

DL 04.ABR2001*193028

UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Estudo da variabilidade de
Asplenium hemionitis L. (Aspleniaceae)
em Portugal

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra no âmbito do Mestrado em Biologia Vegetal

Cecília José Rodrigues Durães
Coimbra, 2000



ÍNDICE

1. SUMÁRIO	5
2. INTRODUÇÃO	6
3. HISTÓRIA TAXONÓMICA	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Estudo de caracteres	14
4.2. Colheita de material vegetal	17
4.3. Distribuição geográfica e ecologia	18
4.4. Estudo de isoenzimas em populações de <i>A. hemionitis</i> L.	19
4.4.1. Colheita de material vegetal	19
4.4.2. Extracção de enzimas	20
4.4.3. Preparação dos sistemas tampão	22
4.4.4. Preparação do gel de amido	23
4.4.5. Colocação das amostras	24
4.4.6. Condições de ensaio	25
4.4.7. Coloração	25
4.4.8. Registo dos dados e fotografia dos géis	28
4.4.9. Análise estatística dos dados	28
5. ESTUDO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS	30
5.1. Revisão bibliográfica	30
5.2. Resultados	33
5.3. Discussão e conclusões	39
6. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ECOLOGIA	40
6.1. Revisão dos dados de distribuição geográfica e ecologia	40
6.2. Locais de estudo em Portugal	42
6.3. Resultados	43
6.4. Discussão e conclusões: ecologia em Portugal em contraste com outras localidades	45
7. ELECTROFORESE DE ISOENZIMAS	48
7.1. Introdução	48
7.1.1. Isoenzimas	48
7.1.2. Comportamento das isoenzimas no gel e interpretação do padrão das bandas electroforéticas	49

7.2. Resultados	53
7.3. Discussão e conclusões	56
8. IMPLICAÇÕES A NÍVEL DE CONSERVAÇÃO	59
9. BIBLIOGRAFIA	60
10. APÊNDICES	65
I. Lista de todos os exemplares de Filicopsida pertencentes ao herbário de Willkomm (COI – Willk)	66
II. Revisão da bibliografia relativamente à distribuição geográfica, ecologia e altitude de <i>A. hemionitis</i> L.	73
III. Revisão dos exemplares de herbário relativamente à distribuição geográfica, ecologia e altitude de <i>A. hemionitis</i> L.	76
IV. Preparação das soluções corantes	79

1. SUMÁRIO

A colecção de pteridófitas do Herbário de Willkomm (COI-Willk) serviu de base a este estudo. Este herbário inclui 36 espécies de fetos colhidas em território português. Para estudo pormenorizado foi seleccionada a espécie *A. hemionitis* L., um feto raro e protegido que se encontra na Macaronésia, N África e W Europa. As populações europeias estão restritas a Portugal, isoladas na Serra de Sintra, sendo assim estudado o seu estado de conservação Portugal, investigando a sua variabilidade morfológica e genética, ecologia e distribuição geográfica.

Nos arquipélagos que compõem a Macaronésia e no N África, *A. hemionitis* cresce em habitats naturais, esporadicamente em muros. Em Portugal cresce em habitats artificiais, muros construídos pelo Homem com perto de 150 anos. O estudo morfológico revelou que *A. hemionitis* é uma espécie com grande variabilidade morfológica ao nível das frondes. Esta característica pode não ser determinada geneticamente, mas ser devida a condições ecológicas particulares.

Marcadores bioquímicos, nomeadamente isoenzimas e aloenzimas, foram usados com o objectivo de: 1) avaliar a variação genética intra e interpopulacional de *A. hemionitis* em Sintra (Portugal); 2) determinar o modo de cruzamento predominante nas populações de *A. hemionitis* em Sintra; 3) determinar o estatuto nativo de *A. hemionitis* em Sintra, ou seja, estabelecer se as populações são colonizações secundárias ou foram introduzidas deliberada ou acidentalmente; 4) estabelecer bases científicas para delinear recomendações quanto à conservação da espécie.

Das evidências reunidas neste estudo, conclui-se que 1) ocorre intercruzamento em *A. hemionitis*; 2) é considerável a diversidade genética das suas populações em Portugal (mais alta do que a média nas pteridófitas); 3) apesar de se encontrarem em habitats construídos pelo Homem, as populações de *A. hemionitis* em Sintra são reliquiais e autóctones (e, portanto, improvável que tenham sido introduzidas, tanto deliberada como acidentalmente, a partir de outro local).

Conclui-se que os muros na Serra de Sintra têm grande valor em termos de conservação, já que providenciam um refúgio seguro para esta espécie, a qual, de outro modo, devido ao presente regime climático e práticas de gestão da paisagem, pode ter poucas hipóteses de sobreviver.

9. BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, R. (1973). Plantas canarias en el Herbario del Jardín Botánico de Madrid. *An. Inst. Bot. Cavanilles* **30**: 126.
- BENL, G. (1967). Die Farne der Insel Tenerife. *Nova Hedwigia* **14**(1): 69-105.
- BENL, G. (1969). Zur Variabilität der Blattgestalt bei *Asplenium hemionitis* L. *Ber. Naturwiss. Ges. Bayreuth* **13**: 63-68.
- BENL, G. (1971). Fern hunting in Madeira. *Brit. Fern Gaz.* **10** (4): 165-174.
- BOLLE, C. (1864). Die Standorte der Farn auf der Canarischen Inseln, II. *Zeitschr. Allg. Erdk. Berlin* **17**: 249-282.
- BORNMÜLLER, J. (1904). Ergebnisse zweier botanischer Reisen nach Madeira und den Canarischen Inseln. *Bot. Jahrb.* **33**(3): 387-492.
- BRAMWELL, D. (1971). Studies in the Canary Islands flora: the vegetation of Punta de Teno, Tenerife. *Cuad. Bot. Canar.* **11**: 4-37.
- CAIN, S. A. & CASTRO, G. M. O. (1971). *Manual of vegetation analysis*. Hafner Publishing Company, New York.
- CEDERCREUTZ, C. (1941). Beitrag zur Kenntnis der Gefässpflanzen auf den Azoren. *Comment. Biol. Soc. Sci. Fenn.* **8**(6): 1-29.
- CHEVALIER, A. (1935). Les Iles du Cap Vert: géographie, biogéographie, agriculture, flore de l'archipel. *Rev. Bot. Appl.* **15**: 1057.
- CHRIST, H. (1907). Filices Azoricae. Leg. Dr. Bruno Carneiro. *Acad. Intern. Géogr. Bot.*, Sér. 3, **16** (212): 155.
- COUTINHO, A. X. P. (1939). *Flora de Portugal*: 45 (2ª edição revista por Ruy Telles Palhinha). Bertrand Lda., Lisboa.
- DANSEREAU, P. (1961). Études Macaronésiennes. I. *Agron. Lusit.* **23** (3): 164.
- DRAY, A. M. (1985). *Plantas a proteger em Portugal continental*. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza., Lisboa.
- DRUCE, G. C. (1911). Plants of the Azores. *Journ. Bot. (London)* **49**: 23.
- FENNANE, M. & TATTOU, M. I. (1998). Catalogue des plantes vasculaires rares, menacés ou endémiques du Maroc. *Bocconea* **8**: 13.
- FERNANDES, A. (1977). História da aquisição do Herbário de Willkomm pelo Jardim Botânico de Coimbra. *An. soc. Brot.* **43**: 15-44.
- FERNANDES, R. B. (1980). *Asplenium hemionitis* (Aspleniaceae) in A. Fernandes & R. Fernandes eds, *Iconographia Selecta Florae Azoricae* **1**: 87-97. Secretaria Regionali Culturae Regionis Autonomae Azoriensis, Conimbriga.

- FRANCO, J. A. & AFONSO, M. L. R. (1982). *Distribuição de pteridófitos e gimospérmicas em Portugal*. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Património Paisagístico, Lisboa.
- FRANCO, J. A. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)* 1: 22. Sociedade Astória Lda., Lisboa.
- GASTONY, G. J. & DARROW, D. C. (1983). Chloroplastic and cytosolic isozymes of the homosporous fern *Asplenium filix-femina* L. *Amer. J. Bot.* 70: 1409-1415.
- GIBBY, M., ORMONDE, J. & PAUL, A. M. (1994). *Asplenium* L. in J. R. Press & M. J. Short eds, *Flora of Madeira*. 42-47. The Natural History Museum, HMSO, London.
- GOTTLIEB, L. D. (1981). Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.* 7: 1-46.
- GOTTLIEB, L. D. (1982). Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216: 373-380.
- GREUTER, W. *et al* (1984). *Medchecklist* 1: 11. Conservatoires et Jardins Botaniques, Genève.
- GUINEA, E. & HEYWOOD, V. H. (1954). Sobre *Asplenium hemionitis* L. *Col. Bot.* 4(2): 243-248.
- HANSEN, A. (1971). Contributions to the Flora of the Azores (especially Santa Maria e São Miguel). *An. Soc. Brot.* 37: 88.
- HARTL, D. L. & CLARK, A. G. (1997). *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- HAUFLER, C. H. (1985). Enzyme variability and modes of evolution in the fern genus *Bommeria*. *Syst. Bot.* 10: 92-104.
- HENRIQUES, J. (1896). Contribuição para o estudo da Flora d'África (Enumeração de plantas colhidas nas ilhas de Cabo Verde por J. A. Cardoso Junior). *Bol. Soc. Brot.* 13: 132.
- HOLMEGREN, P.K., KEUKEN, W. & SCHOFIEL, E. K. (1981). *Index Herbariorum*. Part I. Bohn, Scheltema & Holkema, Antwerpen.
- HUNTER, R. L. & MARKERT, C. L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.
- JAHANDIEZ, E. & MAIRE, R. (1931). *Catalogue des plants du Maroc* 4: 4. Minerva, Alger.
- KEPHART, S. R. (1990). Starch electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77(5): 693-712.
- KUNKEL, G. (1965). Enumeración de los helechos (Pteridofitos) de Lanzarote y notas sobre su distribución geográfica. *Rev. Mus. Canar.* 26(93-96): 7-17.
- KUNKEL, G. (1966). Eine monströse Form von *Asplenium hemionitis* L.: f. *crisatum*. *Nova Hedwigia* 11(1-4): 351-352.
- KUNKEL, G. (1967). On the pteridophytes of La Gomera (Canary Islands). *Cuad. Bot. Canar.* 2: 29-41.

- KUNKEI, G. (1971). Lista revisada de los pteridófitos de las Islas Canarias. *Cuad. Bot. Canar.* **13**: 21-46.
- KUNKEL, G. (1977). *Endemismos canarios. Inventario de las plantas vasculares endémicas en la provincia de Las Palmas*:15. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- KUNKEL, G. (1992). Los helechos in G. Kunkel ed., *Flora y Vegetación del Archipiélago Canario* 1:195-216. MAE, Madrid.
- LANG, G. (1994). *Quartaere Vegetationsgeschichte Europas*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- LI, J. & HAUFLER, C. H. (1999). Genetic variation, breeding systems, and patterns of diversification in Hawaiian *Polypodium* (Polypodiaceae). *Syst. Bot.* **24**: 339-355.
- LOBIN, W., FISHER, E. & ORMONDE, J. (1998). The fern and fern-allies (Pteridophyta) of the Cape Verde Islands, West Africa. *Nova Hedvigia* **115**: 1-112.
- MAIRE, R. (1952). *Flore de l'Afrique du Nord* **1**: 57-58. Paul Lechevalier, Paris.
- MENEZES, C. A. (1914). *Flora do Archipelago da Madeira*: 205. Bazar do Povo, Funchal.
- MURPHY *et al.* (1990). Proteins I: Isozyme electrophoresis in D. M. Hillis & C. Moritz eds, *Molecular Systematics*: 45-126. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- NEI, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* **41**: 225-233.
- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.
- NOGUEIRA, I. & ORMONDE, J. (1986). *Asplenium* L. in S. Castroviejo *et al* eds, *Flora iberica* **1**: 92. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- ORMONDE, J. (1990). Pteridófitos endémicos, raros ou ameaçados das ilhas macaronésicas. *Fontqueria* **28**: 5-12.
- ORMONDE, J. (1991). Pteridófitas macaronésicas endémicas, raras ou em vias de extinção I. Aspleniáceas. In Dias, E., Carretas, J. P. & Cordeiro, P. eds, *Comunicações Apresentadas nas 1^{as} Jornadas Atlânticas de Protecção do Meio Ambiente, Angra do Heroísmo, 25 de Janeiro-1 de Fevereiro 1988*: 215-242. Angra do Heroísmo.
- PAGE, C. N. (1977). An ecological survey of the ferns of the Canary Islands. *Fern Gaz.* **11**(5): 297-312.
- PALHINHA, R. T. (1966). *Catálogo das plantas vasculares dos Açores*. 8. Sociedade de Estudos Açorianos Afonso Chaves, Lisboa.
- PINTO DA SILVA, A. R. *et al.* (1991). A flora da Serra de Sintra. *Separata Port. Acta Biol.*, sér. 2 **15**: 5-258.

- PITARD, J. & PRÓUST, L. (1973). *Les Iles Canaries. Flore de l'archipel*: 407. Otto Koeltz Antiquariat, Koenigstein.
- PITARD, M. C.-J. (1912). *Exploration scientifique du Maroc* **1**: 125. Masson et Cie., Paris.
- PRESS, J. R. & SHORT, M. J. (1994). *Flora of Madeira*. HMSO, London.
- QUEZEL, P. & SANTA, S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* **1**: 25. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- REICHSTEIN, T. (1981). Hybrids in European *Asplenaceae* (Pteridophyta). *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **91**: 104.
- RODRIGO PÉREZ, J. (1992). Origen de la flora Canaria in G. Kunkel ed., *Flora y Vegetación del Archipiélago Canario* **1**: 33-54. Edirca, Madrid.
- RUMSEY, F. J. *et al.* (1998). Climate, colonization and celibacy: population structure in central European *Trichomanes speciosum* (Pteridophyta). *Bot. Acta* **111**: 481-489.
- SAMPAIO, G. (1909). *Manual da flora portuguesa*. 6. 1º de 12 fascículos encadernados por Ismael Chuvas, Coimbra.
- SAMPAIO, G. (1913). *Lista das espécies representadas no herbário português*: 10. Costa Carregal, Porto.
- SÁNCHEZ VELÁSQUEZ, T. (1996). Contribución al conocimiento de las esporas de helechos de la Sierra de Anaga (Tenerife), Islas Canarias. *Bot. Macaronésica* **23**: 83-103.
- SAVAGE, S. (1945). *A catalogue of the Linnaean Herbarium*: 186. Taylor & Francis Ltd, London.
- SCHNEIDER, G. (1892). *Book of choice ferns* **1**: 582-587. London.
- SCHNELLER, J. J. & HOLDEREGGER, R. (1997). Vigor and survival of inbred and outbred progeny of *Athyrium filix-femina*. *Int. J. Plant Sci.* **158**: 79-82.
- SENNEN, F. *et* MAURICIO (1933). *Catálogo de la Flora del Rif Oriental y principalmente de las cabilas limítrofes con Melilla*: 140. Gráficas Iaa Ibérica, Melilla.
- SERMOLLI, P. (1979). A survey of the pteridological flora of the Mediterranean Region. *Webbia* **34**(1): 175-242.
- SERMOLLI, P. (1991). Considerazioni sull'affinità ed origine della flora pteridologica della Regione Mediterranea. *Acta Bot. Malacitana* **16**(1): 235-280.
- SHIMWELL, D. W. (1971). *Description & Classification of Vegetation*. Sidgwick & Jackson, London.
- SJÖGREN, E. (1973). Recent changes in the vascular flora and vegetation of the Azores islands. *Mem. Soc. Brot.* **22**: 5-453.
- SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S. (1990). Polyploidy, breeding systems and genetic differentiation in homosporous pteridophytes in Soltis, D. E. & Soltis, P. S. eds, *Isozymes in Plant Biology*: 241-258. Chapman and Hall, London.

- SOLTIS, D. E., HAUFLER, C. H., DARROW, D. E. & GASTONY, G. J. (1983). Starch gel electrophoresis in ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.* **73**: 9-27.
- SWARTZ, O. (1801). Genera et Species Filicum. *Sbrard. Journ. Bot.* **2**: 50.
- SWARTZ, O. (1806). *Synopsis Filicum earum Genera et Species Systematice complectens*: 75, 90. Imprensus bibliopolii novi academici, Kiliae.
- TUTIN, T. G. *et al.* (1986). *Flora Europaea* **1**, 2^a ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- VALENTINE, D. H. (1964). Aspleniaceae in T. G. Tutin *et al.* eds, *Flora europaea* **1**: 14-17. Cambridge University Press, Cambridge.
- VASCONCELLOS, J. C. (1941). Anotações do Herbário do Instituto Superior de Agronomia. *An. Inst. Sup. Agron.* **12**: 171.
- VIANE, R., JERMY, A. C. & LOVIS, J. D. (1986). *Asplenium* L. in T. G. Tutin *et al.* eds, *Flora europaea* **1**: 18-23. Cambridge University Press, Cambridge.
- VOGEL, J. C. *et al.* (1999a). Genetic structure, reproductive biology and ecology in isolated populations of *Asplenium csikii* (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Heredity* **83**: 604-612.
- VOGEL, J. C. *et al.* (1999b). Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biol J Linn Soc.* **66**: 23-37.
- WARD, C. M. (1970). The pteridophytes of Flores (Açores): a survey with bibliography. *Brit. Fern Gaz.* **10**(3): 119-126.
- WEEDEN, N. F. & WENDEL, J. F. (1990). Genetics of plant isozymes in Soltis, D. E. & Soltis, P. S. eds., *Isozymes in Plant Biology*: 46-72. Chapman and Hall, London.
- WENDEL, J. F. & WEEDEN, N. F. (1990). Visualization and interpretation of plant isozymes in Soltis, D. E. & Soltis, P. S. eds. *Isozymes in plant biology*: 5-45. Chapman and Hall, London.
- WERTH, C. R. (1989). The use of isozyme data for inferring the ancestry of polyploid pteridophytes. *Biochem. Syst. and Evol.* **17**: 117-130.
- WILLKOMM, H. M. & LANGE, J. (1861). *Prodromus Florae Hispanicae* **1-2**: 1-11. E. Schweizerbart, Stuttgartiae.
- WILMANN, O. & RASBACH, H. (1973). Observations on the pteridophytes of São Miguel, Açores. *Brit. Fern Gaz.* **10**(6): 315-329.
- WRIGHT, S. (1921). Systems of mating. *Genetics* **6**: 111-178.
- WRIGHT, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.