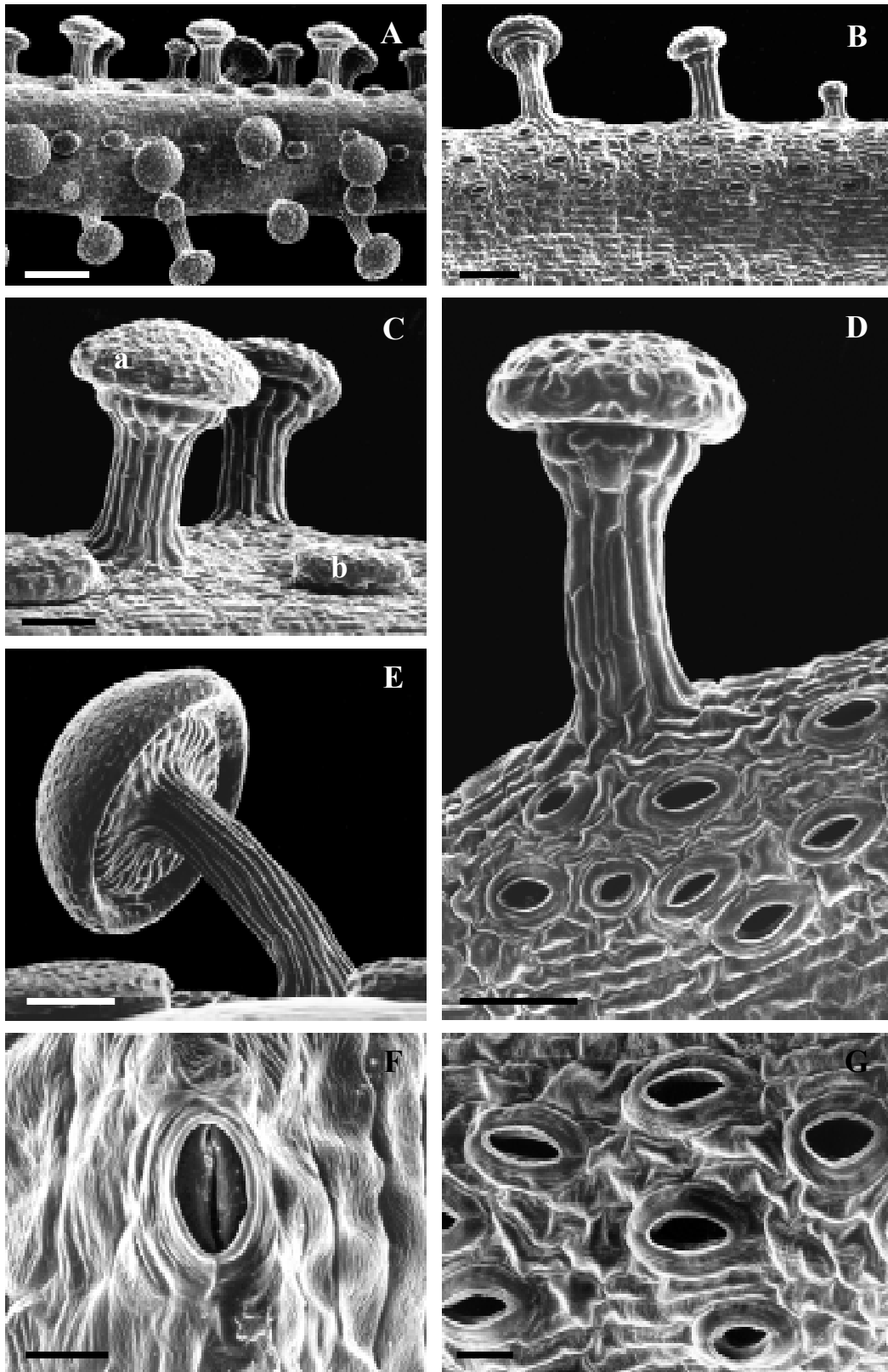
Estampa 2.1. Diferentes aspectos da germinação de sementes e multiplicação *in vitro* de *D. lusitanicum* (barra = 1 cm). (A) sementes utilizadas nos ensaios de germinação *in vitro*; (B, C) rebentos provenientes da germinação em meio MS com $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de GA_3 ; (D, E, F) rebentos provenientes da germinação em meio 1/4MS sem reguladores de crescimento 3, 4 e 5 semanas após inoculação, respectivamente; (G) rebentos no final da fase de multiplicação em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ de BA; (H) rebentos no final da fase de multiplicação em meio MS suplementado com $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ de Zea.



Estampa 2.2. Enraizamento *in vitro* de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum*. (A, C) Rebentos no final do enraizamento *in vitro* em meio de cultura 1/4 MS com 0,2 mg l⁻¹ de IBA (barra = 2 cm); (B, D) pormenor das raízes desenvolvidas (barra = 0,5 cm); (E) plântula durante a fase de aclimatização (barra = 1,5 cm).

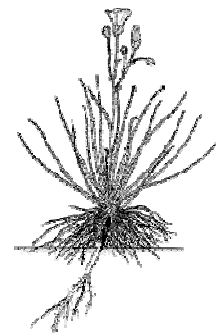


Estampa 2.3. Diferentes aspectos do enraizamento *ex vitro*/aclimatização de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum*. (A) Imersão basal dos rebentos em solução auxínica (barra = 2); (B, C) rebentos envasados no início do período de enraizamento (barra = 2 cm); (D) rebento enraizado *ex vitro* (barra = 3 cm); (E) pormenor das raízes desenvolvidas *ex vitro* (barra = 1 cm); (F) plantas aclimatizadas a crescer no exterior (barra = 5 cm); (G) planta micropropagada, 5 meses após enraizamento (barra = 5 cm).



Estampa 2.4. Imagens de SEM mostrando a morfologia das glândulas e os estomas de folhas de *D. lusitanicum*, de plantas no habitat natural e de rebentos a crescer em condições controladas *in vitro*. Aspecto geral de uma secção foliar (A) de uma planta de campo e (B) de um rebento *in vitro*. Barra = 150 μm); (C) pormenor das glândulas pediculadas (a) e sésseis (b) de uma planta de campo, e (D) de uma glândula pediculada de um rebento *in vitro* (barra = 50 μm); (E) pormenor de uma glândula pediculada (barra = 50 μm) e (F) de um estoma de uma planta de campo (barra = 25 μm); (G) pormenor de estomas de rebentos *in vitro* (barra = 25 μm).

**Estudos de diversidade genética em *D. lusitanicum*:
implicações para a sua conservação**



3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Variabilidade e estrutura genética de populações vegetais

O estudo da estrutura genética de espécies naturais envolve a quantificação dos níveis de variabilidade dentro das populações e a caracterização do nível de estruturação genética entre populações (Hamrick, 1983).

A diversidade genética tem sido referida como a riqueza de espécies dentro de um ecossistema e também como o nível de variabilidade genética existente dentro de cada população (Nei, 1973). Pode ser medida pelo nível de heterozigocidade esperada nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg independentemente dos efeitos de migração, selecção, mutação ou sistema reprodutivo (Nei, 1973). Segundo Weir (1996) além da heterozigocidade, a frequência de heterozigotos é também um indicador importante da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes.

A variabilidade genética intra-populacional tem sido quantificada em termos de número de alelos por locus, percentagem de loci polimórficos, heterozigocidade observada e esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, e índice de fixação (Hamrick, 1983). O número de alelos por locus e a percentagem de loci polimórficos têm sido empregues como índices de diversidade em populações naturais, no sentido de caracterizar e comparar os níveis da variação genética nestas populações.

A caracterização do nível de estruturação genética entre populações, ou seja a maneira pela qual a variabilidade genética é repartida pelos níveis inter e intra-populacionais, é também de grande importância. A estrutura genética refere-se à distribuição heterogénea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante da acção de forças evolutivas, tais como: mutação, migração, selecção e deriva genética

que actuam dentro do contexto de cada espécie e população (Hamrick, 1982). A migração e a mutação aumentam a variabilidade genética, enquanto que a selecção e a deriva diminuem a variabilidade genética dentro das populações.

Os genótipos das populações vegetais apresentam-se estruturados no espaço e no tempo. A estrutura espacial refere-se à distribuição espacial dos indivíduos, sendo característica de cada espécie e determinada principalmente pelo sistema de reprodução e pelos padrões de dispersão de pólen, sementes ou outros propágulos. Por sua vez, a estrutura temporal diz respeito à subdivisão de gerações, por exemplo entre pais e filhos, plântulas, jovens e adultos (Brown, 1978; Hamrick, 1989).

A existência de estrutura espacial decorre principalmente das limitações físicas no sentido de todos os indivíduos se cruzarem entre si, ou da ocorrência com maior probabilidade de cruzamento entre indivíduos próximos. Isso produz uma tendência localizada no sentido da fixação de certos alelos (aumento da frequência de alguns e diminuição de outros), pois apenas uma amostra da população estará a trocar alelos ao acaso. Além disso, os efeitos de selecção irão favorecer alelos com maior valor adaptativo local, ampliando ou reduzindo a divergência em função das variações ambientais existentes.

A endogamia gerada por autofecundação ou cruzamento entre aparentados também tenderá a alterar a frequência de certos alelos em relação ao total da população. Assim, tanto por endogamia, deriva genética ou selecção, poderá ocorrer formação de grupos divergentes dentro das populações. No entanto, esta diferenciação pode ser contraposta pelo fluxo genético. Espécies com intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com fluxo genético restrito (Hamrick, 1989).

Factores como tamanho da população, sistema de reprodução, fluxo genético e tipo de ambiente em que a espécie ocorre, influenciam a distribuição da variação genética entre e dentro de populações.

Para quantificar a estrutura genética das populações três metodologias têm sido frequentemente utilizadas: i) estatística F de Wright (Wright, 1951; Wright, 1965); ii) análise da diversidade genética (Nei, 1973; Nei, 1977; Nei, 1987); e, iii) análise da variância de frequências genéticas (Cockerham, 1969). A estatística F fornece os índices de fixação de alelos para o total das populações, medida dentro e entre populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (Wright, 1965; Nei, 1977). A análise da variância de frequências genéticas fornece a distribuição da variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos (Cockerham, 1969) e a diversidade genética de Nei fornece, a partir de uma metodologia estatística simples, a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigocidade esperados para o total e média das populações (Nei, 1973).

3.1.2. Estrutura genética de populações de *Drosophyllum lusitanicum* na região do Algarve

A perda de diversidade genética tem efeitos negativos no vigor de uma espécie e pode pôr em causa a sobrevivência das populações (Malone *et al.*, 2003; Reed, 2003). A estimativa dos níveis e distribuição da variação genética de uma espécie ameaçada é o primeiro passo para a sua conservação (Fritsch & Rieseberg, 1996). 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 informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação de plantas raras (Gustafsson & Sjögren-Gulve, 2002).

D. lusitanicum é uma espécie severamente ameaçada que é protegida há vários anos em Espanha, estando incluída na *Andalusian Red List of Threatened Plants*, e é considerada rara em Marrocos (Fennane & Ibn Tattou, 1998). Em Portugal Correia & Freitas (2002) analisaram a distribuição desta espécie e compararam-na com dados de herbário, tendo concluído que ocorreu uma regressão na sua distribuição nos últimos 60 anos. Segundo estudos de Garrido *et al.* (2003), a maioria das populações está em declínio e vai provavelmente desaparecer devido à fraca regeneração. Relativamente às populações algarvias as informações existentes restringem-se à Serra de Monchique, onde Muller & Deil em 2001 localizaram 21 populações com uma média de 165 indivíduos por população. Relativamente às restantes populações desta região estudadas neste trabalho, não se conhecem referências escritas sobre a sua localização e/ou situação, tendo sido localizadas através de informações pessoais.

Tornando-se clara a necessidade de implementar estratégias efectivas de conservação para esta espécie, é necessário conhecer a estrutura genética da espécie, o nível de variabilidade intra-populacional e de diferenciação entre populações. No entanto, o reduzido número de indivíduos encontrado nas populações amostradas, e a falta de indivíduos jovens não permitia um estudo de genética de populações ou de ecologia molecular muito profundo. Por esta razão, neste trabalho são incluídos indivíduos provenientes da germinação de sementes recolhidas em algumas das populações estudadas. A comparação da variabilidade genética de indivíduos adultos e de germinantes da mesma população permitirá avaliar as implicações, em termos de impacto na composição alélica, da revitalização de populações através da re-introdução

de plantas produzidas *ex situ*. Esta medida tem sido considerada uma medida válida em programas de conservação para reduzir os riscos de extinção de espécies ameaçadas (Bowes, 1999).

No contexto da conservação, é também importante obter informações sobre a variabilidade genética de diferentes populações e, conhecer a diferenciação genética entre elas. Estas informações são imprescindíveis para a definição de estratégias de amostragem com vista à eficiente e adequada ‘captura’ de diversidade genética a utilizar em estratégias de conservação *ex situ*. As populações com maior variabilidade ou com alelos raros poderão servir como ‘fonte’ genética para re-estabelecer populações onde se verificou maior perda de diversidade genética. Por outro lado, uma grande diferenciação entre populações implicará que a manutenção de elevada variabilidade genética e a diminuição de *inbreeding*, sejam efectuadas recorrendo à mistura de sementes do maior número possível de populações. A variabilidade encontrada dentro de cada população e o nível de diferenciação entre populações ajudará também a definir quais as populações com maior necessidade de revitalização (Ceska *et al.*, 1997).

3.1.3. Utilização de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética

A introdução da técnica de electroforese de isoenzimas iniciou a era dos marcadores moleculares. A utilização de técnicas de isoenzimas permitiu a detecção de polimorfismos entre plantas que não mostravam diferenças morfológicas, sendo possível uma melhor visualização da informação genética nas populações. Os avanços rápidos das técnicas de biologia molecular abriram uma nova era nos estudos de biologia de populações e conservação de espécies (Haig, 1998), permitindo pela primeira vez analisar a variabilidade genética ao nível do DNA. Nas últimas décadas

foram desenvolvidos uma série de marcadores moleculares, baseados em polimorfismos na sequência de DNA, tais como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), no intuito de caracterizar e avaliar os recursos genéticos e entender a estrutura e organização da diversidade genética das populações. O surgimento da técnica da reacção em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) na década de 1980, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, levando ao aparecimento de novos marcadores moleculares, tais como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), microsatélites e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Como atrás referido, o planeamento de estratégias de conservação para *D. lusitanicum*, passando, nomeadamente, pela restauração de populações implica estudos de variabilidade genética de populações. O tipo de informações necessários condiciona o tipo de marcador molecular a utilizar, assim neste capítulo utilizaram-se os marcadores ISSRs, marcadores cloroplastidiais e os espaçadores internos transcritos (ITS – *Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal (rDNA). O ISSR é um método que envolve a amplificação de fragmentos de DNA presentes em uma distância amplificável entre dois microsatélites idênticos repetidos, orientados em direcções opostas. Esta técnica emprega um único *primer*¹ com a sequência repetitiva interna de um microsatélite, permitindo a detecção de polimorfismos em locus localizados entre os microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994). À semelhaça do RAPD, o ISSR não requer o conhecimento prévio do genoma, não requer a utilização de clonagem ou de *primers* específicos, tem baixos custos de execução e os conhecimentos laboratoriais podem ser facilmente transferidos de uma planta para outra. No entanto, vários autores têm observado uma

¹ *Primer* = iniciador

maior reprodutibilidade dos ISSRs, relativamente aos RAPDs, devido à utilização de *primers* com maior número de bases e específicos para zonas de microssatélites e às temperaturas de *annealing*² mais elevadas (Tsumura *et al.*, 1996; Nagaoka & Ogihara, 1997; Wolfe *et al.*, 1998; Quian *et al.*, 2001). Além disso, as sequências alvo dos ISSRs são abundantes por todo o genoma dos eucariotas e evoluem rapidamente. Consequentemente, podem revelar muito maior número de fragmentos polimórficos por *primer* que os RAPDs (Esselman *et al.*, 1999; Fang & Roose, 1997). De facto, recentemente, os ISSRs têm provado ser hiper-variáveis e adequados para estudos de genética de populações, inclusivamente de plantas endémicas e/ou ameaçadas de extinção fornecendo informações úteis no planeamento de estratégias para a sua conservação (Ge *et al.*, 2003; Quiu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Meloni *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2007). Contudo, à semelhança dos RAPDs as maiores limitações desta técnica, residem no facto de as bandas serem analisadas como marcadores dominantes e a diversidade genética estimada ser baseada em caracteres dialélicos (Ge *et al.*, 2005).

Também os marcadores cloroplastidiais têm mostrado ser uma ferramenta útil para estudar a evolução genética e os padrões genéticos de um grande número de espécies (Taberlet *et al.*, 1998). Estes marcadores são muito utilizados porque várias regiões do DNA cloroplastidial estão já caracterizadas e com *primers* universais descritos, e pelo facto de o DNA plastidial apresentar, em geral, herança uniparental materna em Angiospérmicas, enquanto o DNA nuclear possui herança biparental. O DNA do cloroplasto (cpDNA) é muitas vezes associado à técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*), podendo revelar grande número de variabilidade. A sua utilização é muitas vezes complementada com a utilização de

² Temperatura de *annealing* = temperatura de hibridação dos *primers*

um marcador nuclear. De entre estes, os espaçadores internos transcritos (ITS) do rDNA, que correspondem aos espaçadores ITS1 e ITS2, os quais separam os genes 18S, 5.8S e 26S, têm sido amplamente utilizados em estudos de variabilidade intra-populacional (Szalanski *et al.*, 2001). A amplificação por PCR desta região, seguida de análise de polimorfismo da conformação de cadeia simples (SSCP) permite detectar alterações de sequência (Orita *et al.*, 1989). Neste método o DNA amplificado e desnaturado pelo calor em associação com um agente desnaturante, é separado em gel de poliacrilamida não-desnaturante (Silva & Russo, 2000). A análise dos padrões de mobilidade electroforética das conformações individuais das duas cadeias de DNA (*single strand DNA*), que compõem cada sequência, permitem detectar diferenças entre sequências de igual tamanho (Moricca & Ragazzi, 1998). As principais vantagens deste método são a sua simplicidade e capacidade de detectar polimorfismos de DNA (Fukuoka *et al.*, 1994).

3.1.4. Objectivos

Tendo em conta a necessidade de obter informações importantes para a definição de estratégias de conservação para *D. lusitanicum*, nomeadamente através da restauração de populações a partir de plantas produzidas *ex situ*, os objectivos específicos propostos para este capítulo foram:

i) a pesquisa de um marcador molecular polimórfico e adequado para estudar a variabilidade e estrutura genética de populações de *D. lusitanicum*, que possa ser utilizado como ferramenta na obtenção de informações úteis para a sua conservação: região ITS do rDNA, marcadores cloroplastidiais e ISSR;

- ii) estudar a variabilidade e estrutura genética de populações de *D. lusitanicum* recorrendo a marcadores ISSR;
- iii) avaliar a variabilidade genética de plântulas provenientes de germinação de sementes *in vitro*;
- iv) comparar a variabilidade genética entre plantas adultas e plântulas da mesma população;
- v) definir estratégias de conservação para esta espécie, nomeadamente avaliando as implicações, em termos de impacto na composição alélica, da utilização de plantas produzidas *ex situ* para reforçar as populações naturais desta espécie.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Amostragem e extracção de DNA

Foram localizadas e amostradas populações de *D. lusitanicum* em quatro regiões do Algarve (Figura 3.1), 2 locais em Barranco do Velho, 2 locais em Algoz, Albufeira e 3 locais na Serra de Monchique (próximo de: Alferce - Monchique 1, Casais - Monchique 2 e Chilrão – Monchique 3) e, uma população no Sul de Espanha perto de Pinar no Parque Natural ‘Los Arcornocales’. Foram recolhidas amostras não destrutivas de folhas jovens de acordo com o tamanho da população, tendo-se amostrado todos os indivíduos nas populações mais pequenas (Tabela 3.1). Foi também recolhido material foliar de um indivíduo de *Drosera binata* e de *Drosera capensis* a crescer no Jardim Botânico da Universidade de Lisboa. O material foliar foi transportado em gelo até ao laboratório e conservado a 5 °C até à sua utilização (2-3 dias), ou em sílica gel no caso das amostras provenientes de Espanha.

Extraíu-se o DNA total a partir de folhas recolhidas nas diferentes populações, utilizando o kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fornecedor. Para tal, fez-se a maceração do material vegetal (100 mg de peso fresco ou 20 mg de peso seco para cada indivíduo) em azoto líquido. Após extracção, o DNA foi eluído com o tampão fornecido e armazenado a -20 °C.

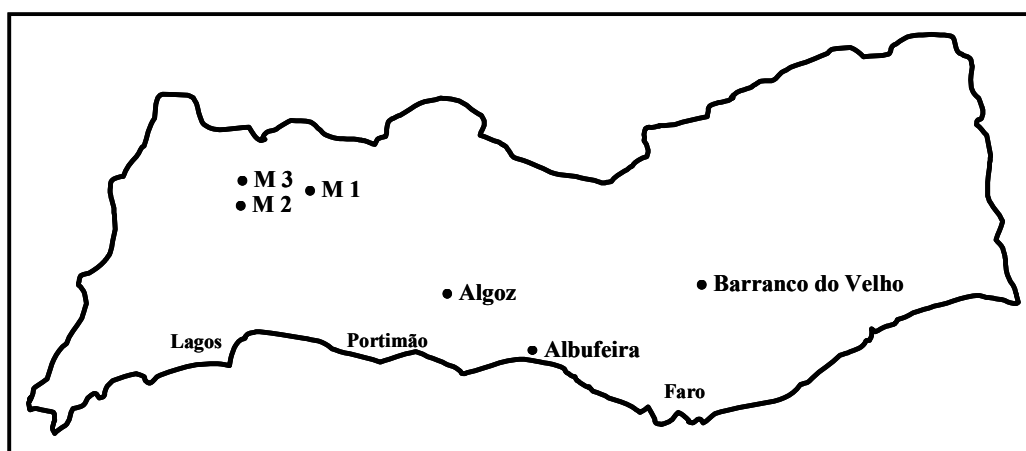


Figura 3.1. Localização das diferentes populações de *Drosophyllum lusitanicum* estudadas no Algarve.

Tabela 3.1. Populações estudadas e número de indivíduos amostrados por população.

População	Nº indivíduos
Algoz 1	4
Algoz 2	4
Barranco do Velho 1	3
Barranco do Velho 2	1
Albufeira	8
Monchique 1	14
Monchique 2	5
Monchique 3	17
Espanha	15
<i>Drosera binata</i> *	1
<i>Drosera capensis</i> *	1

* Amostras recolhidas de exemplares a crescer no Jardim Botânico da Universidade de Lisboa

Efectuou-se a quantificação do DNA genómico em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1× (40 mM tris – acetato / 1 mM EDTA, pH=8.3) usando como padrão a banda dos 500 bp do marcador 100 bp Plus (Fermentas GeneRuler™), tendo-se verificado que as amostras de DNA continham aproximadamente 10 ng μl^{-1} .

3.2.2. ITS

3.2.2.1. Amplificação da região ITS do rDNA por PCR

Para cada amostra de DNA dos indivíduos de *D. lusitanicum* amostrados no campo e das duas espécies de *Drosera* (Tabela 3.1), foi feita a amplificação por PCR em tubos de 0,2 ml num volume final de 25 μl , que consistiam em aproximadamente 10 ng de DNA genómico, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl (Fermentas), 3 mM MgCl_2 (Fermentas), 0,4 mM de dNTPs (Fermentas), 0,4 μM de cada um dos *primers* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), considerados universais para esta região (White *et al.*, 1990) e 1,5 U *Taq* Polimerase (Fermentas). As condições do termociclador (Biometra UNO II) 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.

3.2.2.2. Análise do produto de amplificação por electroforese

O produto de PCR foi analisado por electroforese em géis de agarose a 1%. Os géis foram carregados com 10 μl do produto de PCR em cada poço. Usou-se um padrão de fragmentos de DNA 100 bp Plus (Fermentas). A electroforese foi feita em tampão TAE 1× (40 mM tris – acetato / 1 mM EDTA, pH=8.3) a 75 V durante 1 h. A visualização

dos fragmentos foi feita, após coloração com brometo de etídio ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), sob luz UV e o resultado registado com sistema digital (Kodak, Vilber Luormat).

3.2.2.3. *Análise de polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP)*

3.2.2.3.1. Desnaturação do produto de amplificação por PCR

O produto da amplificação foi desnaturado por choque térmico e por tratamento com formamida, ficando as duas cadeias de DNA separadas. Para tal, de acordo com a intensidade das bandas em gel de agarose, adicionaram-se 1 ou 2 μl do produto de amplificação a 9 ou 8 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.

3.2.2.3.2. Electroforese

A análise de conformação de cadeia simples foi feita por electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%. Estes géis (dimensões: 8,5 × 6,5 cm, 0,75 mm, Bio rad mini PROTEAN II) foram preparados adicionando 2 ml de bis-acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida, 29:1) a 40%, 2 ml TBE 5× (89 mM Tris – borate – 2 mM EDTA, pH=8.3), 100 μl de persulfato de amónio (APS) a 10%, 10 μl de Temed e 6 ml de água ultra-pura, para cada gel.

Carregou-se todo o volume (10 μl) a analisar por amostra em cada poço do gel de poliacrilamida. A electroforese foi feita em tampão TBE 1× a 4 °C e desenrolou-se a

200 V durante 3 h. Findo este período, os géis foram retirados dos suportes e foram corados com nitrato de prata.

3.2.2.3.3. Coloração dos géis com nitrato de prata

O DNA no gel foi fixado com ácido acético glacial a 10% durante pelo menos 20 min e de seguida efectuaram-se 3 lavagens (4 min cada) em água destilada. Findo este período, os géis foram colocados numa solução de ácido nítrico a 1% durante 3 min, seguindo-se 3 lavagens em água destilada (4 min cada). Em seguida os géis foram incubados numa solução de nitrato de prata (1 g l^{-1} de AgNO_3 e $1,5 \text{ ml l}^{-1}$ de formaldeído a 37%, em água ultra-pura) durante 30 min. Após lavagem com água destilada durante 4 min os géis foram colocados na solução de revelação (Na_2CO_3 30 g l^{-1} , $1,5 \text{ ml l}^{-1}$ de formaldeído a 37% e 2 mg l^{-1} de NaS_2O_3 , em água ultra-pura) até ao aparecimento das bandas. A reacção foi parada com uma solução de ácido acético a 10% durante pelo menos 5 min. Após 3 lavagens em água destilada os géis foram colocados sobre papel de filtro e secos num secador de géis DryGel (Biorad 453) durante 45 min a $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2.4. Clonagem dos produtos de PCR

Os padrões SSCP obtidos, visualizados por coloração com nitrato de prata, evidenciaram um padrão complexo de várias bandas, indicadores da existência de cópias múltiplas da região ITS do rDNA, em cada indivíduo. Assim, foi necessário clonar os fragmentos amplificados a fim de separar as diferentes cópias. Tal era incomportável de fazer para cada indivíduo em separado, recorrendo-se por isso à constituição de *bulks* por local de amostragem. Para evitar a sobre-representação de

cópias que à partida existam em maior número, em detrimento de cópias mais raras, os *bulks* foram constituídos, não de DNA total, mas do produto de amplificação individual (10 µl de cada indivíduo). Para verificar se 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.

Para o *bulk* obtido para cada população foram feitas duas ligações ao vector pGEM T-*easy* vector system I (Promega) de acordo com as recomendações do fornecedor. Para tal, adicionaram-se 1,5 µl de tampão de ligação T4 2×, 50 ng de vector pGEM T-*easy*, 1 µl do produto do PCR preparado no ponto 3.2.2.1 e 3 U de T4 DNA *ligase* (Promega). A ligação efectuou-se durante 1 h e 30 min à temperatura ambiente. O vector pGEM T-*easy* é concebido para a clonagem de produtos de PCR, uma vez que possui nas extremidades 3' uma timidina que impede a recircularização do vector e aumenta a eficiência da ligação. É portanto um plasmídeo indicado para clonagem de fragmentos de DNA resultantes de polimerases que deixem deoxiadenosina nas extremidades 3' das cadeias sintetizadas, com a *Taq* polimerase.

O pGEM T-*easy* confere resistência à ampicilina e contém um segmento do gene Lac-Z para a β-galactosidase de *Escherichia coli*, que codifica para os aminoácidos iniciais da β-galactosidase e que vai actuar por α complementação com o gene de células hospedeiras que codifica a porção carboxi – terminal da proteína e assim activar a síntese da β-galactosidase activa. O local de clonagem múltipla está inserido na região que codifica para o peptídeo α da β-galactosidase, logo, quando há a inserção de um fragmento de DNA exógeno neste local a síntese de β-galactosidase não é activa, com a consequente não degradação de lactose. Isto permite a identificação de clones recombinantes por meios selectivos e por análise de cor.

As células bacterianas que adquirem informação genética exógena dizem-se transformadas e, ao sofrerem os seus ciclos de replicação normais, irão replicar conjuntamente com o seu DNA cromossómico os vectores recombinantes, originando colónias de bactérias que contêm biliões de cópias do fragmento de DNA exógeno. As bactérias que adquirem e replicam o fragmento de interesse podem ser identificadas em meios selectivos através de características conferidas pelo vector de clonagem nelas inserido.

O produto de cada ligação foi utilizado na transformação de células competentes de *E. coli* (Inv α F') baseado no método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Para tal, adicionaram-se 2 μ l do produto da ligação a 100 μ l de células competentes Inv α F' e colocou-se no gelo durante 30 min. Colocaram-se os tubos no bloco térmico a 42 °C durante 30 s, transferindo-os rapidamente para o gelo (choque térmico) durante 90 s.

Em condições de assepsia, adicionaram-se 250 μ l de meio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) líquido a cada tubo. As culturas foram incubadas na horizontal durante 45 min a 37 °C e com agitação.

Preparou-se meio LB sólido (Invitrogen; 10 g l⁻¹ de Bacto-triptona; 5 g l⁻¹ extracto de levedura e 10 g l⁻¹ cloreto de sódio; 15 g l⁻¹ bacto-agar) estéril, adicionou-se ampicilina (50 μ g ml⁻¹, Stratagene) e distribuiu-se por placas de petri. Após solidificação do meio espalharam-se 40 μ l de X-Gal (Sigma) (substrato cromogénico para a β -galactosidase) de uma solução de 40 mg ml⁻¹, e deixou-se secar. Transferiram-se 140 μ l de células competentes transformadas para as placas, espalhou-se o inóculo à superfície do meio e deixou-se secar à temperatura ambiente. Os procedimentos atrás descritos foram efectuados em condições de assepsia na câmara de fluxo laminar. As placas foram

invertidas e colocadas na estufa (Memmert) a 37 °C durante a noite. Quando a enzima está activa (β -galactosidase) degrada o X-Gal originando colónias de cor azul. Quando há a inserção do fragmento de DNA exógeno no vector, a síntese de β -galactosidase não está activa, não existe a degradação de X-Gal e origina colónias recombinantes de cor branca.

3.2.2.5. Amplificação, electroforese e SSCPs das colónias transformadas

Seleccionaram-se algumas colónias transformadas (com cor branca) de cada indivíduo e de cada *bulk* para a realização de PCR. A mistura de PCR foi preparada nas condições atrás descritas. Em cada um dos tubos de PCR colocou-se, além de 50 μ l da mistura reactiva, a colónia correspondente. Colocaram-se os tubos no termociclador e realizou-se o programa descrito no ponto 3.2.2.1.

Realizou-se uma electroforese em gel de agarose a 1% como descrito no ponto 3.2.2.2. Para as colónias transformadas seleccionadas realizaram-se análises de SSCP como descrito no ponto 3.2.2.3.

3.2.2.6. Cálculo do coeficiente de heterozigocidade

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. Para tal, utilizou-se a seguinte formula: $H_e = (x/x-1) * 1-\sum(\%P)^2$, em que x representa o número total de colónias analisadas para cada população e (%P) representa a percentagem de colónias em que cada padrão aparece. Quando o valor

obtido se aproxima de zero significa que, independentemente do número de alelos considerados, um deles tem uma frequência muito mais elevada do que qualquer outro.

3.2.2.7. Extração do DNA do plasmídeo em pequena escala (“miniprep”)

Através da análise dos diferentes padrões existentes nos géis de poliacrilamida, seleccionaram-se quais os plasmídeos a isolar para posteriormente sequenciar. Utilizou-se o *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System Kit* (Promega), seguindo as especificações do fornecedor.

As placas onde se encontravam as colónias seleccionadas foram colocadas na estufa a 37 °C durante 1-2 h. Passado este tempo transferiu-se individualmente cada cultura bacteriana para 5 ml de meio LB líquido (Invitrogen) e ampicilina (50 µg ml⁻¹) e incubou-se a 37 °C com agitação durante a noite. No dia seguinte, efectuou-se a lise das células bacterianas na presença de RNase A e a precipitação de proteínas e polissacáridos utilizando soluções fornecidas no kit. O DNA foi posteriormente ligado a uma resina por afinidade, sendo posteriormente sujeito a lavagens e eluído com água ultra-pura estéril, e armazenado a -20 °C.

Para confirmar se o DNA do plasmídeo extraído continha o fragmento de DNA exógeno inserido, recorreu-se ao uso da endonuclease de restrição EcoRI (Pharmacia) que possui dois sítios únicos de corte no plasmídeo usado a flanquear o local de clonagem múltipla, originando a separação do plasmídeo do fragmento de DNA inserido. Para efectuar a digestão dos plasmídeos efectuou-se a seguinte mistura para cada reacção de restrição: 3 µl de plasmídeo, 10 U de EcoRI, 1,2 µl de Tampão da enzima 10× e 6,8 µl de água ultra-pura estéril. A restrição ocorreu a 37 °C durante 1 h e 30 min.

Com o produto da digestão efectuou-se uma electroforese em gel de agarose a 1% para comprovar a existência e tamanho do fragmento antes se proceder à sua sequenciação.

3.2.2.8. Alinhamento das sequências obtidas e construção de dendrogramas

Os fragmentos clonados foram sequenciados comercialmente pela empresa Macrogen Inc. (Coreia do Sul). As sequências obtidas foram alinhadas com Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). O alinhamento foi verificado visualmente com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 1999). A matriz de distâncias e os dendrograma foram construídos com o programa MEGA 2 (Kumar *et al.*, 2001).

3.2.3. Análise de marcadores cloroplastidiais por PCR-RFLP

3.2.3.1. Material vegetal

Para optimização das condições de amplificação utilizou-se inicialmente apenas 1 indivíduo adulto de cada uma das populações amostradas (Tabela 3.1) e os 2 indivíduos do género *Drosera*. Na pesquisa de endonucleases de restrição e na optimização das condições de restrição utilizaram-se apenas 2 indivíduos (1 de Algoz 2 e 1 de Espanha). Posteriormente, para verificar a existência de polimorfismo utilizaram-se 4 indivíduos de Algoz, 4 de Barranco do Velho, 4 de Monchique, 4 de Espanha e os 2 indivíduos do género *Drosera*.

3.2.3.2. Amplificação por PCR

Nas análises PCR-RFLP foram utilizados vários pares de *primers* universais que permitem amplificar diferentes regiões do DNA cloroplastidial (Tabela 3.2). A mistura

de PCR foi preparada num volume final de 50 μ l com a seguinte composição: 10 mM Tris-Hcl (pH 8), 50 mM KCl, 1,75 ou 2 mM MgCl₂ (Tabela 3.1) (Fermentas), 0,4 mM de dNTPs (Fermentas), 0,4 μ M de cada um dos *primers*, 1 U de *Taq* Polimerase (Fermentas) e aproximadamente 10 ng de DNA genómico de cada um dos indivíduos analisados. Os tubos foram colocados no termociclador (Biometra UNO II) e sujeitos aos seguintes ciclos de temperatura: 94 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 45, 48 ou 52 °C (Tabela 3.2) durante 30 s e 72 °C durante 45 s, seguiu-se o passo final de 72 °C durante 5 min.

Tabela 3.2. Resumo dos *primers* utilizados, concentração de MgCl₂ e temperatura de *annealing* utilizada para cada um deles.

Designação do <i>primer</i>	Concentração de MgCl₂ (mM)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
RPS16 F / RPS16 R2	1,75	48
RBCI-1 / ATP B-1	2,00	52
PSBA / TRNH2R	1,75	48
TAB E / TAB F	1,75	48
TAB C / TAB F	1,75	45
TAB C / TAB D	1,75	48

Para análise do produto de amplificação foi feita uma electroforese com 10 μ l de cada amostra, em gel de agarose 1% em tampão TAE 1 \times a 75 V durante aproximadamente 1 h. Usou-se um padrão de fragmentos de DNA 100 pb Plus (Fermentas). A visualização dos fragmentos foi feita após coloração com brometo de etídio, sob luz UV e a imagem registada com sistema digital (Kodak, Vilber Luormat).

3.2.3.3. Restrição com endonucleases

Foram testadas 20 endonucleases de restrição, para averiguar quais delas digeriam o produto amplificado por cada um dos pares de *primers* utilizados. As enzimas com os respectivos sítios de clivagem estão indicadas na Tabela 3.3. As condições foram as recomendadas pelos fornecedores Pharmacia e Fermentas. Em resumo, preparou-se uma mistura constituída por 1 U de enzima de restrição e o respectivo tampão em quantidade variável, 2 µl do produto de PCR e água ultra-pura para perfazer o volume de 20 µl. A digestão ocorreu a 37 °C durante a noite, excepto para a *Taq* I que ocorreu a 65 °C. Estas condições, seleccionadas a partir de alguns ensaios prévios, permitiram, no caso em que a enzima restringe o fragmento, a sua restrição completa.

Tabela 3.3. Resumo das endonucleases de restrição testadas, respectivo tampão e local de clivagem.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão
Nsi I	ATGCA'T	NE3
BsrB I	CCG'CTC	NE2
Ssp I	AAT'ATT	NE Ssp I
Spe I	A'CTAGT	NE2 + BSA
Pac I	TTAAT'TAA	NE1 + BSA
Sca I	AGT'ACT	Sac ⁺
Xba I	T'CATGA	Tango
Ban I	G'GpyPuCC	0
Vsp I	AT'TAAT	0
Pst I	CTGCA'G	0 ⁺
Rca I	T'CATGA	0 ⁺
Ban II	GPuGCPy'C	Y ⁺ /Tango
EcoRI	G'AATTC	Mix III + BSA
BamH I	G'GATCC	OPA
Sac I	GAGCT'C	OPA
Xho I	C'TCGAG	OPA
Alu I	AAGCT	OPA
Hae III	RGCGCY	M
Hinf I	GANTC	H
Taq I	TCGA	OPA

Os fragmentos resultantes de digestão enzimática foram analisados electroforeticamente em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%, contendo também 10 µl de Temed e 100 µl de APS em tampão TBE, num volume final de 10 ml (dimensão: 85 mm × 65 mm × 0,75 mm). O tampão TBE também foi usado como electrólito e as amostras foram separadas a 100 V durante aproximadamente 1,5 h à temperatura ambiente. Usou - se um padrão de fragmentos de DNA 100 bp Plus (Fermentas). A visualização dos fragmentos foi feita, após coloração com brometo de etídio, sob luz UV e o resultado registado com sistema digital (Kodak, Vilber Luormat).

A análise dos fragmentos obtidos para os indivíduos das diferentes populações estudadas permite avaliar a presença ou ausência de polimorfismo.

3.2.4. Análises ISSR

3.2.4.1. Material vegetal

Para as análises ISSR foram utilizadas as amostras de DNA dos indivíduos adultos amostrados (Tabela 3.1), mas também DNA proveniente de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de sementes. As sementes, ainda agarradas à cápsula, foram recolhidas nas populações de Algoz, Albufeira e Monchique 3, na mesma altura que se recolheu as amostras de material foliar para extracção de DNA. Foram desinfectadas, escarificadas e germinadas *in vitro* em meio 1/4MS sem reguladores de crescimento (ver Capítulo II). Os germinantes obtidos (15 de Algoz, 10 de Albufeira e 15 de Monchique 3), 6 meses após germinação, foram utilizados para extracção de DNA como atrás descrito.

3.2.4.2. Amplificação PCR-ISSR

Para as análises ISSR foram, inicialmente, efectuados *bulks* (através da mistura de 10 µl de DNA extraído de cada indivíduo) de DNA das diferentes populações a analisar. Para cada um dos *bulks* foram, inicialmente testados 25 *primers* ISSR. As amplificações foram efectuadas em tubos 0,2 ml num volume final de 50 µl, que consistiam em aproximadamente 10 ng de DNA genómico, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl (Fermentas), 2,75 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,4 mM de dNTPs (Fermentas), 0,4 µM de cada um dos *primers* e 1 U *Taq* Polimerase (Fermentas). As condições do termociclador (Biometra TGradient) foram as seguintes: 94 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60-50 °C (decrecendo um grau em cada ciclo) durante 1 min e 72 °C durante 1 min, seguiu-se o passo final a 72 °C durante 10 min. A partir do resultado destas amplificações foram seleccionados 10 *primers* [UBC 810; UBC 817; UBC 834; UBC 857; UBC 842; UBC 827; UBC 848; ISSR 19; UBC 818 e (GTGC)₄] para analisar todos os indivíduos, individualmente, utilizando o procedimento anterior. A selecção dos *primers* foi feita com base no polimorfismo detectado entre os diferentes *bulks* analisados, na reprodutibilidade dos resultados em amplificações independentes e na ausência de bandas no controlo negativo.

3.2.4.3. Análise do produto de amplificação por electroforese

O produto de amplificação foi analisado por electroforese em géis de agarose a 2%. Os géis foram carregados com 18 µl de amostra em cada poço. Usou-se um padrão de fragmentos de DNA 100 bp Plus (Fermentas). A electroforese foi feita em tampão TAE 1× a 100 V durante aproximadamente 2 h. A visualização dos fragmentos foi feita, após

coloração com brometo de etídio, sob luz UV e o resultado registado com sistema digital (Kodak, Vilber Luormat).

3.2.4.4. Análise estatística

Dado o reduzido número de indivíduos e a grande proximidade dos locais amostrados, na análise dos resultados consideraram-se os indivíduos de Algoz 1 e 2 no mesmo grupo assim como os de Barranco do Velho 1 e 2. Uma vez que os marcadores ISSR são dominantes assumiu-se que cada banda representa o fenótipo de um locus bialélico simples. Os fragmentos amplificados são analisados pela presença (1) ou ausência (0) de bandas homólogas. A matriz resultante dos dados de presença/ausência dos diferentes fenótipos ISSR foi analisada no programa POPGENE versão 1.31. Para estimar a diversidade genética foram calculados os seguintes parâmetros: número e percentagem de loci polimórficos, número efectivo de alelos por locus (n_e), número de alelos observado por locus (n_a), coeficiente de heterozigocidade de Nei (h) (1973) e índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972). Ao nível da espécie foram ainda calculados os seguintes parâmetros: a diversidade genética total (H_t), a diversidade média entre populações (H_s), o coeficiente de diferenciação [$G_{st} = (H_t - H_s)/H_t$] e o nível de fluxo genético [$N_m = 0.5 (1 - G_{st})/G_{st}$] (McDermott & McDonald, 1993) As distâncias genéticas entre pares de populações (D) foram também calculadas pelo programa (Nei, 1972).

A estimativa da correlação entre as distâncias genética e geográfica (em km) e entre o fluxo genético e as distâncias geográficas foi efectuada recorrendo ao teste de Mantel, utilizando o programa XLSTAT 2007.

As distâncias genéticas, foram utilizadas para a construção de dendrogramas usando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetical Means*) (MEGA 2) (Kumar *et al.*, 2001). Na elaboração de gráficos utilizou-se o programa Sigma Plot Versão 8.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar do estudo ecológico e demográfico das populações de *D. lusitanicum* amostradas não ser um dos objectivos propostos para este trabalho enumeram-se de seguida algumas características mais relevantes das várias populações que poderão ser importantes para estudos posteriores. Na Figura 3.2 mostram-se aspectos gerais das várias populações algarvias estudadas.

As populações de Barranco do Velho localizadas em plena Serra Algarvia apresentavam reduzido número de indivíduos com aspecto muito envelhecido. O mesmo aconteceu com as populações de Algoz que se localizam numa zona com maior intervenção humana, uma vez que se encontram nas proximidades de zonas de habitação e de pastoreio. Nas populações destas duas regiões não se observou regeneração, uma vez que não foram encontrados indivíduos jovens. A vegetação circundante nestas populações era maioritariamente composta por arbustos de pequeno porte (Figura 3.2), permitindo uma exposição considerável à luz solar.

A população localizada na região de Albufeira encontrava-se numa falésia (Figura 3.2) junto ao mar, numa zona sujeita a grande erosão. Esta zona apresenta pouca vegetação e as plantas de *D. lusitanicum* aqui encontradas apresentavam um aspecto menos envelhecido e mais vigoroso que as atrás descritas, provavelmente devido à maior

humidade desta região. No entanto, também não se observou existência de indivíduos jovens nesta população.

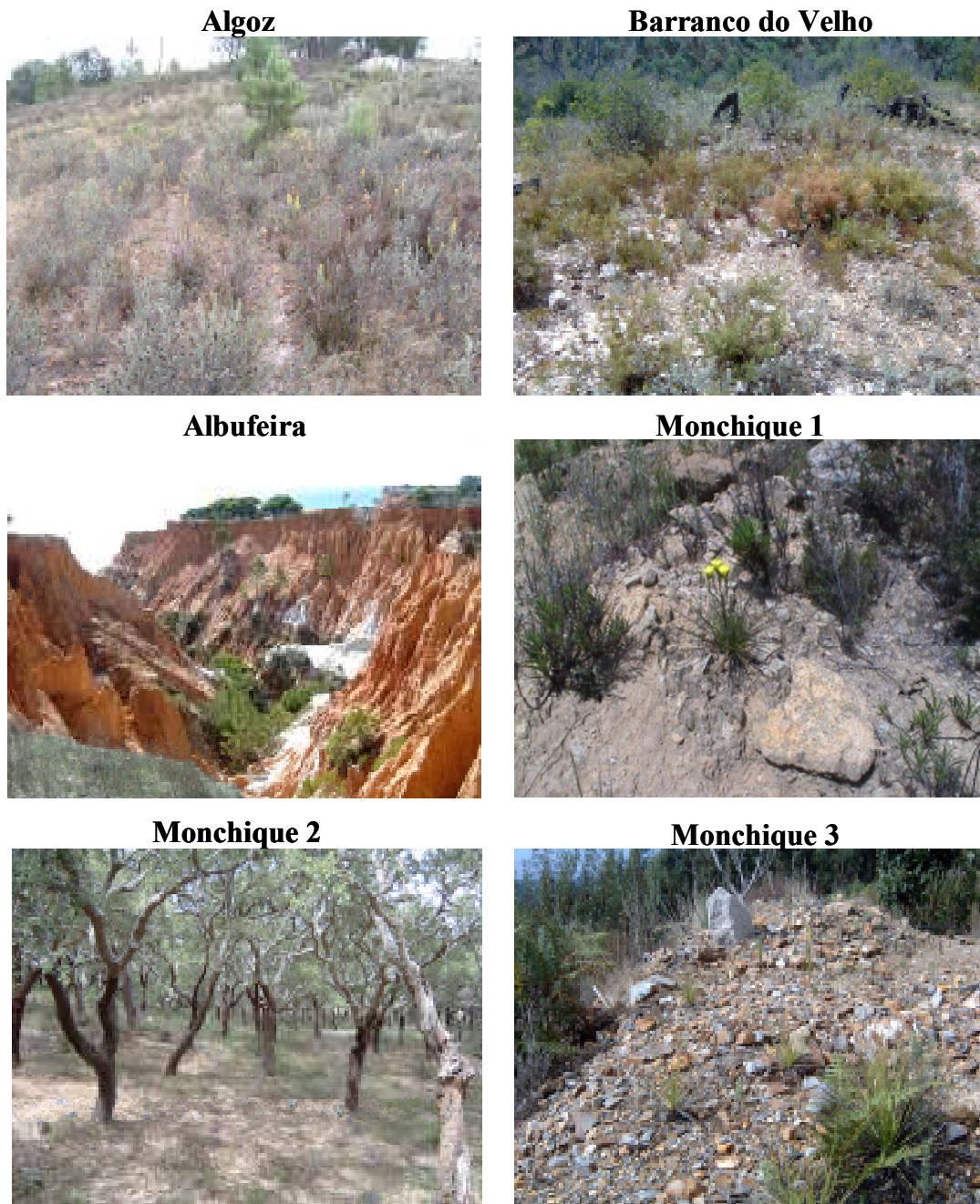


Figura 3.2. Aspecto geral das diferentes populações algarvias de *D. lusitanicum* estudadas.

As populações da Serra de Monchique apresentavam algumas diferenças entre si, nomeadamente em termos de exposição, vegetação circundante e número e idade dos indivíduos. As populações de Monchique 1 e Monchique 3 foram as populações com maior número de indivíduos, encontrando-se ambas junto à estrada em locais movimentados. Nas zonas onde se localizam estas populações era visível a recente mobilização do solo o que, dado o carácter pioneiro desta espécie, provavelmente facilitou a colonização destas zonas. O solo destes locais era visivelmente seco e pedregoso, comprovando a preferência desta espécie por este tipo de solo (Garrido *et al.*, 2003). Apesar de nas proximidades destas populações a vegetação arbustiva e arbórea ser bastante densa, as plantas de *D. lusitanicum* existiam em zonas mais abertas afastadas de outras plantas, permitindo uma maior exposição à luz. A população de Monchique 1 tinha elevado número de indivíduos envelhecidos (lenhificados) mas também, grande quantidade de plantas mais jovens. Por outro lado, as plantas da população de Monchique 3, situada próximo da localidade de Chilrão, eram em média mais jovens ou seja nesta população não se encontraram indivíduos muito lenhificados. A população de Monchique 2 é muito peculiar uma vez que as plantas de *D. lusitanicum* se encontravam numa zona de sobreiros (Figura 3.2), estando mais ensombradas ao contrário do que acontecia nas restantes populações. Nesta população a maioria dos indivíduos era muito jovem, de reduzido tamanho, e encobertos pela folhagem. Além disso, existiam poucos indivíduos lenhificados e com reduzido número de folhas jovens. Estas características tornam esta população bastante distinta das restantes.

A população de Espanha situa-se no parque Natural ‘Los Alcornocales’, zona protegida, e, talvez por isso, apresentava maior número de indivíduos entre adultos e jovens com um aspecto muito vigoroso e aparentemente mais estável.

3.3.1. Análise da região ITS do rDNA

3.3.1.1. Coeficiente de Heterozigocidade

Os *primers* universais ITS4 e ITS5 descritos para a região ITS do rDNA permitiram amplificar um único fragmento com aproximadamente 700 bp (Figura 3.3) em todos os indivíduos das diferentes populações estudadas.

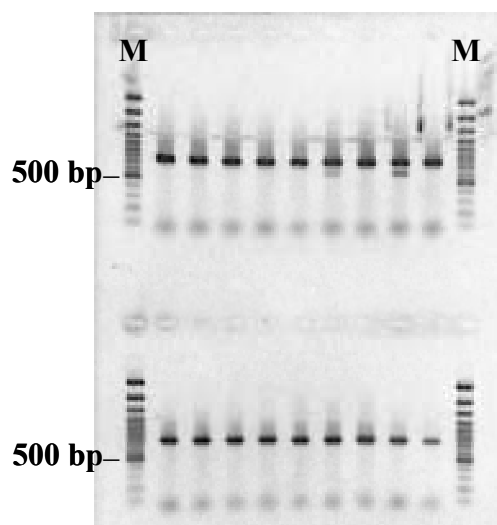


Figura 3.3. Resultado da electroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de alguns indivíduos das várias populações. M – marcador 100 bp Plus (Fermentas).

O produto da amplificação individual foi submetido a análises SSCP para verificar a existência de cópias múltiplas do gene amplificado. Como se pode verificar na Figura 3.4, os géis correspondentes à análise de SSCP de diferentes indivíduos mostraram a existência de padrões complexos, com três bandas, comprovando a existência de cópias múltiplas. Assim, recorreu-se à clonagem, no intuito de separar as diferentes cópias. Para tal foram feitos *bulks*, por população, do resultado da amplificação individual da região ITS e duas ligações ao vector de clonagem por cada *bulk*.

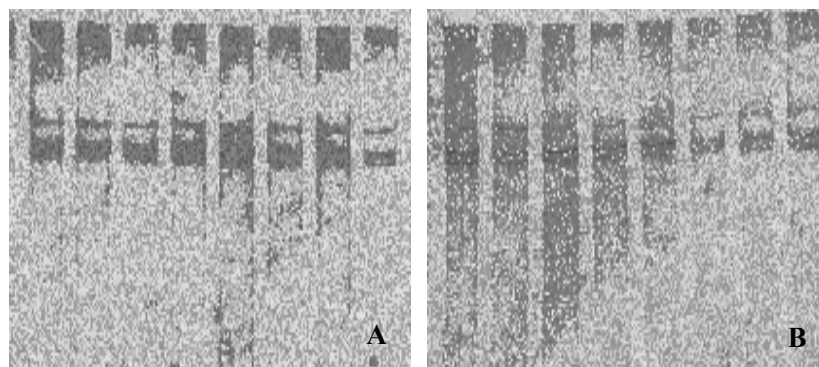


Figura 3.4. Padrões de bandas obtidos por SSCP em gel de poliacrilamida não desnaturante, após coloração com nitrato de prata. Estão representados padrões de bandas de indivíduos de diferentes populações de *D. lusitanicum*.

Após clonagem efectuou-se a amplificação das colónias recombinantes e novas análises SSCP. Analisando os padrões obtidos para as diferentes populações estudadas, pode-se verificar que alguns padrões são comuns a todas as populações (Figura 3.5), embora existindo em percentagem variável. Existem alguns padrões que, embora em baixo número, só foram obtidos em determinada população.

As 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 obtidos em cada população, em que cada padrão diferente é tratado como um alelo. Como se pode observar na Tabela 3.4, 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 um

défice de heterozigotia. Resultados semelhantes foram recentemente obtidos para outras plantas raras, com outros marcadores moleculares (Archibald *et al.*, 2001; Gustafsson & Sjögren-Gulve, 2002; Neel & Ellstrand, 2003).

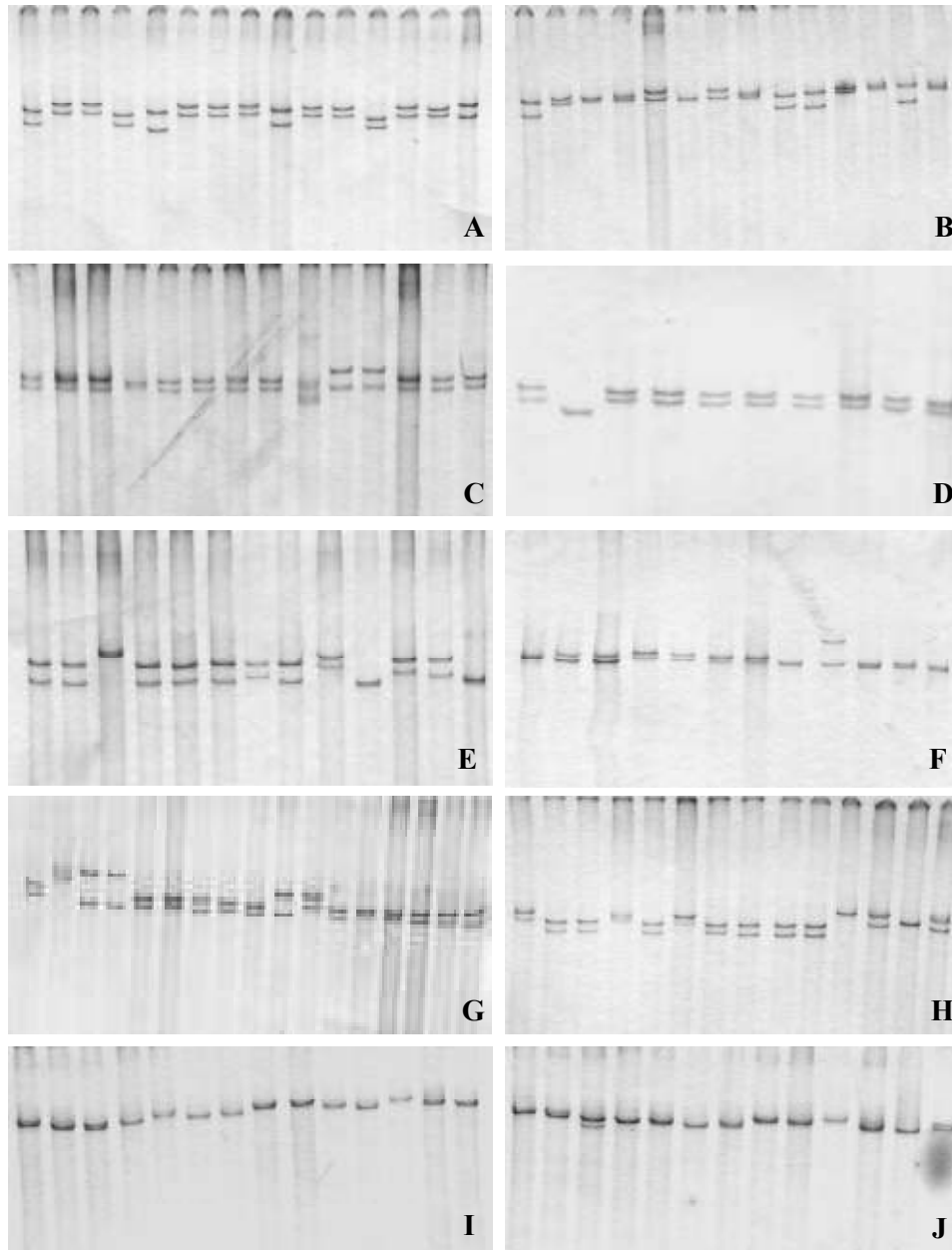


Figura 3.5. Padrões SSCP de vários clones dos *bulks* das várias populações de *D. lusitanicum*: (A) Algoz 1, (B) Agoz 2, (C) Barranco do Velho 1, (D) Barranco do Velho 2, E Albufeira, (F) Monchique 1, (G) Monchique 2, (H) Monchique 3 e (I, J) Espanha.

No entanto, na zona de Barranco do Velho os valores do coeficiente encontrados são bastante mais baixos do que nas outras populações. Esta diferença acentua-se ainda

mais quando se comparam os valores de H_e e o número de padrões SSCP encontrados para os indivíduos analisados separadamente em cada local. Verifica-se que, não só o grau de polimorfismo intra-populacional é baixo como são baixos os níveis de heterozigocidade individual. Embora o esclarecimento das causas desta situação ultrapasse o âmbito deste trabalho, sugere-se que esteja relacionada com o facto de se ter encontrado um reduzido número de indivíduos, provavelmente o que resta de uma população de maiores dimensões.

Tabela 3.4. Coeficiente de heterozigocidade (H_e) (Nei, 1987), calculado para 1 indivíduo e para o *bulk* de cada população, 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 indivíduos	Indivíduos		Bulk	
		Nº padrões/ indivíduo	H_e	Nº padrões / população	H_e
Algoz 1	4	4	0,81	13	0,89
Algoz 2	4	5	0,97	13	0,87
Barranco do Velho 1	3	2	0,25	4	0,68
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	17	4	0,81	10	0,88
Espanha	15	6	0,87	6	0,70

Vários tipos de auto-polinização ocorrem simultaneamente em *D. lusitanicum* (Ortega-Olivencia *et al.*, 1998) verificando-se baixos níveis de polinização cruzada, provavelmente 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, restando indivíduos eventualmente sujeitos a uma grande pressão selectiva e grande isolamento reprodutivo.

3.3.1.2. Análise das sequências nucleotídicas

O DNA plasmídeo correspondente a cada padrão SSCP das várias populações foi isolado e foi efectuada a confirmação da presença do fragmento ITS no vector pGEM T- *easy*, por restrição com a enzima EcoRI. Nas construções baseadas em pGEM T-*easy*, a digestão com EcoRI separa o fragmento do vector. Como resultado, obtêm-se duas bandas em gel de agarose (Figura 3.6) na presença do fragmento inserido, uma de aproximadamente 700 bp que corresponde à região ITS, e outra superior de 3018 bp que corresponde ao vector.

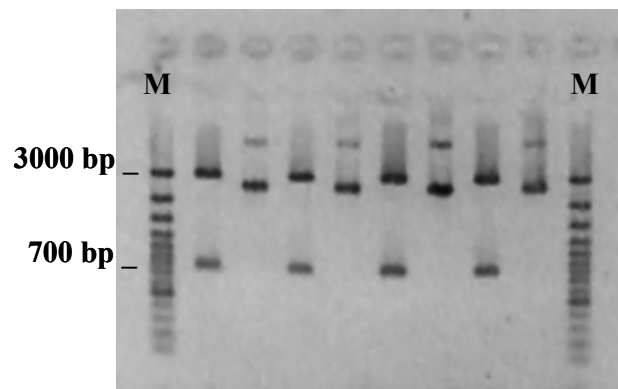


Figura 3.6. Resultado da restrição com EcoRI, do DNA plasmídico de alguns clones da população de Algoz purificado a partir de colónias transformadas. Electroforese em gel de agarose 1%. M – marcador 100 bp Plus (Fermentas).

As sequências nucleotídicas correspondentes aos padrões SSCP das várias populações estudadas foram analisadas (Anexo II). Nesta análise sequências demasiado grandes ou que não permitiam um bom alinhamento na zona correspondente ao 5.8S foram

excluídas, bem como a de *D. capensis*, pela última razão. Com as restantes sequências foram construídos dendrogramas correspondentes à região ITS1 e ITS2 em separado e, a toda a região correspondente ao ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA (Figura 3.7).

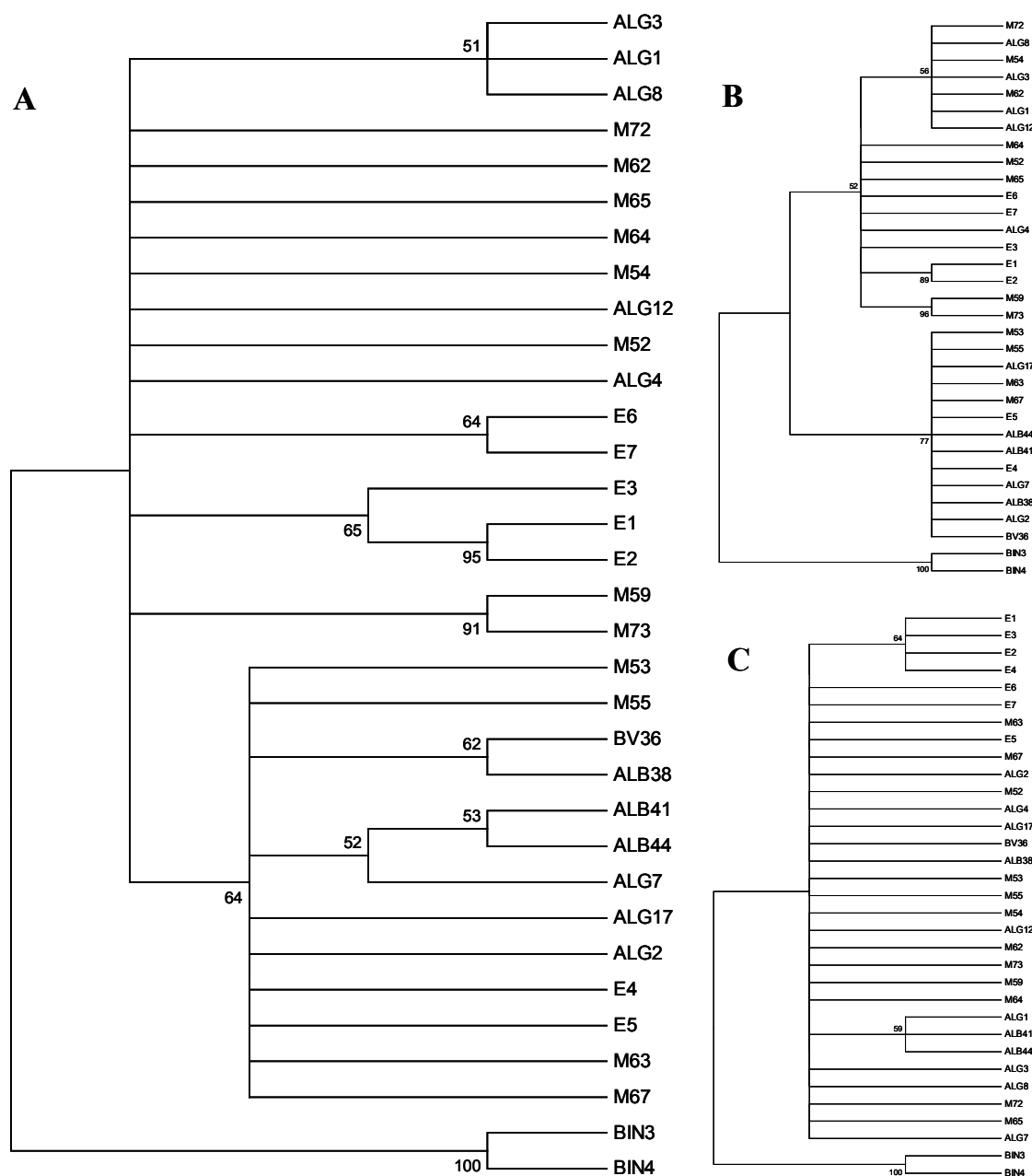


Figura 3.7. Dendrogramas de consenso obtidos a partir de 33 sequências nucleotídicas correspondentes à região (A) ITS1-5.8S-ITS2; (B) ITS1 e (C) ITS2 do rDNA (UPGMA, 1000 bootstrap, Kimura 2-parameter) (ALG – Algoz; BV – Barranco do Velho; ALB – Albufeira; M – Monchique; E – Espanha; BIN – *Drosera binata*).

Verifica-se que, embora esta região do genoma seja marcador da espécie permitindo separar nitidamente a espécie *Drosera binata*, não permite a diferenciação de populações de *D. lusitanicum* no geral. Nem sequer permite a diferenciação entre as populações algarvias da espanhola, o que seria de esperar devido à distância geográfica em que as populações se encontram. Apesar de haver a formação de alguns grupos, em especial para a região ITS1, não há a formação de agrupamentos correspondentes a sequências de cada população. As distâncias médias intra-populacionais, baseadas nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA (Tabela 3.5) apresentam valores bastante baixos, sendo a média de $0,011 \pm 0,002$.

Tabela 3.5. Distâncias médias intra-populacionais (Kimura 2-parameter) baseadas nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA das populações de Monchique, Algoz, Albufeira e Espanha.

População	Distância
Algoz	0,011 (0,003)
Albufeira	0,007 (0,003)
Monchique	0,016 (0,003)
Espanha	0,008 (0,002)
Média	0,011 (0,002)

Analisando as distâncias médias inter-populacionais baseadas nesta região do genoma (Tabela 3.6), verifica-se também que estes valores são baixos, mesmo entre as populações portuguesas e a espanhola.

Tabela 3.6. Matriz de distâncias médias inter-populacionais (Kimura 2-parameter) baseadas nas sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA das populações de Monchique, Algoz, Albufeira e Espanha.

População	Algoz	Albufeira	Monchique	Espanha
Algoz	***			
Albufeira	0,013 (0,003)	***		
Monchique	0,014 (0,003)	0,015 (0,003)	***	
Espanha	0,013 (0,003)	0,014 (0,003)	0,014 (0,003)	***

A região 18-5.8S-26S existe no genoma em centenas ou milhares de cópias que não permanecem todas funcionais durante o processo de evolução, degenerando algumas delas em pseudogenes (Álvarez & Wendel, 2003). Estes, que não têm significado funcional, são acumulados não sendo perdidos pelo genoma. Esta poderá ser umas das causas para, apesar dos elevados níveis de polimorfismo encontrados neste trabalho, não se ter observado a diferenciação de populações, mesmo após terem sido excluídas da análise sequências que não permitiam um bom alinhamento na região conservada correspondente à região 5.8S (Jobes & Thien, 1997).

Em suma, o marcador ITS permite detectar a espécie *D. lusitanicum*, mas não tem definição (nem o ITS1 nem o ITS2) sobre o nível de diferenciação de populações. Por esta razão este marcador não é adequado para analisar populações desta espécie no contexto deste trabalho.

3.3.2. Análise de marcadores cloroplastidiais por PCR-RFLP

O genoma cloroplastidial, de uma maneira geral evoluiu lentamente, tornando-o ideal para estabelecer relações filogenéticas entre géneros (Downie *et al.*, 1996) ou famílias (Olmstead *et al.*, 1992). Além disso, alguns estudos têm revelado variação genética entre populações baseadas em RFLP's do genoma cloroplastidial. Actualmente estão já

referenciados *primers* universais (Taberlet *et al.*, 1991; Demesure *et al.*, 1995; Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997) que permitem amplificar determinadas regiões do DNA cloroplastidial que se têm mostrado variáveis entre espécies ou populações (Demesure *et al.*, 1996; Wattier *et al.*, 2001; Petit *et al.*, 2002; Kelleher *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2005). Neste trabalho foi possível otimizar as condições de amplificação para seis desses pares de *primers* (Tabela 3.7). Os fragmentos amplificados variaram entre os 450 e os 1000 bp (Tabela 3.7). Na Figura 3.8 estão representados os resultados da amplificação de três destes fragmentos.

Tabela 3.7. Dimensão do fragmento amplificado com cada um dos *primers* testados e enzimas que restringiram o fragmento obtido.

Designação dos <i>primers</i>	Dimensão do fragmento amplificado (bp)	Enzimas que restringiram o amplicon
RPS16 F / RPS16 R2	900	Xba I, Ban II, Sac I, Xho I Alu II
RBCI-1 / ATP B-1	900	Ban I, EcoRI, Hae III
PSBA / TRNH2R	600	Alu I, Taq I
TAB E / TAB F	450	Sca I, Alu I, Hae III
TAB C / TAB F	1000	Sca I, Vsp I, Pst I, Alu I, Hae III, Taq I
TAB C / TAB D	600	Vsp I, Alu I, Tap I



Figura 3.8. Géis de agarose 1% do produto de amplificação de diferentes regiões do DNA cloroplastidial por 3 pares de *primers* (A - RBCI-1/ATP B-1; B - TAB E/TAB F; C - RPS16 F/RPS16 R2).

Para digerir os diferentes fragmentos amplificados a fim de detectar polimorfismo no tamanho dos fragmentos digeridos, foram testadas vinte endonucleases de restrição. Apenas uma pequena percentagem destas enzimas (Tabela 3.7) permitiu a restrição dos fragmentos amplificados. Além disso, a análise dos fragmentos digeridos de vários indivíduos das diferentes populações não permitiu detectar polimorfismo, quer entre indivíduos da mesma população, quer de populações diferentes (Figura 3.9). Isto mostra que os marcadores utilizados, apesar de permitirem detectar polimorfismo intraespecífico em outras espécies (Demesure *et al.*, 1996; Wattier *et al.*, 2001; Petit *et al.*, 2002; Kelleher *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2005), não são adequados para avaliar a diversidade genética de populações de *D. lusitanicum*.

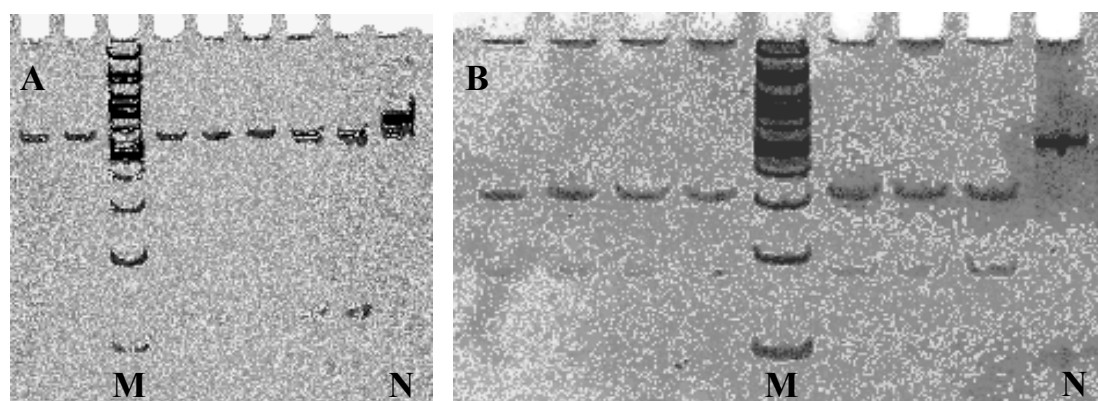


Figura 3.9. Géis de acrilamida a 8% dos fragmentos digeridos pela (A) endonuclease Vsp I na região amplificada pelos *primers* TAB C/TAB D e (B) endonuclease Sac I na região amplificada pelos *primers* TAB E/TAB F. Em cada gel está representado um indivíduo de cada população. N – fragmento não digerido e M - marcador 100 bp Plus (Fermentas).

A detecção de polimorfismo no cpDNA de *D. lusitanicum* requer provavelmente o estudo de marcadores microssatélites polimórficos específicos desta região do genoma. Vários autores têm sugerido que esta técnica permite detectar maiores níveis de polimorfismo que a PCR-RFLP (Provan *et al.*, 1997; Provan *et al.*, 1999).

A análise da região ITS do rDNA e a utilização da técnica PCR-RFLP para analisar o cpDNA não se mostraram adequadas para caracterizar a estrutura genética das populações de *D. lusitanicum*, e conseqüentemente não se mostram úteis na obtenção de informações a usar no estabelecimento de estratégias de conservação para esta espécie. Assim, decidiu-se utilizar os marcadores ISSR, recentemente muito utilizados em estudos deste tipo, particularmente em espécie endémicas e raras, dada a sua facilidade e baixo custo de execução, a sua reprodutibilidade e, ao permitirem a amplificação de fragmentos ao longo de todo o genoma, a sua capacidade de detectar variabilidade.

3.3.3. ISSR

3.3.3.1. Variabilidade genética intra-populacional

Numa análise prévia em que os resultados obtidos, com marcadores ISSR, para as duas populações de Algoz e para as duas populações de Barranco do Velho foram tratados em separado, verificou-se a existência de uma elevada proximidade genética entre as duas populações de cada local. Isto, aliado à grande proximidade geográfica e ao reduzido número de indivíduos destas populações levou a que em análises futuras fossem analisados os indivíduos de Algoz 1 e 2 no mesmo grupo, assim como os de Barranco do Velho 1 e 2, com vista a uma maior robustez das análises. Os 10 *primers* ISSR utilizados para analisar os 109 indivíduos de *D. lusitanicum*, incluindo indivíduos adultos e plântulas provenientes da germinação de semente, geraram um total de 159 bandas, correspondendo a uma média de 16 bandas por *primer* (Tabela 3.8). Dessas bandas 94% são polimórficas (149) entre os 109 indivíduos analisados, salientando-se ainda o facto de para 5 dos *primers* 100% das bandas serem polimórficas.

Tabela 3.8. Resumo dos *primers* ISSR utilizados, respectiva sequência, número total de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas (BP) e percentagem de bandas polimórficas.

Nome	Sequência na orientação 5'...3'	Nº total de bandas amplificadas	Nº BP	BP (%)
UBC 810	(GA) ₈ T	18	15	83
UBC 817	(GA) ₈ A	11	11	100
UBC 834	(AG) ₈ YT	16	16	100
UBC 857	(AC) ₈ YG	19	19	100
UBC 842	(GA) ₈ YG	18	17	94
UBC 827	(AC) ₈ G	14	13	93
UBC 848	(CA) ₈ RG	11	11	100
ISSR 019	GGA(GTG) ₄	17	14	82
UBC 818	(CA) ₈ G	13	11	92
(GTGC) ₄	(GTGC) ₄	22	22	100
Total		159	149	93,71

Nos adultos a percentagem de bandas polimórficas por população, varia entre 5,66 e 48,43% na população de Monchique 2 e Espanha, respectivamente (Tabela 3.9). As diferenças, em termos de frequência alélica, entre estas populações são visíveis na Figura 3.10. Na população de Monchique 2 os 5,66% de loci polimórficos distribuem-se apenas por 4 classes de frequência. Na população de Espanha os loci polimórficos apresentam várias classes de frequências em especial abaixo dos 0,5.

Tabela 3.9. Variabilidade genética dentro de cada população de *D. lusitanicum* detectada por análises de marcadores ISSR.

População	Nº indivíduos	Nº BP	BP (%)	na	ne	h	I
<i>Adultos</i>							
Algoz	8	36	22,64	1,23 (0,420)	1,15 (0,300)	0,09 (0,170)	0,13 (0,247)
Barranco do Velho	4	30	18,87	1,19 (0,386)	1,13 (0,309)	0,07 (0,163)	0,11 (0,233)
Albufeira	8	43	27,04	1,27 (0,446)	1,17 (0,323)	0,09 (0,174)	0,14 (0,250)
Monchique 1	14	76	47,80	1,48 (0,501)	1,29 (0,374)	0,17 (0,201)	0,25 (0,287)
Monchique 2	5	9	5,66	1,06 (0,232)	1,04 (0,176)	0,02 (0,095)	0,03 (0,137)
Monchique 3	17	76	47,80	1,48 (0,501)	1,30 (0,386)	0,17 (0,207)	0,26 (0,295)
Espanha	15	77	48,43	1,48 (0,501)	1,29 (0,370)	0,17 (0,199)	0,25 (0,285)
<i>Plântulas</i>							
Algoz	13	32	20,13	1,20 (0,402)	1,07 (0,205)	0,05 (0,117)	0,07 (0,173)
Albufeira	10	35	22,01	1,22 (0,416)	1,13 (0,287)	0,07 (0,156)	0,11 (0,225)
Monchique 3	15	31	19,50	1,20 (0,397)	1,06 (0,178)	0,04 (0,107)	0,07(0,163)
<i>Adultos e plântulas em conjunto</i>							
Algoz	8 + 13	66	41,51	1,42 (0,494)	1,20 (0,308)	0,12 (0,173)	0,19 (0,254)
Albufeira	8 + 10	79	49,69	1,50 (0,502)	1,28 (0,357)	0,17 (0,197)	0,25 (0,284)
Monchique 3	17 + 15	101	63,52	1,64 (0,483)	1,32 (0,344)	0,19 (0,191)	0,30 (0,274)

BP = bandas polimórficas; na = número de alelos observados; ne = número efectivo de alelos; h = diversidade genética de Nei (1973); I = índice de Shannon (Lewontin, 1972). Erro-padrão entre parênteses.

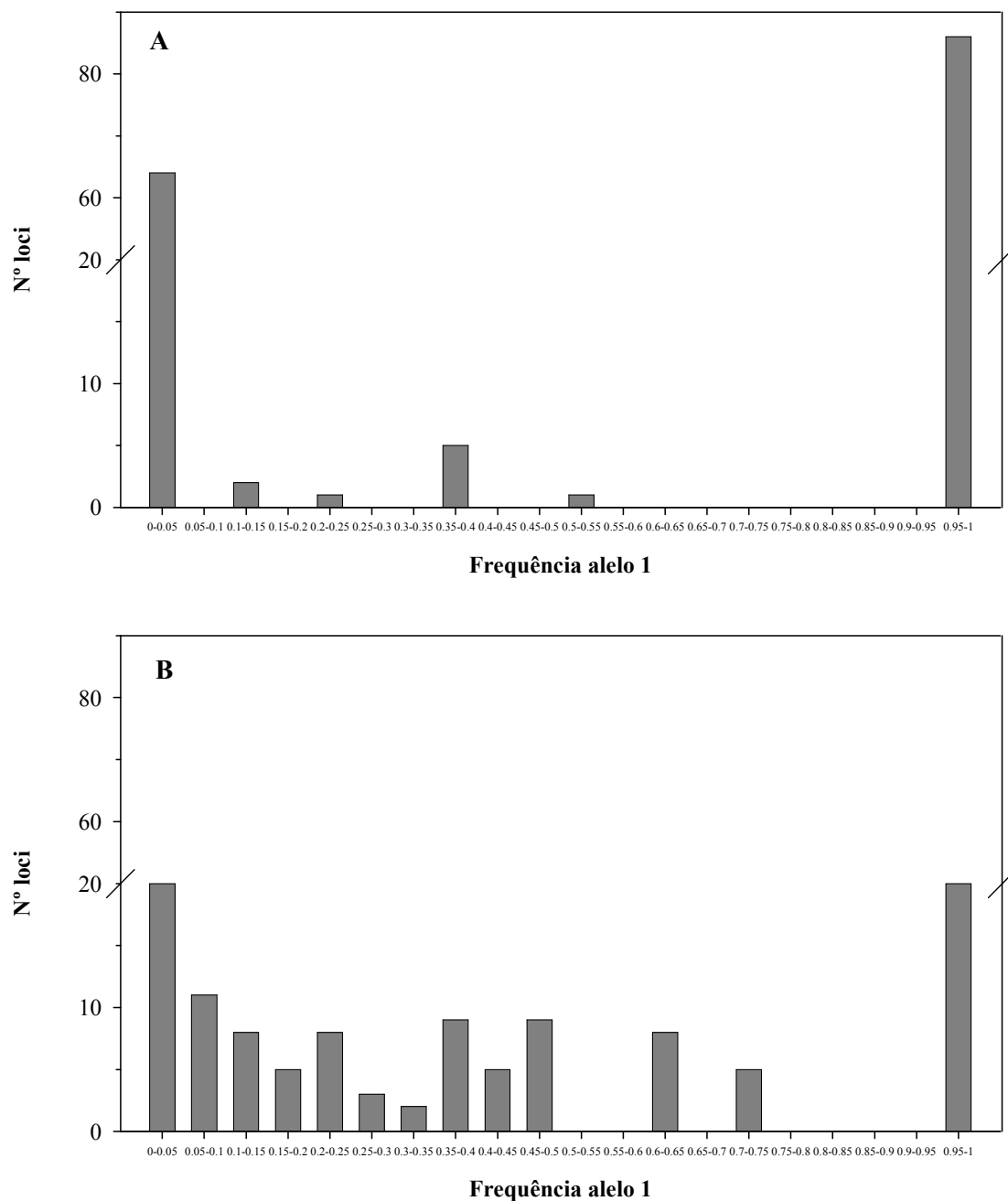


Figura 3.10. Número de loci por classe de frequência do alelo 1 nas populações de Monchique 2 (A) e Espanha (B).

A Figura 3.11 ilustra o padrão de bandas obtido pelo *primer* (GTGC)₄ para a população de Espanha, onde é visível a grande variabilidade de padrões gerados por este *primer* nos vários indivíduos dessa população. Os elevados níveis de polimorfismo detectados confirmam o alto teor de informação genética dos marcadores ISSR utilizados para o estudo de parâmetros genéticos de populações de

D. lusitanicum. Resultados semelhantes estão referenciados para outras plantas raras e endémicas (Ge *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Meloni *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2007).

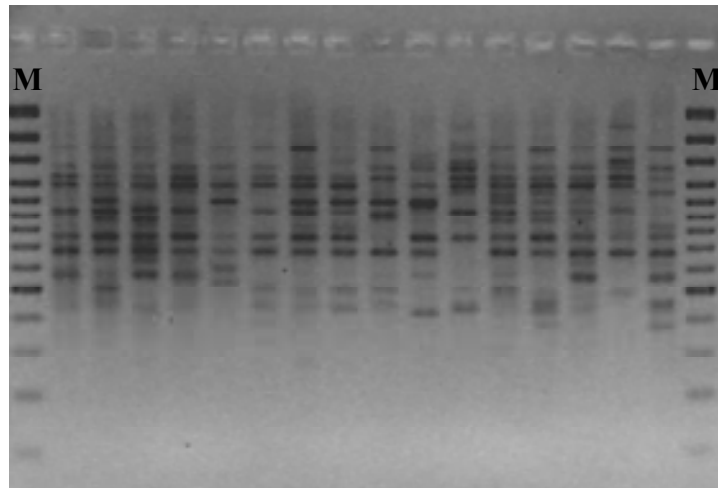


Figura 3.11. Gel de agarose a 2% a representar o padrão de bandas amplificadas pelo *primer* (GTGC)₄ nos diferentes indivíduos da população de Espanha (da esquerda para a direita, o *bulk* e os 15 indivíduos desta população). As linhas assinaladas com M representam o marcador 100 bp Plus (Fermentas).

Dos diferentes loci estudados poucos foram exclusivos de determinada população, salientando-se, no entanto, a população de Espanha com 10 loci que não apareceram nas restantes populações (Figura 3.12). Ou seja, a população de Espanha não só é a que apresenta maior variabilidade, como apresenta loci exclusivos. A maior variabilidade observada na população espanhola pode estar relacionada com o facto de esta população se encontrar numa zona protegida. Salienta-se que *D. lusitanicum* é há alguns anos uma espécie protegida em Espanha. As diferenças verificadas nesta população podem indicar que as medidas de conservação *in situ* foram tomadas atempadamente neste local e que a sua implementação parece estar a impedir a diminuição da variabilidade e do número de indivíduos da espécie.

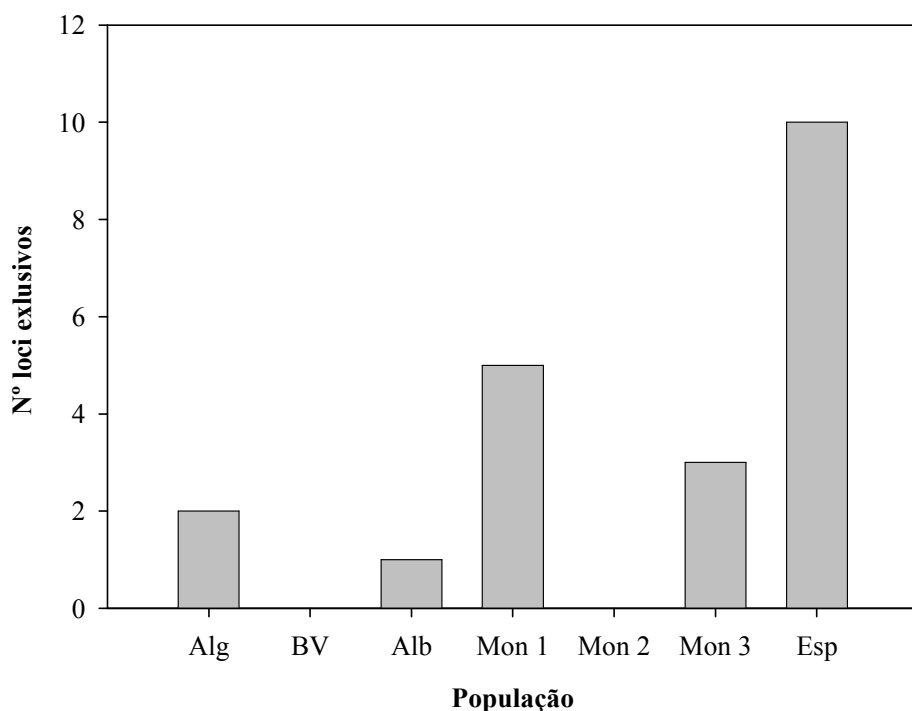


Figura 3.12. Número de loci exclusivos nos indivíduos adultos de cada uma das populações analisadas. Alg = Algoz; BV = Barranco do Velho; Alb = Albufeira; Mon 1 = Monchique 1; Mon 2 = Monchique 2; Mon 3 = Monchique 3; Esp = Espanha

Analisando os valores de diversidade genética de Nei (h) (1973) e os índices de Shannon (I) (Lewontin, 1972) verifica-se que a população de Monchique 2 é a que apresenta menor variabilidade ($h = 0,02 \pm 0,095$ e $I = 0,03 \pm 0,137$) (Tablea 3.9). Por outro lado, as populações de Monchique 1, Monchique 3 e Espanha são as que exibem a maior variabilidade, com valores de h de 0,17 e valores de I de 0,25-0,26.

Em loci hipervariáveis a utilização de amostras pequenas pode causar distorções nas frequências genóticas, uma vez que o número de indivíduos genotipados pode ser insuficiente para que sejam encontrados indivíduos em todas as classes genóticas possíveis (Collevatt *et al.*, 2001). No entanto, a baixa variabilidade observada na população de Monchique 2 não parece dever-se ao baixo número de indivíduos analisado, uma vez que a população de Barranco do Velho, também com reduzido

número de indivíduos, apresenta valores de variabilidade superiores e idênticos aos observados em Algoz (Tabela 3.9). As diferenças de variabilidade entre as várias populações podem estar relacionadas com a situação geográfica e ecológica das populações. De facto, a população de Monchique 2, localiza-se na Serra de Monchique mas, ao contrário das outras duas populações, encontra-se num vale e sobre uma zona de grande cobertura arbórea o que pode limitar o fluxo genético entre as restantes populações, aumentando o isolamento e reduzindo a sua variabilidade. Tendo em conta que, os poucos indivíduos lenhificados encontrados nesta população praticamente não apresentavam folhas verdes, não foi possível a sua amostragem, sendo por isso os indivíduos amostrados nesta população visivelmente mais jovens que os amostrados nas restantes.

Analisando a percentagem de bandas polimórficas (Tabela 3.9), em cada população, verifica-se que, apesar de as populações de Monchique 1 e 3 e de Espanha apresentarem maior variabilidade em relação às restantes, a verdade é que, de uma maneira geral, a variabilidade intra-populacional observada foi baixa. De acordo com Hamrick & Godt (1996) as plantas endémicas, geralmente possuem menor variabilidade devido à deriva genética e ao fluxo genético restrito. O predomínio da auto-polinização em *D. lusitanicum* (Ortega-Olivencia *et al.*, 1998) e a aparente ausência de um processo de dispersão de sementes, fazem com que plantas vizinhas possam ter um nível muito próximo de parentesco, pelo que, a existir polinização cruzada, esta poderá conduzir a *inbreeding*. O *inbreeding* é também uma consequência das populações pequenas, como é o caso de *D. lusitanicum* o que pode explicar os baixos níveis de polimorfismo intra-populacional encontrados neste trabalho, e evidenciados por 3 diferentes tipos de marcadores moleculares.

D. lusitanicum é uma planta perene, pelo que não é possível saber a idade dos indivíduos analisados neste trabalho. No sentido de tentar compreender a situação actual da espécie em termos de diversidade e estrutura genética e de fazer a sua comparação com as plantas adultas naturalmente estabelecidas nos diferentes locais de amostragem, durante este trabalho foram também analisados indivíduos desta espécie provenientes de germinação de sementes. Estas foram recolhidas nas populações de Algoz, Albufeira e Monchique 3 no mesmo ano da recolha de material foliar. A análise conjunta dos indivíduos adultos e das plântulas correspondentes a cada uma das populações mostrou um aumento considerável da variabilidade. A percentagem de bandas polimórficas aumentou de 22,6 para 41,51; 27,04 para 49,69 e 47,80 para 63,52%, respectivamente para as populações de Algoz, Albufeira e Monchique 3 (Tabela 3.9). Os valores de h e I aumentaram acentuadamente, em especial nas populações de Algoz e Albufeira. No entanto, continua a ser a população de Monchique 3 a que apresenta maior variabilidade (Tabela 3.9). Ao analisar as plântulas separadamente, verifica-se um decréscimo da percentagem de bandas polimórficas, comparativamente com os adultos, nas três populações estudadas, embora esse decréscimo seja muito mais acentuado no caso da população de Monchique 3. Nesta população verificou-se um decréscimo de 76 para 31 bandas polimórficas, ou seja de 47,80 para 19,50% (Tabela 3.9). De facto, ao comparar as frequências alélicas dos indivíduos adultos e das plântulas verifica-se haver uma alteração na distribuição dos loci pelas diferentes classes de frequência do alelo 1 (Figura 3.13), mais visível para a população de Monchique 3. Verificou-se ainda existir uma grande alteração nas frequências alélicas dos adultos para as plântulas (Figura 3.14).

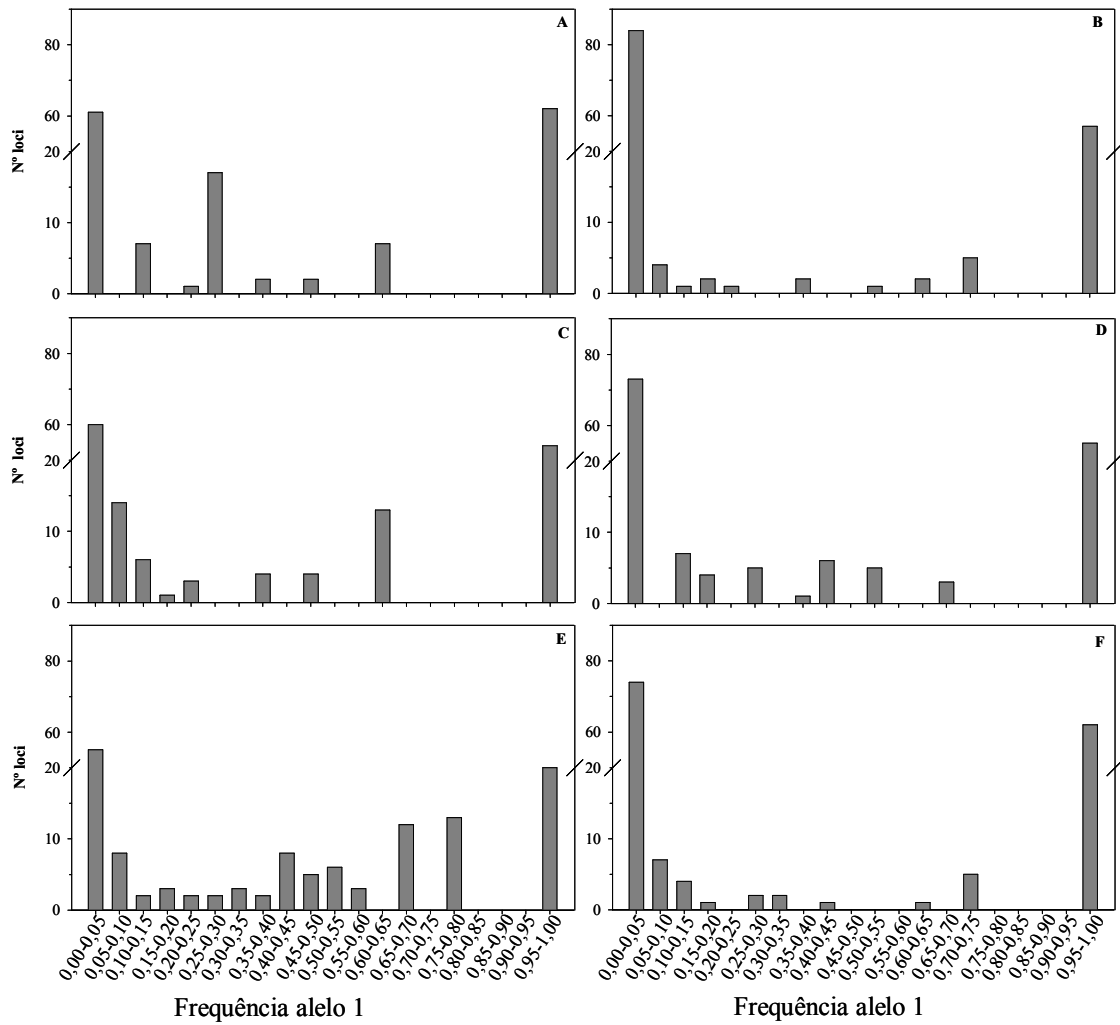


Figura 3.13. Número de loci por classe de frequência do alelo 1 nos indivíduos adultos e nas plântulas das populações de Algoz (A - adultos, B - plântulas), Albufeira (C - adultos, D - plântulas) e Monchique 3 (E - adultos e F - plântulas).

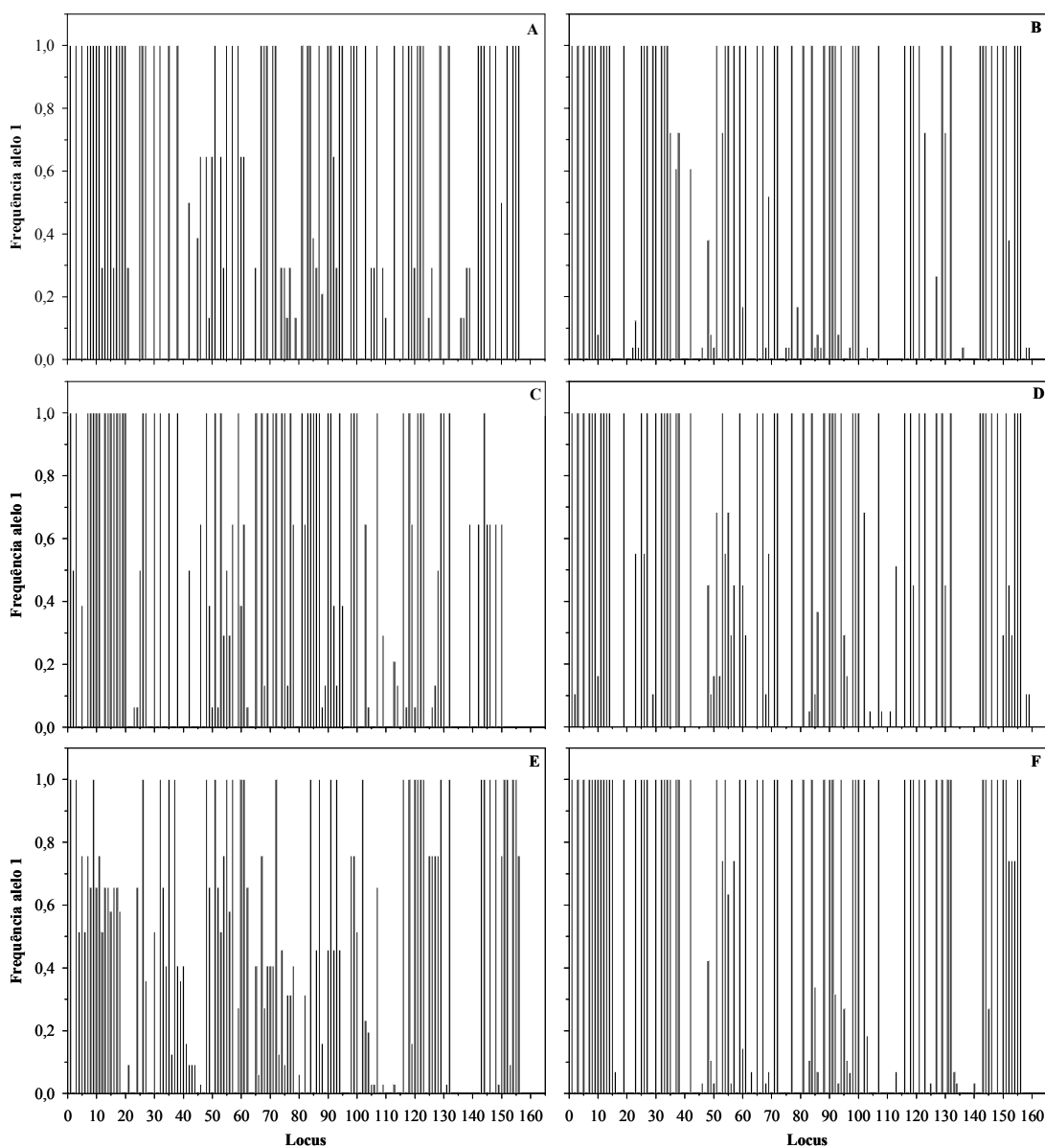


Figura 3.14. Comparação das frequências do alelo 1, para cada um dos 159 locos ISSR analisados, dos indivíduos adultos e das plântulas das populações de Algoz (A - adultos, B - plântulas), Albufeira (C - adultos, D - plântulas) e Monchique 3 (E - adultos e F - plântulas).

A perda de variabilidade nas plântulas, que poder estar relacionada com o sistema reprodutivo da espécie ou com factores evolutivos, pode indicar que estas populações estão a sofrer de *bottleneck*. De acordo com England *et al.* (2003) o efeito de *bottleneck* reduz consideravelmente a diversidade alélica, a heterozigocidade, a percentagem de loci polimórficos e altera a distribuição das frequências alélicas.

Muitas vezes o *bottleneck* é consequência da diminuição do tamanho das populações e pode aumentar o risco de extinção das espécies (Saccheri *et al.*, 1998; Frankham *et al.*, 2002).

O facto de a maioria das populações desta espécie estar sujeita a elevada perturbação humana pode também ser uma das causas da redução da variabilidade genética nas plântulas, que pode representar o início do processo de extinção das populações de *D. lusitanicum*. Tendo em conta que a variabilidade genética de uma espécie tem influência na manutenção das suas populações a longo prazo, esta perda de variabilidade pode de alguma forma explicar os resultados de trabalhos ecológicos recentemente publicados que alertam para o decréscimo do número de indivíduos e populações desta espécie, tornando urgente a implementação de medidas que visem a sua conservação (Correia & Freitas, 2002; Garrido *et al.*, 2003).

Curiosamente, foi possível registar a ocorrência de alelos nas plântulas que nos adultos são exclusivos da população de Espanha. Isto pode estar relacionado com o facto de serem eventualmente alelos raros, e por isso não terem sido detectados nos adultos, ou de existir um processo de selecção natural que discrimina contra estas novas frequências alélicas no caso das populações portuguesas. Dada a grande distância entre as populações portuguesas e a população espanhola e, as várias barreiras geográficas existentes não parece possível que resulte de fluxo genético entre as populações.

3.3.3.2. Diferenciação genética das populações

A diferenciação ou estruturação genética de populações refere-se à distribuição da variabilidade genética no espaço e no tempo. A estruturação genética resulta da

interacção entre vários processos evolutivos, tais como a história evolutiva da espécie, a fragmentação do habitat onde ocorre, a mutação, o fluxo genético, a selecção natural, a deriva genética e o isolamento das populações, que actuam no contexto biológico e histórico de cada espécie (Hogbin & Peakall, 1999).

Ao nível da espécie, a percentagem de bandas polimórficas encontrada em *D. lusitanicum* foi de 93,08 - 93,71% (Tabela 3.10). Na Figura 3.15 estão representados os resultados da amplificação de indivíduos de diferentes populações utilizando os *primers* UBC 857 e (GTGC)₄, onde é visível a natureza polimórfica dos marcadores utilizados.

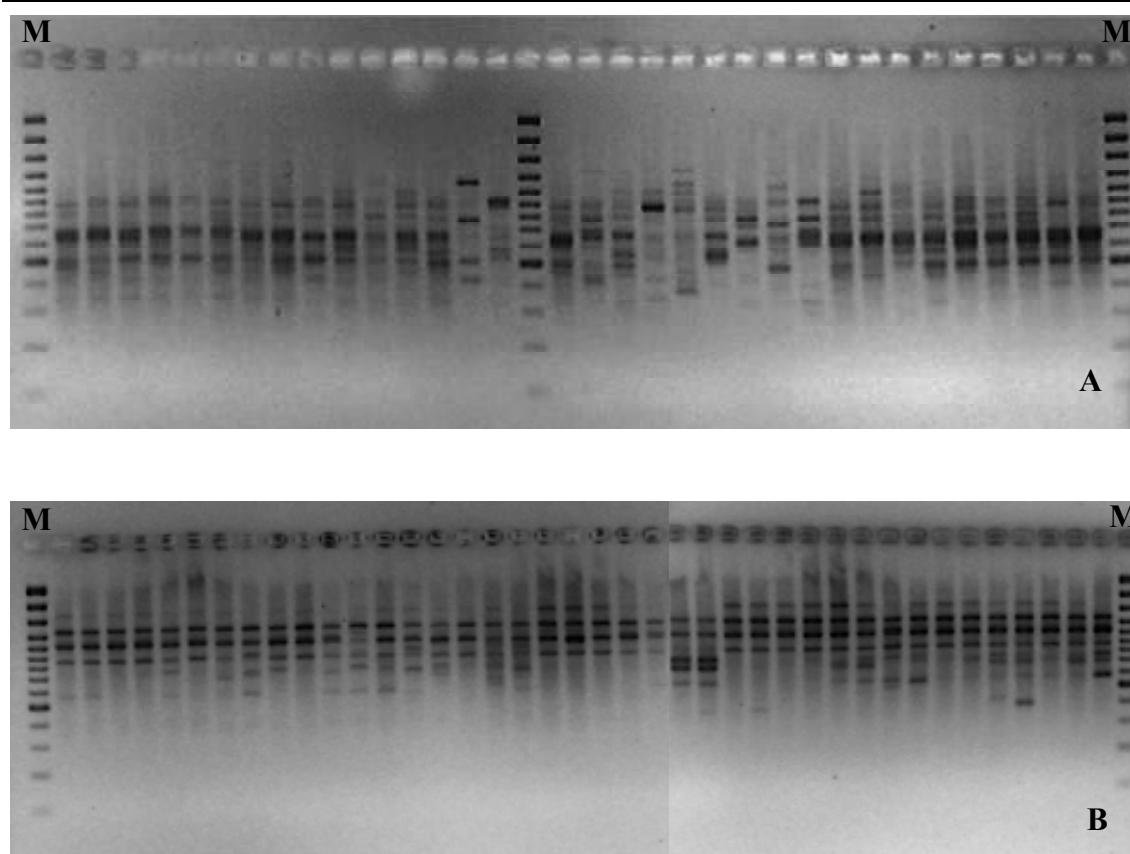


Figura 3.15. Gel de agarose a 2% do produto amplificado pelo *primer* UBC 857 (A) e ISSR 19 (B) em indivíduos de *D. lusitanicum* de diferentes populações. As linhas assinaladas com M representam o marcador 100 bp Plus (Fermentas).

Os valores de h e I foram de $0,28 \pm 0,173$ e $0,43 \pm 0,23$, respectivamente. Estes valores decrescem apenas ligeiramente quando se analisam os adultos e as plântulas em conjunto (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 Estrutura genética de populações de *D. lusitanicum*

	BP (%)	h	I	H_t	H_s	G_{ST}	N_m
Adultos	93,08	0,28 (0,173)	0,43 (0,230)	0,26 (0,031)	0,11 (0,008)	0,57	0,37
Adultos e plântulas	93,71	0,26 (0,660)	0,40 (0,221)	0,26 (0,031)	0,13 (0,010)	0,51	0,48

BP = bandas polimórficas; h = diversidade genética de Nei (1973); I = índice de Shannon (Lewontin, 1972); H_t = diversidade genética total; H_s = diversidade genética média entre populações; G_{ST} = coeficiente de diferenciação genética entre populações; N_m = fluxo genético estimado. Erro-padrão entre parêntesis.

Segundo Hamrich & Godt (1989) a biologia reprodutiva de uma espécie é o principal factor na determinação da estrutura genética das suas populações. Geralmente, as espécies sujeitas a *inbreeding* apresentam maior diversidade genética entre populações e menor dentro de cada população (Brown, 1979). De acordo com Nybom & Bartish (2000) valores de G_{ST} (coeficiente de diferenciação genética entre populações) de 0,59; 0,19 e 0,23 referem-se, respectivamente, a espécies autóгамas, espécies com sistema de cruzamento misto e espécies alógamas. Neste trabalho verificou-se que, os valores para este coeficiente foram de 0,57 ou 0,52, respectivamente quanto se analisaram só adultos ou adultos e plântulas (Tabela 3.10). Os elevados valores de G_{ST} obtidos em *D. lusitanicum* suportam a ideia do predomínio da autopolinização relativamente à polinização cruzada. Os elevados níveis de diferenciação podem ser explicados por vários factores, incluindo o sistema reprodutivo da espécie, a deriva genética e o isolamento genético das populações (Hogbin & Peakall, 1999). Se as populações são pequenas e isoladas umas das outras,

a deriva genética pode ser capaz de influenciar a estrutura genética e aumentar a diferenciação entre populações.

O fluxo genético efectivo observado entre populações de *D. lusitanicum* foi de apenas 0,37 ou 0,48, analisando apenas adultos ou adultos e plântulas. De facto, têm sido observados baixos níveis de fluxo genético entre populações e elevada diferenciação genética para espécie endémicas e raras, tais como *Changium smyrnioides* (Quiu *et al.*, 2004), *Megacodon styphorus* (Ge *et al.*, 2005) e *Sinojackia dolichocarpa* (Cao *et al.*, 2006), com coeficientes de diferenciação entre populações de 0,52; 0,73 e 0,45, respectivamente. O fluxo genético efectivo por geração é em *D. lusitanicum* inferior a um indivíduo por geração, indicando o limitado fluxo genético entre populações, que será, possivelmente devido, ao isolamento das populações e à limitada capacidade de dispersão das sementes (Ortega-Olivencia *et al.*, 1995). De acordo com Ortega-Olivencia *et al.* (1995) as sementes desta espécie libertam-se da cápsula de forma passiva essencialmente pela força da gravidade, mantendo-se em alguns casos agarradas à planta-mãe de um ano para o outro. A inexistência de um processo de dispersão das sementes pode também explicar o facto de as populações desta espécie ocuparem, em geral, uma pequena área. O tamanho reduzido das populações, associado a um limitado fluxo genético, contribui para a elevada diferenciação entre populações. No entanto, não podemos esquecer que a adaptação local através das interacções com o ambiente pode também contribuir para a divergência genética entre populações.

As distâncias genéticas (Nei) entre pares de populações foram calculadas com base nas 159 bandas analisadas. Os valores variaram entre 0,0745 entre Algoz e Barranco do Velho e 0,3635 entre Barranco do Velho e Espanha (Tabela 3.11). Embora não haja um consenso entre os autores, de acordo com Hamrick & Godt (1989) existe

uma forte associação entre a distribuição geográfica e a diversidade genética. De facto, os resultados obtidos neste trabalho suportam esta ideia, visto que o dendrograma construído pelo método UPGMA mostrou uma tendência das populações se agruparem de acordo com a sua localização geográfica, evidenciando uma estruturação da variabilidade genética das populações no espaço (Figura 3.16). A confirmar esta ideia verificou-se que, de acordo com o teste de Mantel, existe uma correlação altamente significativa ($r = 0,660$, $P = 0,001$) entre a matriz de distâncias geográficas e a matriz de distâncias genéticas. Assim, a elevada diferenciação entre populações de *D. lusitanicum*, pode estar correlacionada com a distância geográfica entre as populações. No entanto, se analisarmos os pares de populações geograficamente mais distantes, ou seja a população de Espanha e qualquer uma das populações de Monchique, são de realçar alguns dados importantes (Tabela 3.11).

Tabela 3.11. Distância geográfica em km (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as diferentes populações analisadas, considerando apenas as plantas adultas.

População	Alg	BV	Alb	Mon 1	Mon 2	Mon 3	Esp
Alg	***	37	17	24	32	33	274
BV	0,0745	***	28	49	60	61	244
Alb	0,1207	0,1128	***	39	32	18	258
Mon 1	0,2116	0,2247	0,1997	***	17	15	292
Mon 2	0,2439	0,2425	0,2820	0,1325	***	7	303
Mon 3	0,2138	0,2636	0,2597	0,1566	0,1722	***	304
Esp	0,2833	0,3635	0,3265	0,2735	0,3261	0,2390	***

Apesar das idênticas distâncias geográficas entre cada uma destas populações e a de Espanha, verifica-se que a distância genética com a população de Monchique 2 é superior à encontrada com as restantes. Aliás, a distância genética entre a população de Espanha e a de Monchique 3 é de apenas 0,239. Este valor é mesmo inferior ao obtido entre Monchique 3 e Barranco do Velho ou Albufeira, que geograficamente são muito mais próximas. Este resultado poderá dever-se a atributos ecológicos similares entre a população de Espanha e a de Monchique 3 ou mesmo Monchique 1. Convém também lembrar que estas três populações foram as que apresentaram maior variabilidade intra-populacional, com um nível de polimorfismo muito idêntico entre si.

De acordo com o teste de Mantel não existe correlação entre as distâncias geográficas e o fluxo genético entre pares de populações, ou seja, o fluxo genético não é directamente proporcional à distância entre populações existindo outros factores a afectar esta relação, tais como barreiras naturais causadas por aspectos topográficos do terreno.

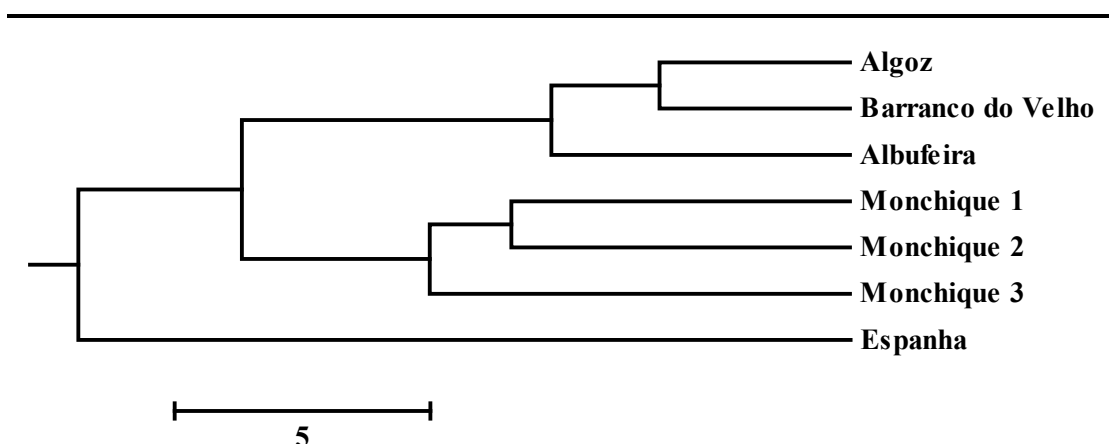


Figura 3.16. Dendrograma construído pelo método UPGMA com base nas distâncias genéticas entre populações.

A Figura 3.17 mostra o dendrograma construído com base nas distâncias genéticas entre as várias populações de *D. lusitanicum*, com os indivíduos adultos e as plântulas separados, e incluindo as espécies de *Drosera*. Neste dendrograma é nítida a diferente composição das plântulas relativamente aos adultos. Isto significa que as populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, há deriva genética e as frequências alélicas e, eventualmente, o próprio *pool* genético não estão estabilizados.

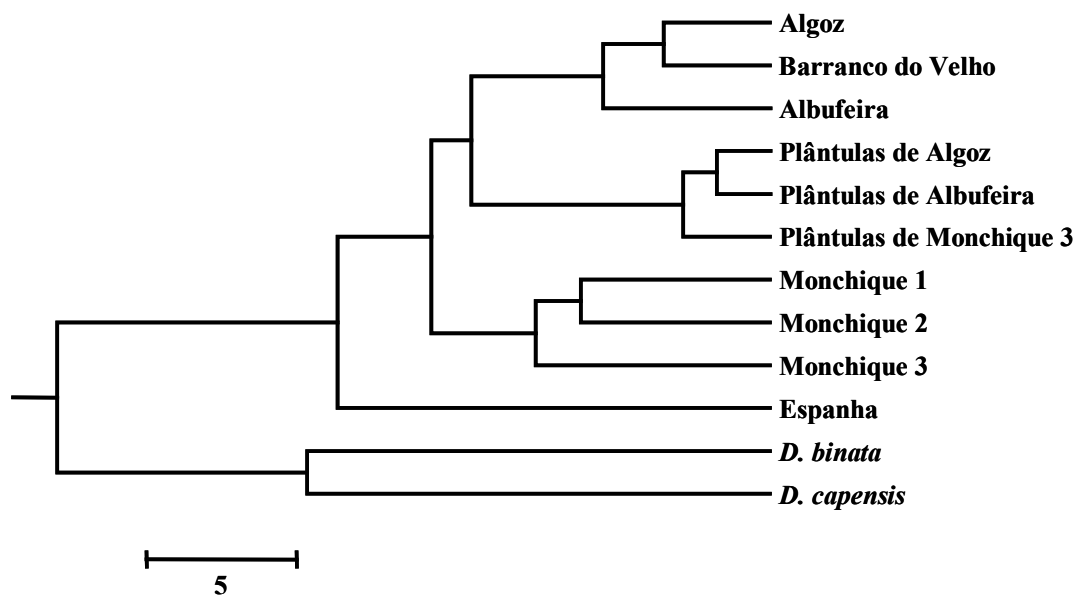


Figura 3.17. Dendrograma construído pelo método UPGMA com base nas distâncias genéticas entre populações.

Quando as plântulas são analisadas em conjunto com os adultos é possível mais uma vez verificar, através do teste de Mantel, a existência de correlação entre as distâncias geográficas e genéticas ($r = 0,668$, $P = 0,001$). Continuando a não haver correlação entre as distâncias geográficas e o fluxo genético entre os diferentes pares de populações ($r = -0,305$, $P = 0,117$). A diferente composição e frequência alélica das plântulas relativamente aos adultos resultam num aumento de polimorfismo quando a sua análise é efectuada em conjunto, provocando alterações nos cálculos dos vários

parâmetros, nomeadamente no *Gst* e no fluxo genético. De facto verifica-se que o fluxo genético obtido para os diferentes pares de populações sofre um aumento considerável, em especial entre as populações de Algoz e Albufeira (de 0,89 para 4,37), Algoz e Monchique 3 (de 0,59 para 2,44) e Albufeira e Monchique 3 (de 0,67 para 2,55) (Tabela 3.12).

Tabela 3.12. Fluxo genético (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as diferentes populações analisadas, considerando as plantas adultas e os germinantes incluídos na respectiva população.

População	Alg	BV	Alb	Mon 1	Mon 2	Mon 3	Esp
Alg	***	1,12	4,37	0,93	0,35	2,44	0,75
BV	0,1300	***	1,09	0,68	0,23	0,81	0,45
Alb	0,0394	0,1339	***	1,18	0,46	2,50	0,86
Mon 1	0,2024	0,2247	0,1877	***	0,83	1,59	0,84
Mon 2	0,2559	0,2425	0,2562	0,1325	***	0,67	0,37
Mon 3	0,0798	0,2107	0,0920	0,1500	0,1963	***	1,10
Esp	0,2562	0,3635	0,2633	0,2735	0,3261	0,2220	***

Incluindo as plântulas, o dendrograma do agrupamento das distâncias genéticas entre populações é alterado verificando-se o aumento da proximidade genética entre as três populações onde se analisaram plântulas (Figura 3.18).

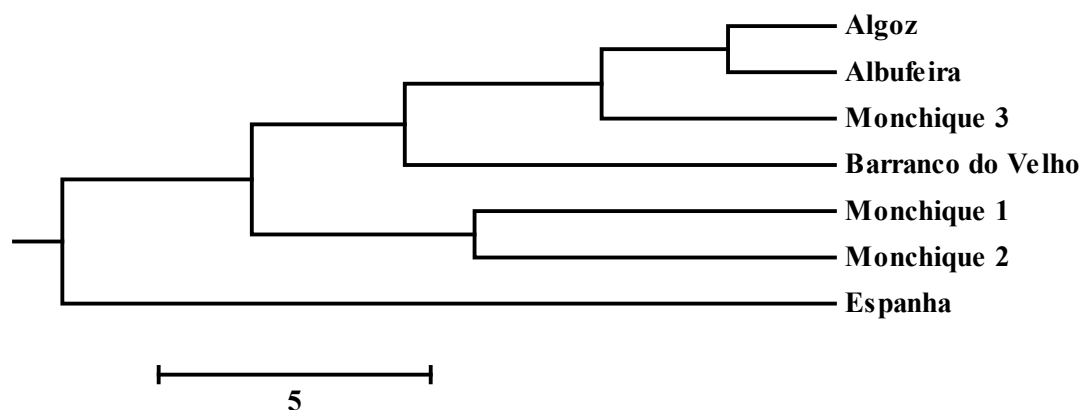


Figura 3.18. Dendrograma construído pelo método UPGMA com base nas distâncias genéticas entre populações (incluindo as plântulas na respectiva população).

3.3.4. Implicações para a conservação

Há claras evidências de que, as plantas endêmicas apresentem baixos níveis de diversidade genética (Gitzendanner & Soltis, 2000). *D. lusitanicum* é uma planta endêmica restrita a Portugal, Sul de Espanha e Norte de Marrocos. As populações estudadas desta espécie, embora algumas geograficamente próximas, apresentam uma elevada variação ao nível da espécie, com mais de 90% de loci polimórficos. Contrariamente ao que se verificou ao nível da espécie, dentro de que cada população a variabilidade encontrada foi baixa, implicando que grande parte da variação encontrada reside entre populações. Não existindo outros estudos de diversidade e estrutura genética nesta espécie, não é possível a comparação dos dados obtidos com os de outros autores.

A diversidade global de uma espécie tem grande importância para a sua sobrevivência a longo prazo e evolução (Avice & Hamrick, 1996). Assim, o conhecimento dos níveis e distribuição da diversidade genética é importante para definir estratégias de conservação para espécies ameaçadas (Hamrick, 1983; Hamrick & Godt, 1989; Francisco-Ortega *et al.*, 2000). Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho com a utilização de marcadores ISSR, propõe-se uma estratégia de conservação que inclua a propagação *ex situ* de plantas desta espécie e sua utilização para reforçar e restaurar as populações naturais. Esta tem sido considerada uma medida válida para reduzir o risco de extinção de espécies ameaçadas (Bowes, 1999; Lofflin & Kephart, 2005). A implementação desta medida implica a existência de estratégias de amostragem do material a utilizar na propagação das plantas a re-introduzir (Ge *et al.*, 2003). Tendo em conta os elevados coeficientes de diferenciação entre populações e o

reduzido fluxo genético observado, a gestão da variabilidade genética para conservação desta espécie, deve incluir o máximo de populações possível, incluindo as populações mais pequenas. Sendo a via seminal a única conhecida para propagar esta espécie, propõe-se a recolha de sementes de várias populações com o objectivo de capturar o máximo de variabilidade genética.

Um entrave ao desenvolvimento da estratégia proposta prende-se com o facto de os resultados obtidos neste capítulo, mostrarem uma perda de variabilidade dos adultos para os germinantes (Algoz, Albufeira e Monchique 3) o que invalidaria a restauração da variabilidade das populações desta espécie. No intuito de encontrar uma solução para este problema, efectuou-se a análise conjunta dos germinantes das três populações estudadas (Algoz, Albufeira e Monchique 3) tendo-se verificado um aumento de polimorfismo para 40,88% de loci polimórficos. Assim, propõe-se que o banco de sementes a germinar *in vitro* seja composto por sementes recolhidas no máximo de populações possível.

Por se encontrar situada no Parque Natural ‘Los Alcornocales’, a população de Espanha encontra-se numa situação interessante e por isso foi incluída neste estudo. De facto, verificou-se que esta população se encontra muito diferenciada das restantes, é a que apresenta maior variabilidade e além disso possui 10 alelos exclusivos, ou seja, que não aparecem nas restantes populações analisadas. Por isso, esta população deve também ser utilizada como fonte de sementes a usar na propagação de plantas com objectivo de fortalecer as restantes populações.

Como apresentado no Capítulo II deste trabalho as sementes desta espécie são difíceis de germinar, necessitando de tratamento de escarificação. Assim, propõe-se que para propagação de plantas desta espécie se recorra à germinação *in vitro* que, para além de permitir elevadas taxas de germinação permite a multiplicação dos germinantes

obtidos e a propagação em larga-escala desta espécie. As plantas obtidas, depois de devidamente aclimatizadas deverão ser reintroduzidas no máximo de populações naturais. Propõe-se também que o processo de adaptação das plantas ao ambiente natural seja monitorizado durante vários anos. Não é de excluir que a dificuldade em encontrar jovens possa estar relacionada com um processo de selecção natural que discrimina contra as novas frequências alélicas que se evidenciou neste trabalho estarem presentes nas sementes.

A implementação de estratégias de conservação *ex situ* para esta espécie deve ser acompanhada pela conservação *in situ* ou seja, pela protecção dos habitats naturais da espécie à semelhança do que acontece em Espanha.

3.4. CONCLUSÕES

Este capítulo teve por principal objectivo o estudo da diversidade genética de várias populações de *D. lusitanicum* com vista à obtenção de informações úteis para o estabelecimento de estratégias para a sua conservação. Para tal utilizaram-se 3 tipos de marcadores moleculares: um marcador nuclear, a região ITS do rDNA, que foi estudada recorrendo a análises SSCP e sequenciação; vários marcadores cloroplastidiais, recorrendo à técnica PCR-RFLP; e os marcadores ISSR distribuídos por todo o genoma. O primeiro, embora tenha permitido detectar elevado polimorfismo intra-populacional e permita identificar a espécie não permitiu a diferenciação das diferentes populações. Os marcadores cloroplastidiais mostraram ser regiões muito conservadas a nível da espécie não tendo sido possível a detecção de polimorfismo quer ao nível intra-populacional quer entre populações. Por outro lado, os marcadores ISSR mostraram-se hipervariáveis e por isso adequados para analisar a variabilidade genética desta espécie. Além disso trata-se de um marcador de

fácil execução técnica que pode ser utilizado rotineiramente no contexto da conservação. Por isso, decidiu analisar-se com este marcador plântulas provenientes de germinação *in vitro* de sementes recolhidas em três populações na mesma altura da recolha de amostras de indivíduos adultos para extracção de DNA. Os resultados obtidos mostraram que à semelhança do que acontece em várias plantas raras e endémicas as populações de *D. lusitanicum* têm baixa variabilidade intra-populacional existindo considerável diferenciação entre as populações e reduzido fluxo genético.

Os resultados obtidos nas análises ISSR reforçam a necessidade de implementar estratégias de conservação para *D. lusitanicum*. Propõe-se a conservação *in situ* através da protecção das populações naturais, que deve ser complementada com outras estratégias, nomeadamente o reforço das populações através da re-introdução de plantas no campo, a criação de bancos de germoplasma *in vitro* e criopreservação de sementes seguindo as metodologias descritas no Capítulo IV.

Tendo em conta que não são conhecidos processos de propagação vegetativa nesta espécie, a produção de plantas terá de ser efectuada pela via seminal que é também a mais adequada para propagar plantas raras visto que permite aumentar a variabilidade genética. Dada a considerável diferenciação encontrada entre as populações, propõe-se a recolha de sementes do máximo de populações possíveis que devem ser misturadas para aumentar o nível de variabilidade. Propõe-se a germinação *in vitro* das sementes e a utilização dos germinantes para produzir plantas micropropagadas desta espécie em larga-escala como descrito no Capítulo II. Após aclimatização às condições externas estas plantas deverão ser reintroduzidas nas populações naturais em especial nas que evidenciaram menor variabilidade, Monchique 2, Barranco do Velho, Algoz e Albufeira. O processo de adaptação das plantas re-introduzidas deverá

ser monitorizado. A implementação das estratégias propostas, para além de coadjuvarem activamente com o estatuto de espécie protegida, contribuiria para a conservação desta importante espécie da flora Ibero-Marroquina.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez I, Wendel JF 2003. Ribosomal sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434
- Archibald JK, Wolf PG, Tepedino VJ, Bair J 2001. Genetic relationships and population structure of the endangered steamboat buckwheat *Eriogonum ovalifolium* var. *williamsiae*. *American Journal of Botany* 88: 608-615
- Awise JC, Hamrick JL 1996. *Conservation Genetics, Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York
- Bowes BG 1999. *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Manson Publishing Ltd, London
- Brown AHD 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 52: 145-157
- Brown AHD 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theoretical Population Biology* 15:1-42
- Cao P-J, Yao Q-F, Ding B-Y, Zeng H-Y, Zhong Y-X, Fu C-X, Jin X-F 2006. Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 231-139
- Ceska JF, Affolter JM, Hamrick JL 1997. Developing a sampling strategy for *Baptisia arachnifera* based on allozyme diversity. *Conservation Biology* 11: 1133-1339
- Cockerham CC 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23:72-84
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD 2001. Population genetic structure of the endangered tropical species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356

- Correia E, Freitas H 2002. *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediterranean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 383-390
- Demesure B, Comps B, Petit RJ 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520
- Demesure B, Sodzi N, Petit RJ 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131
- Downie SR, Katz-Downie DS, Cho KJ 1996. Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast rpoC1 intron. *Molecular Phylogenetics Evolution* 6: 1-18
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487
- England PR, Osler GHR, Woodworth LM, Montgomery ME, Briscoe DA, Frankham R 2003. Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conservation Genetics* 4: 595-604
- Esselman EJ, Li JQ, Crawford DJ, Windus JL, Wolfe AD 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451
- Fang DQ, Roose ML 1997. Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Theoretical Applied Genetics* 95: 408-417
- Fennane M, Ibn Tattou M 1998. Catalogue dès plantes vasculaires rares, menacées ou endémiques du Maroc. *Bocconea* 8: 1-243
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim SC, Crawford DJ 2000. Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany* 87: 909-909
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK

- Fritsch P, Rieseberg LH 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. Em: Smith TB, Wayne RK (eds.), Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford University Press, New York
- Fukuoka S, Inoue T, Miyao A, Monna L 1994. Mapping of sequence-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). Diversity and Distributions 9: 335-350
- Ge X-J, Yan Y, Zhao N-X, Chen H-S, Qi W-Q 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). Biological Conservation 111: 427-434
- Ge X-J, Zhang L-B, Yuan Y-M, Hao G, Chiang T-Y 2005. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). Biodiversity and Conservation 14: 849-861
- Gitzendanner MA, Soltis PS 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. American Journal of Botany 87: 783-792
- Gustafsson S, Sjögren-Gulve P 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. Conservation Genetics 3: 225-234
- Haig SM 1998. Molecular contributions to conservation. Ecology 79: 413-425
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98
- Hamrick J, Godt MJW 1989. Allozyme diversity in plants. Em: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds.), Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sinauer, Sunderland
- Hamrick JE, Godt MJW 1996. Conservation genetics of endemic plant species. Em: Avise JC, Hamrick JE (eds.), Conservation Genetics: case histories from nature. Chapman and Hall, New York

- Hamrick JL 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69: 1685-1693
- Hamrick JL 1989. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. Em: Soltis DE, Soltis PS (eds.). *Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations*. Chapman and Hall, London
- Hamrick JL 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. Em: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, Macbride B, Thomas L (eds.), *Genetics and Conservation*. The Benjamin/Cummings Publishing Company
- Hogbin PM, Peakall R 1999. Evaluation of the conservation of genetic research to the management of endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology* 13: 514-522.
- Huenneke LF 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. Em: Falk DA, Holsinger KE (eds.), *Genetics and conservation of rare plants (eds.)*, Oxford University Press Inc., New York
- Jobs DV, Thien LB 1997. A conserved motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribe spacer (ITS) sequence. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 326-334
- Kelleher CT, Hodkinson TR, Kelly DL, Douglas GC 2004. Characterisation of chloroplast DNA haplotypes to reveal the provenance and genetic structure of oaks in Ireland. *Forest Ecology and Management* 189: 123-131
- Koch M, Al-Shehbaz IA 2000. Molecular systematics of the Chinese *Yinshania* (Brassicaceae): evidence from plastid trnL intron and nuclear ITS DNA sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87: 246-272
- Kumar S, Tamura K, Jacobsen IB, Nei M 2001. MEGA, molecular evolutionary genetics analysis, version 2.1. <http://www.megasoftware.net>
- Lewinton RC 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398
- Lofflin DL, Kephart SR 2005. Outbreeding, seedling establishment, and maladaptation in natural and reintroduced populations of rare and common *Silene douglasii* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 92: 1671-1700

- Lu Z, Wang Y, Peng Y, Korpelainen H, Li C 2006. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern china revealed by ISSR markers. *Plant Science* 170: 407-412
- Malone CL, Knapp CR, Taylor JF, Davis SK 2003. Genetic consequences of Pleistocene fragmentation: Isolation, drift, and loss of diversity in rock iguanas (*Cyclura*). *Conservation Genetics* 4: 1-15
- McDermott JM, McDonald BA 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31: 353–373
- Meloni M, Perini D, Filigheddu R, Binelli G 2006. Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Annals of Botany* 97: 299-304
- 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 U 2001. Ecology and structure of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link populations in the south-western of the Iberian Peninsula. *Acta Botanica Malacitana* 26: 47-68
- Nagaoka T, Ogihara Y 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602
- Neel MC, Ellstrand NC 2003. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var: *vineum* (Polygonaceae). *Conservation Genetics* 4: 337-352
- Nei M 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 282-292
- Nei M 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 70: 3321-3323
- Nei M 1977. F-statistic and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41: 225-233
- Nei M 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York

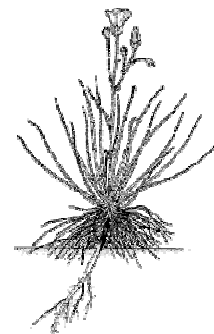
- Nyblom H, Bartish IV 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers. *Perspectives in Plant Ecology* 3: 93-114
- Olmstead RG, Michaels HJ, Scott KM, Palmer JD 1992. Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 249-265
- 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 JA, Rodríguez-Riaño T, Devesa JA 1998. Modes of self-pollination and absence of cryptic self-incompatibility in *Drosophyllum lusitanicum* (Droseraceae). *Botanica* 111: 474-480
- Petit RJ, Latouche-Hallé C, Pemonge M-H, Kremer A 2002. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management* 156: 115-129
- Provan J, Corbett G, McNicol JW, Powell W 1997. Chloroplast variability in wild and cultivated rice (*Oryza* spp.) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 49: 104-110
- Provan J, Russel JR, Booth A, Powell W 1999. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology* 8: 505-511
- Qian W, Ge S, Hong DY 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 440-449
- Qiu Y-X, Hong D-Y, Fu C-X, Kenneth M 2004. Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 583-596
- Reed DH 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237
- Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Silva EP, Russo AM 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hydrobiologia* 420: 119-135
- Su Y-J, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Chen G-P, Ouyang P-Y, Sun Y-F 2005. Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA *trnL-F* noncoding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 323-333
- Szalanski AL, Steinauer G, Bischof R, Petersen J 2001. Origin and conservation genetics of the threatened Ute Ladies'-tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88: 177-180
- Taberlet P, Fumgalli L, Wust-Saucy A-G, Cosson J-F 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882
- Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH 1996. Diversity and inheritance of inter simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40-45
- Wang DL, Li ZC, Hao G, Chiang TY, Ge XJ 2004. Genetic diversity of *Calocedrus macrolepis* (Cupressaceae) in southwestern China. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 797-807
- Wattier RA, Davidson AL, Ward BA, Maggs CA 2001. cpDNA-RFLP in *Ceramium* (Rhodophyta): intraspecific polymorphism and species-level phylogeny. *American Journal of Botany* 88: 1209-1213
- Weir BS 1996. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Sunderland, USA
- White TJ, Bruns B, Lee S, Taylor J 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky

- J, White TJ (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego
- Wolfe AD, Liston A 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. Em: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ (eds.), Molecular Systematics of Plants. II. DNA Sequencing. Chapman and Hall, New York
- Wright S 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354
- Wright S 1965. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420
- Xia T, Chen S, Chen S, Zhang D, Zhang D, Gao Q, Ge X 2007. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 209-214
- Xie G-W, Wang D-L, Yuan Y-M, Ge X-J 2005. Population genetic structure of *Monimopetalum chinense* (Celastraceae), an endangered endemic species of Eastern China. *Annals of Botany* 95: 773-777
- Zhang X-P, Li X-H, Qiu Y-X 2006. Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. *Biochemical Systematics and Ecology* 34 38-47
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183

Capítulo IV

Conservação *ex situ* de germoplasma de *D. lusitanicum*



4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. Estratégias de conservação de recursos fitogenéticos

Os recursos genéticos não são inesgotáveis. À medida que as pressões ambientais aumentam, as formas selvagens ancestrais desaparecem e os “reservatórios” de germoplasma diminuem. A preocupação com a erosão genética encontra expressão internacional no trabalho do “Consultive Group on International Agricultural Research” (CGIAR) fundado em 1971 e com treze centros espalhados pelo mundo. Estes centros têm como função a recolha de germoplasma ameaçado de erosão genética, a sua multiplicação, conservação, avaliação e distribuição. O “International Board for Plant Genetic Resources” (IBPGR) é um dos institutos do CGIAR que tem por função coordenar a nível mundial as actividades relacionadas com a conservação de espécies vegetais com interesse agrícola e tem organizado, dirigido e financiado estudos relevantes neste campo (Withers *et al.*, 1990).

A conservação dos recursos genéticos é uma prioridade estabelecida e reconhecida a nível mundial. O objectivo da conservação é assegurar que os conjuntos génicos úteis sejam eficientemente conservados, mantidos e disponibilizados para uma utilização sustentável. A conservação é o processo que retém activamente a diversidade dos grupos génicos numa perspectiva de utilização, presente ou futura. A base da conservação é a diversidade genética e esta a soma das variações alélicas encontradas na natureza, é esta a diversidade que é conservada e utilizada.

Há uma ligação íntima, clara e essencial entre conservação e utilização: o homem conserva porque deseja utilizar. Por isso, há sempre um custo económico na conservação, sendo difícil persuadir a sociedade a suportar esse custo se não for encontrado qualquer valor. É relativamente fácil atribuir benefícios económicos à conservação, utilização e exploração de formas varietais regionais ou de progenitores

silvestres das culturas associados aos programas de melhoramento, mas é difícil atribuir valor económico às espécies verdadeiramente selvagens. No entanto, todas as plantas têm algum valor, quer em termos potenciais para o melhoramento da cultura, para utilização imediata, farmacêutica, de recreio, para eco-turismo ou mesmo a nível educacional, ou, para formas menos abertas de utilização, como seja conferir felicidade às pessoas quando em natureza e em segurança. Tal como toda a biodiversidade, a diversidade genética é parte do património, tal como é a arte e a cultura. Assim, é importante explicitar a ligação entre conservação e utilização em qualquer estratégia de conservação.

Nos últimos anos têm aumentado os esforços para desenvolver métodos de conservação *in situ* que permitam a conservação dinâmica das populações vegetais. Há poucas regras aplicáveis à elaboração de uma estratégia de conservação. As opções a tomar dependem das necessidades, possibilidades e da espécie em causa. As razões para conservar e as espécies a conservar devem definir-se com base em critérios lógicos, científicos e económicos como a necessidade, o valor e uso das espécies, e a possibilidade de conservá-las (Maxted *et al.*, 1997).

Há duas estratégias básicas de conservação dos recursos fitogenéticos, a conservação *in situ* e *ex situ*, existindo várias técnicas que o conservacionista pode adoptar na preservação da diversidade genética. Segundo o Art. 2 da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD) (UNCED, 1992) a "conservação *in situ* significa a conservação dos ecossistemas e dos habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies no seu meio natural e, no caso das espécies domesticadas ou cultivadas, em meios onde tenham desenvolvido as suas propriedades específicas". "A conservação *ex situ* significa a conservação de componentes da diversidade biológica fora dos seus habitats naturais". As duas estratégias básicas de

conservação podem ser implementadas recorrendo a diversas técnicas. Cada técnica tem as suas vantagens e desvantagens e deve ser seleccionada de acordo com a espécie a conservar (Figura 4.1, Tabela 4.1).

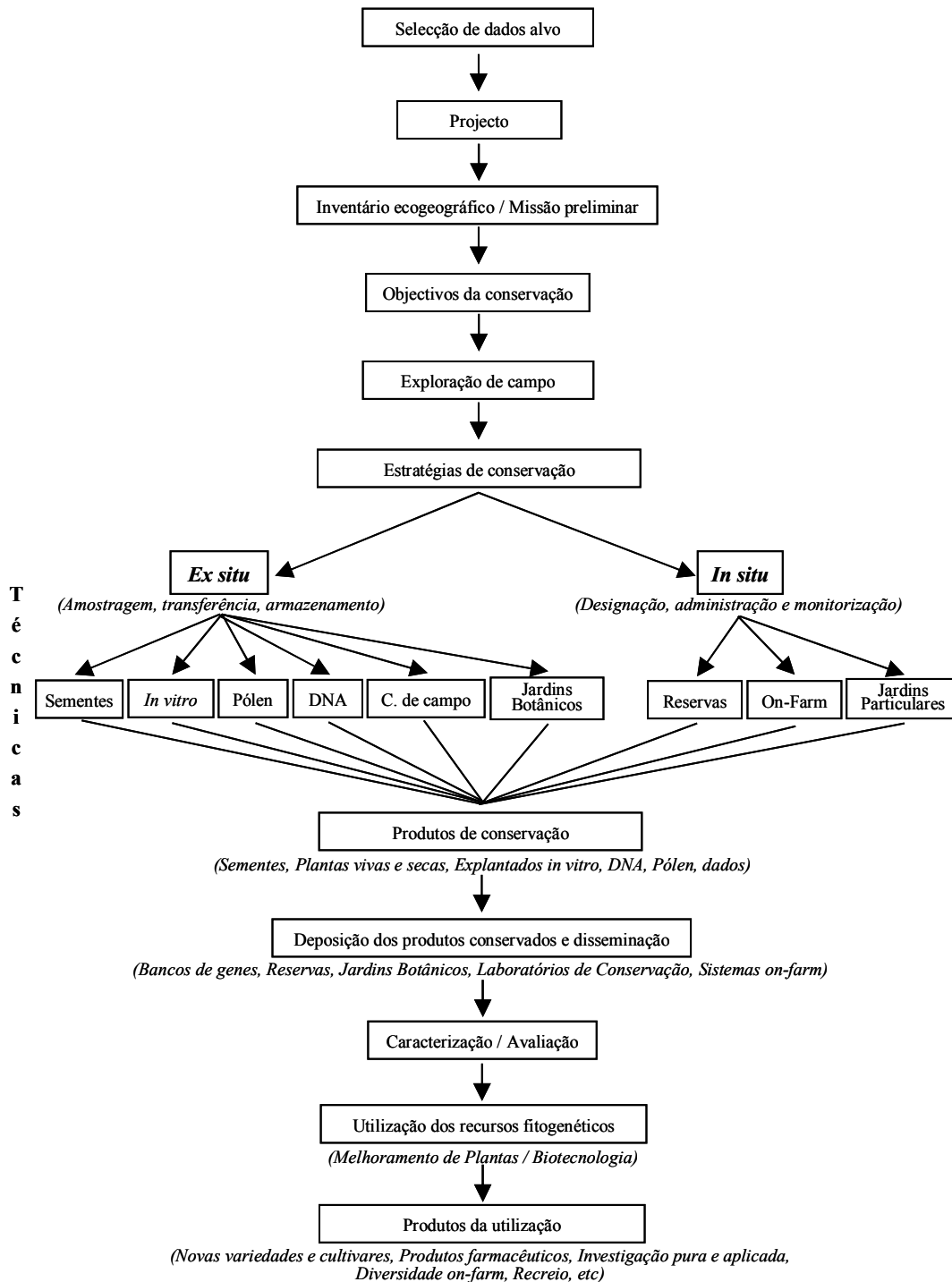


Figura 4.1. Modelo integrado e estratégico de conservação de recursos fitogenéticos. Adaptado de: Maxted *et al.*, 1997

Tabela 4.1. Resumo das estratégias e técnicas de conservação, principais vantagens e desvantagens de cada uma.

Métodos de Conservação	
Técnicas	Definição, principais vantagens e desvantagens
Conservação <i>in situ</i>	<p>Conservação em reservas genéticas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Envolve a localização, classificação, manutenção e fiscalização da diversidade genética num determinado local natural; • Conservação dinâmica face às alterações ambientais, pragas e doenças, fácil acesso e fácil conservação da grande diversidade dos parentes silvestres; • Materiais dificilmente disponíveis para utilização, vulneráveis a catástrofes naturais e induzidas pelo homem, requer supervisão activa e monitorização; a diversidade genética conservada em qualquer reserva é limitada.
	<p>Conservação na exploração do agricultor</p> <ul style="list-style-type: none"> • Consiste na manutenção das variedades de cultura tradicionais ou sistemas de rotação dos agricultores dentro dos sistemas agrícolas tradicionais; • Conservação dinâmica face às alterações ambientais, pragas e doenças, e assegura a conservação das variedades tradicionais das culturas; • Vulnerável às alterações nas práticas agrícolas, requer elevada manutenção, restringido às culturas de campo e apenas uma limitada diversidade pode ser mantida em cada exploração.
	<p>Conservação em jardins particulares</p> <ul style="list-style-type: none"> • Idêntica à conservação na exploração do agricultor numa escala mais pequena, embora envolvendo a conservação genética mais diversa em espécies ornamentais, de interior ou jardins próximos da casa; • Conservação dinâmica face às alterações ambientais, pragas e doenças e assegura a conservação das variedades tradicionais das culturas menores; • Vulnerável a mudanças nas práticas de gestão, requer a manutenção de sistemas de cultivo tradicionais e possível pagamento de subsídios aos agricultores.

Tabela 4.1. Continuação

Conservação <i>ex situ</i>	Armazenamento de sementes	<ul style="list-style-type: none"> • As sementes são, em geral, desidratadas até um conteúdo hídrico adequado e são mantidas em ambiente seco e a baixa temperatura (entre 0 e -20 °C) nos chamados bancos de sementes; • Permite o armazenamento a médio e longo prazo, é um método eficiente, reprodutível, seguro e com reduzida exigência em manutenção; • Problemas no armazenamento de sementes recalcitrantes e intermédias, não aplicável para espécies com genótipos estéreis e propagadas vegetativamente.
	Conservação <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Manutenção de explantados em condições controladas <i>in vitro</i> e em ambiente estéril; • Conservação relativamente fácil para elevado número de espécies, fácil acesso para avaliação e à utilização; • Risco de variação somaclonal, necessidade de desenvolver protocolos individuais de manutenção na maioria das espécies, custos de tecnologia e manutenção relativamente elevados.
	Bancos de genes no campo	<ul style="list-style-type: none"> • Envolve a colheita de material num local e a sua transferência e plantação para outro local. Geralmente é conservado um elevado número de plantas de poucas espécies; • Fácil acesso para caracterização, avaliação e utilização do material conservado; • O material é susceptível a riscos ambientais, intempéries, catástrofes naturais, pragas, doenças e vandalismos, precisa de grandes áreas de terreno, tem elevados custos de manutenção.
	Jardins Botânicos	<ul style="list-style-type: none"> • Consiste na colheita do material num local e a sua transferência e manutenção num jardim botânico. São geralmente conservadas poucas plantas de um grande número de espécies; • Liberdade para dar atenção às plantas selvagens sem interesse económico e fácil acesso do público à educação sobre conservação; • Limites de espaço e de número, e elevadas exigências de manutenção.
	Conservação de pólen / DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Passa pela recolha de pólen ou DNA e sua conservação em condições apropriadas; • Conservação relativamente fácil e de baixos custos; • A conservação de pólen requer o desenvolvimento de protocolos individuais de regeneração para produzir plantas haplóides e di-haplóides, e só permite a conservação de material paterno. A regeneração de plantas completas a partir de DNA ainda não é possível.

Adaptado de Hawkes *et al.* (2000)

A conservação *ex situ* envolve a amostragem, transferência e armazenamento dos *taxa* alvo, enquanto que a conservação *in situ* envolve a classificação, gestão e monitorização dos *taxa* alvo onde são encontrados. A importância da conservação *ex situ*, como estratégia complementar da conservação *in situ*, tem vindo a aumentar (Maunder *et al.*, 2004). A conservação *ex situ* permite proteger desde espécies cultivadas até espécies silvestres e formas regressivas. A aplicação de técnicas *ex situ* a espécies ameaçadas foi recomendada pela CBD e pela Estratégia Global para a Conservação de Plantas (UNEP, 2002).

As duas estratégias de conservação, *in situ* e *ex situ*, não devem ser usadas como alternativas ou em oposição, mas essencialmente como complementares. Cada técnica de conservação actuará como recuperadora da outra, sendo a ênfase de cada uma dependente dos recursos de conservação disponíveis, dos objectivos e da utilização potencial do *taxa* alvo. O método escolhido depende da espécie em causa, da sua distribuição e ecologia. Quando se formula uma estratégia de conservação geral deve-se pensar em termos de uma aplicação combinada de diferentes técnicas disponíveis, incluindo, se possível, as técnicas *in situ* e *ex situ*, onde as diferentes metodologias se complementam. A combinação das técnicas apropriadas para conservar um conjunto de genes específico deve ser aplicada de uma forma pragmática e balanceada de acordo com as características da espécie a conservar.

Existe uma íntima ligação entre conservação e utilização. Quando se planeia uma estratégia de conservação deve-se ter presente que os produtos de conservação quer sejam “vivos” ou “suspensos” devem estar disponíveis para utilização quando necessário. No âmbito da conservação de plantas silvestres, como é o caso da espécie *Drosophyllum lusitanicum*, o material conservado constitui uma reserva de germoplasma, que para além de poder vir a ser usado para fins científicos pode ser

utilizado para acções como a restauração de habitats e re-introdução ou reforço de populações já existentes. Neste contexto, a conservação e utilização do germoplasma permite intervir em acções que visem a minimização da perda do património genético existente.

Tendo em conta que neste trabalho foram apenas aplicadas metodologias de conservação *in vitro* em condições mínimas de crescimento e de criopreservação de sementes, de seguida será efectuada uma descrição mais pormenorizadas destas técnicas de conservação.

4.1.2. Conservação *in vitro*

As técnicas de conservação *in vitro*, oferecem novos métodos de conservação que têm sido cada vez mais aplicados a uma vasta gama de espécies e sistemas de cultura. Um documento do IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) realça a importância da conservação *in vitro* para a conservação de germoplasma (Ashmore, 1997). A cultura de tecidos vegetais tem vindo a ser considerada uma ferramenta promissora para a preservação de espécies vegetais, pois facilita a distribuição de material das espécies ameaçadas e permite a formação de bancos de genes. Além disso, o material conservado pode ser utilizado em qualquer altura para micropropagar as espécies em questão. Através da micropropagação o cultivo das espécies pode ser viabilizado em menos tempo, tanto para a recuperação do ambiente, como para o cultivo comercial das espécies com potencial económico (Fay, 1992). A conservação *in vitro* pode fazer-se pela manutenção das culturas em condições normais de crescimento, manutenção das culturas em condições mínimas de crescimento e manutenção a temperaturas ultra-baixas (criopreservação).

A simples introdução de material *in vitro* pode ser considerada uma estratégia de conservação. A conservação *in vitro* em condições normais de crescimento consiste em manter o material em condições *in vitro* realizando subculturas para meio de cultura fresco, em intervalos de tempo regulares (6 a 8 semanas). Esta técnica é muito simples e proporciona material em crescimento activo em qualquer altura. No entanto, o facto de as culturas terem de ser transferidas regularmente para meio fresco torna este processo dispendioso e muito laborioso, além dos riscos de contaminações e alterações genéticas após longos períodos em condições *in vitro*.

No sentido de resolver os problemas da conservação *in vitro* em condições normais de crescimento, duas outras estratégias de conservação *in vitro* foram desenvolvidas: a conservação *in vitro* em condições mínimas de crescimento e a criopreservação. O objectivo da conservação em condições mínimas de crescimento é reduzir o crescimento das culturas, sem parar o seu crescimento, no sentido de aumentar o intervalo entre transferências para meio de cultura fresco. Esta técnica permite a conservação de material *in vitro* por períodos curtos a médios (inferiores a 3 anos). A redução do crescimento é conseguida através da alteração das condições de cultura, que podem passar pela modificação do ambiente de cultura ou pela modificação do meio de cultura. As técnicas a aplicar são diferentes consoante a duração do período de conservação desejado, mas devem sempre assegurar a preservação da integridade genética e fisiológica do material, requerendo manutenções mínimas.

São várias as modificações que se podem fazer no meio de cultura com o objectivo de reduzir o crescimento das culturas, tais como: i) diminuição da concentração de nutrientes ou hidratos de carbono; ii) adição de crioprotectores como o dimetilsulfóxido e o polietilenoglicol; iii) adição de substâncias com propriedades osmóticas como o

manitol, ou aumentar a concentração de sacarose; iv) adição de retardadores de crescimento como o ácido abscísico ou o paclobutrazol.

A manipulação do ambiente de cultura pode incluir a redução da temperatura de crescimento, a redução ou ausência de luz e a modificação da atmosfera de cultura limitando a quantidade de oxigénio disponível. Os diferentes métodos podem ser aplicados individualmente ou combinados e, devido às vantagens imediatas e aos reduzidos investimentos necessários são usados rotineiramente.

O sucesso dos programas de conservação, independentemente do factor limitante, é determinado com base no aumento do intervalo de subcultura, na duração da exposição ao factor limitante, na taxa de sobrevivência e na recuperação do crescimento após o retorno às condições normais. O sucesso da aplicação das metodologias de conservação *in vitro* em condições mínimas de crescimento requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie (Watt *et al.*, 2000; Mandal *et al.*, 2000; Yusuf *et al.*, 2001). A conservação de culturas *in vitro* em condições mínimas de crescimento, através da manipulação das condições de crescimento, tem sido amplamente utilizada para as mais diversas espécies, incluindo plantas cultivadas (Sarkar & Naik, 1998; Bekheet, 2000; Negah *et al.*, 2001; Sarkar *et al.*, 2001; Hao & Deng, 2003; Borges *et al.*, 2004; Gollagunta *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2005; Islam *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005) e espécies silvestres (Bekheet *et al.*, 2002; Gagliardi *et al.*, 2002; Martin & Pradeep, 2003, Tyagi *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006).

Para a conservação durante períodos superiores a três anos a criopreservação é o único método disponível. Esta técnica permite a conservação de células, tecidos e órgãos vegetais a temperatura ultra-baixa, normalmente à temperatura do azoto líquido (-196 °C). A esta temperatura cessam todos os processos metabólicos, não ocorrendo divisão celular e, teoricamente, o material pode ser conservado por períodos ilimitados.

A criopreservação tem sido aplicada à conservação das mais variadas estruturas, nomeadamente, protoplastos, suspensões celulares, *calli*, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos e produtos biotecnológicos (culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse económico e linhagens celulares geneticamente modificadas). A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do azoto líquido. Por isso, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação requer o conhecimento de mecanismos bioquímicos e biofísicos associados com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento (Stushnoff & Seufferheld, 1995). Existem três técnicas básicas de criopreservação: o congelamento lento (metodologia clássica), a vitrificação e o encapsulamento-desidratação.

Estudos realizados nos últimos anos resultaram no desenvolvimento de protocolos de criopreservação de células, tecidos ou órgãos de uma grande variedade de espécies de plantas, utilizando as diferentes técnicas de criopreservação (Read *et al.*, 2001; Tyagi & Hymowitz, 2003; Danso & Ford-Lloyd, 2004; Jayasankar *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2005; Gonzalez-Arno *et al.*, 2006; Péran *et al.*, 2006). As várias técnicas de criopreservação têm também sido aplicadas para a conservação de sementes, de diversas espécies, por longos períodos (Muthusamy *et al.*, 2005; Pence & Clark, 2005; Dussert & Engelmann, 2006; Flachslund *et al.*, 2006; Rakotondranony *et al.*, 2006). Para que as técnicas de criopreservação sejam amplamente aplicadas é necessária a validação de protocolos de criopreservação em diferentes laboratórios internacionais (Reed *et al.*, 2001).

4.1.3. Objectivos

Não existindo até ao momento nenhum trabalho que vise a conservação da espécie *D. lusitanicum*, neste capítulo pretendeu-se:

- i) estudar quais as melhores condições de conservação de rebentos de *D. lusitanicum* *in vitro* em condições mínimas de crescimento;
- ii) criopreservar sementes desta espécie, utilizando um protocolo simples, sem recurso a equipamento sofisticado.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Conservação de rebentos *in vitro* em condições mínimas de crescimento

Para a realização destes ensaios foram utilizados rebentos com aproximadamente 2 cm, isolados de culturas a crescer *in vitro* em meio MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea. Estas culturas foram estabelecidas *in vitro* a partir da germinação de sementes como descrito no Capítulo II.

Testou-se a adição de diferentes concentrações de sacarose (0,5; 2; 3; 4; 6%; p/v) e diferentes combinações de sacarose e manitol (2% sacarose + 2% manitol; 4% sacarose + 2% manitol e 6% sacarose + 2% manitol; p/v) em meio de cultura MS suplementado com 0,2 mg l⁻¹ Zea. Em cada frasco (250 ml capacidade) contendo 50 ml de meio de cultura (Estampa 4.1B), inocularam-se 5 rebentos. As culturas foram incubadas a 5 ± 1 C ou 25 ± 2 °C no escuro.

No final do período de conservação (4, 8 e 12 meses) as culturas foram transferidas para meio de cultura fresco (MS + 0,2 mg l⁻¹ Zea) e colocadas nas condições normais de crescimento (25 ± 2° C; fotoperíodo de 16 h, 60 µmol m⁻² s⁻¹). Após 6 semanas

contabilizou-se a percentagem de viabilidade, ou seja a percentagem de rebentos que regenerou. Durante as três primeiras subculturas após conservação, contabilizou-se a taxa de multiplicação, expressa pelo número de rebentos produzidos por cada cultura conservada.

4.2.2. Criopreservação de sementes

Nos ensaios de criopreservação foram utilizadas sementes maduras de *D. lusitanicum* recolhidas em Agosto de 2005 na população de Monchique 3 (próximo de Chilrão). Tal como efectuado para os ensaios de germinação descritos no Capítulo II, as sementes foram recolhidas aleatoriamente de vários indivíduos distribuídos na população. O número de sementes recolhidas foi o menor possível de forma a não pôr em causa a integridade da população. As sementes foram desinfectadas como descrito no Capítulo II e foram embebidas em água estéril durante 4 dias a 5 °C.

Nos ensaios de criopreservação sem nenhum tratamento prévio, as sementes foram transferidas individualmente para tubos de plástico de 1,5 ml e estes foram directamente imersos em azoto líquido. Após 30 min os tubos foram retirados e as sementes descongeladas através de descongelamento rápido ou lento. Para o descongelamento rápido, os tubos foram retirados do azoto líquido e de imediato imersos num banho de água a 37 ± 2 °C durante 12 min. Para o descongelamento lento, as sementes foram colocadas numa placa de Petri estéril destapada, sob o ar de uma câmara de fluxo laminar vertical, à temperatura ambiente durante 30 min.

Testou-se o efeito da desidratação por fluxo de ar, antes da criopreservação. Para isso as sementes foram colocadas numa única camada em placas de Petri estéreis e sujeitas ao fluxo de ar de uma câmara de fluxo laminar vertical durante 4 h à temperatura ambiente.

Após o período de desidratação as sementes foram colocadas em tubos de plástico de 1,5 ml e directamente imersas em azoto líquido durante 30 min ou 24 h. Findo o período de criopreservação as sementes foram descongeladas por descongelamento rápido ou descongelamento lento, como atrás descrito.

Num outro ensaio, após desidratação e imersão em azoto líquido durante 30 min, as sementes foram armazenadas a -20 ou -80 °C durante 2 ou 4 meses. Após armazenamento as sementes foram descongeladas por descongelamento rápido.

Após cada tratamento as sementes foram inoculadas em meio 1/4MS sem reguladores de crescimento ou alternativamente foram escarificadas manualmente com pinça e bisturi antes da inoculação. Para a germinação das sementes utilizaram-se como recipientes de cultura tubos de vidro (25 × 160 mm) contendo 10 ml de meio de cultura, sendo inoculada uma semente por tubo. As sementes foram incubadas em condições controladas a 25 ± 2 °C e sob fotoperíodo de 16 h ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a percentagem de germinação avaliada após 6 semanas.

Foi também efectuado um ensaio controlo em que, as sementes foram embebidas em água e armazenadas a 5 °C durante 4 dias, escarificadas e inoculadas em meio 1/4MS.

4.2.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados

Nos ensaios de criopreservação de sementes utilizaram-se 5 repetições com 10 sementes cada, por tratamento. Nos ensaios de conservação de rebentos em condições mínimas de crescimento, testaram-se 4 repetições, com 10 rebentos cada, por tratamento. Os dados foram tratados estatisticamente utilizando o programa SPSS para Windows versão 11.0, através de análise de variância. Para valores de F significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Os

dados apresentados sob a forma de percentagens foram transformados em arco seno da raiz quadrada da percentagem / 100, antes de serem submetidos à análise estatística. Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão, sendo os valores significativamente diferentes assinalados com letras diferentes.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Conservação de rebentos *in vitro* em condições mínimas de crescimento

A conservação *in vitro* de *D. lusitanicum* é rotineiramente efectuada mantendo as culturas em crescimento contínuo, transferindo-as para meio fresco em intervalos de tempo regulares (6 semanas) (Estampa 4.1A). Apesar de este método proporcionar material em crescimento activo em qualquer altura, é muito dispendioso e requer muita mão-de-obra além de aumentar os riscos de ocorrência de alterações genéticas (Engelmann, 1997). Estes problemas podem ser evitados aplicando técnicas de conservação *in vitro*, que se baseiam na redução do crescimento e desenvolvimento dos rebentos mantidos *in vitro* (Hao *et al.*, 2005).

O decréscimo da temperatura de conservação é talvez o método mais utilizado para reduzir o crescimento das culturas *in vitro*, tendo sido utilizado com sucesso na conservação de culturas de diversas espécies (Sarkar & Naik, 1998; Bekheet, 2000; Sarkar *et al.*, 2001; Bekheet *et al.*, 2002). Neste trabalho o decréscimo da temperatura de conservação de 25 para 5 °C foi crucial para a sobrevivência dos rebentos após a conservação, visto que não ocorreu regeneração em rebentos conservados a 25 °C. Durante a conservação os rebentos continuaram a regenerar rebentos laterais, mas muitos destes rebentos morreram durante o período de armazenamento *in vitro*

(Estampa 4.1C-E). A recuperação após a conservação só ocorreu em rebentos conservados até 8 meses.

Na Figura 4.2 apresentam-se as percentagens de sobrevivência de rebentos conservados durante 4 e 8 meses a 5 °C no escuro, em diferentes meios de cultura. Nestas condições, não se observou recuperação nos rebentos conservados em meio de cultura com uma concentração de sacarose inferior a 4%. Por outro lado, o incremento da concentração de sacarose de 4 para 6% resultou num aumento significativo da percentagem de sobrevivência (33 para 70% e 18 para 38%, para 6 e 8 meses de período de conservação, respectivamente) (Figura 4.2).

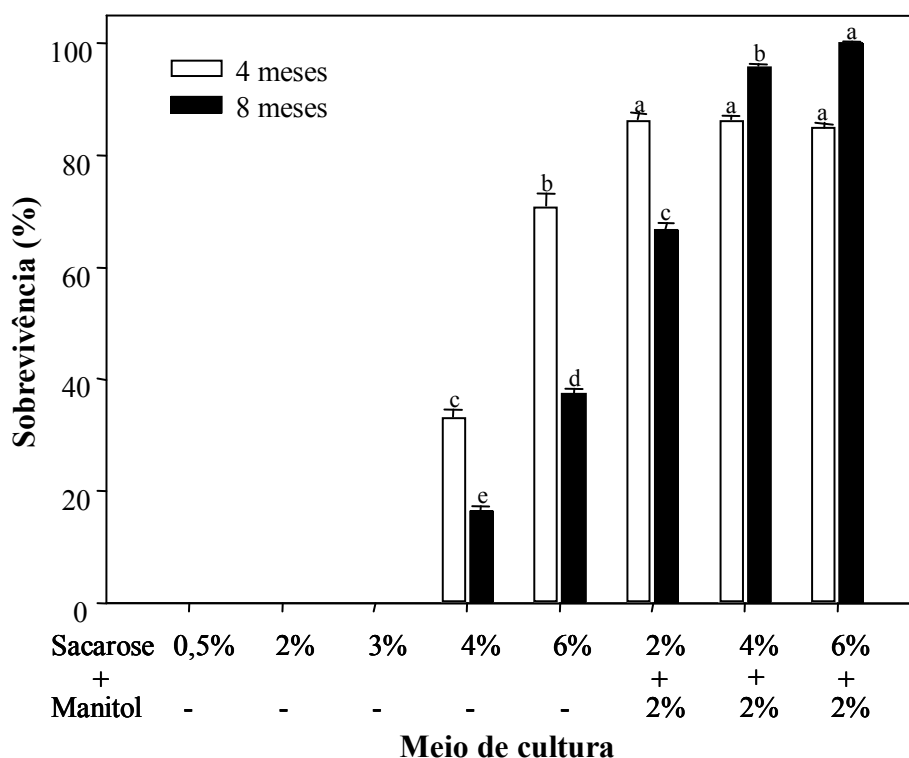


Figura 4.2. Sobrevivência dos rebentos (%) após 6 semanas em condições normais de crescimento. Os rebentos foram conservados a 5 °C no escuro, durante 4 e 8 meses em diferentes meios de cultura. As barras verticais representam o erro-padrão de 4 repetições com 10 rebentos cada. Para cada período de conservação, letras diferentes indicam médias significativamente diferente a $P < 0.05$.

De acordo com Gollagunta *et al.* (2005), o crescimento, o potencial de conservação e a performance após a conservação dos rebentos está intimamente relacionado com o armazenamento de hidratos de carbono por parte das culturas. Vários autores em diversas espécies têm observado um aumento da sobrevivência de rebentos conservados *in vitro* aumentando a concentração de sacarose no meio de cultura (Fletcher, 1994; Gollagunta *et al.*, 2005).

Uma vez que tem sido referido por vários autores (Sarkar & Naik, 1998; Negash *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2004) que o manitol inibe o crescimento de rebentos de várias espécies, incorporou-se no meio de cultura 2% deste açúcar álcool não-metabolizado com o objectivo de reduzir o crescimento das culturas de *D. lusitanicum*. O manitol aumenta o potencial osmótico do meio de cultura, diminuindo a disponibilidade de água para o crescimento. A adição de manitol ao meio de conservação aumentou significativamente a sobrevivência de rebentos de *D. lusitanicum* após a conservação ($P < 0.05$) (Figura 4.2). A percentagem de regeneração mais elevada (100%) foi observada em rebentos conservados durante 8 meses em meio de cultura contendo 6% de sacarose e 2% de manitol. Em alguns meios de cultura os valores de viabilidade após 8 meses de conservação foram ligeiramente superiores aos observados para 4 meses, o que poderá indicar uma adaptação das culturas às baixas temperaturas (Negash *et al.*, 2001).

A capacidade de multiplicação dos rebentos conservados a 5 °C foi avaliada durante as três primeiras subculturas após a conservação (Estampa 4.2). Na Tabela 4.2 resumem-se as taxas de multiplicação (média das primeiras 3 subculturas nas condições normais de crescimento) dos rebentos após conservação a 5 °C durante 4 e 8 meses. A média do número de rebentos foi significativamente afectada pelo meio de cultura ($P < 0,001$).

Pelo contrário, independentemente do meio de cultura utilizado, o período de conservação não afectou a taxa de multiplicação ($P \geq 0,05$).

Tabela 4.2. Taxas de multiplicação de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum* após conservação a 5 °C no escuro, em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Período de conservação (meses)	
	4	8
Controlo	4 ± 0,30 ab	
4% sacarose	3 ± 0,40 bc	3 ± 0,34 cd
6% sacarose	4 ± 0,17 ab	4 ± 0,37 a
2% sacarose + 2% manitol	3 ± 0,25 c	2 ± 0,15 d
4% sacarose + 2% manitol	4 ± 0,36 a	3 ± 0,25 bc
6% sacarose + 2% manitol	4 ± 0,34 a	4 ± 0,16 ab

Análise ANOVA bi-factorial

Meio de cultura	***
Período de conservação	ns
Meio de cultura × Período de conservação	ns

Os valores representam médias ± erros-padrão de 4 repetições com 10 rebentos. As taxas de multiplicação foram avaliadas nas primeiras 3 subculturas após conservação, cada uma de 6 semanas. Para cada variável, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test). ns, **, não significativo ou significativo a $P < 0,01$, respectivamente (Análise ANOVA bi-factorial).

Não se observaram diferenças significativas ($P \geq 0,05$) entre a taxa de multiplicação dos rebentos do ensaio controlo e dos rebentos conservados durante 4 meses em meio de cultura suplementado com 6% de sacarose, 4% de sacarose + 2% de manitol ou 6% de sacarose + 2% de manitol (Tabela 4.2). Quando o período de conservação aumentou de 4 para 8 meses, os resultados foram semelhantes excepto para os rebentos conservados em meio com 4% de sacarose + 2% de manitol.

Este trabalho permitiu elaborar um protocolo simples e eficiente para conservar rebentos de *D. lusitanicum* em condições mínimas de crescimento. Os resultados obtidos mostram que os rebentos podem ser conservados *in vitro* a 5 °C no escuro, durante 8 meses sem subcultura em meio suplementado com elevadas concentrações de sacarose e manitol. Os rebentos conservados quando colocados em condições de cultura normais multiplicaram normalmente sem perda de capacidade de regeneração e sem alterações morfológicas aparentes.

4.3.2. Criopreservação de sementes

Tendo em conta que *D. lusitanicum* é propagada por via seminal, é fundamental que a elaboração de uma estratégia de conservação para esta espécie contemple a criação de um banco de sementes. No decorrer deste trabalho foram recolhidas sementes desta espécie e conservadas de acordo com as metodologias convencionais de conservação no Banco de Sementes António Luís Belo Correia do Jardim Botânico da Universidade de Lisboa. Paralelamente, as sementes foram também usadas em ensaios de criopreservação. Os resultados obtidos, confirmaram os resultados apresentados no Capítulo II, uma vez que não se observou germinação das sementes não escarificadas mesmo após criopreservação. Assim, os resultados de germinação apresentados neste trabalho referem-se a sementes escarificadas.

Não foi observada germinação quando as sementes foram directamente imersas em azoto líquido sem serem previamente desidratadas (Tabela 4.3). O conteúdo em água das sementes é um factor importante para o sucesso da criopreservação, podendo o excesso de água levar à formação de cristais de gelo durante o congelamento, reduzindo consideravelmente a germinabilidade das sementes (Nikishina *et al.*, 2001). A

existência de um período de desidratação antes da criopreservação funciona como um factor crio-protector (Muthusamy, 2005).

Tabela 4.3. Taxas de germinação de sementes criopreservadas de *D. lusitanicum* após 6 semanas em meio de cultura 1/4MS.

Desidratação	Período de congelamento	Descongelamento	Germinação ^a (%)
Controlo	-	-	82 b
-	30 min	Rápido	0 c
-	30 min	Lento	0 c
+	30 min	Rápido	94 a
+	30 min	Lento	80 b
+	24 h	Rápido	80 b
+	24 h	Lento	84 b

^a As sementes foram assepticamente escarificadas antes da inoculação em meio de cultura. Os valores representam médias \pm erros-padrão de 5 repetições com 10 sementes cada. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test).

O segundo factor importante na criopreservação de sementes desta espécie foi o modo como foi efectuado o descongelamento. Segundo Withers (1985), a forma como o descongelamento é efectuado é importante para a sobrevivência celular após o congelamento. Os resultados obtidos (Tabela 4.3) mostram que o descongelamento rápido a 37 °C durante 12 min, após um período de imersão em azoto líquido de 30 min, permitiu obter uma taxa de germinação superior ($P < 0,05$) à obtida nas sementes sujeitas a descongelamento à temperatura ambiente durante 30 min (94 e 80% de germinação, respectivamente). As sementes imersas em azoto líquido durante 30 min e descongeladas rapidamente apresentaram inclusivamente uma taxa de germinação superior ($P < 0,05$) à obtida no controlo (sementes não criopreservadas) (82%). Este incremento na germinação após criopreservação tem sido referenciado em outras

espécies (Pritchard, 1984; Nikishina *et al.*, 2001). De acordo com Pritchard (1984) a criopreservação provoca um re-arranjo dos lípidos do tegumento da semente, tornando-o mais permeável à água, o que conseqüentemente facilita a germinação. No entanto, ainda não está completamente esclarecido até que ponto este aumento de germinação é causado simplesmente por alterações mecânicas no tegumento ou pelo re-arranjo dos lípidos (Nikishina *et al.*, 2001).

Outro factor estudado neste trabalho foi a duração do período de imersão em azoto líquido (30 min ou 24 h). O aumento deste período não afectou significativamente a taxa de germinação relativamente ao controlo ($P \geq 0,05$) (Tabela 4.3). Teoricamente, as sementes que sobrevivem ao processo de congelamento e descongelamento, podem manter-se criopreservadas por tempo ilimitado. Neste contexto, os resultados deste trabalho demonstram que a criopreservação de sementes poderá ser utilizada com sucesso para a conservação de germoplasma de *D. lusitanicum*.

Num outro ensaio, estudou-se o efeito do armazenamento das sementes a -20 ou -80 °C durante 2 ou 4 meses após a imersão das sementes em azoto líquido. As sementes foram descongeladas por descongelamento rápido e a sua capacidade de germinação avaliada. Os resultados (Tabela 4.4) mostraram que as taxas de germinação de sementes conservadas durante 2 meses, independentemente da temperatura de conservação, não foram significativamente diferentes da obtida no ensaio controlo ($P \geq 0,05$) (Tabela 4.4). A temperatura de conservação revelou-se um factor importante, observando-se que após 4 meses de conservação a -20 °C a capacidade de germinação não foi afectada ($P \geq 0,05$) (76%), tendo-se observado um decréscimo significativo ($P < 0,05$) na taxa de germinação (68%) a -80 °C (Tabela 4.4). Estes resultados poderão ser importantes para a conservação de germoplasma desta espécie, uma vez que permitem combinar as vantagens do congelamento rápido em azoto líquido com a conservação a -20 °C num

congelador comum, evitando a utilização de azoto líquido ao longo do período de armazenamento.

Tabela 4.4. Taxas de germinação de sementes de *D. lusitanicum* (após 6 semanas em meio de cultura 1/4MS) previamente imersas em azoto líquido durante 30 min e de seguida conservadas durante 2 e 4 meses a -20 ou -80 °C.

Temperatura de armazenamento	Período de armazenamento (meses)	Germinação (%)
Controlo	-	82 a
-20 °C	2	78 a
-20 °C	4	76 a
-80 °C	2	88 a
-80 °C	4	68 b

^a As sementes foram assepticamente escarificadas antes da inoculação em meio de cultura. Os valores representam médias \pm erros-padrão de 5 repetições com 10 sementes cada. Letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test).

A criopreservação tem sido considerada uma ferramenta importante para a conservação a longo prazo de germoplasma vegetal uma vez que, à temperatura do azoto líquido os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantidos em estado latente, proporcionando preservação praticamente ilimitada (Engelmann, 2000; Walters *et al.*, 2004). Além disso, a probabilidade de ocorrerem danos por deterioração no material criopreservado é menor que no material conservado nas temperaturas convencionais. Isto é especialmente importante quando o material a ser preservado pertence a plantas em vias de extinção, dada a menor disponibilidade de material (González-Benito *et al.*, 1998).

A criopreservação de sementes tem sido aplicada na preservação de várias espécies silvéticas e raras (Pence, 1991; Iriondo *et al.*, 1992; Touchell & Dixon, 1993; González-

Benito *et al.*, 1998; Hirano *et al.*, 2005a; Hirano *et al.*, 2005b; Muthusamy *et al.*, 2005; Pence & Clark, 2005; Flachslund *et al.*, 2006; Rakotondranony *et al.*, 2006).

Após criopreservação, as sementes de *D. lusitanicum* germinaram normalmente originando plântulas com aspecto normal. Os resultados obtidos mostram que a criopreservação de sementes pode ser utilizada com sucesso para a conservação a longo prazo de germoplasma de *D. lusitanicum* através da criação de um crio-banco de sementes, sem necessidade de utilizar técnicas dispendiosas ou equipamentos sofisticados.

4.4. CONCLUSÕES

Tendo em conta que vários autores recomendam a aplicação complementar de várias técnicas para a conservação de germoplasma vegetal, a criopreservação de sementes, por um lado e manutenção de culturas em condições mínimas de crescimento, por outro, parecem ser duas alternativas válidas para a conservação de germoplasma de *D. lusitanicum*. Os protocolos aqui descritos, poderão ser aplicados na conservação de material proveniente de várias populações desta espécie, formando bancos de germoplasma para esta espécie. A criopreservação de sementes permitirá a conservação de germoplasma por longos períodos de tempo, e a conservação de culturas *in vitro* funcionará como um banco de genes activo que pode ser usado para a propagação de plantas, aplicando o protocolo descrito no Capítulo II, sempre que necessário. Estas plantas poderão ser utilizadas por exemplo, para restauração de habitats e re-introdução ou reforço de populações.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

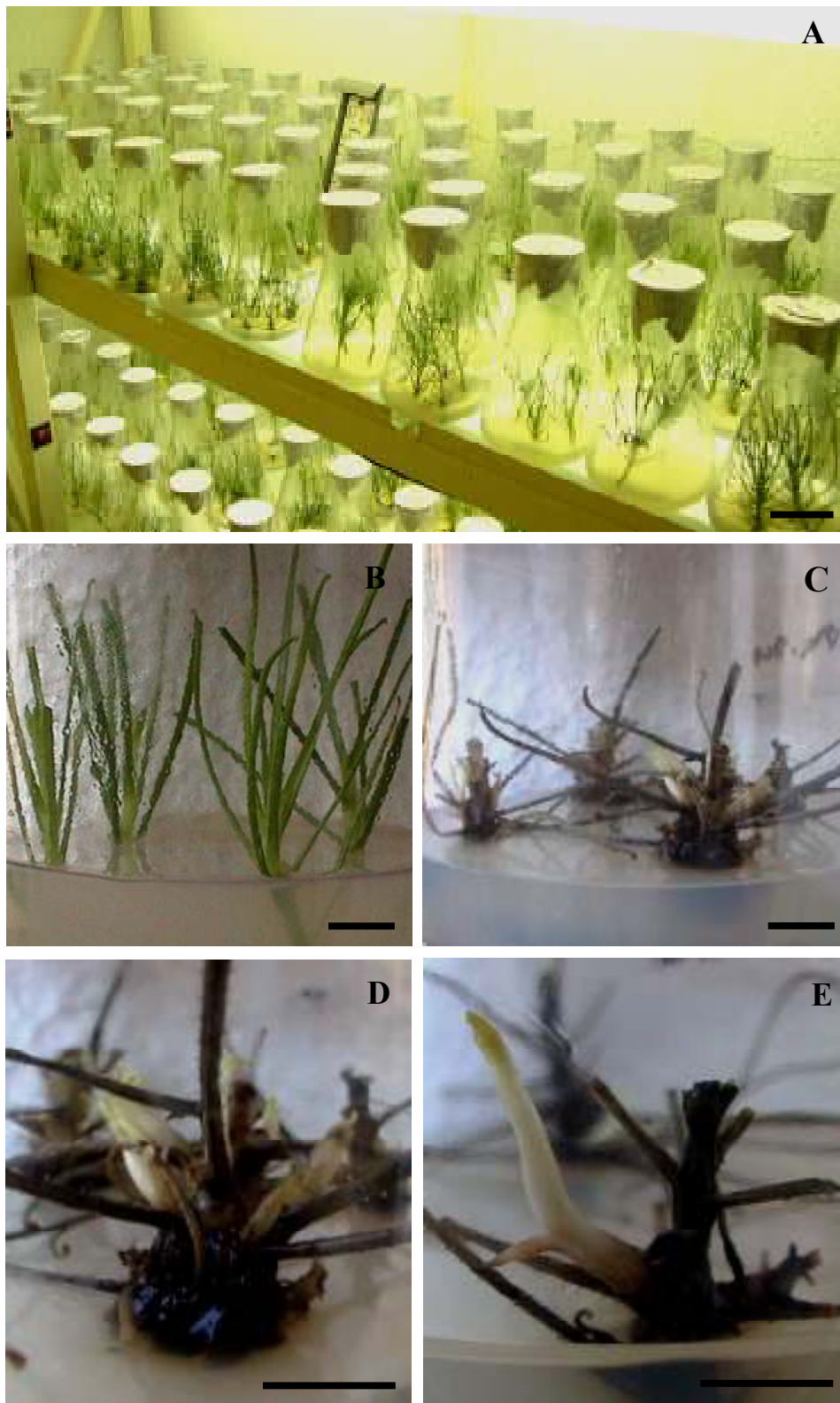
- Ashmore SE 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI, Rome
- Bekheet SA 2000. *In vitro* preservation of *Asparagus officinalis*. *Biologia Plantarum* 179: 179-183.
- Bekheet SA, Taha HS, Saker MM 2002. *In vitro* long-term storage of date palm. *Biologia Plantarum* 45: 121-124
- Benson EE 1999. *Plant Conservation Biotechnology*, Taylor & Francis Ltd., London
- Borges M, Ceiro W, Meneses S, Aguilera N, Vázquez J, Infante Z, Fonseca M 2004. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76: 87-90
- Danso K, Ford-Lloyd B 2004. Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. *Plant Cell Reports* 22: 623-631
- Dussert S, Engelmann F 2006. New determinants for tolerance of Coffee (*Coffea Arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. *Cryoletters* 27: 169-178
- Engelmann F 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112: 9-18
- Engelmann F 2000. Importance of cryopreservation of plant genetic resources. Em: Takagi H, Engelmann F (eds.), *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. IPGRI, Rome
- Fay MF 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In *Vitro Cellular Development Biology - Plant* 28: 1-4
- Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engelmann F 2006. Cryopreservation of seeds and *in vitro*-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *Cryoletters* 27: 235-242
- Fletcher PJ 1994. *In vitro* long-term storage of asparagus. *New Zealandia Journal of Crop and Horticulture Science* 22: 351-359

- Gagliardi RF, Pacheco, GP, Valls JFM, Mansur E 2002. Germplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoots apices and axillary buds from *in vitro* plants. *Biologia Plantarum* 45: 353-357
- Gollagunta V, Adelberg JW, Rieck J, Rajapakse N 2005. Sucrose in storage media and cultivar affects post-storage regrowth of *in vitro* *Hosta* propagules. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80: 191-199
- González ML, Mallón R, Reinoso J, Rodríguez-Oubiña J 2006. *In vitro* micropropagation and long-term conservation of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Biologia Plantarum* 50: 339-345
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryoletters* 27: 155-168
- González-Benito ME, Iriondo JM, Pérez-García F 1998. Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. *Seed Science and Technology* 26: 257-262
- Hao Y-J, Deng X-X 2003. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72: 253-260
- Hao Y-J, Cheng Y-J, Deng X-X 2005. Stable maintenance and expression of a foreign gene in transgenic pear shoots retrieved from *in vitro* conservation. *Journal of Plant Physiology* 162: 237-243
- Hawkes JG, Maxted N, Ford-Lloyed BV 2000. The *ex situ* conservation of plant genetic resources, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Hirano T, Godo T, Mii M, Ishikawa K 2005a. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports* 23: 534-539
- Hirano T, Ishikawa K, Mii M 2005b. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifoli* var. *suzukiana* by vitrification. *CryoLetters* 26: 139-146
- Iriondo JM, Pérez C, Pérez-García F 1992. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. *Seed Science and Technology* 20: 165-171

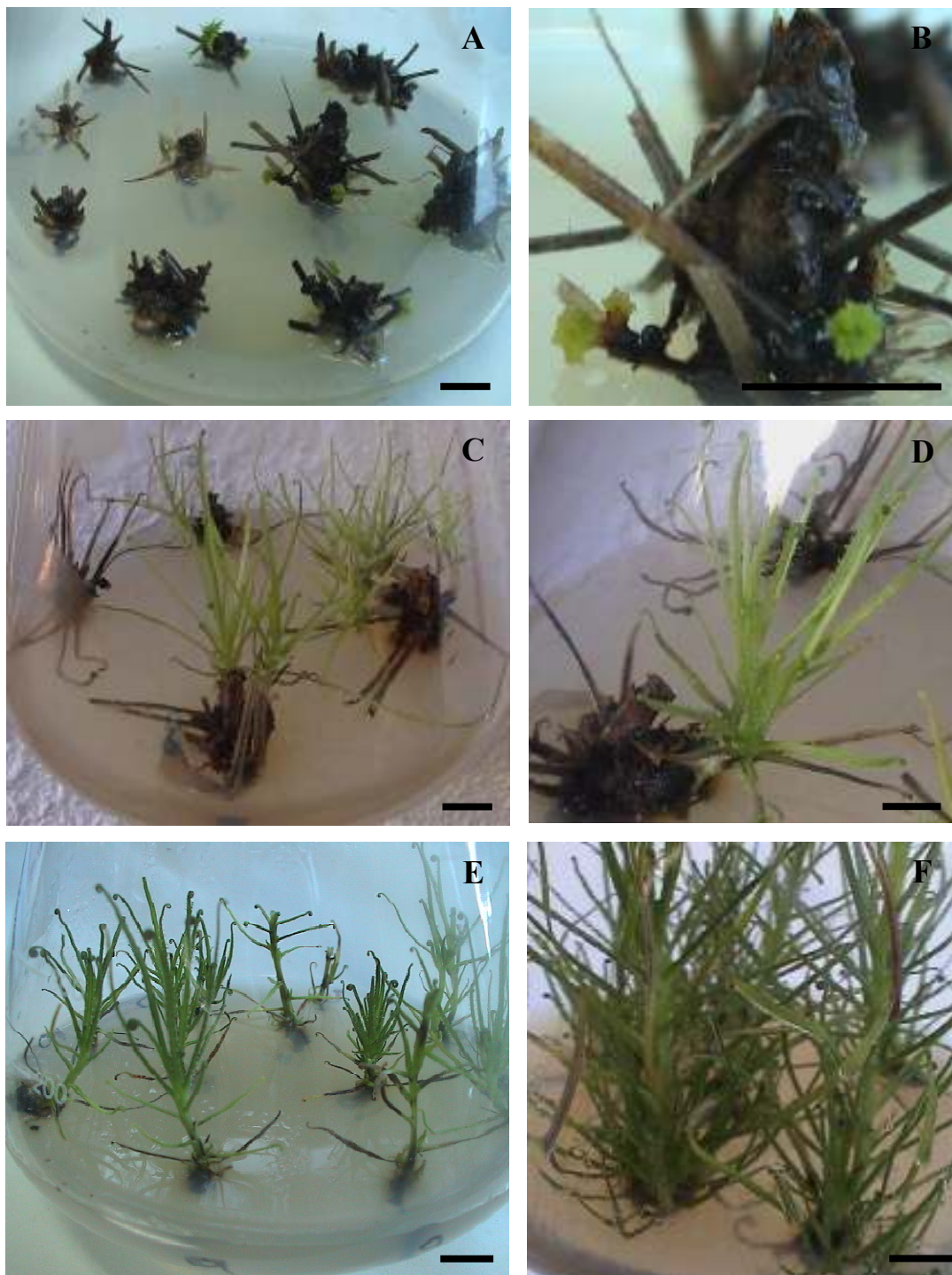
- Islam MT, Dembele DP, Keller ER 2005. Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* culture for germplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 123-130
- Jayasankar S, Van Aman M, Cordts J, Dhekney S, Li ZT, Gray DJ 2005. Low temperature storage of suspension culture-derived grapevine somatic embryos and regeneration of plants. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 41: 752-756
- Mandal BB, Tyagi RK, Pandey R, Sharma N, Agrawal A 2000. *In vitro* conservation of germplasm of agrihorticultural crops at NBPGR: an overview. Em: Razdan MK, Cocking EC (eds.), *Conservation of plant genetic resources in vitro: applications and limitations*, Vol. 2. Science Publishers Inc., Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi
- Martin KP, Pradeep AK 2003. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipsea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 197–200
- Maunder M, Havens K, Guerrant EO Jr, Falk DA 2004. *Ex situ* methods: a vital but underused set of conservation resources. Em: Guerrant EO Jr, Havens K, Maunder M (eds.), *Ex situ* plant conservation – supporting species survival in the wild. Island Press, Washington
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG 1997. Complementary conservation strategies. Em: Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG (eds.), *Plant genetic conservation: the in situ approach*, Chapman & Hall, London
- Muthusamy J, Staines HJ, Benson EE, Mansor M, Krishnapillay 2005. Investigating the use of fractional replication and Taguchi techniques in cryopreservation: a case study using orthodox seeds of a tropical rainforest tree species. *Biodiversity and Conservation* 14: 3169-3185
- Negash A, Krens F, Schaart J, Visser B 2001. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 66: 107-111.
- Nikishima TV, Popov AS, Kolomeitseva GL, Golovkin BN 2001. Effect of Cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 810-815

- Pence V 1991. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. *Seed Science and Technology* 19: 235-51
- Pence VC, Clark 2005. Desiccation, cryopreservation and germination of seeds of the rare wetland species, *Plantago cordata* Lam. *Seed Science and Technology* 33: 767-770
- Perán R, Berjak P, Pammenter NW, Kioko JI 2006. Cryopreservation, encapsulation and promotion of shoot production of embryonic axes of a recalcitrant species *Ekebergia capensis*, Sparrm. *Cryoletters* 27: 5-16
- Pritchard HW 1984. Liquid Nitrogen Preservation of Terrestrial and Epiphytic Orchid Seed. *CryoLetters* 5: 295-300
- Rakotondranony GL, Sacande M, Wood CB, Pritchard HW 2006. Seed storage responses in four species of the threatened genus *Ravenea* (Arecaceae). *Seed Science and Technology* 34: 513-517
- Reed BM, Bumet D, Denoma JM, Benson EE 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation* 10: 939-949
- Sarkar D, Chakrabarti SK, Naik PS 2001. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 117: 133-142
- Sarkar D, Naik PS 1998. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* 102: 275-280
- Sarkar D, Pandey S, Chanemougasoundharam A, Sud KC 2005. The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 221-227
- Stushnoff C, Seufferheld M 1995. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. Em: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm. Berlin, Springer-Verlag, Heidelberg, New York
- Suzuki M, Akihama T, Ishikawa M 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 83: 115-121

- Touchell DH, Dixon KW 1993. Cryopreservation of seed of Western Australian native seeds. *Biodiversity and Conservation* 2: 594-602
- Tyagi RK, Hymowitz T 2003. Pollen from Glycine species survive cryogenic exposure. *Cryoletters* 24: 119-124
- Tyagi RK, Yusuf A, Dua P, Agrawal A 2004. *In vitro* plant regeneration and genotype conservation of eight wild species of *Curcuma*. *Biologia Plantarum* 48: 129-132
- UNCED 1992. Convention on Biological diversity, United Nations Conference on Environment and Development, Geneva
- UNEP 2002. Global Strategy for Plant Conservation. Decision VI/9 UNEP/CBD/COP/6/20 CBD Secretariat, Montreal, Canada http://www.bgci.org.uk/files/7/0/global_strategy.pdf
- Vidal N, Sánchez C, Jorquera L, Ballester A, Vieitez AM 2005. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant* 41: 63-68
- Walters C, Wheeler L, Stanwood PC 2004. Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48: 229-244
- Watt MP, Thokoane NL, Mycock D, Blakeway F 2000. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61: 161-164
- Withers LA 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. Em: Kartha K (ed.), *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Withers LA, Engelmann F 1997. *In vitro* conservation of plant genetic resources. Em: Altman A (ed.), *Biotechnology in agriculture*, Marcel Dekker Inc., New York
- Withers LA, Wheelans SK, Williams JT 1990. *In vitro* conservation of crop germoplasm and the IBPGR databases. *Euphytica* 45: 9-22
- Yusuf A, Tyagi RK & Malik SK 2001. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65: 255-258



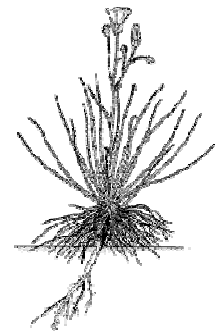
Estampa 4.1. Diferentes aspectos da conservação *in vitro* de rebentos de *D. lusitanicum*. (A) rebentos a crescer *in vitro* em condições normais de crescimento (barra = 5 cm); (B) rebentos no início da conservação *in vitro* em condições mínimas de crescimento (5 °C, no escuro e em meio MS contendo 60 g l⁻¹ de sacarose e 20 g l⁻¹ de manitol) (barra = 1 cm); (C-E) rebentos após 8 meses nas condições descritas em B (barra = 1 cm).



Estampa 4.2. Diferentes aspectos de rebentos de *D. lusitanicum* após conservação *in vitro* em condições mínimas de crescimento (5 °C, no escuro e em meio MS contendo 60 g l⁻¹ de sacarose e 20 g l⁻¹ de manitol) (barra = 1 cm). (A e B) rebentos após 2 semanas a crescer *in vitro* em condições normais de crescimento; (C e D) rebentos no final da primeira subcultura; (E) rebentos isolados no início da segunda subcultura; (F) rebentos após 3 subculturas em condições normais de crescimento.

Capítulo V

**Avaliação da actividade biológica de
extractos de *D. lusitanicum***



5.1. INTRODUÇÃO

5.1.1. Importância dos compostos de origem vegetal

As plantas são uma valiosa fonte de produtos do metabolismo primário e secundário, os quais são utilizados como fármacos (com acção tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida, etc.), agro-químicos, flavorizantes, aromatizantes, corantes, bio-inseticidas, aditivos alimentares, entre outros. A exploração das plantas com fins terapêuticos começou historicamente no Oriente vários anos antes de Cristo, mas somente com o advento da química fina é que a actividade tomou impulso, permitindo a manipulação destes metabolitos com várias aplicações científicas. Segundo Rao & Ravishankar (2002), o número de estruturas químicas encontradas no reino vegetal será quatro vezes maior que no reino dos microrganismos, sendo que as plantas continuarão a proporcionar novos produtos e novas estruturas químicas, para novas drogas, nos próximos séculos, uma vez que a maioria das espécies de plantas não foi ainda caracterizada quimicamente. Estima-se que nos últimos anos, aproximadamente um quarto dos medicamentos mais vendidos a nível mundial são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (Balunas & Kinghorn, 2005). É de salientar que as estruturas químicas provenientes de plantas, para além de serem usadas directamente, podem servir de percursos para novos medicamentos por optimização do processo de síntese química.

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, efectivos contra algumas patologias ainda sem tratamento adequado e que possam substituir os existentes a custos menores e com menos efeitos adversos, tem impulsionado as pesquisas nesta área. O número de infecções humanas tem aumentado drasticamente e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos transformou-se num alarmante problema terapêutico (Eloff,

1998; Yasunaka *et al.*, 2005). Os compostos bio-activos de origem vegetal podem ser fontes alternativas de agentes antimicrobianos, possivelmente com diferentes mecanismos de acção (Essawi & Srour, 2000; Motsei *et al.*, 2003; Barbour *et al.*, 2004). A investigação na área da fitoquímica tem sido considerada uma abordagem válida para a identificação de novas drogas de origem vegetal com acção antimicrobiana (Kloucek *et al.*, 2005). A utilização de óleos essenciais e extractos vegetais tem recentemente ganho popularidade e interesse científico, dado o seu potencial uso no tratamento de doenças infecciosas (Tepe *et al.*, 2005).

Para além das aplicações na área médica, as plantas são importantes fontes de moléculas com interesse agro-químico. O uso indiscriminado de insecticidas químicos para a protecção das culturas levou ao aparecimento de problemas ambientais e humanos, ao desenvolvimento de pragas resistentes e efeitos letais nos organismos auxiliares (Abudulai *et al.*, 2001). A investigação na procura de novos agentes de controlo de pragas, baseados em produtos de origem natural, tem vindo a aumentar. Os metabolitos secundários das plantas possuem um efeito fundamental nas interacções planta-insecto podendo esses compostos possuir actividade insecticida, hormonal e de inibição da alimentação, importantes no combate aos insectos (Han *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003; Jayasekara *et al.*, 2005). No caso dos insecticidas, as plantas têm servido de importante fonte de compostos activos que podem ser usados directamente ou servir de modelo para a síntese de moléculas análogas (Wink, 1993; Godfrey, 1994; Tewary *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

Comparativamente aos insecticidas químicos, os insecticidas botânicos têm várias vantagens ecológicas inerentes à sua natureza: i) como moléculas resultantes do metabolismo secundário das plantas, têm uma acção específica, pelo que causam efeitos limitados nos organismos auxiliares; ii) devido a essa especificidade, actuam em

pequenas doses nos insectos nocivos; iii) são biodegradáveis, não sendo muito persistentes, o que representa uma grande vantagem ambiental; iv) pertencendo a várias famílias químicas (polifenóis, terpenos, alcalóides, etc.), têm mecanismos de acção diferentes, o que limita o desenvolvimento de insectos resistentes. Os insecticidas de origem vegetal são assim altamente efectivos, seguros, ecologicamente aceites (Pascual-Villalobos & Robledo, 1998; Park *et al.*, 2003; Tewary *et al.*, 2005; Senthil Nathan & Kalaivani, 2005) e compatíveis com o controlo biológico (Schmutterer, 1997; Charleston *et al.*, 2005).

Recentemente, a alelopatia, definida como o efeito favorável ou desfavorável que uma planta exerce noutra através da produção de substâncias químicas libertadas no ambiente (Rice, 1984), tem sido amplamente explorada sob o ponto de vista agronómico para a produção de herbicidas naturais em alternativa aos herbicidas químicos (Bhowmik & Inderjit, 2003). Quando essas substâncias são libertadas no ambiente em quantidades suficientes, causam efeitos alelopáticos que podem ser observados na germinação, no crescimento e/ou no desenvolvimento de plantas já crescidas e, ainda, no desenvolvimento de microrganismos. Os herbicidas e agro-químicos com base em produtos naturais são atractivos porque a maioria destes produtos biologicamente activos são solúveis em água e exibem a sua actividade a baixas concentrações. Muitos exercem o seu potencial seguindo mecanismos distintos dos herbicidas comerciais, fazendo deles importantes compostos na descoberta de novos herbicidas. Embora a literatura descreva a actividade alelopática de várias espécies (Ben-Hammouda *et al.*, 2001; Scrivanti *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Pérez-Léal *et al.*, 2005), a grande diversidade de espécies existentes no planeta continua a justificar o estudo de novas espécies do ponto de vista químico e biológico.

5.1.2. Propriedades biológicas de *Drosophyllum lusitanicum*

A espécie *D. lusitanicum* há muito que tem sido referenciada como contendo na sua composição a naftoquinona 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, vulgarmente conhecida por plumbagina. Recentemente Budzianowski *et al.* (2002) descreveram a presença, nesta espécie, de outros compostos, tais como fenóis (ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-naftaleno-carboxílico, ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-naftaleno-carboxílico metil ester, ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-naftaleno-carboxílico 5-O- β -glucosídeo) e flavonóides (luteolina, leucocianidina, leucodelfinidina, isovitexina e orientina). O termo composto fenólico abrange um amplo grupo de moléculas que possuem em comum um anel aromático, portando uma ou mais hidroxilas. Estes compostos são solúveis em água, podendo estar ligados a açúcares. Do ponto de vista farmacológico possuem actividade anti-séptica, anti-inflamatória e podem inibir actividade enzimática (Harborne, 1984; Bruneton, 1995). Os flavonóides são compostos caracterizados por apresentarem dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos, também derivados da via do ácido chiquímico-acetato. São bastante comuns na natureza, actuando na atracção de polinizadores e como co-pigmentos das antocianidinas (Bruneton *et al.*, 1995). Apresentam actividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antidiabética (Barnes *et al.*, 2001), o que torna essa classe de compostos de interesse para a indústria farmacêutica.

Relativamente à plumbagina, segundo Tokunaga *et al.* (2004), a sua produção por parte das plantas, pode estar relacionada com o mecanismo de protecção contra predadores. Este composto tem recebido grande atenção no âmbito da investigação farmacológica devido à sua actividade antimicrobiana (Didry *et al.*, 1998; Wang & Huang, 2005; Lim *et al.*, 2007), anticancerígena (Kavimani *et al.*, 1996; Naresh *et al.*, 1996; Sugie *et al.*, 1998; Sajan *et al.*, 2005), anti-malária (Likhitwitayawuid *et al.*, 1998), cardiotónica

(Itoigawa *et al.*, 1991) e antiviral (Min *et al.*, 2002). A actividade insecticida desta naftoquinona foi também comprovada por diversos autores (Khambay & Jewess, 2000; Banerjee *et al.*, 2001; Kumar & Banerji, 2002; Ganapaty *et al.*, 2004).

A maior fonte de plumbagina são as raízes de plantas pertencentes ao género *Plumbago* (*P. indica*, *P. rosea* e *P. zeylanica*). Porém, estas plantas crescem lentamente, levando anos até que as raízes estejam prontas para serem sujeitas ao processo de extracção, o que torna relevante a procura de novas fontes de plumbagina mais rentáveis (Nahálka *et al.*, 1996). Trabalhos realizados anteriormente descrevem o estudo dos níveis de produção de plumbagina em várias espécies do género *Drosera* (Marczak *et al.*, 2005) e em suspensões celulares de culturas de *D. lusitanicum* (Nahálka *et al.*, 1996). No entanto não se conhece qualquer trabalho com exemplares de campo da espécie *D. lusitanicum*, nem trabalhos que comprovem a actividade biológica dos extractos desta espécie.

5.1.3. Objectivos

A espécie *D. lusitanicum* tem sido descrita como produzindo elevadas quantidades de plumbagina, uma substância biologicamente activa. No entanto, a sua extracção e quantificação, a partir de plantas de *D. lusitanicum* a crescer no seu habitat natural, bem como a avaliação da sua actividade biológica não foram ainda estudadas. Assim, no intuito de contribuir para a valorização da espécie *D. lusitanicum*, neste capítulo avaliou-se a actividade biológica de extractos preparados a partir de exemplares a crescer em condições naturais. Tendo em conta que se trata de uma espécie rara, comprovadas as suas potencialidades medicinais e/ou agroquímicas, a sua exploração só

será possível através da produção desta espécie *ex situ*. Assim, os objectivos específicos propostos para este capítulo foram:

- i) preparar extractos a partir de material foliar de plantas de *D. lusitanicum* a crescer no campo e de rebentos a crescer *in vitro*, comprovar a presença de plumbagina através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e fazer a sua quantificação;
- ii) averiguar as propriedades antimicrobianas dos extractos, num grupo de microrganismos patogénicos para o homem (incluindo leveduras e bactérias), através do método de difusão em agar e da determinação da concentração mínima inibitória;
- iii) avaliar o efeito insecticida, por contacto e ingestão, dos extractos no combate de adultos de *Liriomyza trifolii* (Burgess), uma praga hortícola e frutícola;
- iv) avaliar os efeitos alelopáticos de extractos aquosos na germinação de sementes e crescimento de plantas de alface e trigo;
- vi) otimizar o processo de extracção, com vista a aumentar a taxa de recuperação de plumbagina.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foi recolhido de plantas de *D. lusitanicum* de uma população localizada perto de Alferce (Monchique 1). As plantas foram identificadas e depositou-se um exemplar no Herbário do Jardim Botânico da Universidade de Lisboa, tendo sido registado com o número LISU 206396. O material vegetal foi recolhido de forma a salvaguardar a integridade da população. Recolheu-se

reduzido número de folhas completamente expandidas de cada planta, amostrando-se apenas as plantas de maior tamanho. Com o objectivo de evitar a degradação do material vegetal, as amostras recolhidas foram transportadas para o laboratório no frio.

O material vegetal, recolhido de plantas diferentes, foi misturado de forma a garantir a sua homogeneidade, foi seco durante 2 dias a 40 °C e moído. Posteriormente, o material seco foi sujeito a duas extracções à temperatura ambiente, cada uma de 24 h, com 300 ml de hexano (Merck) cada. O extracto resultante das duas extracções foi filtrado em papel de filtro (Watman N° 2) e concentrado por evaporação rotativa a 50 °C. Pesou-se o extracto resultante e, com base no peso fresco de material foliar utilizado, calculou-se o rendimento da extracção. O extracto foi ressuscitado em hexano obtendo-se uma solução de concentração conhecida, que foi conservada a -20 °C, até à sua utilização. Foram também preparados extractos, a partir de rebentos micropropagados de *D. lusitanicum* no final da fase de multiplicação em meio MS com 0,2 mg l⁻¹ de Zea (como descrito no Capítulo II), usando a mesma metodologia. Estes extractos foram usados na avaliação da capacidade antimicrobiana e insecticida.

5.2.2. Análise química dos extractos por GC-MS

Os extractos à concentração de 50 mg ml⁻¹ (de plantas de campo e rebentos a crescer *in vitro*) foram analisados por GC-MS com recurso a um cromatógrafo gasoso Agilent 6890 Series acoplado a um detector selectivo de massa Agilent 5973 N. As amostras (1 µl) foram injectadas manualmente, tendo o injector de vaporização operado no modo de “splitless” à temperatura de 250 °C. Programou-se o forno com uma temperatura inicial de 45 °C (0,5 min) seguida de incrementos de 20 °C min⁻¹ até 240 °C e mantida durante 5 min. As análises foram efectuadas numa coluna capilar TRB5-MS (5%

difenil, 95% dimetilpolisiloxano), tendo-se usado hélio como gás de arrastamento com velocidade linear de 35 cm s⁻¹. A temperatura da linha de transferência, da fonte de ionização e do quadrupolo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C, respectivamente, tendo-se usado um *solvent delay* de 4 min.

Para aquisição dos dados seleccionou-se uma gama de massas compreendida entre 40 e 400 Da e uma energia de ionização de 70 eV contendo uma corrente de ionização de 34,6 µA. A identificação dos componentes foi efectuada por comparação espectral com padrões de referência contidos na base de dados *Wiley* com recurso a uma *Chemstation*. As soluções padrão de plumbagina isolada a partir da planta *Plumbago indica* (Sigma) (1-15 mg ml⁻¹) em hexano foram injectadas nas mesmas condições analíticas. Construiu-se uma curva padrão que se utilizou para quantificar a plumbagina nos extractos em análise.

5.2.3. Avaliação da capacidade antimicrobiana

5.2.3.1. Microrganismos

A capacidade antimicrobiana do extracto hexânico de *D. lusitanicum* foi avaliada num grupo de microrganismos (leveduras e bactérias), através do método de difusão em agar e da determinação da concentração mínima inibitória (MIC). No que se refere às leveduras testaram-se espécies isoladas clinicamente e gentilmente cedidas pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (*Candida albicans* YP0048, *Candida albicans* YP0175, *Candida famata* YP0011, *Candida catenulata* YP0160, *Candida guilliermondi* YP0170, *Yarrowia lipolytica* YP0005, *Trichosporon mucoides* YP0096, *Trichosporon beigelii* YP0005 e *Cryptococcus neoformans* YP0186) e duas estirpes de *Candida albicans* catalogadas e adquiridas da *American Type Culture*

Collection (ATCC) (*Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC 90028). Relativamente às bactérias utilizaram-se espécies Gram-negativas e Gram-positivas catalogadas incluindo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter sakazakii* ATCC 29544 e *Enterobacter sakazakii* ATCC BA-894.

As estirpes catalogadas foram adquiridas na forma liofilizada, tendo-se procedido à sua recuperação em meio nutritivo TSB (Tryptone Soya Broth) e posterior inoculação em meio de cultura PCA (Plat Count Agar, Scharlau) no caso das bactérias, com excepção de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* que foram inoculadas em meio Blood Agar Base (Oxoid) suplementado com 7% (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado. As leveduras foram crescidas em placas de Petri contendo meio de cultura constituído por 0,3% de extracto de levedura, 0,3% de extracto de malte, 0,5% de peptona, 1% de glucose e 2% de agar (p/v). As bactérias e as estirpes de *Candida albicans* foram incubadas a 37 °C durante 24 h e as restantes leveduras foram incubadas a 25 °C durante 48 h. Após 3 subculturas para meio fresco os microrganismos foram utilizados nos testes de avaliação da capacidade antimicrobiana do extracto de *D. lusitanicum*.

5.2.3.2. Método de difusão em agar

Inicialmente, utilizou-se o método de difusão em agar para avaliar a capacidade antimicrobiana do extracto vegetal de *D. lusitanicum* preparado a partir de plantas de campo. Este método foi realizado de acordo com os protocolos internacionais do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997). Assim, preparou-se uma suspensão de microrganismo em solução salina estéril (0,85%, p/v)

utilizando colónias isoladas de culturas microbianas com 24 ou 48 h, ajustando-se a turvação ao padrão 0,5 MacFarland [aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colónia (CFU) por ml].

Com a ajuda de zaragatoas estéreis inoculou-se a suspensão do microrganismo em placas de Petri com 20 ml de meio de cultura Mueller Hinton Agar (MHA, Scharlau) para as bactérias, excepto *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* em que se usou Blood Agar Base (Oxoid) com 7% de sangue de cavalo desfibrinado, e Mueller Hinton Agar suplementado com 2% (p/v) de glucose e $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de corante azul de metileno (pH 7,2-7,4), para as leveduras. Após 10 min colocaram-se 3 discos de papel de filtro estéreis (de 6 mm de diâmetro) sobre cada placa de Petri inoculada com a suspensão do microrganismo respectivo. Cada um dos discos foi impregnado respectivamente com: 20 μl de extracto vegetal (a 50 mg ml^{-1}), 20 μl de solução salina estéril e 20 μl de hexano. Nos ensaios efectuados com leveduras, utilizou-se ainda um quarto disco impregnado com 20 μl de DMSO (dimetilsulfóxido), uma vez que foi o solvente usado para preparar a solução de anfotericina B. Para as leveduras utilizaram-se como antimicóticos de referência a anfotericina B (10 μg / disco, Sigma), a nistatina [100 unidades (U) / disco, Oxoid] e o flucozanol (25 μg / disco). Para as bactérias utilizaram-se como antibióticos de referência a penicilina G [10 unidades (U) / disco, Oxoid], a ampicilina (10 μg / disco, Oxoid), a eritromicina (15 μg / disco, Oxoid), a gentamicina (10 μg / disco, Oxoid), a ciprofloxacina (10 μg / disco, Oxoid) e o cloranfenicol (30 μg / disco, Oxoid). Os discos com as substâncias de referência foram igualmente colocados sobre as placas de Petri previamente inoculadas com a suspensão de microrganismo. Após a evaporação do hexano, as placas de petri inoculadas foram incubadas a 37 °C durante 24 h no caso das bactérias e das várias estirpes de *C. albicans*, e a 25 °C durante 48 h no caso das restantes leveduras. Todos os testes

foram efectuados em triplicado. Após o respectivo período de incubação mediram-se os diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano.

5.2.3.3. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

Para cada microrganismo em que o extracto apresentou uma actividade antimicrobiana relevante, determinou-se a concentração mínima inibitória (MIC), ou seja a concentração mínima de extracto que inibe o crescimento do microrganismo. Estes ensaios foram realizadas em meio de cultura líquido de acordo com as recomendações do NCCLS (NCCLS, 1999). O meio de cultura utilizado foi o Mueller Hinton Broth (MHB, Scharlau), suplementado com 5% (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado no caso da *S. pyogenes* e com 2% de glucose no caso das leveduras. Foram efectuadas diluições do extracto no respectivo meio de cultura num intervalo de 1 e 0,002 mg de extracto por ml de meio de cultura. A penicilina G e a anfotericina B foram utilizadas como substâncias de referência para as bactérias e as leveduras, respectivamente. Foram também incluídos tubos contendo hexano, DMSO e etanol, uma vez que foram os solventes utilizados para preparar o extracto, a solução de anfotericina B e a solução de penicilina G, respectivamente. Em cada tubo foram inoculados 100 µl de suspensão de microrganismo em concentração conhecida, resultando em cada tubo a concentração aproximada de 10^4 CFU ml⁻¹. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 24 h no caso das bactérias e das estirpes de *C. albicans*, e a 25 °C durante 48 h no caso das restantes leveduras. Após o respectivo período de incubação, para cada microrganismo registou-se a MIC do extracto e das substâncias de referência, ou seja a diluição mais baixa que inibiu completamente o crescimento do microrganismo. A ausência de crescimento foi avaliada pela ausência de turvação no meio de cultura. Todos os ensaios foram repetidos 3 vezes.

5.2.3.4. Avaliação da actividade antimicrobiana do extracto de rebentos de *D. lusitanicum* a crescer *in vitro*

Depois de comprovada a actividade do extracto obtido a partir de plantas de campo testou-se também o extracto preparado a partir de rebentos a crescer *in vitro* em alguns dos microrganismos previamente utilizados (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* YP0175, *C. guilliermondi* YP0170, *C. neoformans* YP0186, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *E. faecalis* ATCC 29212). Para tal utilizou-se apenas o método de difusão em agar, como atrás descrito, visto ser o de mais rápida execução e permitir comparar facilmente a actividade dos extractos das duas origens.

5.2.4. Avaliação da capacidade insecticida

O potencial insecticida de *D. lusitanicum* foi avaliado em fêmeas adultas de *Liriomyza trifolii*. Tendo em conta que a fase larvar desta espécie ocorre no interior das folhas da planta hospedeira, no laboratório utilizaram-se plantas de *Phaseolus vulgaris* para a sua manutenção. As plantas, a crescer em gaiolas e em condições controladas a 23 ± 2 °C, $70 \pm 5\%$ de humidade relativa e fotoperíodo de 16 h, foram infestadas com adultos de *L. trifolii*. A postura dos ovos e a fase larvar decorreram no interior das folhas, desenvolvendo-se as pupas na superfície das mesmas. Cada pupa foi transferida individualmente para tubos de vidro, onde foi colocada uma gota de mel diluído. Os tubos foram tapados com algodão e foram colocados de novo em condições controladas até o adulto emergir. Nesta fase, separaram-se as fêmeas para utilização nos ensaios subsequentes.

5.2.4.1. Ensaio de contacto

A actividade insecticida do extracto hexânico de *D. lusitanicum*, foi inicialmente avaliada recorrendo ao ensaio de contacto. Para tal, aplicaram-se 250 µl de extracto proveniente de plantas de campo, em diferentes concentrações (1, 5, 25, 50 e 100 mg ml⁻¹), em papéis de filtro (Whatman No. 2; 5,5 cm Ø). Após a evaporação do solvente, à temperatura ambiente durante 1 h, colocou-se cada papel de filtro individualmente no fundo de um frasco de vidro (7 cm Ø × 8 cm) (Estampa 5.1A,B). De seguida, colocou-se em cada frasco uma gota de mel diluído e um pedaço de algodão embebido em água, para garantir a alimentação dos insectos, e 10 fêmeas adultas de *L. trifolii* com 1-2 dias. Os frascos taparam-se com um tule, de forma a garantir as trocas gasosas com o meio exterior. Testou-se também o extracto preparado a partir de rebentos micropropagados nas concentrações de 50 e 100 mg l⁻¹. Em paralelo, efectuaram-se ensaios controlo do solvente com 250 µl de hexano, e ensaios controlo em que não se aplicou nenhuma substância no papel de filtro. Os ensaios decorreram nas condições controladas atrás descritas.

5.2.4.2. Ensaio de ingestão

Num outro ensaio incorporou-se o extracto vegetal de *D. lusitanicum* na dieta alimentar e avaliou-se a sua acção na taxa de mortalidade os insectos. Para tal, 500 µl de extracto nas concentrações de 2,5 e 5 mg ml⁻¹, preparado a partir de material foliar de plantas a crescer no campo foram misturados com mel diluído. Após 24 h a 37 °C, para evaporação do solvente, a dieta tratada foi colocada em frascos de vidro (5 cmØ × 3,5 cm) onde foram colocadas 10 fêmeas adultas de *L. trifolii* com 1-2 dias. Taparam-se os frascos e colocaram-se em condições controladas. Efectuaram-se os

respectivos ensaios controlo e controlo do solvente. No primeiro caso não se aplicou qualquer tratamento, e no segundo aplicaram-se 500 µl de hexano na dieta alimentar que foi evaporado como atrás descrito.

5.2.4.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados

Todos os ensaios foram repetidos pelo menos 5 vezes. O número de insectos mortos em cada tratamento foi contabilizado 1, 2, 3 e 7 dias após o início do ensaio. As percentagens de mortalidade foram transformados em arco seno da raiz quadrada da percentagem / 100 e foram tratadas estatisticamente, através de análise de variância, utilizando o programa SPSS para Windows versão 11.0. Para valores de F significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão, sendo os valores significativamente diferentes assinalados com letras diferentes.

5.2.5. Efeito alelopático de extractos aquosos de *D. lusitanicum*

5.2.5.1. Preparação de extractos aquosos

Para a avaliação do efeito alelopático de *D. lusitanicum* utilizaram-se extractos aquosos preparados a partir de material foliar recolhido em plantas de campo. O material foliar fresco foi cortado em pequenas secções e colocado num frasco com água destilada a agitar durante 24 h à temperatura ambiente. No final da extração removeu-se o material foliar por filtração e os extractos foram guardados a -20 °C até utilização.

Alternativamente, secaram-se as folhas numa estufa a 40 °C durante 48 horas, moeram-se, colocaram-se em frascos de vidro com água destilada a agitar durante 24 h à temperatura ambiente. Passado este período realizou-se uma filtragem em vácuo para

remover os resíduos de material foliar e guardaram-se os extractos resultantes a -20 °C até utilização.

Foram preparados extractos aquosos a partir de material fresco (2,5; 5; 10%, p/v) e seco (1; 2,5; 5; 10; 20; 30%, p/v) a diferentes concentrações.

5.2.5.2. Efeito dos extractos na germinação de sementes de alface e trigo

Avaliou-se o efeito alelopático dos extractos aquosos na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.). Para tal, as sementes foram desinfectadas com lixívia comercial a 20%, contendo 2 gotas de Tween 20, durante 20 min e de seguida lavadas três vezes com água destilada estéril.

Para a realização dos ensaios de germinação aplicaram-se 500 µl de extracto a diferentes concentrações em papéis de filtro (9 cm Ø) colocados no interior de placas de Petri (10 cm Ø) em condições estéreis. Para as sementes de alface testou-se o efeito do extracto aquoso fresco a 2,5%, 5% e 10% e do extracto aquoso seco a 1%, 2,5%, 5% e 10%. No caso do trigo utilizou-se apenas o extracto aquoso seco a 10%, 20% e 30%. Estas concentrações foram seleccionadas a partir de ensaios preliminares. Após a aplicação do extracto, na respectiva concentração, aplicaram-se 2 ou 2,5 ml (para as sementes de alface ou trigo, respectivamente) de água destilada estéril em cada papel de filtro e inocularam-se 20 sementes em cada placa de Petri. Todas as manipulações foram efectuadas em condições assépticas em câmara de fluxo laminar. As sementes foram incubadas a 25 ± 2 °C no escuro. Efectuaram-se ensaios controlo nas condições descritas mas sem a aplicação de extracto.

5.2.5.3. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados

Diariamente e durante cinco dias após inoculação, contabilizou-se o número de sementes germinadas em cada repetição e tratamento. Ao quinto dia, nos ensaios onde foi possível, mediu-se o comprimento do caule e da raiz mais longa, e determinou-se o peso fresco da raiz e do caule de 15 plântulas escolhidas aleatoriamente em cada tratamento. No caso das plântulas de trigo contabilizou-se também o peso seco da raiz e do caule (após 24 h a 35 °C).

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS para Windows versão 11.0, através de análise de variância. Para valores de F significativos compararam-se as médias pelo teste de Duncan para $P < 0,05$ (Duncan's New Multiple Range Test). Os dados relativos às percentagens de germinação obtidas ao quinto dia, foram transformados em arco seno da raiz quadrada da percentagem / 100, antes de serem submetidos à análise estatística. Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão de 10 repetições com 20 sementes cada. Valores assinalados com letras diferentes representam médias significativamente diferentes.

5.2.6. Optimização da extracção de plumbagina

Identificada a plumbagina como o composto maioritário do extracto de *D. lusitanicum* e, sendo provavelmente o composto responsável pelas actividades biológicas comprovadas neste trabalho, conduziram-se ensaios com vista à optimização da extracção de plumbagina. Para tal, estudou-se a extracção a partir de material vegetal fresco e seco. O material foliar foi recolhido como descrito no ponto 5.2.1 e utilizado imediatamente após a recolha ou, alternativamente, foi seco a 40 °C durante 48 h previamente à extracção. A fim de averiguar o efeito do solvente na extracção, testaram-

se três solventes: o metanol, o clorofórmio e o hexano (Merck). Como método de extracção testou-se a extracção Soxhlet e a extracção assistida por ultra-sons (EAU). No primeiro caso, amostras de material fresco (3 g) e seco (correspondentes a 3 g de material fresco) foram inseridas num cartucho de extracção, que após ter sido tapado com algodão, foi colocado no aparelho de extracção Soxhlet. Transferiram-se 100 ml de solvente extractante para cada balão de destilação e as extracções decorreram durante 8 h.

No caso da EAU as amostras de material vegetal fresco (3 g) foram maceradas utilizando azoto líquido e as amostras secas (correspondente a 3 g de material vegetal fresco) foram reduzidas a pó. As amostras foram colocadas em tubos Falcon e imersas em 20 ml de solvente. Os tubos, num recipiente com gelo, foram colocados individualmente no sonicador (Sonics Vibra Cell) de forma a não entrar em contacto com a ponta da sonda. Os ultra-sons foram transmitidos à solução de forma intermitente, a um ritmo de 15 pulsos por 30 s, seguido de um intervalo de 30 s, durante 30 min. Para clarificar a solução, os extractos obtidos foram centrifugados a 5000 rpm ($4332 \times g$) (Heraeus Megafuge 1.0R) durante 15 min.

Todos os extractos obtidos foram separados do solvente extractante num evaporador rotativo a funcionar à temperatura de 50 °C. Os extractos obtidos foram pesados, ressuspendidos em hexano à concentração de 50 mg de extracto por ml de hexano de forma a uniformizar as amostras para as análises subsequentes. As soluções obtidas foram armazenadas a -20 °C até às análises posteriores. Todos os ensaios foram repetidos 3 vezes.

Para quantificar a plumbagina nos extractos recorreu-se mais uma vez à construção de uma curva padrão, tendo-se preparado soluções de plumbagina em hexano com concentrações no intervalo 0,25-30,0 mg ml⁻¹, que foram analisadas por GC-MS. Com o

objectivo de identificar e quantificar apenas a plumbagina presente nos diferentes extractos, o programa de análise utilizado foi optimizado em relação ao anteriormente utilizado, no sentido de reduzir o tempo de análise de cada amostra. Programou-se o forno com uma temperatura inicial de 70 °C (0,5 min) seguida de incrementos de 20°C min⁻¹ até 240 °C e mantida durante 5 min. A temperatura da linha de transferência, da fonte de ionização e do quadrupolo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C, respectivamente, tendo-se usado um *solvent delay* de 5 min. Devido ao elevado número de amostras, estas foram injectadas com auxílio de um injector automático Agilent 7683 series.

Para aquisição dos dados seleccionou-se uma gama de massas compreendida entre 35 e 550 Da e uma energia de ionização de 70 eV contendo uma corrente de ionização de 34,6 µA. A identificação dos componentes dos extractos foi efectuada por comparação espectral com padrões de referência contida na base de dados *Wiley* com recurso a uma *Chemstation*. As soluções padrão de plumbagina foram injectadas nas mesmas condições analíticas.

Para cada extracto calculou-se o rendimento de extracção, que representa a quantidade de extracto obtido a partir da amostra de material vegetal, a quantidade de plumbagina existente por ml de extracto e o rendimento de extracção de plumbagina, representando a quantidade de plumbagina efectivamente recuperada a partir do material vegetal.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Análise química dos extractos

Por ser o método de extracção mais simples, a extracção estática usando hexano como solvente, foi a técnica inicialmente escolhida para preparar extractos a partir de material

foliar de *D. lusitanicum* para testar a actividade antimicrobiana e insecticida desta espécie. Esta técnica permitiu obter 0,60 e 0,54% de rendimento de extracção, respectivamente para material foliar de plantas de campo e rebentos a crescer *in vitro* (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Comparação do rendimento de extracção e quantificação da plumbagina em extractos preparados a partir de material de campo e rebentos a crescer *in vitro*.

Material vegetal	Rendimento de extracção (% p/p)	mg de plumbagina / ml de extracto	mg de plumbagina / g peso fresco de folha
Campo	0,60	5,50	0,66
<i>In vitro</i>	0,54	4,14	0,45

A GC-MS é uma ferramenta analítica muito útil na análise de misturas complexas, combinando a separação por alta resolução com a identificação espectral inequívoca dos compostos individuais. Os extractos (na concentração de 50 mg de extracto por ml de hexano) foram analisados por GC-MS e, tal como esperado, o composto maioritário identificado foi a plumbagina (Figura 5.1). No entanto, foram também identificados outros compostos presentes em pequenas quantidades, como o neofitadieno e o fitol. A GC-MS é uma ferramenta com grande potencial na caracterização química de extractos vegetais, particularmente na identificação de novos compostos (Péres *et al.*, 2006). Porém, apresenta a limitação de ser mais indicada para analisar compostos que volatilizam facilmente, não permitindo identificar a totalidade dos compostos presentes no extracto. Pelo que, para uma caracterização mais detalhada do extracto será necessária a utilização de outras técnicas analíticas.

A quantificação da plumbagina, efectuada recorrendo a uma curva padrão construída com plumbagina *standard*, permitiu verificar que os extractos de campo e *in vitro* continham, respectivamente, 5,50 e 4,14 mg de plumbagina por ml de extracto (Tabela

5.1). A técnica de extracção e o solvente utilizados permitiram recuperar, respectivamente, 0,66 e 0,45 mg de plumbagina por g de peso fresco de material vegetal.

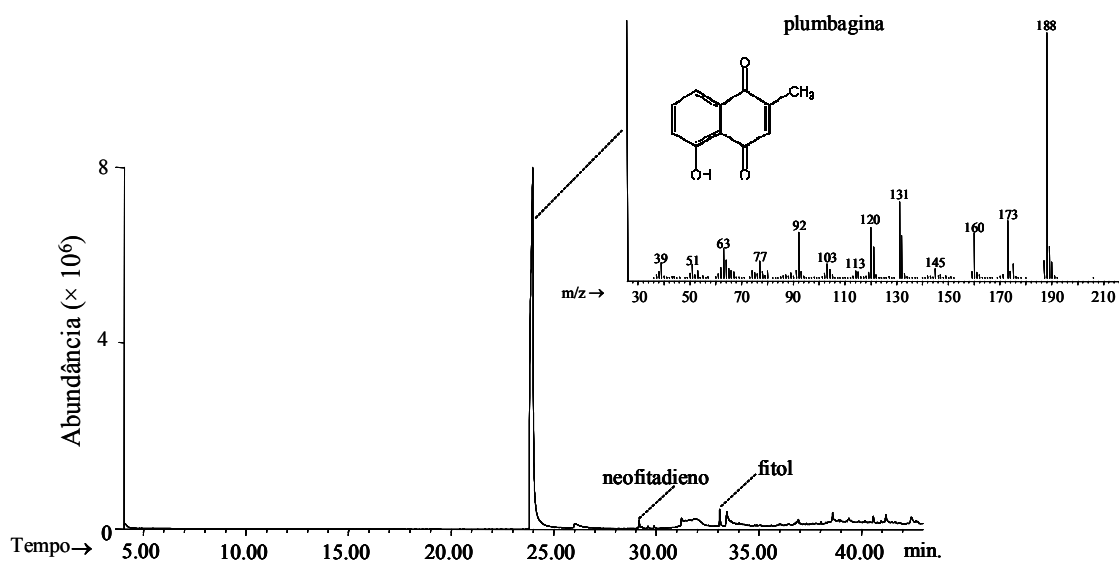


Figura 5.1. Traçado de corrente iónica do extracto de *D. lusitanicum*, preparado a partir de folhas de plantas de campo, analisado por GC-MS, e espectro de massa da plumbagina.

Estes resultados demonstram que, à semelhança do que tem sido referido para outras espécies (Budzianowski, 2000; Hook, 2001; Satheeshkumar & Seeni, 2003; Marczak *et al.*, 2005), as culturas *in vitro* de *D. lusitanicum* são uma alternativa válida para extracção de plumbagina, visto que a concentração de plumbagina no extracto proveniente de rebentos a crescer *in vitro* foi semelhante à obtida nos extractos de plantas de campo. Este resultado é da maior importância, tendo em conta que se trata de uma espécie rara, em que a exploração das suas potencialidades medicinais e agroquímicas só será possível recorrendo a plantas propagadas *ex situ*.

Embora a aplicação da cultura de tecidos seja especialmente importante no caso de plantas raras, existem outras vantagens decorrentes da utilização desta técnica para a

extracção de bio-compostos nomeadamente, o facto do material ser mantido em condições controladas, estar disponível em qualquer época do ano, independentemente das variações sazonais e livre de pragas e infestantes (Kurz & Constable, 1998).

5.3.2. Avaliação da capacidade antimicrobiana

A actividade antimicrobiana do extracto de plantas de *D. lusitanicum* a crescer em campo, em comparação com as substâncias antimicrobianas de referência, foi inicialmente avaliada pelo método de difusão em agar. Os resultados obtidos por este método estão sumarizados nas Tabelas 5.2 e 5.3. Não se observou inibição do crescimento dos microrganismos nos ensaios controlo, ficando assim afastada a hipótese de o hexano inibir o seu crescimento.

Tabela 5.2. Actividade antimicótica do extracto de *D. lusitanicum* usando o método de difusão em agar^a.

Leveduras	Extracto vegetal	Anfotericina	Fluconazol	Nistatina
	20 µl / disco	10 µg / disco	25 µg / disco	100 U / disco
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	36,67 ± 0,33	23,33 ± 1,20	-	24,67 ± 1,20
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	31,00 ± 1,00	19,67 ± 1,67	15,33 ± 0,88	25,00 ± 1,00
<i>C. albicans</i> YP0048	33,33 ± 0,67	24,67 ± 0,33	22,67 ± 0,20	26,33 ± 0,33
<i>C. albicans</i> YP0175	23,67 ± 0,88	19,33 ± 0,33	-	23,67 ± 0,88
<i>C. famata</i> YP0011	30,00 ± 1,00	16,00 ± 0,58	-	26,67 ± 1,45
<i>C. catenulata</i> YP0160	34,33 ± 1,45	21,00 ± 0,58	20,00 ± 1,15	27,67 ± 0,33
<i>C. guilliermondi</i> YP0170	34,33 ± 0,67	22,67 ± 1,20	-	32,67 ± 1,20
<i>Y. lipolytica</i> YP0005	29,67 ± 2,03	25,33 ± 1,86	27,33 ± 1,20	34,67 ± 0,67
<i>T. mucoides</i> YP0096	30,67 ± 0,88	21,67 ± 0,88	26,33 ± 0,67	28,67 ± 0,33
<i>T. beigeli</i> YP0005	32,33 ± 0,67	23,00 ± 0,58	27,67 ± 2,33	29,33 ± 1,20
<i>C. neoformans</i> YP0186	42,33 ± 1,33	20,67 ± 0,88	-	32,33 ± 0,33

^a Os resultados são expressos sob a forma de diâmetros dos halos de inibição (mm); inactivo (-). Os valores representam médias ± erros-padrão de 3 repetições.

O extracto inibiu o crescimento de todas as espécies de leveduras testadas neste trabalho (com diâmetros dos halos de inibição superiores a 23,67 mm), incluindo algumas espécies resistentes ao fluconazol (Tabela 5.2). Além disso, na maioria das leveduras o extracto produziu um halo de inibição do crescimento superior aos antimicóticos de referência utilizados (Estampa 5.2A-D). A estirpe *Candida albicans* YP0175, clinicamente isolada e resistente ao fluconazol, foi a levedura mais tolerante ao extracto, enquanto que a espécie *C. neoformans* YP0186 foi a mais sensível, ou seja aquela em que o extracto induziu o halo de inibição maior ($48,33 \pm 0,88$ mm).

Os 3 principais grupos de antifúngicos de uso clínico são os antibióticos polienos, os derivados azólicos e os alilaminas/tiocarbamatos. Todos interagem ou inibem a síntese do ergosterol, principal esteroide da membrana plasmática da maioria dos fungos (Georgopapadokou & Walsh, 1994). Os polienos (ex: anfotericina B, nistatina) ligam-se ao esteroide da membrana causando um aumento da sua permeabilidade, levando à perda de componentes citoplasmáticos e consequentemente à morte celular. Os inibidores desta classe têm maior afinidade pelo ergosterol que pelo seu correspondente na espécie humana, o colesterol, viabilizando assim o seu uso clínico. Os compostos azólicos (ex: cetoconazol, itraconazol, fluconazol, clotrimazol) são sintéticos e actuam primariamente na biossíntese do ergosterol no passo de demetilação C-14, uma reacção dependente do citocromo P-450.

Sendo a disponibilidade de antifúngicos inferior à de agentes antibacterianos são necessárias pesquisas que visem a obtenção de novas substâncias com actividade antimicrobiana, principalmente com actividade dirigida contra patógenos fúngicos. Os fármacos antifúngicos disponíveis actualmente têm alguma toxicidade e produzem recorrência ou causam resistência em muitos microrganismos, o que torna a procura de

novos agentes mais potentes e, sobretudo, mais seguros que os já existentes de elevado interesse (Zacchino, 2001; Somchit *et al.*, 2003).

Relativamente às bactérias, as espécies *S. epidermidis* ATCC 12228 (Estampa 5.2.E,F) e *S. aureus* ATCC 25923 foram as mais sensíveis ao extracto, com halos de inibição de $43,00 \pm 0,58$ mm e $35,67 \pm 0,33$ mm, respectivamente (Tabela 5.3). Nestas bactérias o extracto foi inclusivamente mais efectivo que os seis antibióticos testados. Por outro lado, *E. faecalis* ATCC 29212 mostrou ser a bactéria Gram-positiva mais tolerante ao extracto ($17,67 \pm 0,33$ mm). No que se refere às bactérias Gram-negativas, o extracto não inibiu o crescimento da espécie *P. aeruginosa* ATCC 27853 e induziu halos de inibição do crescimento com diâmetros reduzidos nas restantes (*E. coli* ATCC 25922, *E. sakazakii* ATCC 29544 e *E. sakazakii* ATCC BA-894). A tolerância das bactérias Gram-negativas a extractos vegetais tem sido referenciada para outras espécies por diversos autores (Palombo & Semple, 2001; Daud *et al.*, 2005). Além disso, as bactérias Gram-negativas são muitas vezes referidas como resistentes aos antibióticos correntemente comercializados (Sader *et al.*, 2002). As diferenças observadas entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas no padrão de resposta aos agentes antimicrobianos podem estar relacionadas com diferenças a nível da estrutura da parede celular e com diferenças ao nível do alvo de actuação do agente antimicrobiano. A parede celular das bactérias Gram-positivas é fundamentalmente constituída por uma camada de peptidoglicano adjacente à membrana plasmática. Nas bactérias Gram-negativas esta camada é muito menos espessa e possuem uma camada externa de lipopolissacáridos, que forma uma barreira à entrada das substâncias antimicrobianas (Tadeg *et al.*, 2005; Madignan & Martinko, 2006).

Tabela 5.3. Actividade antibacteriana do extracto de *D. lusitanicum* usando o método de difusão em agar^a.

Bactérias	Extracto Vegetal 20 µl / disco	Penicilina G 10 U / disco	Ampicilina 10 µg / disco	Eritromicina 15 µg / disco	Gentamicina 10 µg / disco	Ciprofloxacina 10 µg / disco	Cloranfenicol 30 µg / disco
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	43,00 ± 0,58	18,00 ± 1,15	18,00 ± 1,15	27,33 ± 0,33	27,67 ± 0,33	28,00 ± 0,00	23,67 ± 0,33
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35,67 ± 0,33	29,33 ± 0,33	28,33 ± 0,67	23,67 ± 0,33	23,33 ± 0,67	25,33 ± 0,67	20,33 ± 0,33
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	24,67 ± 0,67	34,33 ± 0,33	33,00 ± 0,00	28,67 ± 0,33	10,33 ± 0,33	20,67 ± 0,67	23,00 ± 0,58
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	23,33 ± 0,88	31,67 ± 0,88	33,67 ± 0,33	34,33 ± 0,33	16,67 ± 0,33	27,00 ± 0,58	27,00 ± 0,58
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	17,67 ± 0,33	19,00 ± 0,58	19,00 ± 0,58	20,00 ± 0,58	12,00 ± 0,00	21,33 ± 0,33	16,00 ± 0,58
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	21,00 ± 0,00	29,67 ± 0,33	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14,67 ± 0,33	-	14,00 ± 1,53	28,67 ± 0,33	19,67 ± 0,33	32,00 ± 0,58	24,00 ± 0,58
<i>E. sakazakii</i> ATCC 29544	13,67 ± 0,33	-	16,33 ± 0,88	12,00 ± 0,58	23,67 ± 0,88	34,33 ± 0,33	23,00 ± 1,00
<i>E. sakazakii</i> ATCC BA-894	13,67 ± 0,33	-	18,33 ± 0,33	13,33 ± 0,33	26,33 ± 3,84	33,33 ± 1,67	24,00 ± 0,58

^a Os resultados são expressos sob a forma de diâmetros dos halos de inibição (mm); inactivo (-).

Os valores representam médias ± erros-padrão de 3 repetições

Embora não tenha sido objectivo deste trabalho estudar o mecanismo de acção dos compostos presentes no extracto, os resultados obtidos sugerem que estes actuem a nível da parede celular, uma vez que as bactérias Gram-negativas não foram inibidas. O mesmo aconteceu com a Penicilina G que é um dos antibióticos mais comum e que actua a nível da síntese da parede celular.

É interessante verificar que, embora o extracto tenha induzido halos de inibição do crescimento com diâmetros diferentes nas várias estirpes de *C. albicans*, estas apresentaram o mesmo valor de MIC ($31 \mu\text{g ml}^{-1}$). Além disso, as estirpes em que o extracto induziu os maiores halos de inibição pelo método anterior, não foram sempre as mais sensíveis ao extracto, ou seja, nem sempre apresentam os menores valores de MIC. Isto pode ser explicado, pelo facto de a eficácia de um composto ser afectada por vários factores, tais como, a solubilidade do extracto, a taxa de difusão no agar, a evaporação (que pode afectar a dose), entre outros (Cimanga *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2005).

Na comparação das MIC obtidas para o extracto e para as substâncias de referência, é necessário ter em conta que, enquanto nos agentes controlo se trata de uma substância pura, no extracto vegetal trata-se de um extracto bruto. Ou seja, não é de estranhar a discrepância dos valores obtidos para um e outro caso. De facto, quando comparamos os valores de MIC obtidos para o extracto de *D. lusitanicum* com os obtidos em trabalhos do mesmo género, efectuados com extractos vegetais de outras espécies, verificamos que os valores observados são bastante promissores.

Tabela 5.4. Concentração mínima inibitória (MIC) do extracto de *D. lusitanicum*, em comparação com os agentes antimicrobianos de referência, para os vários microrganismos.

Microrganismo	Extracto Vegetal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Controlo^a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Leveduras		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	31	0,039
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	31	0,078
<i>C. albicans</i> YP0048	31	0,020
<i>C. albicans</i> YP0175	31	0,039
<i>C. famata</i> YP0011	63	0,078
<i>C. catenulata</i> YP0160	31	0,078
<i>C. guilliermondi</i> YP0170	63	0,078
<i>Y. lipolytica</i> YP0005	63	0,039
<i>T. mucoides</i> YP0096	63	0,039
<i>T. beigeli</i> YP0005	31	0,039
<i>C. neoformans</i> YP0186	63	0,078
Bactérias		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31	0,039
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	15,6	0,625
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	250	1,250
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	125	0,010

^a A anfotericina B e a penicilina G foram usadas como controlo para as leveduras e as bactérias, respectivamente.

Os resultados obtidos comprovam a actividade antimicrobiana do extracto de *D. lusitanicum* preparado a partir de material recolhido no campo. De seguida testou-se o extracto preparado a partir de rebentos desta espécie a crescer *in vitro*. Para tal, seleccionaram-se alguns dos microrganismos anteriormente utilizados e, utilizando o método de difusão em agar, avaliou-se a sua actividade. Os resultados comparativos da actividade dos dois extractos estão compilados na Tabela 5.5. Para os microrganismos testados verificou-se que o extracto de rebentos *in vitro* apresentou um efeito muito semelhante ao obtido pelo extracto de campo.

Tabela 5.5. Comparação da actividade antimicrobiana do extracto preparado a partir de plantas de *D. lusitanicum* de campo e de rebentos a crescer *in vitro*, usando o método de difusão em agar^a.

Microorganismo	Extracto	
	Plantas de campo	Rebentos <i>in vitro</i>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	36,67 ± 0,33	34,67 ± 0,33
<i>C. albicans</i> YP0175	23,67 ± 0,88	22,67 ± 0,88
<i>C. guilliermondi</i> YP0170	34,33 ± 0,67	33,33 ± 0,33
<i>C. neoformans</i> YP0186	42,33 ± 1,33	41,67 ± 0,88
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	43,00 ± 0,58	41,00 ± 0,58
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	17,67 ± 0,33	17,00 ± 0,58

^a Os resultados são expressos sob a forma diâmetros dos halos de inibição (mm). Os valores representam médias ± erros-padrão de 3 repetições.

Tendo em conta a elevada concentração de plumbagina nos extractos de *D. lusitanicum*, este poderá ser o composto responsável pela actividade antimicrobiana observada nesta espécie, à semelhança do que tem sido descrito noutras espécies (Didry *et al.*, 1998; Wang & Huang, 2005; Lim *et al.*, 2007). No entanto, convém lembrar que um extracto vegetal é uma mistura de vários compostos, alguns deles não identificáveis por GC-MS, que podem actuar sinergisticamente com a plumbagina e serem responsáveis pela actividade do extracto (Skočibušić *et al.*, 2006). Em trabalhos futuros, será importante isolar os diversos compostos do extracto, incluindo a plumbagina, e testá-los isoladamente.

5.3.3. Avaliação da capacidade insecticida

A avaliação da capacidade insecticida dos extractos de *D. lusitanicum* foi estudada em insectos de *L. trifolii*, por esta ser uma das principais pragas em fruticultura e horticultura ao ar livre e cultura protegida (Kaspi & Parrella, 2005) e por existirem trabalhos em curso na Universidade do Algarve com esta praga. O combate a esta praga

tem sido essencialmente efectuado recorrendo a insecticidas químicos, com todos os problemas ambientais e humanos que daí advêm. Assim, a pesquisa de insecticidas naturais para o combate efectivo de *L. trifolii* reveste-se de elevado interesse.

Os efeitos tóxicos do extracto de *D. lusitanicum*, avaliados por ensaios de contacto, em insectos de *L. trifolii* (Estampa 5.1 C) estão resumidos na Tabela 5.6. As percentagens de mortalidade nos ensaios controlo e controlo do solvente, ao longo do período do ensaio, foram muito baixas e significativamente inferiores às obtidas nos tratamentos com extracto ($P < 0,05$).

Tabela 5.6. Actividade insecticida de extractos de *D. lusitanicum* no combate de *L. trifolii*, utilizando o método de contacto.

Tratamento	Mortalidade (%)			
	Dias após o início do tratamento			
	1	2	3	7
<i>Controlo</i>	3 ± 1 d	4 ± 2 d	7 ± 1 c	30 ± 10 b
<i>Controlo do solvente</i>	3 ± 3 d	3 ± 3 d	3 ± 3 c	35 ± 14 b
<i>Extracto de plantas de campo (mg ml⁻¹)</i>				
100	100 ± 0 a	-	-	-
50	98 ± 2 a	100 ± 0 a	-	-
25	94 ± 0 a	100 ± 0 a	-	-
5	68 ± 11 b	80 ± 8 b	82 ± 9 a	96 ± 4 a
1	10 ± 3 c	10 ± 3 c	12 ± 2 bc	56 ± 14 b
<i>Extracto de rebentos a crescer in vitro (mg ml⁻¹)</i>				
100	100 ± 0 a	-	-	-
50	95 ± 5 a	100 ± 0 a	-	-

^a Os valores representam médias ± erros-padrão de 5 repetições com 10 insectos cada. Em cada coluna, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test).

Analisando os resultados obtidos com a utilização de extracto preparado a partir de folhas de plantas de campo verificou-se que, quando este foi aplicado na concentração mais elevada (100 mg ml^{-1}) 100% dos insectos morreram no final do primeiro dia de tratamento (Tabela 5.6). Diminuindo a concentração do extracto para 50 e 25 mg ml^{-1} a percentagem de mortalidade foi igualmente elevada no final do primeiro dia (98 e 94%, respectivamente) e foi de 100% no final do segundo dia. A toxicidade do extracto, baseada na percentagem de mortalidade, diminuiu significativamente para as concentrações de 5 e 1 mg ml^{-1} ($P < 0,05$). O extracto na concentração de 5 mg ml^{-1} só produziu o máximo de mortalidade, 96%, uma semana após o início do tratamento. Após o mesmo período o extracto a 1 mg ml^{-1} induziu apenas 56% de mortalidade, não sendo este valor significativamente diferente do obtido no tratamento controlo ($P \geq 0,05$).

Analisando os efeitos do extracto quando misturado com a dieta dos insectos (Figura 5.2), verificou-se que as percentagens de mortalidade, apesar de superiores ao controlo, não foram estatisticamente diferentes ($P \geq 0,05$). De salientar a grande variabilidade de resposta observada, que se traduziu em elevados valores de erros-padrão.

De facto, só ao fim do sétimo dia de tratamento é que as percentagens de mortalidade, de insectos em contacto com dieta tratada com extracto a 2,5 e 5 mg ml^{-1} , foram significativamente superiores ao controlo ($P < 0,05$), embora idênticas entre si ($P \geq 0,05$) (70% e 90%, respectivamente para o extracto a 2,5 e 5 mg ml^{-1}) (Figura 5.2).

As diferenças entre os resultados dos dois ensaios podem estar relacionadas com o modo de acção dos constituintes do extracto. O extracto misturado com a dieta pode ter causado um efeito repelente ou anti-alimentar, impedindo a ingestão da dieta. De facto o efeito repelente da plumbagina, o composto maioritário do extracto, foi anteriormente

referido por outros autores (Ganapaty *et al.*, 2004). Para comprovar esta suposição relativamente ao extracto de *D. lusitanicum*, teriam que ser efectuados estudos comportamentais dos insectos em contacto com dieta tratada com o extracto.

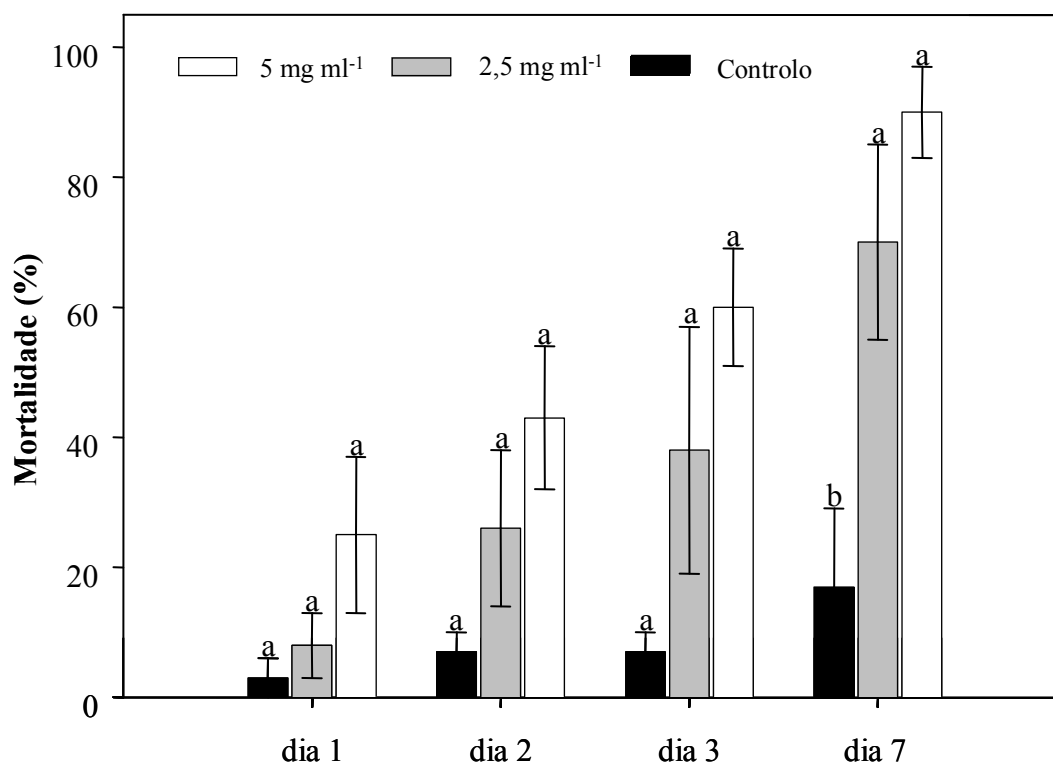


Figura 5.2. Percentagem de mortalidade de insectos de *L. trifolii* alimentados com dieta tratada com extracto preparado a partir de plantas de campo de *D. lusitanicum*. As barras verticais representam médias \pm erros-padrão de 5 repetições com 10 insectos cada. Para cada dia, letras diferentes representam médias significativamente diferentes para $P < 0,05$ (Duncan's Multiple Range Test).

À semelhança do efectuado relativamente à actividade antimicrobiana, também neste ensaio se avaliou a actividade insecticida do extracto preparado a partir de rebentos a crescer *in vitro*. Seleccionou-se o método de contacto por ser o mais simples e o que permitiu melhores resultados com a aplicação de extracto de plantas de campo, e testaram-se as concentrações mais elevadas (50 e 100 mg ml⁻¹). Os resultados obtidos (Tabela 5.6) permitiram verificar que este extracto possui uma actividade insecticida idêntica à observada com o extracto de plantas de campo ($P \geq 0,05$), comprovando,

mais uma vez, a validade da utilização das culturas *in vitro* para a extracção de compostos biologicamente activos de *D. lusitanicum*.

Os resultados obtidos, especialmente nos ensaios de contacto, permitem comprovar a actividade insecticida dos extracto de *D. lusitanicum*. Esta actividade é provavelmente devida à plumbagina, que é o principal composto do extracto utilizado e tem sido referenciado por outros autores como apresentando actividade insecticida (Rao *et al.*, 1996; Khambay & Jewess, 2000; Banerjee *et al.*, 2001; Kumar & Banerji, 2002), repelente (Ganapaty *et al.*, 2004) e anti-alimentação (Tokunaga *et al.*, 2004). No entanto, mais uma vez não se pode deixar de frisar que um extracto é uma mistura complexa de vários compostos, podendo haver efeitos quer sinérgicos quer antagónicos entre eles (Tewary *et al.*, 2005).

5.3.4. Efeitos alelopáticos de extractos aquosos de *D. lusitanicum*

Os efeitos negativos dos herbicidas químicos têm motivado a pesquisa de compostos alternativos e biodegradáveis (Dudai *et al.*, 1999). Para tal, o estudo do potencial alelopático de extractos vegetais e óleos essenciais é uma metodologia válida na procura destes agentes, uma vez que vários compostos produzidos pelas plantas actuam como aleloquímicos, afectando a germinação e/ou o crescimento das plântulas, a divisão celular, a síntese proteica, a actividade enzimática, entre outras.

De acordo com Vyvyan (2002) a metodologia utilizada na preparação dos extractos deve ser cuidadosamente seleccionada. A utilização de solventes orgânicos é seriamente questionada (Inderjit & Dakshini, 1995), sendo recomendado o uso de extractos aquosos uma vez que o efeito alelopático se deve principalmente a compostos solúveis em água (Vyvyan, 2002). O efeito alelopático é, geralmente, avaliado no laboratório recorrendo a

ensaios biológicos que visam avaliar o efeito do extracto na germinação e no crescimento das plântulas. Nestes ensaios devem incluir-se sempre espécies dicotilédneas e monocotilédneas (Dayan *et al.*, 2000), sendo a alface (*Lactuca sativa* L.) e o trigo (*Triticum aestivum* L.) duas espécies muito utilizadas como modelo nestes testes.

Relativamente aos ensaios com sementes de alface, a percentagem de germinação obtida no controlo foi de 98,5% (Figura 5.3) (Estampa 5.1D). À excepção dos extractos aquoso fresco a 2,5% e aquoso seco a 1% (com 97% e 96,5% de germinação, respectivamente), todos os extractos testados inibiram significativamente a germinação de sementes de alface ($P < 0,05$) (Figura 5.3). No ensaio realizado com extracto aquoso fresco (Figura 5.3A) verificou-se diminuição da percentagem de germinação para as concentrações de 5 (Estampa 5.1E) e 10%, com 76 e 21,5 % de germinação, respectivamente.

Em relação ao ensaio usando extracto aquoso seco (Figura 5.3B) três concentrações de extracto (2,5; 5 e 10%) (Estampa 5.1F) induziram uma diminuição significativa na percentagem de germinação ($P < 0,05$), atingindo-se praticamente 100% de inibição. Perante estes resultados podemos concluir que os extractos aquosos, em especial preparados com material foliar seco, apresentam elevado efeito alelopático.

As diferenças obtidas entre os dois tipos de extractos podem dever-se ao facto de no caso do extracto preparado com material seco, este ter sido moído, o que pode ter facilitado a extracção dos compostos. Assim, seria interessante testar extractos preparados com material foliar fresco moído.

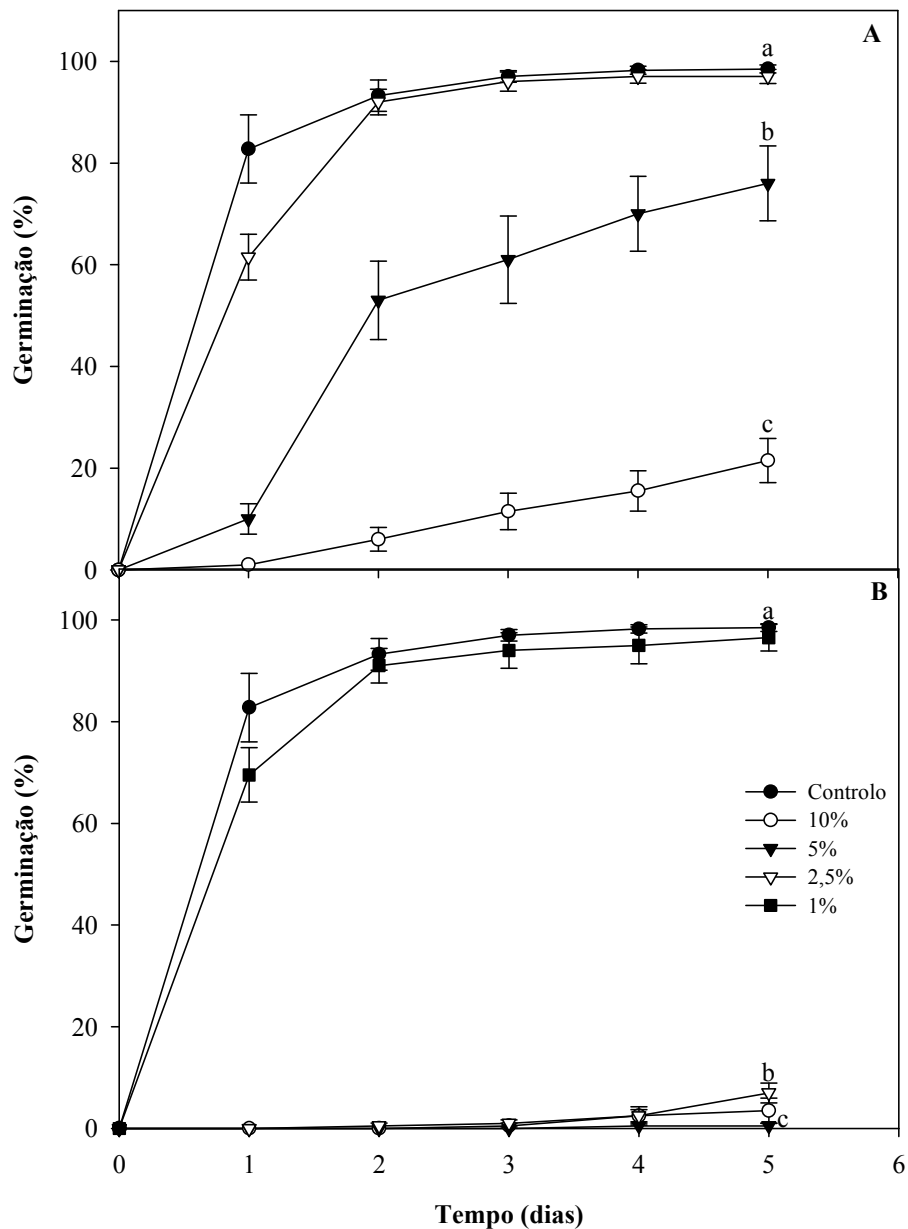


Figura 5.3. Comparação da taxa de germinação de sementes de alface tratadas com extractos aquosos preparados a partir de material foliar de *D. lusitanicum* fresco (A) ou seco (B), a várias concentrações (%). Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão de 10 repetições com 20 sementes cada. Em cada gráfico, ao quinto dia, valores assinalados com letras diferentes representam médias significativamente diferentes (Duncan's New Multiple Range Test, $P < 0,05$).

Uma vez que a fitotoxicidade de um extracto é avaliada não só pela inibição na germinação mas também pela sua capacidade de afectar o normal desenvolvimento das plântulas, nos extractos em que não houve inibição total da germinação, foram

estudados vários parâmetros de crescimento das plântulas para verificar se estes são afectados pelos extractos de *D. lusitanicum*. Estes parâmetros foram anteriormente analisados por diferentes autores e têm-se mostrado adequados neste tipo de estudos (Williams & Hoagland, 1982; Rice, 1984; Chon *et al.* 2005; Kim *et al.*, 2005; Bogatek *et al.*, 2006). O comprimento e o peso fresco da raiz de plântulas tratadas com diferentes concentrações de extractos aquosos preparados com material foliar fresco e seco (Figura 5.4) não foram significativamente diferentes do controlo ($P \geq 0,05$). No entanto, verificou-se que, plântulas desenvolvidas em contacto com extractos aquosos frescos a 5 e 10% e seco a 2,5 e 10%, apresentaram menor comprimento do caule ($P < 0,05$) (Figura 5.4). Relativamente ao peso fresco do caule, este só foi significativamente afectado pelo tratamento com extracto seco a 10%, observando-se valores significativamente inferiores ao controlo ($P < 0,05$) (Figura 5.4).

Analisando o efeito dos extractos de *D. lusitanicum* na germinação de sementes de trigo, verificou-se que o extracto preparado a partir de material foliar fresco não afectou a germinação das sementes. Além disso, nenhuma das concentrações de extracto aquoso com material seco testadas com a alface afectou significativamente a germinação de sementes de trigo, pelo que foram testadas duas concentrações superiores (20 e 30%).

Na Figura 5.5 apresentam-se os resultados obtidos quando se aplicou o extracto preparado a partir de material seco a 10, 20 e 30%. A menor sensibilidade das sementes do trigo à acção do extracto será devida às características das suas sementes, que apresentam um revestimento do embrião mais resistente comparativamente com o das sementes de alface. Pode verificar-se que para a concentração de extracto preparado a partir de material seco na concentração de 10% não se observou uma diminuição significativa ($P \geq 0,05$) da percentagem de germinação, 93%, percentagem semelhante ao controlo, 97,5% (Estampa 5.1G). É interessante comparar este valor com a

percentagem de germinação de 0,5% obtida com a mesma concentração de extracto (10%) no ensaio usando sementes de alface. Esta diferença vem confirmar as diferenças que existem entre os dois tipos de sementes.

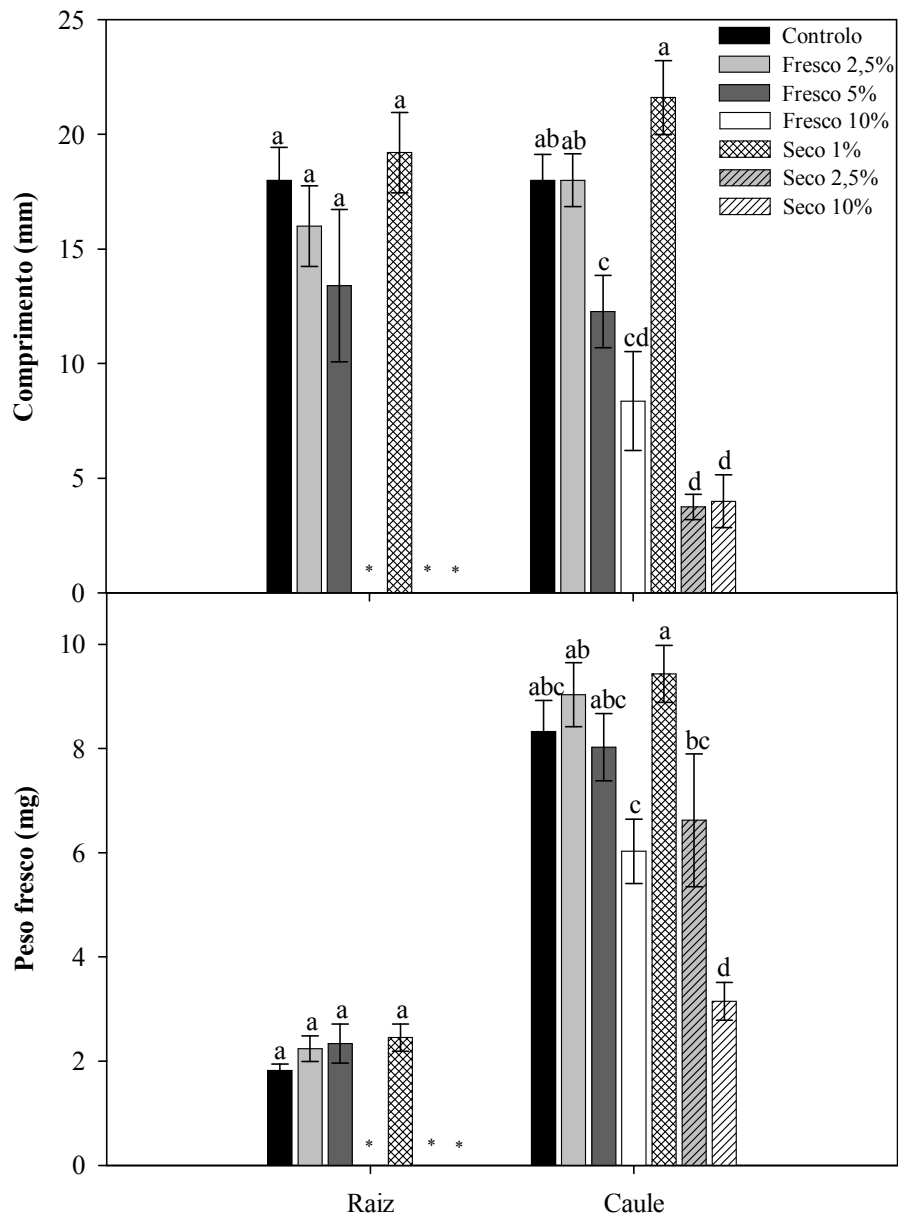


Figura 5.4. Comparação do comprimento e peso fresco do caule e da raiz de plântulas de alface desenvolvidas em contacto com extractos aquosos (fresco e seco) a várias concentrações. Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão de 10 repetições com 20 sementes cada. Em cada gráfico, para cada variável, barras assinaladas com letras diferentes representam médias significativamente diferentes (Duncan's New Multiple Range Test, $P < 0,05$). (*: devido às reduzidas dimensões das plântulas desenvolvidas na presença de algumas concentrações de extracto não foi possível, nesses casos, avaliar os parâmetros de crescimento pelo que, os valores não são apresentados nos gráficos)

Os testes realizados mostram que houve efectivamente uma diminuição da germinação com o aumento da concentração (Figura 5.5), verificando-se que o extracto nas concentrações de 20 e 30%, provocou uma diminuição significativa ($P < 0,05$) em relação ao controlo (83 e 59,5 % de germinação, respectivamente) (Estampa 5.1H,I).

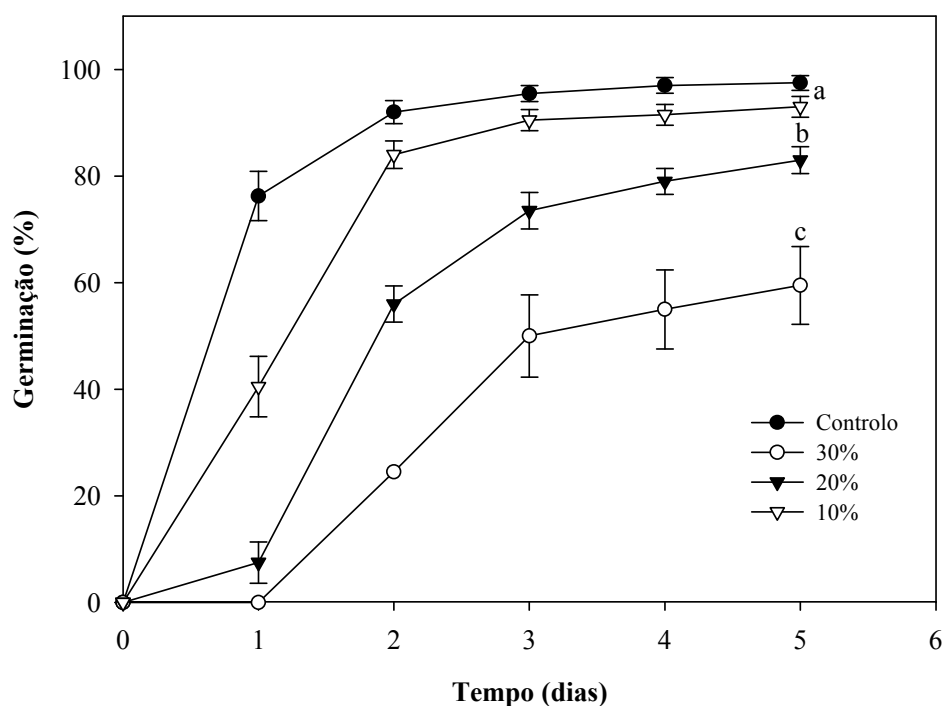


Figura 5.5. Comparação da taxa de germinação de sementes de trigo tratadas com extractos aquosos preparados a partir de material foliar de *D. lusitanicum* seco, a várias concentrações (%). Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão de 10 repetições com 20 sementes cada. Ao quinto dia, valores assinalados com letras diferentes representam médias significativamente diferentes (Duncan's New Multiple Range Test, $P < 0,05$).

Embora nenhuma das concentrações de extracto testadas tenha resultado em percentagens de inibição da germinação superiores a 40,5% (Figura 5.5), o extracto afectou consideravelmente os parâmetros de crescimento das plântulas desenvolvidas (Figura 5.6). À excepção do peso seco do caule e da raiz de plântulas do tratamento com 10 e 20% de extracto, todos os parâmetros avaliados foram significativamente afectados pelas concentrações de extracto testadas, incluindo a concentração de 10%, a qual não afectou significativamente a percentagem de germinação (Figura 5.6).

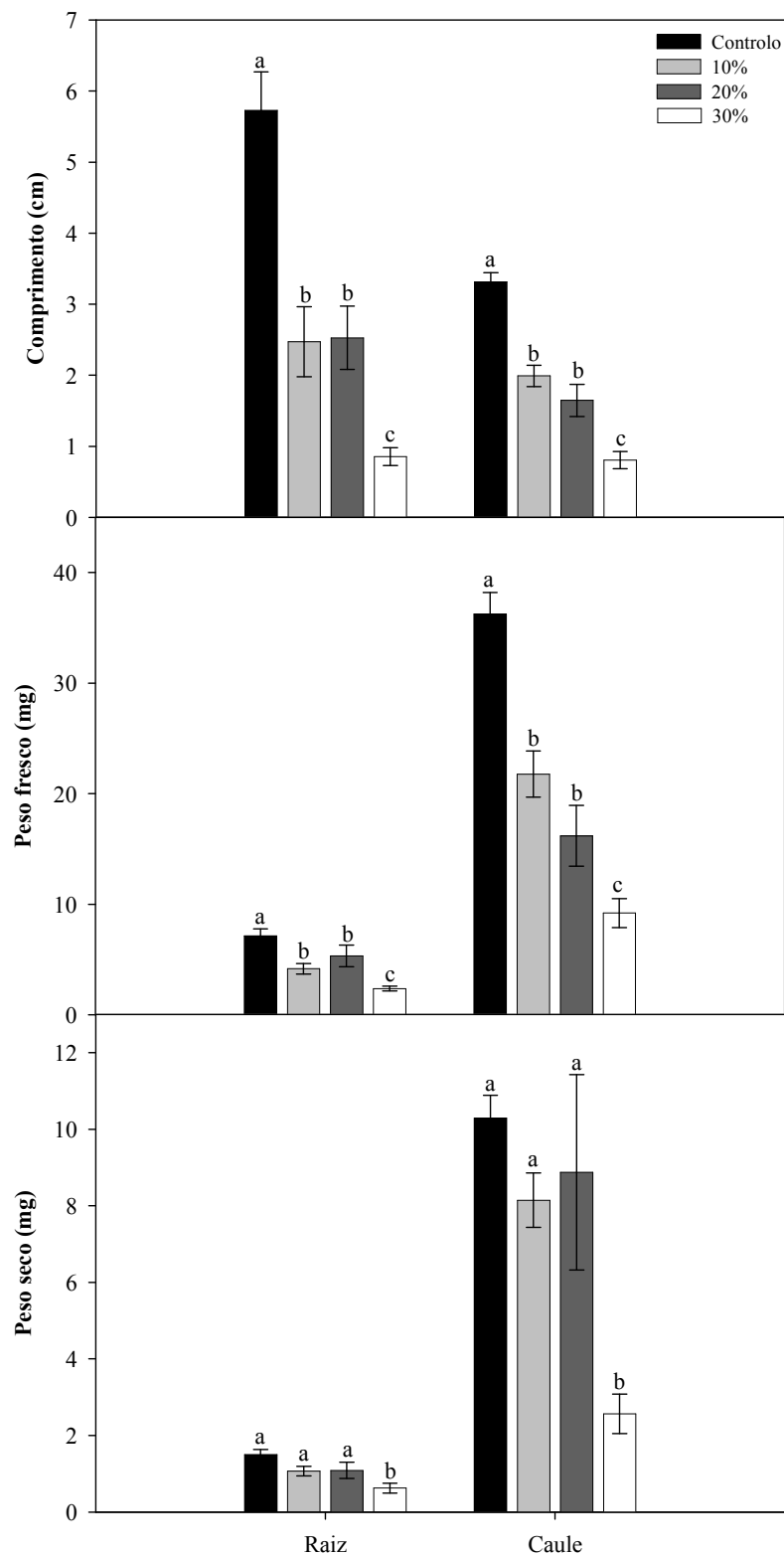


Figura 5.6. Comparação do comprimento e peso fresco do caule e da raiz de plântulas de trigo tratadas com extractos aquosos de *D. lusitanicum* a várias concentrações (%). Os resultados são apresentados sob a forma de médias \pm erros-padrão de 10 repetições com 20 sementes cada. Em cada gráfico, para cada variável, barras assinaladas com letras diferentes representam médias significativamente diferentes (Duncan's New Multiple Range Test, $P < 0,05$).

Os resultados obtidos permitem comprovar que o extracto de *D. lusitanicum* contém compostos com potencial alelopático, inibindo a germinação de sementes de alface e trigo e afectando o crescimento das plântulas. A resposta variou com a espécie, sendo a alface muito mais susceptível ao extracto. No caso do trigo, mesmo com concentrações de extracto mais elevadas, não se verificou 50% de inibição da germinação. No entanto, o crescimento das plântulas foi bastante afectado, o que também reflecte o potencial alelopático do extracto que não se deve restringir à inibição da germinação.

Além de afectar a germinação e o crescimento, os compostos aleloquímicos podem causar alterações fisiológicas e bioquímicas como peroxidação lipídica, alterações a nível da estrutura membranar (permeabilidade e fluidez), desestabilização dos lisossomas, indução de apoptose, entre outras. Assim, outros parâmetros poderão ser analisados no sentido de avaliar os efeitos alelopáticos do extracto, incluindo por exemplo a medição da condutividade, muito importante nos casos em que os aleloquímicos actuam ao nível da membrana celular, avaliação da eficiência fotossintética das plantas através de estudos de fluorescência ou quantificação da clorofila, etc.

Tendo em conta o efeito alelopático do extracto de *D. lusitanicum* que foi comprovado neste trabalho, em estudos futuros será relevante avaliar este efeito nas sementes da própria espécie. Estes estudos poderiam esclarecer se existe um mecanismo de competição intraespecífico mediado pela libertação de fitotóxicos, como sugerido por Correia & Freitas (2002).

5.3.5. Optimização da extracção de plumbagina

Comprovada a actividade biológica dos extractos desta espécie e, sendo a plumbagina o composto maioritário dos extractos hexânicos, supõe-se que seja este o composto responsável por aquela actividade. Embora não esquecendo que esta espécie produz outros compostos biologicamente activos conhecidos pela sua elevada actividade biológica (Budzianowski *et al.*, 2002) foram estudados vários factores envolvidos no processo de extracção de plumbagina, no sentido de otimizar a sua extracção a partir de folhas de *D. lusitanicum*. Os resultados obtidos para os diferentes procedimentos de extracção, foram comparados com os obtidos no extracto descrito anteriormente, preparado por extracção estática com hexano (Tabela 5.7).

O rendimento da extracção ou seja, a quantidade de extracto obtida a partir do material vegetal inicial, foi, para qualquer dos procedimentos, superior ao valor obtido por extracção estática, sendo esse rendimento mais elevado quando se efectuou a extracção a partir de material foliar fresco. Em cada método de extracção verificou-se um aumento do rendimento de extracção com o aumento da polaridade do solvente, exceptuando o ensaio realizado com material seco extraído por extracção Soxhlet com clorofórmio (Tabela 5.7). Estes resultados parecem indicar que a maior parte dos componentes da planta têm maior afinidade para solventes polares (Grigonis *et al.*, 2005). A extracção com metanol permitiu obter os valores de rendimento de extracção mais elevados, sendo de 14,78 e 18,44% nos ensaios realizados a partir de material foliar fresco e 6,56 e 4,17% a partir de material seco, por extracção Soxhlet e EAU, respectivamente (Tabela 5.7). Pelo contrário, de uma maneira geral, o hexano foi o solvente onde se obtiveram rendimentos de extracção mais baixos (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Comparação de vários procedimentos de extracção a partir de folhas de plantas de campo de *D. lusitanicum*.

Amostra	Processo de extracção	Solvente	Rendimento de extracção (% p/p)	mg de plumbagina / ml de extracto	mg de plumbagina / g peso fresco de folha
Fresco	Soxhlet	Metanol	14,78	0,24	0,69
		Clorofórmio	3,83	4,17	3,21
		Hexano	0,83	14,81	2,42
	EAU	Metanol	18,44	0,98	3,53
		Clorofórmio	1,17	6,55	1,54
		Hexano	0,78	10,49	1,52
Seco	Soxhlet	Metanol	6,56	0,46	0,54
		Clorofórmio	0,67	3,54	0,47
		Hexano	0,78	2,69	0,39
	EAU	Metanol	4,17	0,38	0,31
		Clorofórmio	3,44	0,65	0,47
		Hexano	0,88	0,80	0,14
Seco	Estática	Hexano	0,6	5,50	0,66

Embora a caracterização química detalhada dos extractos obtidos não tenha sido um dos objectivos propostos para este trabalho, verificou-se que para além da plumbagina foram também identificados o neofitadieno, o ácido palmítico e a droserona, em quantidades apreciáveis. A quantidade de compostos extraída foi inferior quando a extracção foi realizada a partir de material seco. Comparando a extracção Soxhlet e a EAU, as diferenças não foram relevantes. No entanto, a composição dos extractos obtidos foi mais complexa usando EAU. A extracção Soxhlet é promovida apenas por fenómenos de transferência de massa em que a afinidade do solvente para um determinado composto é preponderante, enquanto que na EAU a ruptura celular e a agitação provocada no sistema leva à recuperação de uma quantidade superior de componentes. A escolha do solvente foi determinante para o sucesso do protocolo de extracção, tendo os extractos preparados segundo o mesmo protocolo, com solventes diferentes, composições distintas.

Para averiguar qual o método que garante a maior recuperação de plumbagina a partir de folhas de *D. lusitanicum*, ressuspenderam-se os extractos à mesma concentração, 50 mg de extracto seco por ml de hexano. Verificou-se que a quantidade de plumbagina nos extractos resultantes da extracção realizada a partir de material fresco foi superior à obtida com material seco (Tabela 5.7), o que poderá indicar a sua susceptibilidade ao processo de secagem.

Relativamente aos solventes, ao contrário do que se verificou no rendimento de extracção, a polaridade do solvente tem uma influência inversa na concentração de plumbagina. As concentrações mais elevadas de plumbagina foram obtidas nas extracções com hexano, o que poderá indicar uma maior afinidade da plumbagina para solventes apolares. O anel aromático e a ausência de grupos radicais fortes na estrutura molecular da plumbagina contribuem para a insolubilidade relativa em solventes

polares. Os extractos mais concentrados em plumbagina foram os obtidos a partir de material fresco utilizando hexano como solvente extractante, com 14,81 e 10,49 mg ml⁻¹ respectivamente para Soxhlet e EAU. Estes métodos permitem obter extractos mais concentrados que os obtidos no extracto inicial por extracção estática a partir de material seco.

Relativamente aos métodos de extracção não se observaram diferenças significativas, verificando-se que em alguns ensaios a extracção Soxhlet supera a EAU e noutros se verifica o contrário. Não se pode, contudo, excluir a possibilidade de a não linearidade nos resultados se dever a algumas condições experimentais, nomeadamente, a reduzida dimensão da amostra utilizada. Deve ser também realçado, o facto de o trabalho ter sido realizado com amostras de material de campo podendo existir variações entre as amostras no teor em água, perfil genético e idade do material utilizado.

Analisando a quantidade de plumbagina efectivamente recuperada verifica-se que os resultados obtidos não são proporcionais à concentração dos extractos em plumbagina (Tabela 5.7), ou seja, o procedimento que permite obter os extractos mais concentrados em plumbagina não é o que permite recuperar o máximo de plumbagina a partir de 1 g de peso fresco foliar. Por análise dos traçados de corrente iónica verifica-se que, enquanto que os extractos obtidos com o metanol e o clorofórmio são diluídos com outras substâncias também extraídas, os extractos obtidos com hexano têm essencialmente plumbagina na sua composição. Assim, sendo o objectivo deste trabalho incrementar a extracção de plumbagina, dos métodos testados o mais eficaz parece ser a extracção Soxhlet a partir de material fresco e utilizando hexano como solvente extractante.

Marckzak *et al.* (2005) realizaram um estudo exaustivo com espécies pertencentes ao género *Drosera* cultivadas *in vitro*, tendo observado os níveis mais elevados de

plumbagina em *D. binata*, com um rendimento de extracção de plumbagina de 0,059% por EAU. Neste trabalho, para um ensaio semelhante obteve-se um rendimento de 0,35% a partir de amostras de *D. lusitanicum*, comprovando os elevados níveis de produção de plumbagina na espécie. Os resultados obtidos permitiram aumentar a eficiência de extracção de plumbagina. Com base nestes resultados seria interessante efectuar extracção deste composto a partir de rebentos desta espécie a crescer *in vitro*, que como já foi demonstrado, são uma alternativa válida ao uso de exemplares de campo.

5.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo pretendeu-se estudar a actividade biológica de extractos de *D. lusitanicum* e efectuar ensaios preliminares de avaliação fitoquímica e biológica de rebentos a crescer *in vitro*. Dada a inexistência de trabalhos prévios, optou-se por efectuar estes estudos em plantas de campo, tendo contudo o cuidado de não comprometer a sobrevivência da população amostrada. O passo inicial consistiu na preparação de extractos a partir de material foliar, que foram analisados por GC-MS e revelaram ser maioritariamente constituídos pela naftoquinona plumbagina.

A actividade antimicrobiana do extracto de *D. lusitanicum* foi comprovada através da inibição do crescimento de várias bactérias e leveduras patogénicas, incluindo estirpes catalogadas e isoladas clinicamente. Verificou-se também que este extracto possui propriedades insecticidas contra adultos de *L. trifolii*, uma importante praga agrícola. A actividade antimicrobiana e insecticida foram ainda comprovadas em extractos preparados a partir de rebentos a crescer *in vitro*. Este resultado aliado à multiplicação *in vitro* em larga-escala poderá permitir a exploração das propriedades biológicas desta

espécie, não comprometendo a sobrevivência das suas populações. Neste capítulo foram também demonstrados os efeitos alelopáticos dos extractos aquosos preparados a partir de material foliar desta espécie, avaliados pelos efeitos negativos na germinação de sementes de alface e trigo e no crescimento das plântulas.

Sendo a plumbagina o composto maioritário presente nesta espécie e, estando a sua actividade biológica largamente referenciada, presume-se que seja este o composto responsável pelas actividades biológicas observadas. No sentido de otimizar a extracção deste composto foram estudados vários factores envolvidos nesse processo, tendo-se concluído que a extracção a partir de material vegetal fresco, utilizando a extracção Soxhlet e o hexano como solvente, permitem recuperar elevadas quantidades de plumbagina. Tendo em conta a existência de outros compostos de interesse nesta espécie, nomeadamente fenóis e flavonóides, normalmente extraídos com metanol, torna-se importante o aprofundamento do seu estudo, incluindo a avaliação da actividade biológica da fracção metanólica. No entanto, como tem sido referido ao longo deste capítulo, não se pode excluir o facto de as actividades observadas serem relativas à interacção dos vários constituintes do extracto, não se restringindo somente à plumbagina. Além disso, sendo a GC-MS uma técnica indicada para analisar compostos que volatilizam facilmente, não permitindo identificar a totalidade dos compostos presentes nos extractos, será importante uma futura caracterização químicas dos extractos desta espécie, recorrendo a outras técnicas analíticas.

Os resultados aqui obtidos permitem comprovar a actividade biológica de *D. lusitanicum*, tornando-a numa espécie com potencial para exploração na área médica, farmacológica e da agro-química, salientando a necessidade da sua conservação. No entanto, para que tal aconteça será necessário avaliar a toxicidade do extracto, nomeadamente para o homem e outros mamíferos.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abudulai M, Shepard BM, Mitchell PL 2001. Parasitism and predation on eggs of *Leptoglossus phyllopus* (L.) (Hemiptera: Coreidae) in Cowpea: Impact of *Endosulfan Sprays*. Journal of Agricultural and Urban Entomology 18: 105-115
- Balunas M, Kinghorn A 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences 78: 431-441
- Banerjee S, Magdum S, Kalena GP, Banrji A 2001. Insect growth regulatory activity of naturally occurring quinones and their derivatives in *Dysdercus koenigii* Fabr (Hem., Pyrrhocoridae). Journal of Applied Entomology 125: 25-30
- Barbour EK, Al Sharif M, Sagherian VK, Habre AN, Talhouk RS, Talhouk SN 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial acitivity. Journal of Ethnopharmacology 93: 1-7
- Barnes J, Andreson LA, Phillipson JD 2001. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology 53: 583-600
- Ben-Hammouda M, Ghorbal H, Kremer RJ, Oueslati O 2001. Allelopathic effects of barley extracts on germination and seedlings growth of bread and durum wheats. Agronomie 21: 65-71
- Bhowmik PC, Inderjit 2003. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. Crop Protection 22: 661-671
- Bogatek R, Gniazdowska A, Zakzewska W, Oracz K, Gawroński SW 2006. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. Biologia Plantarum 50: 156-158
- Bruneton J 1995. Phenols and Phenolic acids Em: Bruneton J (ed.), Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants, Lavoisier Press, EUA
- Budzianowski J 2000. Naphthoquinone glucosides of *Drosera gigantea* from *in vitro* cultures. Planta Medica 66: 667-669
- Budzianowski J, Budzianowska A, Kromer K 2002. Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and *callus* cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. Phytochemistry 61: 421-425

- Charleston D, Kfir R, Dicke M, Vet LEM 2005. Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. *Biological Control* 33: 131-142
- Chon S-U, Jang H-G, Kim D-K, Kim Y-M, Boo H-O, Kim Y-J 2005. Allelopathic potencial in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Scientia Horticulturae* 106: 309-317
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 213-220
- Correia E, Freitas H 2002. *Drosophyllum lusitanicum*, an endangered West Mediterranean endemic carnivorous plant: threats and its ability to control available resources. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 383-390
- Daud A, Gallo A, Riera S 2005. Antimicrobial properties of *Phrygilanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 193-197
- Dayan FE, Romagni JG, Duke SO 2000. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2079-2094
- Didry N, Dubreuil L, Trotin F, Pinkas M 1998. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 60: 91-96
- Dudai N, Poljakoff-Mayber A, Mayer AM 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1079-1089
- Eloff JN 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711-713
- Essawi T, Srour M 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 343-349
- Ganapaty S, Thomas PS, Fotso S, Laatsch H 2004. Antitermic quinines from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry* 65: 1264-1271
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* 264: 371-373
- Godfrey CRA 1994. *Agrochemicals from Natural Products*. Marcel Dekker, New York

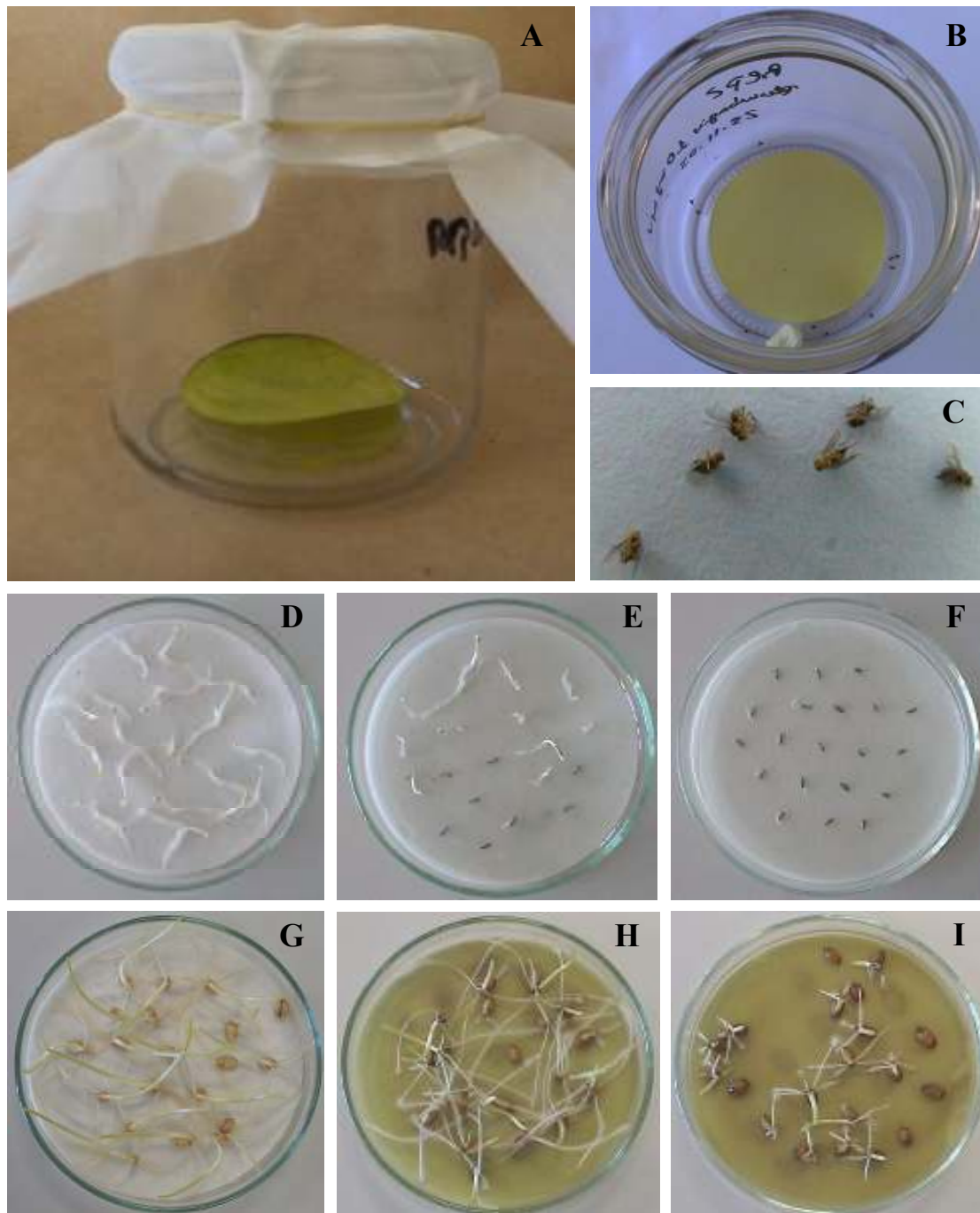
- Grigonis D, Venskutonis P, Sivik B, Sandahl M, Eskilsson C 2005. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloa odorata*). *Journal of Supercritical Fluids* 33: 223-233
- Han MK, Kim SI, Ahn YJ 2006. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Products Research* 42: 15-22
- Harborne JB 1984. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, Londres
- Hernández T, Canales M, Avila JG, García AM, Martínez A, Caballero J, Romo de Vilar A, Lira R 2005. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 96: 551-554
- Hook ILI 2001. Naphthoquinone contents of *in vitro* cultured plants and cell suspensions of *Dionaea muscipula* and *Drosera* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67: 281-285
- Inderjit, Dakshini KMM 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *Botanical Review* 61: 28-44
- Itoigawa M, Takeya K, Furukawa H 1991. Cardiotoxic action of plumbagin on guinea-pig papillary muscle. *Planta Medica* 57: 317-319
- Jayasekara TK, Stevenson PC, Hall DR, Belmain S-R 2005. Effect of volatile constituents from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain. *Journal of Chemical Ecology* 31: 303-311
- Kaspi R, Parrella MP 2005. Abamectin compatibility with the leafminer parasitoid *Diglyphus isaea*. *Biological Control* 35: 172-179
- Kavimani S, Ilango R, Madheswaran M, Jayakar B, Gupta M, Majumdar U 1996. Antitumour activity of plumbagin against Dalton's ascitic lymphoma. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 58: 194-196
- Khambay BPS, Jewess P 2000. The potential of natural naphthoquinones as the basis for a new class of pest control agents – an overview of research at IACR-Rphtamsted. *Crop Protection* 19: 597-601

- Kim S-I, Roh JY, Kim DH, Lee HS, Ahn YJ 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research* 39: 293-303
- Kim Y, Johson JD, Lee EJ 2005. Phytotoxicity of *Phytolacca americana* leaf extracts on the growth, and physiological response of cassia mimosoides. *Journal of Chemical Ecology* 31: 2963-2974
- Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 309-312
- Kumar MAS, Banerji A 2002. Growth disruption in *Opisina arenosilla* Walker by plumbagin, a naturally occurring insect growth regulator. *Insect Science and its Application* 22: 321-323
- Kurz W, Constabel F 1998. Production of secondary metabolites. Em: Altman A (ed.), *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc, New York
- Likhitwitayawuid K, Kaeamatawong R, Ruangrunsi N, Krungkrai J 1998. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Medica* 64: 237-241
- Lim M-Y, Jeon JH, Jeong EY, Lee CH, Lee HS 2007. Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacterial. *Food Chemistry* 100: 1254-1258
- Liu CH, Mishara AK, Tan RX, Tang C, Yang H, Shen YF 2006. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology* 97: 1969-1973
- Madignan MT, Martinko JM 2006. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.), Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey
- Marczak L, Kawiak A, Lojkowska E, Stobiecki M 2005. Secondary Metabolites in *in vitro* Cultured Plants of the Genus *Drosera*. *Phytochemical Analysis* 16: 143-149
- Min B, Miyashiro H, Hattori M 2002. Inhibitory effects of quinones on RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. *Phytotherapy Research* 16: 57-62

- Motsei ML, Lindsey KL, Van Staden J, Jaeger AK 2003. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology 86: 235-241
- Nahálka J, Blanárik P, Gemeiner P, Matúšová E, Partlová I 1996. Production of plumbagin by cell suspension cultures of *Drosophyllum lusitanicum* Link. Journal of Biotechnology 49: 153-161
- Naresh R, Udupa N, Devi P 1996. Niosomal plumbagin with reduced toxicity and improved anticancer activity in BALB/C mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology 48: 1128-1132
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 6th ed. Approved Standard. M2-A6, Wayne Pa
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 9th International Supplement. M100-S9, Wayne Pa
- Palombo EA, Semple SJ 2001. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 77: 151-157
- Park IK, Lee SG, Choi DH, Park JD, Ahn IJ 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). Journal of Stored Products Research 39: 375-384
- Pascual-Villalobos MJ, Robledo A 1998. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. Industrial Crops and Products 8: 183-194
- Péres V, Saffi J, Melecchi M, Abad F, Jacques R, Martinez M, Oliveira E, Caramão E 2006. Comparison of Soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. Journal of Chromatography A 1105: 115-118
- Pérez-Leal R, García-Mateos MR, Vázquez-Rojas TR, Colinas-León MT 2005. Allelopathic potential of *Petiveria alliacea* L. Agronomy for Sustainable Development 25: 177-182

- Rao JV, Screenivasan C, Makkapati AK 1996. Plumbagin effect on growth and metamorphosis of housefly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *International Pest Control* 38: 24-25
- Rao RS, Ravishankar GA 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153
- Rice EL 1984. *Allelopathy* (2nd ed), Academic Press, New York
- Sader HS, Jones RN, Silva JB 2002. Skin and soft tissue infections in Latin American Medical Centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagnostic Microbiology of Infectious Diseases* 44: 281-288
- Sajan D, Laladhas K, Joe I, Jayakumar V 2005. Vibrational spectra and density functional theoretical calculations on the antitumor drug, plumbagin. *Journal of Raman Spectroscopy* 36: 1001-1011
- Satheeshkumar K, Seeni S 2003. *In vitro* mass multiplication and production of roots in *Plumbago rosea*. *Planta Medica* 69: 83-86
- Schmutterer H 1997. Side-effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. *Journal of Applied Entomology* 121: 121-128
- Scrivanti LR, Zunino MP, Zygadlo JA 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*: 563-572
- Senthil Nathan S, Kalaivani K 2005. Efficacy of nucleopolyhedrovirus (NPV) and azadirachtin on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 34: 93-98
- Skočibušić M, Bezić N, Dunkić V 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry* 96: 20-28
- Somchit MN, Reezal I, Nur E, Mutalib AR 2003. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 1-4
- Sugie S, Okamoto K, Rhaman K, Tanaka T, Kawai K, Yamahara J, Mori H 1998. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters* 127: 177-183

- Tadeg H, Mohammed E, Asres K, Gebre-Mariam T 2005. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 168-175
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90: 333-340
- Tewary DK, Bhardwaj A, Shanker A 2005. Pesticidal activities in five medicinal plants collected from mid hills of western Himalayas. *Industrial Crops Products* 22: 241-247
- Tokunaga T, Takadab N, Ueda M 2004. Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plants. *Tetrahedron Letters* 45: 7115-7119
- Vyvyan JR 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58: 1631-1654
- Wang YC, Huang TL 2005. High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. *Journal of Chromatography A* 1094: 99-104
- Williams RD, Hoagland RE 1982. The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Science* 30: 206-212
- Wink M 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. Em: van Beek TA, Breteler H (eds.), *Phytochemistry and Agriculture*, vol. 34, Clarendon, Oxford, UK
- Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada-Pérez L, López-Villafranco E, Múnize EE, Aguilar A, Reyes-Chilpa R 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 293-299
- Zacchino SA 2001. Estrategia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. Em: Yunes RA, Calixto JB (eds.), *Plantas medicinais sob a óptica da moderna química medicinal*, Chapecó, Argos



Estampa 5.1. Diversos aspectos dos ensaios de avaliação do efeito insecticida e alelopático do extracto de *D. lusitanicum*. (A, B) Aspecto dos recipientes utilizados para realizar os ensaios de contacto; (C) aspecto dos insectos de *L. trifolii* mortos após o tratamento; (D, E e F) sementes e/ou plântulas de alface no tratamento controlo, em contacto com o extracto aquoso fresco a 5% e aquoso seco a 2,5%, respectivamente; (G, H e I) sementes e/ou plântulas de trigo no tratamento controlo, em contacto com extracto aquoso seco a 20 e 30%, respectivamente.

Estampa 5.2. Aspecto dos halos de inibição formados pelo extracto de *D. lusitanicum* e pelos antibióticos controlo em alguns microrganismos estudados para avaliar a capacidade antimicrobiana do extracto. (A) *C. albicans* ATCC 10231, extracto (e), controlo do solvente, DMSO e solução salina; (B) *C. albicans* ATCC 10231, anfotericina B (a) e nistatina (n); (C) *C. guilliermondi* YP0170, extracto (e), controlo do solvente, DMSO e solução salina; (D) *C. guilliermondi* YP0170, fluconazol (f) e nistatina (n); (E) *S. epidermidis* ATCC 12228, extracto (e), controlo do solvente e solução salina; (F) *S. epidermidis* ATCC 12228, gentamicina (g), ciprofloxacina (c) e cloranfenicol (cl).

CONCLUSÕES GERAIS

D. lusitanicum é uma espécie insectívora endémica do Oeste da Península Ibérica e Norte de Marrocos com uma biologia muito peculiar e com características singulares, sendo uma das poucas espécies da região Mediterrânica pertencente a uma família monotípica. Apesar do seu interesse esta espécie tem sido pouco estudada. Em alguns dos trabalhos publicados foi realçada a necessidade de implementar estratégias de conservação para a espécie dada a regressão ocorrida na sua distribuição nos últimos anos. Este trabalho foi levado a cabo com o intuito de aumentar o conhecimento científico nesta espécie e contribuir para a implementação de estratégias para a sua conservação.

Vários autores têm realçado a importância da aplicação de estratégias complementares para a conservação dos recursos fitogenéticos. Assim, no início deste trabalho foram planeadas várias estratégias de conservação *ex situ* para *D. lusitanicum*, passando pela restauração de populações, mediante a re-introdução de plantas produzidas *ex situ* e pelo desenvolvimento de protocolos para a conservação de germoplasma *ex situ*. A primeira estratégia, que tem sido considerada uma ferramenta válida na conservação de espécies ameaçadas de extinção, implicava a existência de um protocolo eficiente de propagação de plantas desta espécie. Não se conhecendo nenhuma forma de propagação vegetativa desta espécie, a única via era a via seminal. No contexto da conservação as sementes são o material de propagação preferencial, visto que a variabilidade genética é incrementada. Assim, dando cumprimento ao primeiro objectivo deste trabalho no

Capítulo II foi desenvolvido um protocolo de propagação *in vitro* para esta espécie a partir da germinação de sementes. A aplicação das técnicas de cultura *in vitro*, permitindo a multiplicação ilimitada de rebentos a partir de um explantado inicial, permite a propagação de plantas em larga escala. Além disso, a cultura *in vitro* permite ainda a conservação de germoplasma.

Optimizada a metodologia para produzir plantas, tornava-se essencial conhecer aspectos relacionados com a variabilidade e estrutura genética de populações, no sentido de usar essas informações na implementação dos protocolos de propagação e das estratégias de re-introdução de plantas no habitat natural. Embora fosse da maior importância, neste trabalho não se pretendeu fazer um estudo exaustivo de caracterização genética de populações, que implicaria o estudo de populações abrangendo toda a área de distribuição da espécie.

No Capítulo III estudou-se a variabilidade genética de populações Algarvias, avaliou-se o nível de diferenciação entre estas populações e comparou-se a variabilidade e estrutura genética destas populações com uma população localizada no Parque Natural ‘Los Alcornocales’ no Sul de Espanha. Comparou-se a variabilidade genética de indivíduos adultos e plântulas provenientes da germinação *in vitro* de sementes da mesma população, no sentido de averiguar a situação actual da espécie e inferir se plantas provenientes da germinação de sementes serão adequadas para utilizar na restauração de populações. Os marcadores moleculares ISSR permitiram detectar elevado nível de polimorfismo e diferenciação genética entre as várias populações. Ao nível populacional o polimorfismo obtido foi baixo em especial nas populações de Monchique 2, Algoz, Barranco do Velho e Albufeira, sendo estas as populações com maior urgência de conservação. No entanto, dado o considerável nível de estruturação das populações conclui-se que devem ser conservadas o maior número possível de

populações. Pela mesma razão a recolha de sementes para produção de plantas para re-introdução deve ser efectuada no maior número de populações possível, no sentido de recolher o máximo de variabilidade. Quando se analisou a variabilidade genética de plântulas provenientes da germinação de sementes verificou-se perda de variabilidade em relação aos adultos. Este resultado põe em causa a utilização das sementes para produção de plantas para re-introdução, no entanto, analisando as plântulas das três populações em conjunto verifica-se um incremento de polimorfismo. Assim, sugere-se que o protocolo de propagação *in vitro* desenvolvido no Capítulo II seja aplicado para produzir plantas em larga escala a partir de uma mistura de sementes recolhidas no máximo de populações possível, garantindo assim uma maior variabilidade.

No Capítulo IV testaram-se duas técnicas de conservação de germoplasma de *D. lusitanicum*, a conservação de rebentos *in vitro* em condições mínimas de crescimento e a criopreservação de sementes. Ambas permitem a conservação de material a utilizar para produção de plantas quando necessário. A primeira permite a conservação de rebentos por períodos até 8 meses sem que haja perda da capacidade multiplicativa das culturas. A criopreservação de sementes não reduziu a sua capacidade germinativa permitindo, teoricamente, a sua conservação por longos períodos de tempo. De acordo com os resultados obtidos no Capítulo III estes protocolos deverão ser aplicados na conservação de germoplasma do maior número de populações no sentido de assegurar a conservação do máximo de variabilidade.

No Capítulo V foi comprovada a actividade antimicrobiana do extracto de *D. lusitanicum* através da inibição do crescimento de várias bactérias e leveduras patogénicas, incluindo estirpes catalogadas e isoladas clinicamente. Verificou-se também que este extracto possui propriedades insecticidas contra adultos de *L. trifolii*, uma importante praga agrícola. Neste capítulo foram também demonstrados os efeitos

alelopáticos dos extractos aquosos preparados a partir de material foliar desta espécie, avaliados pelos efeitos negativos na germinação de sementes de alface e trigo e no crescimento das plântulas. Os extractos hexânicos preparados a partir de material foliar de plantas a crescer no ambiente natural e de rebentos a crescer *in vitro* foram analisados por GC-MS, identificando-se como principal composto a naftoquinona plumbagina. A extracção deste composto foi otimizada, com vista ao aumento da sua recuperação a partir de *D. lusitanicum* para futuras aplicações. Os resultados obtidos neste capítulo sugerem que esta espécie poderá ter aplicações a nível médico e/ou agroquímico, reforçando a importância da sua conservação. As propriedades antimicrobina e insecticida de rebentos a crescer *in vitro* foram também comprovadas, o que permite a exploração das propriedades biológicas desta espécie sem comprometer a sobrevivências das suas populações.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as técnicas de cultura *in vitro* são uma ferramenta útil na elaboração de estratégias de conservação para a espécie *D. lusitanicum*. Estas técnicas permitem a propagação de plantas *ex situ* em larga escala e permitem a conservação de germoplasma desta espécie. O material conservado recorrendo às técnicas estudadas neste trabalho, constituirá uma reserva de germoplasma que para além de poder vir a ser usado para fins científicos, pode ser utilizado na restauração de habitats e re-introdução ou reforço de populações já existentes. Neste contexto, a conservação e utilização do germoplasma permite intervir em acções que visem a minimização da perda do património genético existente. Os estudos de diversidade genética recorrendo a marcadores moleculares são um componente importante na elaboração de estratégias de conservação para plantas raras. Neste trabalho o recurso a marcadores ISSR permitiu a obtenção de informações

importantes para a implementação de medidas de conservação para a espécie *D. lusitanicum*.

Com o presente trabalho pensa-se que foram abertos alguns caminhos na investigação desta espécie. Com a implementação das estratégias de conservação aqui propostas espera-se ter contribuído para garantir o futuro desta importante espécie da flora Ibero-Marroquina.

ANEXOS

Composição basal do meio MS (Murashige & Skoog, 1962)

Componente	mg l⁻¹
<i>Macronutrientes</i>	
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
<i>Micronutrientes</i>	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
H ₃ BO ₃	6,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KI	0,83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
<i>Fonte de ferro</i>	
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
<i>Aditivos</i>	
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Tiamina.HCl	0,1
Glicina	2
Agar	7000
Sacarose	20000

Matriz de distâncias da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA

	M52	M53	M54	M55	M72	M59	M73	M65	M62	M64	M63	M67	BIN3	BIN4	ALG3	ALG8	ALG12	ALG1	ALG4	ALG17	ALG7	ALG2	BV36	ALB38	ALB41	ALB44	E1	E2	E3	E6	E7	E4	E5			
M52																																				
M53	0.02																																			
M54	0.02	0.02																																		
M55	0.02	0.01	0.02																																	
M72	0.01	0.02	0.01	0.02																																
M59	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01																															
M73	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01	0.01																														
M65	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01																													
M62	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01																											
M64	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01																										
M63	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02																									
M67	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00																								
BIN3	0.44	0.44	0.46	0.46	0.44	0.43	0.44	0.44	0.45	0.44	0.44	0.44																								
BIN4	0.43	0.44	0.45	0.45	0.44	0.43	0.43	0.43	0.44	0.43	0.44	0.43	0.01																							
ALG3	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.44	0.44																						
ALG8	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.44	0.44	0.00																					
ALG12	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.45	0.45	0.01	0.01																				
ALG1	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.44	0.44	0.00	0.00	0.01																			
ALG4	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.43	0.42	0.01	0.01	0.02	0.01																		
ALG17	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.45	0.44	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02																	
ALG7	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.44	0.43	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01																
ALG2	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.44	0.43	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00															
BV36	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.44	0.44	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01														
ALB38	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.44	0.43	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00													
ALB41	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.44	0.44	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01												
ALB44	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.45	0.44	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00										
E1	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.44	0.44	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		
E2	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.44	0.44	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	
E3	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.45	0.44	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.01	
E6	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.44	0.43	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
E7	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.44	0.43	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	
E4	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.44	0.43	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
E5	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.44	0.43	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01		