



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES
DE CHARCOS TEMPORÁRIOS MEDITERRÂNICOS –
IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO**

Ana Sofia Ramos Serralheiro

Orientação:

Doutora Anabela Dias Ferreira Belo

Co- Orientação:

Doutora Ana Lumbreras Corujo

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

Évora, 2016

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**ECOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES DE
CHARCOS TEMPORÁRIOS MEDITERRÂNICOS –
IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO**

Ana Sofia Ramos Serralheiro

Orientação:

Doutora Anabela Dias Ferreira Belo

Co- Orientação:

Doutora Ana Lumbreras Corujo

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

Évora, 2016

Agradecimentos

Gostaria de deixar um agradecimento especial a todos os que estiveram presentes e contribuíram para a realização deste trabalho.

De entre todos aqueles que se cruzaram comigo ao longo deste percurso gostaria de destacar alguns, cuja ajuda e companheirismo tiveram um impacto significativamente maior nesta jornada.

Em primeiro lugar quero agradecer às minhas orientadoras. À Professora Anabela Belo pelo apoio, disponibilidade e paciência que sempre demonstrou, assim como toda a ajuda, tanto para a solução dos mais pequenos problemas como para a conclusão deste trabalho. À Doutora Ana Lumbreras agradeço o apoio prestado, em particular no trabalho de laboratório, assim como na análise estatística. A ambas agradeço a paciência e a preciosa revisão da tese.

O estudo subjacente à elaboração desta tese foi financiado pelo projeto LIFE Charcos (LIFE12NAT/PT/997), sem o qual não seria possível o seu desenvolvimento.

Agradeço igualmente, a preparação das caixas de Petri com agar à assistente técnica do Departamento de Biologia Gertrudes Mariano e ao laboratório de Microbiologia a utilização da câmara de fluxo laminar.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, irmã, avó Felizarda e namorado por todo o apoio durante o curso.

A minha gratidão à minha mãe por toda a ajuda e acompanhamento durante todo o meu percurso escolar, sem a qual nada seria o mesmo.

À minha madrinha, Engenheira Antonieta Caeiro, pelo apoio, incentivo e ajuda na pesquisa bibliográfica.

Índice

1 – Enquadramento	1
2 – Ecologia da germinação de sementes de espécies de charcos temporários mediterrânicos – implicações para a conservação	
2.1 – Resumo	6
2.2 – Abstract	7
2.3 – Introdução	8
2.4 – Material e métodos	10
2.5 – Resultados	15
2.6 – Discussão	22
3 – Considerações finais	26
4 – Bibliografia	28

Índice de Figuras

Figuras 1 e 2 – Limpeza de sementes em crivos	11
Figura 3 – Desinfecção das sementes	12
Figura 4 – Câmara de fluxo laminar	13
Figura 5 – Incubadora com temperatura e luminosidade controladas	14
Figura 6 – Viabilidade das sementes em estudo	15
Figura 7 – Germinação de sementes de <i>Romulea ramiflora</i>	17
Figura 8 – Percentagem de germinação das 15 espécies de sementes em estudo expostas a dois regimes de luz – um fotoperíodo de 12/12 h e ausência de luz – e dois regimes de temperatura – temperatura constante (15°C) e temperaturas alternadas (10°C/20°C).....	18
Figuras 9 e 10 – Germinação de <i>Agrostis stolonifera</i> em dois regimes de luz – com fotoperíodo de 12/12h (luz) à direita e ausência de luz (escuro) à esquerda.....	19
Figura 11 – Germinação acumulada (%) ao longo do período de tempo que durou o ensaio das 15 espécies de sementes em estudo, expostas a um fotoperíodo de 12/12 h e dois regimes de temperatura – temperatura constante (15°C) e temperaturas alternadas (10°C/20°C)	21
Figuras 12 e 13 – Germinação de sementes de <i>Eryngium corniculatum</i>	22

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resultados do modelo linear generalizado da germinação de sementes com os <i>P</i> -valores do regime de luz (RL), do regime da temperatura (RT) e a interação entre eles.....	19
--	----

Abreviaturas

CTM – charcos temporários mediterrânicos

MTP – Mediterranean Temporary Ponds

1 – Enquadramento

As zonas húmidas estão entre os ecossistemas mais importantes do planeta, devido à sua biodiversidade e produtividade, e encontram-se distribuídas por todo o globo. São frequentemente diversas em relação à origem, à geomorfologia e à fonte de alimentação e não podem ser consideradas nem terrestres, nem aquáticas, pelo que para a maioria dos autores a sua definição é complexa (Keddy *et al.*, 2009; Mitsch & Gosselink, 2015; Keddy, 2010). As características que permitem identificar zonas húmidas são solos hídricos e vegetação hidrófita (vegetação aquática). Estas características estarão presentes, exceto onde, e se, fatores físicos, bióticos ou antropogénicos específicos as removerem ou impedirem o seu desenvolvimento (Silva, 2012).

De acordo com a definição proposta na Convenção sobre zonas húmidas de Importância Internacional (UNESCO, 1971; Ramsar, 2013), as zonas húmidas são “áreas de pântano, paul, turfeira ou água, naturais ou artificiais, permanentes ou temporárias, com água parada ou corrente, doce, salobra ou salgada, incluindo água do mar cuja profundidade na maré baixa não exceda os seis metros”.

Como se deduz desta definição, existe uma grande variedade de habitats dentro das zonas húmidas. Um tipo de zona húmida muito interessante pelo seu funcionamento ecológico são os charcos temporários, caracterizados pela alternância de uma fase seca e de uma fase inundada. Contrariamente aos charcos permanentes, a persistência de boas condições ecológicas por longos períodos de tempo nos charcos temporários deve-se ao facto de, durante a fase seca, a matéria orgânica acumulada durante a fase húmida oxidar, não se verificando um aumento de sedimentos ao longo do ano (Biggs *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2001). Apesar da sua dimensão, comparativamente com outros corpos de água, os charcos temporários constituem uma parte importante dos recursos de água doce continental e contribuem significativamente para a biodiversidade aquática (Williams *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2008), uma vez que se encontram amplamente distribuídos na paisagem (Oertli *et al.*, 2009). Ocorrem por todo o globo e são variáveis em relação à sua forma, tamanho,

período de inundação e biodiversidade (Williams *et al.*, 2001). A área Mediterrânica é particularmente rica em zonas húmidas de grande valor ecológico, social e económico (Rosseló-Graell, 2003).

As características do clima mediterrânico – chuvoso no inverno e seco no verão – condicionam a ocorrência de um habitat particular deste clima, os charcos temporários mediterrânicos. São depressões pouco profundas, de dimensões reduzidas, endorreicas e situadas sobre substratos impermeáveis com águas oligotróficas e pouco mineralizadas (Ruiz, 2008; Camacho *et al.*, 2009). Caracterizam-se por apresentar comunidades pertencentes às alianças *Isoetion*, *Nanocyperion flavescentis*, *Preslion cervinae*, *Agrostion salmanticae*, *Heleochloion* e *Lythrion tribracteati* (EC, 2007). Apresentam alternância entre uma fase em que se verifica acumulação de água da chuva, geralmente no inverno e início da primavera, em que existe um período de submersão e, posteriormente, uma fase terrestre, quando ocorre dessecação do solo anteriormente inundado sendo que estas variações hidrológicas são um fator essencial na dinâmica deste habitat (Grillas *et al.*, 2004).

Embora a altura da coluna de água nos charcos geralmente não exceda os quarenta centímetros de profundidade e o período de inundação geralmente não ultrapasse os cinco meses, o início e duração deste período e a altura da coluna de água dependem das condições meteorológicas de cada ano, que são muito variáveis (Canha & Pinto-Cruz, 2010), não só de ano para ano como até ao longo do mesmo ano. Em casos extremos, alguns charcos podem mesmo manter água por mais de um ano enquanto outros podem permanecer secos pelo mesmo período, dependendo da quantidade de chuva (Zacharias *et al.*, 2007).

Em consequência da adaptação a estas condições ecológicas tão específicas e extremadas, os seres vivos que colonizam estes ambientes são muito peculiares, quer do ponto de vista fisiológico, quer considerando as transformações morfológicas que sofrem no decurso do seu ciclo de vida para poderem sobreviver nas melhores condições (Grillas *et al.*, 2004). Quanto à flora, caracteriza-se por uma elevada heterogeneidade morfológica, taxonómica e ecológica, abrangendo espécies capazes de tolerar solos alagados, espécies anfíbias que habitam quer na terra quer na água, e plantas aquáticas adaptadas a águas profundas (Barret *et al.*, 1993; Baggela & Caria, 2012).

O período de inundação, a altura e o tempo de permanência de água são fatores que, conjugados com situações topográficas de depressão e impermeabilidade do solo, determinam a zonation destas comunidades (Silva, 2009). Ocorrem três zonas concêntricas: na zona central dominam comunidades aquáticas de início de primavera, na zona intermédia comunidades hidrófilas perenes e na zona externa comunidades hidrófilas de pequenas plantas anuais (Bouhim *et al.*, 2010; Pinto-Cruz *et al.*, 2011a). Além das variações no elenco de espécies presentes a nível espacial existem também variações a nível temporal, tanto intra-anual como inter-anual (Espírito-Santo & Arsénio, 2005; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2009).

Estes habitats, considerados *hot spots* de biodiversidade, são vitais para muitas espécies raras e ameaçadas, quer de flora quer de fauna, tanto a nível europeu como global (Grillas *et al.*, 2004; Céréghino *et al.*, 2008; Canha & Pinto-Cruz, 2010). Além disto, os complexos de charcos suportam meta-populações de espécies de plantas, anfíbios e invertebrados aquáticos e têm um papel importante na conectividade entre outros habitats de água doce (Canha & Pinto-Cruz, 2010). Devido à sua importância biológica e ecológica têm elevado interesse do ponto de vista da conservação. No contexto da União Europeia são considerados habitats prioritários (habitat 3170*) pela Diretiva Comunitária 92/43/CEE – Anexo I e em Portugal pela transposição desta Diretiva no Plano Sectorial da Rede Natura 2000 – PSRN2000. Além disto, estes ecossistemas estão reconhecidos pela Convenção de Ramsar e abrangidos pela Diretiva Quadro da Água.

Apesar dos regimes de proteção a taxa de destruição dos charcos temporários mediterrânicos na Bacia Mediterrânica é alarmante (Gallego-Fernández *et al.*, 1999; Rhazi *et al.*, 2001; Canha & Pinto-Cruz, 2010; Rhazi *et al.*, 2011; Ferreira & Beja, 2013). As medidas de proteção por si só não se têm vindo a revelar suficientes para a consciencialização do valor biológico, económico e cultural destes habitats pelos cidadãos (Hay *et al.*, 1999; Silva, 2009), que se encontram cada vez mais ameaçados devido à ação humana, à sua fragilidade ecológica e ao desconhecimento do seu valor natural (Zacharias & Zamparas, 2010). Tradicionalmente vistos como áreas não-produtivas, estão atualmente sujeitos a técnicas agrícolas intensivas, como lavouras profundas de solo, drenagem, irrigação e fertilização de culturas nas suas imediações, terraplanagem da superfície ou a sua transformação em reservatórios permanentes para rega ou abeberamento do gado. As ameaças a este habitat também incluem a

pressão turística, a florestação, a circulação de viaturas, o sobrepastoreio ou a cessação do pastoreio, as espécies invasoras e as alterações climáticas, assim como o desconhecimento e a falta de informação sobre o seu valor biológico e ecológico (Grillas *et al.*, 2004; Dimitriou *et al.*, 2006; EPCN, 2008).

A conservação destes habitats é de extrema importância e deve tentar abranger todo o tipo de hidroperíodos, profundidades e áreas, uma vez que diferentes espécies têm diferentes preferências (Pereira, 2011). Além da conservação *in situ* também é importante a conservação *ex situ*. A conservação *ex situ* da flora está intimamente ligada à prática de recolha e armazenamento de sementes em bancos de germoplasma, que constituem uma forma efetiva, simples e económica para a conservação de material vegetal a longo prazo, já que permitem a conservação de uma enorme diversidade genética num mesmo local (ENSCONET, 2009).

A conservação da diversidade vegetal nasceu com o objetivo de combater a perda exponencial das espécies devida em parte a fenómenos naturais, mas essencialmente a atividades humanas, proteger as sementes de espécies ameaçadas de extinção, mas também manter, através de técnicas de preservação a longo prazo, esporos, estacas, tecido ou qualquer outro material que constitui parte da biodiversidade genética do planeta (Bacchetta *et al.*, 2008). Foi a descoberta, na década de sessenta, que o mundo estava a sofrer uma grave crise de diversidade genética em culturas que expôs a necessidade de tomar medidas concretas para a conservação da biodiversidade vegetal e constituiu o catalisador para a criação do primeiro banco de germoplasma (Bacchetta *et al.*, 2008). De igual modo, a conservação *ex situ* de plantas selvagens contribui para proteger e preservar as espécies selvagens da extinção, sendo reconhecida como um importante complemento das ações desenvolvidas no terreno. A recolha e conservação do germoplasma das espécies presentes nos charcos temporários mediterrânicos, muitas das quais são exclusivas destes habitats, permite a minimização da erosão dos recursos genéticos de um habitat ameaçado e a disponibilização desses recursos para ações de restauro futuras.

No entanto, não devemos esquecer que a conservação *ex situ* não constitui um fim em si e que todas as ações levadas a cabo são parte de uma estratégia global de conservação. Em muitos centros de conservação de germoplasma são desenvolvidos estudos sobre biologia reprodutiva. Os ensaios de germinação são essenciais como

pontos de partida para desenvolver métodos de produção de plantas para projetos de recuperação para a conservação *in situ* de espécies ameaçadas. Assim, a filosofia da conservação converge para o desenvolvimento de atividades de conservação *in situ*, a fim de preservar plantas diretamente no seu ambiente natural (Bacchetta *et al.*, 2008).

A conservação *ex situ* incluindo os ensaios de germinação de sementes e esporos, deve por isso ser considerada uma ferramenta útil e essencial para as intervenções a efetuar *in situ* e, especialmente em casos extremos de extinção iminente das populações naturais, como o único caminho possível para a sua preservação (Bacchetta *et al.*, 2008).

2 – Ecologia da germinação de sementes de espécies de charcos temporários mediterrânicos – implicações para a conservação

2.1 – Resumo

Devido às inúmeras ameaças que se fazem sentir sobre este habitat protegido – os charcos temporários mediterrânicos (CTM) – a recolção de germoplasma e os estudos da reprodução podem contribuir para a sua preservação. As espécies características dos CTM germinam em condições hidrológicas e climatológicas muito variáveis de ano para ano e que se verificam apenas durante um período de tempo curto. No entanto, o conhecimento sobre a ecologia da germinação das suas espécies mais emblemáticas é escasso, em particular após um período de conservação *ex situ*, durante o qual pode ocorrer dormência ou diminuição da sua viabilidade. É por isso crucial obter este conhecimento de modo a poder planificar com sucesso a utilização destas sementes para efeitos de recuperação de CTM.

Os principais objetivos deste trabalho são determinar qual a viabilidade das sementes recolhidas e quais as condições de luz e temperatura mais adequadas à maximização da germinação de cada uma das espécies estudadas. A experimentação foi efetuada em ambiente controlado – câmara de germinação sob um fotoperíodo de 12h e temperaturas constantes de 15°C, a simular as condições de temperatura que se verificam no centro do charco no outono e primavera, ou alternadas de 20 e 10°C, a simular as condições de temperatura que se verificam na periferia do charco nos períodos diurno e noturno, respetivamente. Os resultados obtidos permitiram concluir que a viabilidade inicial dos lotes de semente colhida era elevada o que os torna adequados para a conservação *ex situ*. De um modo geral, a luz favoreceu a germinação das sementes, tal como a temperatura alternada.

Palavras-chave: conservação *ex situ*; fotoperíodo; temperatura; viabilidade das sementes; Costa Sudoeste de Portugal.

Germination ecology of seeds from species of Mediterranean temporary ponds – implications for conservation

2.2 – Abstract

Considering the numerous threats to the protected habitat Mediterranean Temporary Ponds (MTP), collecting germplasm and performing reproduction studies could contribute to its preservation. The characteristics species of MTP germinate in variable hydrological and climatological conditions each year during a short period of time. However, knowledge about the ecology of germination of its most emblematic species is scarce, particularly after a period of *ex situ* conservation, during which dormancy or decreased viability may occur. It is therefore crucial to acquire this knowledge in order to successfully plan the use of these seeds in MTP recovery.

The main objectives of this study were to determine the viability of the collected seeds and which were the light and temperature conditions best suited to maximize the germination of each species studied. The experimentation was performed in a controlled environment - a growth chamber under a photoperiod of 12 hours and constant temperatures of 15°C to simulate the temperature conditions of the pond center) or alternating temperature of 20 and 10°C to simulate the temperature conditions on the margins of the pond, during day and night, respectively. The results allowed us to conclude that the initial viability of the collected seed batches was high and thus adequate to *ex situ* conservation. We found that in general light enhanced seed germination and that alternating temperature also favored seed germination.

Keywords: *ex situ* conservation; photoperiod; temperature; seed viability; SW Coast of Portugal.

2.3 – Introdução

Os Charcos Temporários Mediterrânicos estão classificados como um dos habitats de água doce mais notáveis devido à riqueza específica que albergam (Grillas *et al.*, 2004; Pinto-Cruz *et al.*, 2011a). Para além da sua elevada importância biológica e ecológica apresentam ainda valor intrínseco, estético, educacional e científico (EPCN, 2008; Canha & Pinto-Cruz, 2010).

Na região Mediterrânica, os CTM apresentam um acentuado declínio (Zacharias *et al.*, 2007; Zacharias & Zamparas, 2010; Rhazi *et al.*, 2011), encontrando-se sujeitos a uma grande variedade de pressões que levam a diferentes formas de degradação e alteram o seu funcionamento a diferentes níveis (Ruiz, 2008; Rhazi *et al.*, 2011; Pérez-Bilbao *et al.*, 2015). De um modo geral, as ameaças aos CTM estão relacionadas com as alterações no funcionamento hidrológico, a poluição, a ocorrência de espécies alóctones ou exóticas e os efeitos das alterações climáticas (Pérez-Bilbao *et al.*, 2015). A maioria deles têm sido transformados pela agricultura ou outras atividades humanas. Entre as ações antropogénicas com mais impacto estão a drenagem, o desenvolvimento urbano, a agricultura intensiva, o despejo de lixo, a poluição por fertilizantes e pesticidas, as atividades pecuárias, a extração de água, o aprofundamento para transformação em reservatórios para irrigação e as perturbações das águas subterrâneas (Fonseca *et al.*, 2008). Se as alterações climáticas resultarem na redução da precipitação na região do Mediterrâneo, os hidroperíodos dos charcos temporários mediterrânicos podem tornar-se mais curtos, ou até desaparecerem, devido à queda dos níveis de água subterrânea e à redução do *input* através da chuva e da escorrência superficial (Zacharias *et al.*, 2007). A irregularidade do regime hídrico e a correspondente variação do período de inundação dos charcos pode implicar variações na dinâmica do ciclo vital das espécies em anos sucessivos.

Os declínios na biodiversidade atingem maior expressão em ecossistemas aquáticos do que em ecossistemas terrestres (Sala *et al.*, 2000), pelo que, em muitos países, as plantas aquáticas se encontram entre os organismos mais ameaçados (Preston & Croft, 2001). As muitas e variadas ameaças a que as plantas aquáticas estão sujeitas (p.e., eutrofização, competição com ervas daninhas e algas, aquecimento global,

perda e degradação de zonas húmidas) levou a que sejam consideradas prioritárias medidas de conservação *in situ* (Hay *et al.*, 1999). No entanto, os regimes de proteção por si só não se revelaram suficientes, pelo que se tornou necessário recorrer complementarmente à conservação *ex situ* (Hay *et al.*, 1999). O armazenamento de sementes em bancos de germoplasma permite que um grande número de sementes viáveis sejam armazenadas por períodos mais ou menos longos (Walters *et al.*, 2004) e possibilita o fornecimento de material, tanto para investigação como para reintrodução na natureza (Hay *et al.*, 1999).

A conservação *ex situ* proporciona uma opção eficaz e economicamente viável para conservar a diversidade genética de populações de plantas (Hong & Ellis, 1996), desempenhando um papel importante na salvaguarda de espécies vegetais terrestres e aquáticas (UNEP, 1992). A conservação *ex situ* da flora selvagem em bancos de germoplasma constitui uma ferramenta de conservação cuja relevância tem vindo a ser reconhecida face ao aumento verificado de espécies ameaçadas, parte das quais requer medidas imediatas de conservação (Bacchetta *et al.*, 2008). Por outro lado, os bancos de germoplasma podem constituir igualmente uma medida de conservação preventiva, funcionando como um seguro contra ameaças futuras, situação particularmente importante em espécies que apresentam maior probabilidade de extinção por terem populações pequenas ou muito localizadas, isto é, geograficamente muito circunscritas (ICNF, s/data). Efetivamente, este recurso pode permitir a reintrodução ou o reforço populacional, sendo por essa razão tão importante assegurar a adequada representação genética das espécies conservadas *ex situ* (ICNF, s/data).

As sementes de espécies de plantas aquáticas tendem a ser sensíveis às condições ambientais e requerem temperaturas específicas e regimes hídricos apropriados para a sua germinação (Casanova & Brock, 2000; Grillas *et al.*, 2004). A maior parte das espécies possuem sementes que podem apresentar dormência para evitar que ocorra germinação, e o subsequente desenvolvimento de plântulas, antes ou durante o período em que as condições ambientais são desfavoráveis (Baskin & Baskin, 1998). Esta adaptação pode ser vista como um mecanismo de sobrevivência a um ambiente sazonalmente variável (Westoby, 1981). A dormência tende a ser uma característica de vida mais importante nas espécies anuais do que em espécies perenes devido ao caráter efémero dos seus estádios vegetativos (Forbis, 2010), mas os requisitos de

quebra de dormência de sementes de plantas aquáticas são muitas vezes complexos e/ou desconhecidos.

O conhecimento sobre a ecologia da germinação das espécies de charcos temporários mediterrânicos é escasso (Leck, 1989), mas essencial para o desenvolvimento de protocolos e técnicas de restauração apropriadas (Bowes, 1999). Por isso é crucial determinar quais as condições de luz e temperatura mais adequadas à maximização da germinação das espécies estudadas, após a sua colheita. Por outro lado, essa informação também permite determinar posteriormente, por comparação, quais as alterações que ocorrem nas taxas de germinação e na viabilidade durante as fases subsequentes da conservação *ex situ* – a secagem e a conservação no frio – e com isso decidir se estas técnicas de conservação são ou não adequadas para as espécies em causa. Essa caracterização iniciou-se com este trabalho.

Os objetivos deste estudo são determinar qual a viabilidade das sementes recolhidas, determinar a ecologia da germinação de espécies importantes para a conservação de charcos temporários mediterrânicos e servir de base de comparação para deteção de alterações na viabilidade e nas taxas de germinação durante as fases subsequentes da conservação *ex situ*. Os regimes de luz e de temperatura escolhidos visam simular as condições ecológicas do centro e da periferia de um charco durante a primavera e outono.

2.4 – Material e métodos

Foram selecionadas 19 espécies de sementes e uma de macrósporos (*Isoetes setaceum*) de CTM por serem exclusivas deste habitat ou importantes para a sua conservação. As espécies alvo deste estudo foram *Agrostis stolonifera* L., *Baldellia ranunculoides* (L.) Parl., *Caropsis verticillato-inundata* (Thore) Rauschert, *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult., *Erica ciliaris* Loefl. ex L., *Eryngium corniculatum* Lam., *Exaculum pusillum* (Lam.) Caruel, *Hyacinthoides vicentina* (Hoffmanns. & Link) Rothm., *Hypericum elodes* L., *Illecebrum verticillatum* L., *Isoetes setaceum* Lam., *Juncus emmanuelis* A. Fern. & J. G. Garcia, *Juncus heterophyllus* Dufour, *Juncus rugosus* Steud., *Lobelia urens* L., *Lythrum borysthenticum* (Schrank) Litv., *Potentilla*

erecta (L.) Raeusch., *Romulea ramiflora* Ten. subsp. *ramiflora*, *Scilla autumnalis* L., *Solenopsis laurentia* (L.) C. Presl. A nomenclatura das espécies está de acordo com a Flora Ibérica (Castroviejo *et al.*, 1986-2012).

As sementes e os macrósporos destas espécies foram coletadas entre os meses de maio e setembro de 2014 em charcos estudados no âmbito do projeto LIFE+ "Conservação de charcos temporários na costa Sudoeste de Portugal" e guardadas em local seco até à sua limpeza e posterior utilização.

Antes de delinear a experiência foi realizada consulta da bibliografia disponível e de bases de dados, como a Seed Information Database, RBGK (Liu *et al.*, 2008: <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>), LEDA traitbase (<http://www.leda-traitbase.org/tomcat/LEDAPortal/index.jsp>), ou ENSCOBASE: the ENSCONET Virtual Seed Bank (© ENSCONET. European Native Seed Conservation Network). Esta consulta é fundamental para identificar os requisitos de germinação das espécies selecionadas. Quando não existe informação prévia, a seleção das condições de germinação deverá basear-se em informações sobre a ecologia (habitat e clima).

As sementes e os macrósporos foram limpos meticulosamente de detritos utilizando crivos (®Retsch) de malha adequada (Figuras 1 e 2).



Fig. 1 e 2 - Limpeza de sementes em crivos

De cada espécie foram separadas 100 sementes ou macrósporos e colocados em 4 *eppendorfs* (25 por *eppendorf*) devidamente etiquetados onde foram desinfetados com uma solução 1:1 de hipoclorito de sódio (lixívia comercial a 5%) e água destilada, e lavados depois duas vezes com água destilada (Figura 3).



Fig. 3 – Desinfecção das sementes

Após serem bem escorridos, as sementes e os macrósporos foram colocados na estufa (Memmert®) a 40°C, dentro dos mesmos *eppendorfs*, durante quatro a cinco dias para garantir a secagem completa por evaporação.

Para todos os ensaios foram usadas placas de Petri de vidro com tampa de 9 cm de diâmetro. Estas placas foram lavadas e esterilizadas em estufa (®Memmert) a 180°C durante 2 horas antes de receberem aproximadamente 64 ml de uma preparação de agar bacteriológico a 1% cada, o meio onde foram colocadas as 25 sementes ou macrósporos previamente separados e desinfetados. Tanto a colocação do agar como das sementes e dos macrósporos e a posterior selagem das caixas com ®Parafilm foram realizadas numa câmara de fluxo laminar (®Nuair) para evitar contaminações (Figura 4).



Fig. 4 – Câmara de fluxo laminar

Cada espécie foi distribuída por 4 placas de Petri (totalizando 25 sementes ou macrósporos em cada placa) devidamente identificadas, duas das quais foram embrulhadas em papel de alumínio para simular a germinação na ausência de luz, perfazendo 80 caixas.

As amostras foram colocadas numa incubadora (Figura 5) com temperatura e luminosidade controladas durante 34 dias sob um fotoperíodo de 12/12h e dois regimes de temperatura: temperatura constante de 15°C para simular as condições de outono/primavera no centro do charco e temperaturas alternadas (12h sem luz a 10°C/12h com luz a 20°C), correspondentes às condições que se verificariam na margem do charco.

Durante os ensaios foram efetuadas contagens periódicas, com aproximadamente 4 dias de intervalo, tendo-se considerado como germinadas as sementes com uma radícula de pelo menos 1mm. A germinação ocorrida na ausência de luz foi contabilizada uma única vez no final do ensaio. As sementes ou os macrósporos não germinados no final deste período, sempre que o seu tamanho o permitia, foram cortados longitudinalmente com um bisturi para observação do estado do embrião ou

gamatófito e consequente determinação da viabilidade de acordo com esse estado. Foram consideradas viáveis as sementes cujo embrião apresentava tecidos brancos, firmes e sem necroses. Quando as sementes eram demasiado pequenas (p.e., *Erica ciliaris*, *Solenopsis laurentia*, *Lobelia urens*) o teste à viabilidade foi feito utilizando o teste de pressão, em que são consideradas viáveis apenas as sementes que oferecem resistência à pressão exercida por uma pinça de pontas finas. Em ambos os casos, os embriões ou gametófitos foram observados com lupa binocular.



Fig. 5 - Incubadora com temperatura e luminosidade controladas

Os dados foram analisados utilizando um modelo linear generalizado (GLM) em R (R Development Core Team 2011) com a função *logit link*, com estrutura binomial, tendo em consideração as eventuais interações entre os tratamentos. Quando as interações não eram significativas ($P > 0,05$) entre tratamentos o modelo foi repetido sem considerar as interações.

2.5 – Resultados

A viabilidade das sementes estudadas foi elevada (superior a 70%), à exceção das sementes de *Potentilla erecta*, cuja taxa de viabilidade não atingiu 40% (Figura 6), e que não foi considerada na análise das taxas de germinação por esse motivo. As espécies cujas sementes tiveram uma taxa de viabilidade mais elevada (superior a 95%) foram *Romulea ramiflora* com uma taxa de viabilidade de 100%, *Hyacinthoides vicentina* com 99,5%, *Juncus emmanuelis* com 97,6% e *Juncus heterophyllus* com 95,4% (Figura 6).

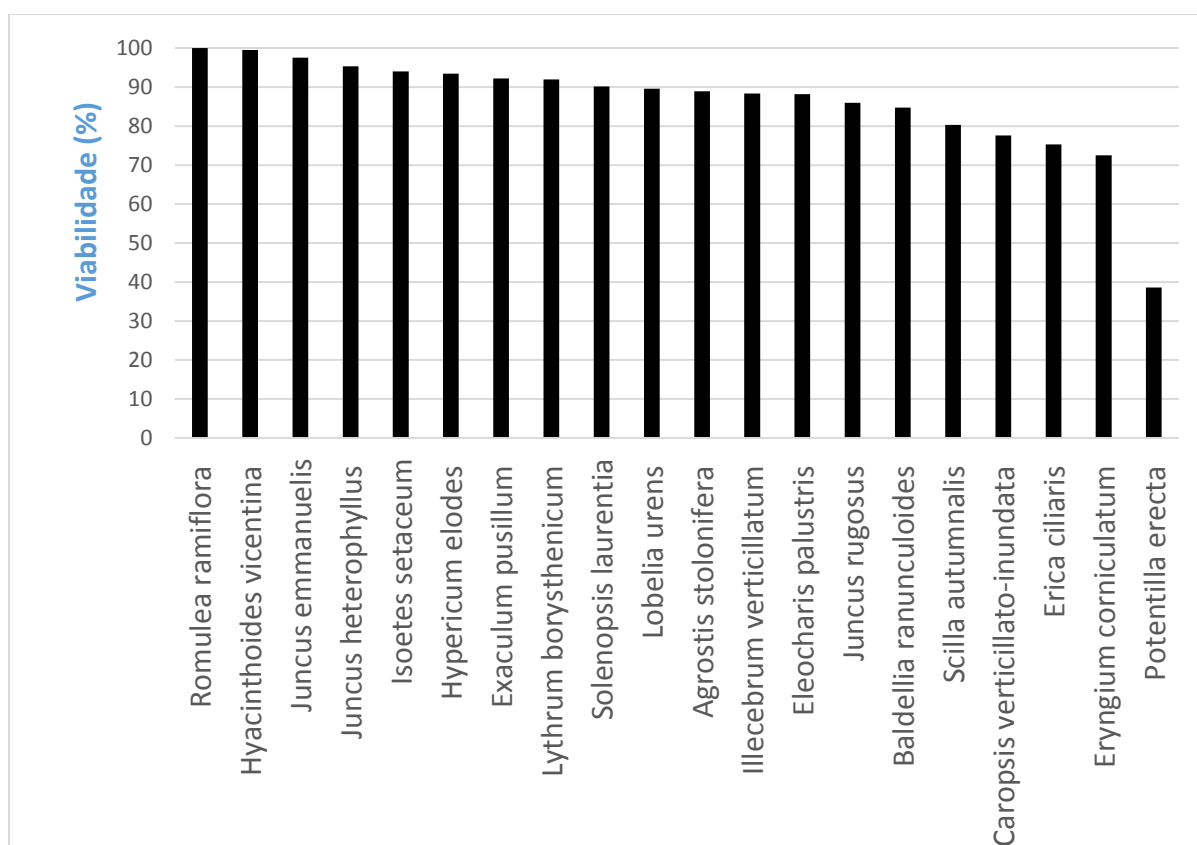


Fig. 6 – Viabilidade das sementes em estudo.

Em relação à germinação, *Illecebrum verticillatum*, *Juncus emmanuelis*, *Juncus heterophyllus*, *Lythrum borysthenicum* e *Romulea ramiflora* (Figura 7) apresentaram taxas de germinação elevadas (> 75 %) em pelo menos uma das modalidades dos tratamentos. A percentagem de germinação das sementes de *Baldellia ranunculoides* foi muito reduzida (2,3%), e deu-se apenas com luz e temperatura constante. *Erica ciliaris* apresentou igualmente uma percentagem de germinação muito reduzida (3,7%) com luz e temperatura alternada (Figura 8). Com as condições de temperatura e luz utilizadas não se verificou germinação nas sementes de *Eleocharis palustris*, *Lobelia urens* e *Scilla autumnalis* nem nos marcrósporos de *Isoetes setaceum*. Devido à falta de germinação ou a apresentarem taxas de germinação muito reduzidas estas espécies não foram abrangidas nas análises estatísticas.

O regime de luz influenciou significativamente a taxa de germinação das sementes de *Agrostis stolonifera* (Figuras 9 e 10), *Caropsis verticillato-inundata*, *Exaculum pusillum*, *Juncus emmanuelis*, *Juncus rugosus*, *Lythrum borysthenicum* e *Solenopsis laurentia* (Tabela 1), favorecendo a germinação sob o fotoperíodo de 12/12h. No caso de *Agrostis stolonifera* existiu interação entre luz e temperatura, pelo que o efeito da luz dependeu da temperatura, ou seja, a germinação foi favorecida pela luz unicamente com temperaturas alternadas. A germinação das espécies do género *Juncus* foi muito diminuta na ausência de luz e, no limite, nenhuma das sementes de *Juncus heterophyllus* germinou sem luz (Figura 8).

O regime de temperatura (temperatura constante *versus* temperatura alternada) influenciou significativamente a germinação das sementes da maioria das espécies estudadas: *Agrostis stolonifera*, *Caropsis verticillato-inundata*, *Eryngium corniculatum*, *Exaculum pusillum*, *Hyacinthoides vicentina*, *Hypericum elodes*, *Illecebrum verticillatum*, *Juncus emmanuelis*, *Juncus heterophyllus*, *Romulea ramiflora* e *Solenopsis laurentia*. As sementes de *C. verticillato-inundata*, *E. pusillum*, *H. vicentina*, *H. elodes*, *I. verticillatum*, *J. emmanuelis* e *J. heterophyllus*, apresentaram maior taxa de germinação com temperaturas alternadas. Já a taxa de germinação das sementes de *Romulea ramiflora* e *Solenopsis laurentia* foi maior em temperatura contínua. Nos casos de *Agrostis stolonifera* e *Eryngium corniculatum* existiu interação entre os tratamentos de luz e temperatura (Tabela 1). O regime de temperatura afetou a germinação das sementes destas espécies unicamente na ausência de luz, mas de forma oposta (Figura 8; Tabela 1). Enquanto a taxa de germinação de *Eryngium*

corniculatum aumentou com a temperatura alternada de 10 e 20°C, a taxa de germinação de *Agrostis stolonifera* foi maior com temperaturas constante de 15°C.

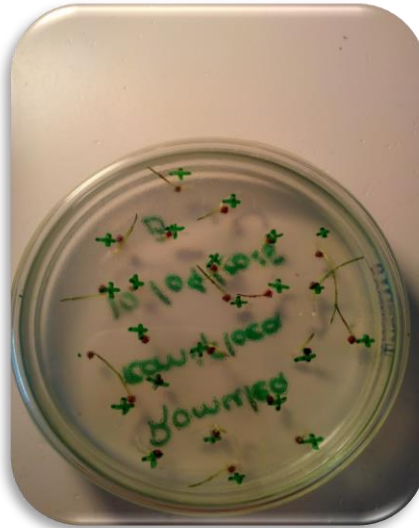


Figura 7 – Germinação de sementes de *Romulea ramiflora*

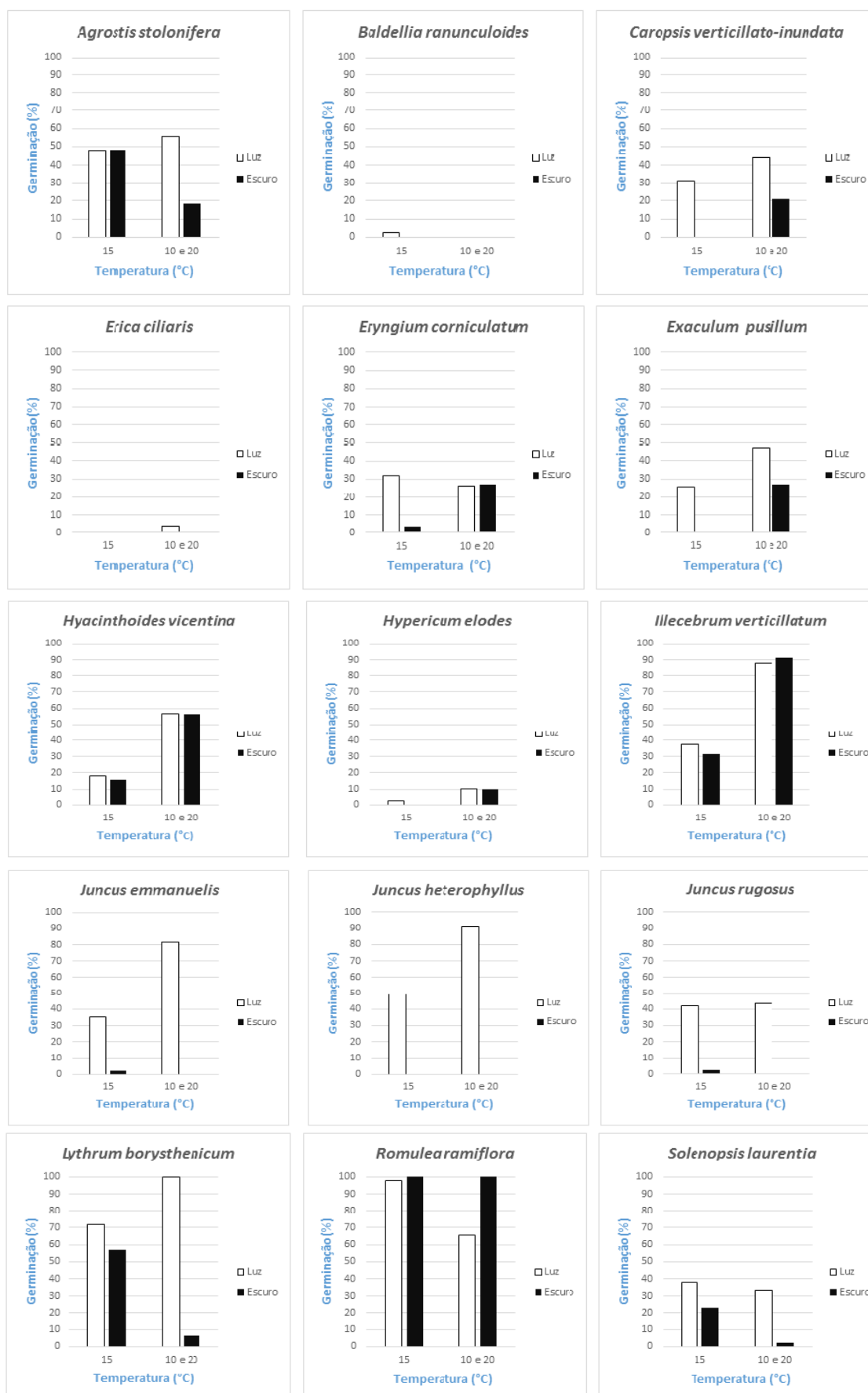


Fig.8- Percentagem de germinação das 15 espécies de sementes em estudo expostas a dois regimes de luz – um fotoperíodo de 12/12 h (Luz) e ausência de luz (Escuro) – e dois regimes de temperatura – temperatura constante (15°C) e temperaturas alternadas (10°C/20°C).

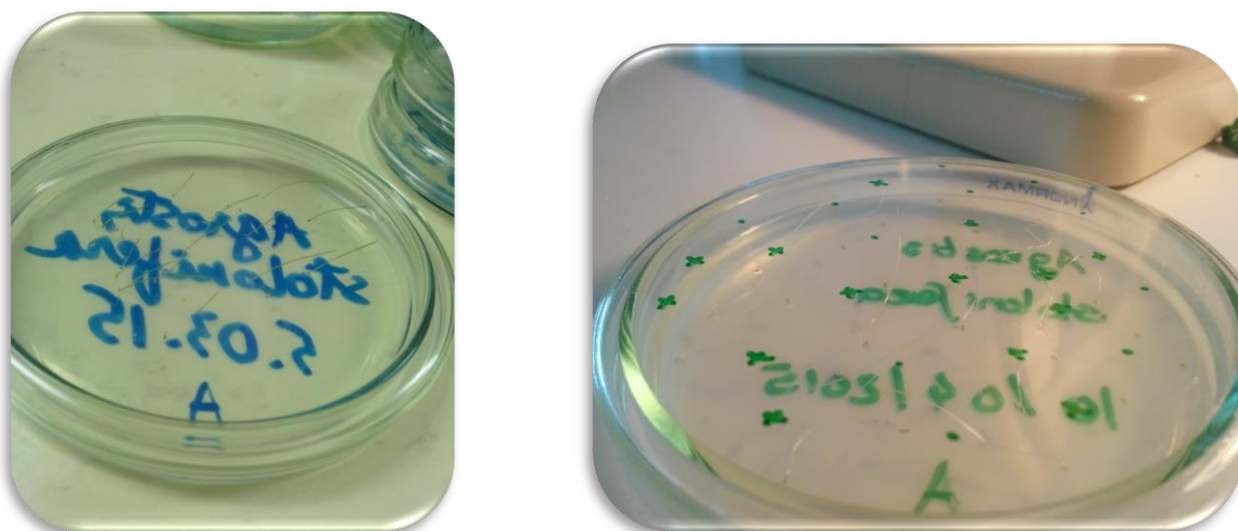


Fig. 9 e 10 – Germinação de *Agrostis stolonifera* em dois regimes de luz – com fotoperíodo de 12/12 h (Luz) à direita e ausência de luz (Escuro) à esquerda.

Tabela 1 – Resultados do modelo linear generalizado da germinação de sementes com indicação dos valores de *P* do regime de luz (RL), do regime da temperatura (RT) e da interação entre eles.

Espécies	<i>p</i> RL	<i>p</i> RT	<i>p</i> RL x RT
<i>Agrostis stolonifera</i>	<0,001	0,003	0,011
<i>Caropsis verticillato-inundata</i>	<0,001	0,01	0,988
<i>Eryngium corniculatum</i>	0,913	0,037	0,034
<i>Exaculum pusillum</i>	0,001	<0,001	0,988
<i>Hyacinthoides vicentina</i>	0,833	<0,001	0,774
<i>Hypericum elodes</i>	0,722	0,03	0,992
<i>Illecebrum verticillatum</i>	0,917	<0,001	0,443
<i>Juncus emmanuelis</i>	<0,001	<0,001	0,991
<i>Juncus heterophyllus</i>	-	<0,001	0,999
<i>Juncus rugosus</i>	<0,001	0,912	0,992
<i>Lythrum borysthenicum</i>	<0,001	0,085	0,989
<i>Romulea ramiflora</i>	0,991	0,002	0,999
<i>Solenopsis laurentia</i>	<0,001	0,002	0,160

Como se pode constatar na Figura 11, as primeiras sementes a germinar (primeira contagem, 5º dia), foram de *Illecebrum verticillatum* e *Lythrum borysthenicum*. Os máximos da germinação acumulada, obtidos com um fotoperíodo de 12/12h e temperatura alternada, foram alcançados ao 13º dia para *Illecebrum verticillatum* (89%) e ao 10º dia para *Lythrum borysthenicum* (100%). A germinação das sementes de *Agrostis stolonifera*, tanto para temperatura constante como alternada, deu-se entre o 5º e o 10º dia, estabilizando em seguida.

Na segunda contagem, no 10º dia, já se observava germinação em ambas as modalidades de temperatura nas sementes de *Eryngium corniculatum*, *Exaculum pusillum* e *Solenopsis laurentia*. Nas sementes de *Eryngium corniculatum* (Figura 12) registou-se estabilidade da taxa de germinação, em ambas as modalidades de temperatura, a partir do 17º dia. Para as sementes de *Exaculum pusillum*, a percentagem de germinação ao 10º dia era ligeiramente superior a temperatura constante. No entanto, verificou-se um aumento de germinação considerável sob temperatura alternada que se manteve até final. Na *Solenopsis laurentia*, a germinação iniciou-se de forma idêntica e no final do ensaio obtiveram-se percentagens muito semelhantes em ambos os regimes de temperatura.

A germinação das sementes de *Hyacinthoides vicentina*, *Juncus emmanuelis*, *Juncus heterophyllus* e *Juncus rugosus* começou mais cedo (antes do 10º dia, segunda contagem) na modalidade de temperatura alternada. Nas sementes de *Juncus rugosus* observou-se uma diferença considerável na percentagem de germinação entre o 10º e o 20º dia entre as duas modalidades de temperatura. Esta diferença foi diminuindo e, no fim do ensaio, a percentagem de germinação foi quase idêntica, em ambas as modalidades.

Nas sementes de *Hypericum elodes* a germinação iniciou-se a partir do 10º dia sob temperatura alternada, só ocorrendo germinação com temperatura constante a partir do 20º dia, embora de forma muito incipiente.

As sementes de *Romulea ramiflora* foram as que mais tarde iniciaram a germinação: sob temperatura constante e a partir do 13º dia. É no entanto de salientar que a percentagem de germinação no final do ensaio foi de 98%. No caso da temperatura alternada, a germinação só se iniciou a partir do 10º dia e atingiu apenas 65,4%.

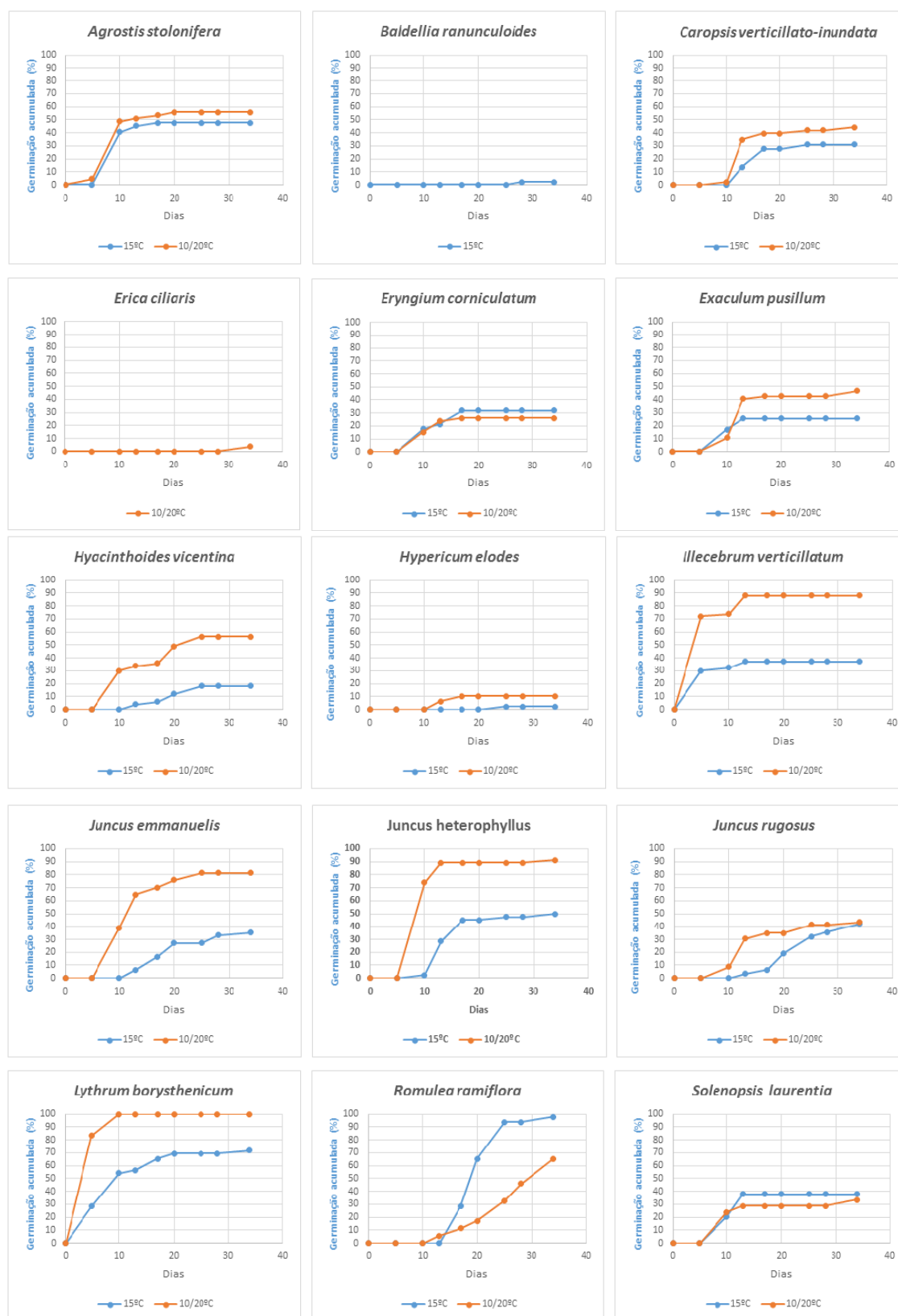


Fig. 11 – Germinação acumulada (%) ao longo do período de tempo que durou o ensaio das 15 espécies de sementes em estudo, expostas a um fotoperíodo de 12/12 h e dois regimes de temperatura – temperatura constante (15°C) e temperaturas alternadas (10°C/20°C).

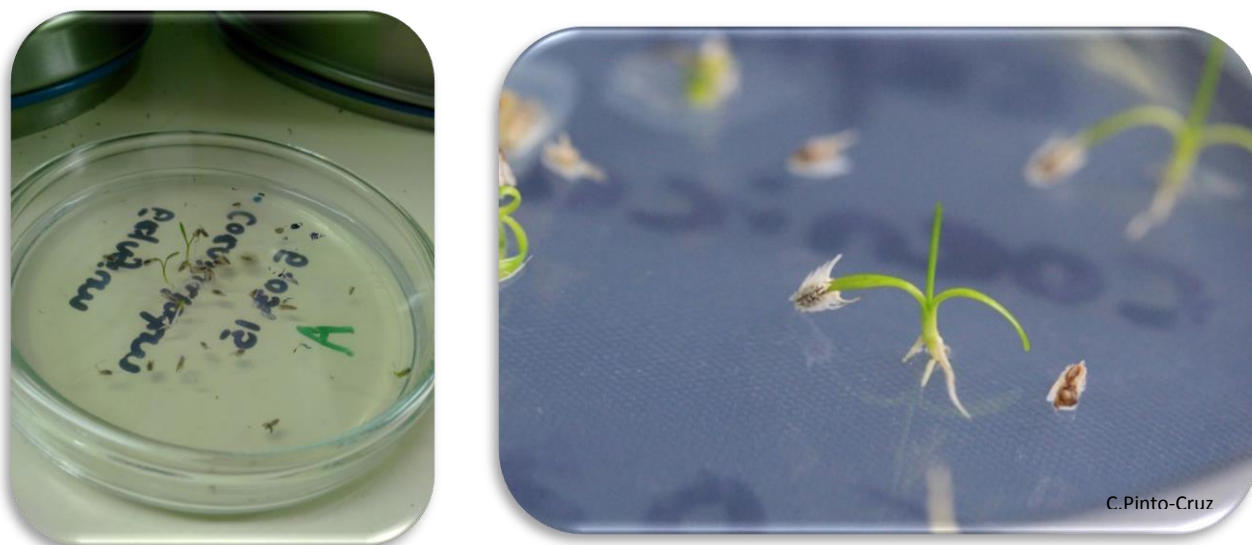


Fig. 12 e 13 – Germinação de sementes de *Eryngium corniculatum*

2.6 – Discussão

A viabilidade das sementes utilizadas foi elevada, com exceção de *Potentilla erecta*. Por vezes o período em que é possível efetuar a recolha de sementes maduras, ou quase maduras, antes da dispersão é muito curto. Como resultado, algumas das sementes de um lote são suscetíveis de ser imaturas, especialmente quando se trata de espécies com hábitos de floração muito específicos (Hay *et al.*, 1999) afetando a viabilidade. A tolerância à dessecação, por exemplo, é adquirida durante o desenvolvimento da semente e, conseqüentemente, mesmo com espécies ortodoxas uma coleção pode conter sementes imaturas que se revelam recalcitrantes, isto é, não tolerantes à dessecação (Hay *et al.*, 1999).

Apesar da elevada taxa de viabilidade, algumas espécies, de entre as que nos propusemos estudar, não encontram as suas condições ótimas de germinação no intervalo de temperaturas selecionado, o que ficou confirmado com as baixas percentagens de germinação que atingiram nas experiências levadas a cabo, ou mesmo com a ausência de germinação. Perante a impossibilidade logística de testar

no período de tempo considerado para este ensaio mais do que duas modalidades de temperatura com duas modalidades de luz, foram escolhidas, para começar, aquelas que dariam garantias de germinação para um maior número de espécies de acordo com bibliografia especializada (Baskin & Baskin, 1998; Probert, 2000).

Dada a elevada taxa de viabilidade, podemos afirmar que as espécies que não germinaram se encontravam dormentes, ou dito de outro modo, as condições fornecidas não foram adequadas à quebra dessa dormência, ou os tratamentos efetuados não continuaram durante um período de tempo suficiente (Hay *et al.*, 1999), como parece ser o caso de *Baldellia ranunculoides* e de *Erica ciliaris*, cujas sementes começaram a germinar nos últimos dias do ensaio.

Relativamente a *Eleocharis palustris* embora tenha revelado possuir uma percentagem de viabilidade elevada, a sua germinação ocorre a temperatura mais elevada (ENSCONET Virtual Seed Bank). Para além disso, níveis elevados de germinação só são alcançados quando a dormência mecânica é removida por escarificação para expor a semente, tal como comprovado por Brochet *et al.* (2010). A taxa de germinação mais elevada foi obtida num regime de temperatura alternada – 12h sem luz a 19°C/12h com luz a 33°C – depois das sementes serem escarificadas (lascadas com bisturi) e sujeitadas a um tratamento químico com ácido giberélico (ENSCONET Virtual Seed Bank). Para *Hypericum elodes* também estão documentadas taxas de germinação com temperaturas mais elevadas (ENSCONET Virtual Seed Bank).

Para as sementes de *Lobelia urens* é necessário um regime de temperatura alternada – 12h sem luz a 16°C/12h com luz a 26°C – para se obter uma taxa de germinação elevada (ENSCONET Virtual Seed Bank).

No que concerne à *Scilla autumnalis*, embora o comportamento de germinação seja variável, outros estudos comprovaram como favorável para a germinação um regime de temperatura constante, com maior número de horas no escuro (ENSCONET Virtual Seed Bank). Níveis elevados de germinação foram obtidos a temperatura constante de 10°C com um fotoperíodo de 8h com luz/16h sem luz. No entanto, também foram obtidas percentagens elevadas de germinação com temperatura constante alta – 31°C – e fotoperíodo de 12/12h, após ser efetuada a escarificação das sementes antecedida por um pré-tratamento que consistia em manter as sementes embebidas

em 1% de agar durante algum tempo a baixa temperatura (ENSCONET Virtual Seed Bank).

No caso do *Isoetes setaceum*, não se conseguiu observar o gametófito em nenhum dos macrósporos nas condições de luz e temperatura estudadas. Não foi encontrada informação sobre a germinação do gametófito desta espécie em condições específicas de luz e temperatura.

A luz e a temperatura constituem dois parâmetros considerados de extrema importância na regulação da germinação (Baskin & Baskin, 1998).

Os resultados deste estudo documentam os efeitos da luz e da temperatura na germinação das sementes das espécies analisadas.

Embora o comportamento de germinação tenha variado entre as espécies estudadas verificou-se que o regime de temperatura (temperatura constante *versus* temperatura alternada) influencia significativamente a germinação.

Para espécies de plantas aquáticas em todo o mundo, as temperaturas preferenciais para a germinação abaixo dos 15°C não são comuns (Baskin & Baskin, 1998). Sementes de espécies não dormentes geralmente germinam com temperaturas entre os 5 e os 20°C (Tuckett *et al.*, 2010). No geral, espécies que ocorrem em habitats caracterizados por períodos de inundação que alternam com períodos de seca, num clima mediterrâneo, germinam preferencialmente com temperaturas baixas, embora a germinação possa ocorrer em qualquer mês a partir do outono até início da primavera (Tuckett *et al.*, 2010; Carta *et al.*, 2012). Em estudos efetuados, embora o comportamento de germinação seja variável entre espécies, observou-se como temperatura favorável para germinação, uma tendência predominante para temperaturas inferiores ou iguais a 15°C, tendo a percentagem de germinação sido maior com temperaturas de cerca de 15°C associadas com o período de chuvas (Tuckett *et al.*, 2010; Cochrane *et al.*, 2011; Carta *et al.*, 2012). Temperaturas similares têm sido registadas como ótimas para espécies características de climas mediterrânicos (Tuckett *et al.*, 2010; Cochrane *et al.*, 2011; Carta *et al.*, 2012).

Na maioria das espécies estudadas verificou-se que a germinação foi estimulada com temperaturas alternadas (10 e 20°C), indicando uma preferência para germinação dessas espécies nas margens dos corpos de água ou quando os níveis de água começam a baixar como já foi referido por Carta *et al.* (2013). Nos estudos efetuados

por Thompson & Grime (1983), a temperatura alternada foi também considerada como requisito essencial na germinação de espécies de zonas húmidas. Outras espécies germinaram bem em ambos os regimes de temperatura (temperatura constante e alternada), indicando que a germinação pode ocorrer igualmente quando se verifica alagamento e quando o charco está seco como já foi referido por Carta *et al.* (2013). É este o caso da *Romulea ramiflora*, que apresentou uma percentagem de germinação elevada tanto à temperatura constante de 15°C quanto à temperatura alternada de 10 e 20°C.

O regime de luz (fotoperíodo de 12/12h *versus* ausência de luz) influenciou significativamente na taxa de germinação, tendo-se comprovado que a luz favorece a germinação.

Quase não houve sementes de espécies do género *Juncus* a germinar na ausência de luz, e no caso de *Juncus heterophyllus* nenhuma das sementes o fez. A exigência de luz para a germinação encontra-se geralmente associada a sementes pequenas que se encontram próximo da superfície do solo (Tuckett *et al.*, 2010) e é um requisito comum nas plantas de zonas húmidas (Thompson & Grime, 1983; Probert, 2000), particularmente dentro do género *Juncus* (Grime *et al.*, 1981).

De acordo com os resultados obtidos (elevadas viabilidades, baixas taxas de germinação, variabilidade nas condições ótimas para germinação das diferentes espécies) e do pouco conhecimento sobre as condições de germinação e dormência de sementes, considera-se que a qualidade de um lote de sementes a preservar deve ser estimada pela sua viabilidade e não pela percentagem de germinação obtida. O mesmo foi previamente concluído por Godefroid *et al.* (2010).

Os requisitos para a quebra de dormência de sementes de plantas aquáticas são muitas vezes complexos e/ou desconhecidos. Também não se conhecem as condições ótimas de germinação de muitas espécies. Ambos conhecimentos são indispensáveis para poder efetuar com sucesso a recuperação ou o restauro de habitats degradados, pelo que a continuação do desenvolvimento de trabalhos nesta área é fundamental.

3 – Considerações finais

O armazenamento de sementes *ex situ* constitui a forma mais eficaz para a conservação de germoplasma de sementes tolerantes à dessecação (Smith *et al.*, 2003). Sendo considerado o método mais fácil e menos dispendioso, tornou-se a opção comum para as espécies que possuem sementes ortodoxas, e que podem portanto ser conservadas a longo prazo por esta via (ICNF, s/data).

Neste estudo, constatou-se que as sementes utilizadas apresentaram níveis de viabilidade bastante elevados.

Manter a viabilidade dessas sementes durante longos períodos de tempo é um elemento-chave na conservação dos recursos genéticos vegetais (FAO, 2014). No entanto, o armazenamento a longo prazo poderá levar à perda de viabilidade das sementes, pelo que se torna necessário proceder à avaliação da sua deterioração ao longo do tempo (Walters *et al.*, 2005; Hay & Probert, 2013). Todo o trabalho aqui desenvolvido pode constituir uma base para a monitorização de alterações na viabilidade das sementes das espécies conservadas *ex situ*.

A luz e a temperatura constituem dois parâmetros considerados de extrema importância na regulação da germinação, tal como a complexa interação entre o estado das sementes e a humidade do solo (Baskin & Baskin, 1998).

Verificou-se neste estudo que os regimes de luz e temperatura são relevantes para a germinação mas que as espécies respondem de forma diferenciada. A grande maioria das espécies em estudo alcançou uma percentagem de germinação elevada, apesar de as condições de luz e temperatura escolhidas para a sua realização não terem abrangido as condições necessárias para a germinação das sementes de todas as espécies. Ainda que os resultados sejam promissores, mais experimentação é necessária para determinação das condições ótimas de germinação, que são aquelas que a maximizam, e que claramente não foram atingidas para algumas das espécies. Entre elas é de salientar *Isoetes setaceum*, pela sua relevância enquanto espécie bioindicadora do habitat prioritário (3170*) e, particularmente, pelo estatuto de espécie

quase ameaçada na Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (UICN).

Um teste de germinação é o método padrão usado para proceder à avaliação da viabilidade de sementes conservadas *ex situ* (Smith *et al.*, 2003; FAO, 2014). No entanto, de acordo com os resultados obtidos, considera-se que a qualidade de um lote de sementes a preservar deve ser estimada pela sua viabilidade. Considerando que a taxa de viabilidade é mais adequada para monitorizar a qualidade dos lotes de sementes a preservar a longo prazo do que a taxa de germinação, os resultados obtidos neste estudo relativamente à viabilidade das sementes são encorajadores para a conservação *ex situ*, cujo principal objetivo é preservar a viabilidade e a identidade genética das sementes pelo maior período de tempo possível em infraestruturas que visam a conservação de recursos genéticos vegetais, os bancos de germoplasma. A conservação *ex situ* deve, no entanto, ser considerada como um método complementar, e deverão sempre ser procuradas vias para recuperar as espécies nos seus habitats naturais (*in situ*), ou seja, deve ser adotada uma estratégia integrada (ICNF, s/data).

4 – Bibliografia

- Bacchetta, G., Bueno Sánchez, A., Fenu, G., Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp
- Baggela, S. & Caria, M. (2012). *Diversity and ecological characteristics of vascular flora in Mediterranean temporary pools*. *Comptes Rendus Biologies* 335: 69-76.
- Barret, S., Eckert, C. & Husband, B. (1993). *Evolutionary processes in aquatic plant populations*. *Aquatic Botany* 44: 105-145.
- Baskin, C. & Baskin, M. (1998). *Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. pp. 492–508. Academic Press, California.
- Biggs, J., Corfield, A., Walker, D., Whitfield, M. & Williams, P. (1994). *New approaches to the management of ponds*. *British Wildlife* 5: 273-287.
- Bouahim, S., Rhazi, L., Amami, B., Sahib, N., Rhazi, M., Waterkeyn, A., Zouahri, A., Mesleard, F., Muller, S. & Grillas, P. (2010). *Impact of grazing on the species richness of plant communities in Mediterranean temporary pools (western Morocco)*. *Comptes Rendus – Biologies* 333: 670-679.
- Bowes, B.G. (1999). *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Manson Publishing Ltd, London.
- Brochet, A., Guillemain, M., Gauthier-Clerc, M., Fritz, H. & Green, A. (2010). *Endozoochory of Mediterranean aquatic plant seeds by teal after a period of desiccation: Determinants of seed survival and influence of retention time on germinability and viability*. *Aquatic Botany* 93: 99-106.
- Camacho, A., Borja, C., Valero-Garcés, B., Sahuquilo, M., Cirujano, S., Soria, M., Rico, E., De La Hera, A., Santamans, C., García de Domingo, A., Chicote, A. & Gosálvez, U. (2009). *3170* Lagunas y charcas temporales Mediterráneas (*)*. In: VV.AA. *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de habitat de interés comunitario en España*. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Madrid, Espanha.

- Canha, P. & Pinto-Cruz, C. (2010). *Plano de Gestão de Charcos Temporários Mediterrânicos no Concelho de Odemira*. Évora.
- Carta, A., Bedini, G., Foggi, B. & Probert, R. (2012). *Laboratory germination and seed bank storage of *Ranunculus peltatus* subsp. *baudotii* seeds from the Tuscan Archipelago*. Seed Sci. & Technol 40: 11–20
- Carta, A., Bedini, G., Muller, J. & Probert, R. (2013). *Comparative seed dormancy and germination of eight annual species of ephemeral wetland vegetation in a Mediterranean climate*. Plant Ecol DOI 10.1007/s11258-013-0174-1
- Casanova, M. & Brock, M. (2000). *How do depth, duration and frequency of flooding influence the establishment of wetland plant communities?* Plant Ecology 147: 237-250.
- Castroviejo, S. (coord. ger.). (1986-2012). Flora Ibérica. Vols. I-VIII, X-XV, XVII-XVIII, XXI. Real Jardín Botánico. CSIC. Madrid, Espanha.
- Céréghino, R., Biggs, J., Oerti, B. & Declerck, S. (2008). *The ecology of European ponds: defining the characteristics of a neglected freshwater habitat*. Hydrobiologia 597: 1-6.
- Cochrane, A., Daws, M. & Hay, F. (2011). *Seed-based approach for identifying flora at risk from climate warming*. Austral Ecology 36: 923-935.
- Davies, B., Biggs, J., Williams, P., Whitfield, M., Nicolet, P., Sear, D., Bray, S. & Maund, S. (2008). *Comparative biodiversity of aquatic habitats in the European agricultural landscape*. Agriculture, Ecosystems and Environment 125: 1-8.
- Dimitriou, E., Karaouzas, I., Skoulikidis, N. & Zacharias, I. (2006). *Assessing the environmental status of Mediterranean temporary ponds in Greece*. Ann. Limnol. - Int. J. Lim 42: 33-41.
- EC (European Commission). (2007). Interpretation Manual of European Union Habitats – EUR27. European Commission DG Environment. Natura 2000. Disponível em: <http://ec.europa.eu>. Acedido a: 17.11.2015.
- ENSCONET (European Native Seed Conservation Network). (2009). *Protocolos e recomendações da ENSCONET para a conservação de sementes*. 55p. ISBN: 978-84-692-6456-0.

- EPCN (European Pond Conservation Network). (2008). *The Pond Manifesto*. Disponível em: <http://www.europeanponds.orgwww>. Acedido a: 18.11.2015.
- Espírito-Santo, D. & Arsénio, P. (2005). *Influence of land use on the composition of plant communities from seasonal pond ecosystems in the Guadiana Valley Natural Park (Portugal)*. Phytocoenologia 35: 2-3, 267-281. Berlin.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2014) *Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture*. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3704e.pdf>. Acedido a: 16.11.2015.
- Ferreira, M. & Beja, P. (2013). *Mediterranean amphibians and the loss of temporary ponds: Are there alternative breeding habitats?* Biological Conservation 165: 179-186.
- Flora-On (Flora de Portugal Interativa). (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. Disponível em: <http://www.flora-on.pt>. Acedido a: 03.03.2015.
- Fonseca, L., Cristo, M., Machado, M., Sala, J., Reis, J., Alcazar, R. & Beja, P. (2008). *Mediterranean temporary ponds in Southern Portugal: Key faunal groups as management tools?* Pan-American Journal of Aquatic Sciences 3: 304-320.
- Forbis, T. (2010). *Germination phenology of some Great Basin native annual forb species*. Plant Species Biology 25: 221-230.
- Gallego-Fernández, J., García-Mora, M. & García-Novo, F. (1999). *Small wetlands lost: a biological conservation hazard in Mediterranean landscapes*. Environmental Conservation 26: 190-199.
- Godefroid, S., Vyver, A. & Vanderborght, T. (2010). *Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks*. Biodivers Conserv 19: 1365–1383.
- Gómez-Rodríguez, C., Díaz-Paniagua, C., Serrano, L., Florencio, M. & Portheault, A. (2009). *Mediterranean temporary ponds as amphibian breeding habitats: the importance of preserving pond networks*. Aquatic Ecology 43: 1179–1191.
- Grime, J., Mason, G., Curtis, A., Rodman, J., Band, S., Mowforth, M., Neal, A. & Shaw, S. (1981). *A comparative study of germination characteristics in a local flora*. Journal of Ecology 69: 1017-1059

- Grillas, P., Gauthier, P., Yavercovski, N. & Perennou, C. (2004). *Les mares temporaires méditerranéennes*. Vol. 1 Enjeux de conservation, fonctionnement et gestion. Station Biologique de la Tour Du Valat. Arles. France.
- Hay, F. & Probert, R. (2013). *Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research*. Conserv Physiol 1: DOI:10.1093/conphys/cot030.
- Hay, F., Probert, R., Marro, J. & Dawson, M. (1999). *Towards the ex situ Conservation of Aquatic Angiosperms: a Review of Seed Storage Behaviour*. In «Seed Biology- Advances and Applications». México. CABI Publishing. ISBN 0-85199-404-0.
- Hong, D. & Ellis, H. (1996). *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI Technical Bulletin 1. Disponível em: [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=g9QJrGkv7NAC&oi=fnd&pg=PA7&dq=Hong+T.D.+%26+Ellis+R.H.+\(1996\)](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=g9QJrGkv7NAC&oi=fnd&pg=PA7&dq=Hong+T.D.+%26+Ellis+R.H.+(1996)) Acedido a: 05.09. 2015.
- ICNF (s/d a). Rede Natura 2000. *In Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas*. Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/patrinatur/especies/flora/banco-sement>. Acedido a: 05.09.2015.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). (2015). *The IUCN Red of List of Threatened Species*. Versão 2015-3. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acedido a: 07.09.2015.
- Keddy, P. (2010). *Wetland Ecology – Principles and Conservation*. 2nd Edition. Cambridge, University Press, New York.
- Keddy, P., Fraser, L., Solomeshch, A., Junk, W., Campbell, D., Arroyo, M. & Alho, C. (2009). *Wet and Wonderful: the world's largest wetlands are conservation priorities*. BioScience 59:39-51.
- Leck, M. (1989). Wetland seed banks. *Ecology of soil seed banks* (eds. M.A. Leck, V.T. Parker e R.L. Simpson), pp. 283-305. Academic Press, London.
- Liu, K., Eastwood, R., Flynn, S., Turner, R. & Stuppy, W. (2008). Seed Information Database (versão 7.1, May.008) <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>.
- Mitsch, W. & Gosselink J. (2015). *Wetlands*. 5th Edition. Wiley & Sons. New Jersey.
- Oertli, B., Céréghino, R., Hull, A. & Miracle, R. (2009). *Pond conservation: from science to practice*. Hydrobiologia 634: 1-9.

- Pereira, A. (2011). *Biodiversidade de charcos temporários de diferentes idades na Serra de Grândola, Portugal*. Dissertação de Mestrado em Biologia da Conservação. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Pérez-Bilbao, A., Benetti, C. & Garrido, J. (2015). *Biodiversity and conservation of temporary ponds – assessment of the conservation status of “Veiga de Ponteliñares”, NW Spain (Natura 2000 Network), using freshwater invertebrates*. Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function, Dr Juan A. Blanco (Ed.). ISBN: 978 953 51 2028 5. InTech: DOI: 10.5772/59104.
- Pinto-Cruz, C., Silva, V., Pedroso, N. M. & Canha, P. (2011) a. Charcos Temporários do Sul de Portugal. 70p.
- Pinto-Cruz, C., Barbosa, A., Molina, J. & Espírito-Santo, M. (2011) b. *Biotic and abiotic parameters that distinguish types of temporary ponds in a Portuguese Mediterranean ecosystem*. Ecological Indicators 11: 1658–1663.
- Preston, D. & Croft, M. (2001). *Aquatic Plants in Britain and Ireland*. Harley Books, Colchester, Essex. Disponível em: [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=lang_es%7Clang_en%7Clang_pt&id=3AgSBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Preston,+C.D.+and+Croft,+J.M.+\(2001\)](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=lang_es%7Clang_en%7Clang_pt&id=3AgSBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Preston,+C.D.+and+Croft,+J.M.+(2001)) Acedido a: 05.09.2015.
- Probert, R. (2000). *The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination*. In Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities, 2nd edition (eds. M. Fenner), pp. 261-292, CAB International, Wallingford, UK.
- Probert, R., Daws, M. & Hay, F. (2009). *Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species*. Ann Bot 104: 57-69.
- Ramsar (2013). *The Ramsar Convention Manual: A guide to the convention on wetlands (Ramsar, Iran, 1971)*. 6th ed. Ramsar Convention Secretariat. Gland, Suíça.
- Rhazi, L., Grillas, P., Toure, A. & Ham, L. (2001). *Impact of land use in catchment and human activities on water, sediment and vegetation*. Life Sciences 324: 165-177.
- Rhazi, L., Grillas, P., Saber, E.-R., Rhazi, M., Brendonck, L. & Waterkeyn, A. (2011). *Vegetation of Mediterranean temporary pools: a fading jewel?*. Hydrobiologia. DOI: 10.1007/s10750-011-0679-3.

- Rosseló-Graell, A. (2003). *Caracterização fito-ecológica das lagoas temporárias do campo Militar de Santa Margarida (Ribatejo, Portugal)*. Portugaliae Acta Biol 21: 245-278. Lisboa.
- Ruiz, E. (2008). *Management of Natura 2000 habitats. 3170* Mediteranean temporary ponds*. European Commission.
- Sala, O., Chapin III, F., Armesto, J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L., Jakson, R., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D., Mooney, H., Oosterheld, M., Leroy Poff, N., Sykes, M., Walker, B., Walker, M. & Wall, D. (2000). *Global biodiversity scenarios for the year 2100*. Science 287: 1770-1774.
- Silva, H. (2012). *Proposta de Ordenamento para as Zonas Húmidas do Baixo Lima*. Dissertação de Mestrado em Ecologia. Escola de Ciências. Universidade do Minho.
- Silva, V. (2009). *Vegetação de charcos e Cursos de água temporários: Estudo da ordem Isoetetalia em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Gestão e Conservação de Recursos Naturais. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Smith, R., Dickie, J., Linington, S., Prichard, H. & Probert, R. (2003). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, London.
- Thompson, K. & Grime, J. (1983). *A comparative study of germination responses to diurnally-fluctuating temperatures*. Journal of Applied Ecology 20: 141-156.
- Tuckett, R., Merritt, D., Hay, F., Hopper, S. & Dixon, K. (2010). *Dormancy, germination and seed bank storage: a study in support of ex situ conservation of macrophytes of southwest Australian temporary pools*. Freshwater Biology 55: 1118-1129.
- UNESCO (1971). *Convention on Wetlands of International Importance especially as Waterfowl Habitat*. Ramsar. Iran.
- UNEP. (1992). *Convention on biological diversity*. United Nations Environmental Programme.
- Walters, C., Wheeler, L. & Grotenhuis, J. (2005). *Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics*. Seed Sci Res 15: 1-20.
- Walters, C., Wheeler, L., & Stanwood, P. (2004). *Longevity of cryogenically stored seeds*. Cryobiology 48: 229-244.

Westoby, M. (1981). *How diversified seed germination behavior is selected*. American Naturalist 118: 882-885.

Williams, P., Biggs, J., Fox, G., Nicolet, P. & Whitfield, M. (2001). *History, origins and importance of temporary ponds*. Freshwater Forum 17: 7-15.

Williams, P., Whitfield, M., Biggs, J., Bray, S., Fox, G., Nicolet, P. & Sear, D. (2003). *Comparative biodiversity of rivers, streams, ditches and ponds in an agricultural landscape in Southern England*. Biological Conservation 115: 329-341.

Zacharias, I., Dimitriou, E., Dekker, A. & Dorsman, E. (2007). *Overview of temporary ponds in the Mediterranean region: Threats, management and conservation issues*. Journal of Environmental Biology 28:1-9.

Zacharias, I. & Zamparas, M. (2010). *Mediterranean temporary ponds. A disappearing ecosystem*. Biodiversity and Conservation 19: 3827-3834.