



Joana Maria Ferreira Gonçalves

Caracterização de populações de Orquídeas em zonas sujeitas a pastoreio

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pela Professora Ana Caperta e pelo Professor João Loureiro,
apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização de populações de Orquídeas em zonas sujeitas a pastoreio

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Cristina Delaunay Caperta (Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa) e do Professor Doutor João Carlos Mano Castro Loureiro (Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra)

Joana Maria Ferreira Gonçalves

2016

Foto de capa tirada por Joana Gonçalves

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Ana Caperta por me ter acompanhado por todo o meu percurso académico, desde o primeiro ano de licenciatura, e por me ter proposto este desafio.

Ao João Loureiro e à Sílvia Castro agradeço terem-me recebido no seu grupo de trabalho e por todo o apoio que me deram ao longo deste percurso.

À Cooperativa Terra Chã, e aos seus dirigentes António Frazão e Júlio Ricardo, agradeço terem aceite a realização deste projecto na área que é gerida por eles e também a disponibilidade para nos acompanharem nas saídas de campo.

Ao Vasco Silva e à Paula Paes agradeço a companhia durante as visitas de campo e a ajuda disponibilizada nas áreas onde tinha mais dificuldades.

Às meninas do grupo, em especial à Daniela Tavares e à Mariana Castro, pela paciência que tiveram a ajudar-me no laboratório.

Aos meus amigos de Coimbra (aka Os Cobra), obrigada por me receberem tão bem no início desta aventura. À Filipa Ribeiro e à Beatriz Filhó agradeço todos momentos de parvoíce, que também são necessários.

Aos meus “amigos do Barreiro”, Hugo, Gonçalo, Ana e Filipa, obrigada por não se esquecerem de mim e terem sempre um tempinho para estarmos juntos quando vou a casa. Às meninas do ISA, Lígia, Inês e Mafalda, agradeço o apoio durante todo o meu percurso universitário e os passeios por Lisboa.

Aos meus pais, agradeço o esforço que fizeram todos estes anos. Ao Filipe, por me apoiar em todos os momentos e ter paciência para mim.

Índice

Resumo.....	V
Abstract.....	VII
1. Introdução.....	1
1.1 Impactes antropogénicos e manutenção de habitats.....	3
1.2 Família <i>Orchidaceae</i>	6
1.2.1 Taxonomia e classificação.....	6
1.2.2 Distribuição e ecologia.....	9
1.2.3 Morfologia.....	10
1.3 Estratégias de reprodução e sucesso reprodutivo.....	12
1.4 Conservação.....	14
1.5 Citometria de fluxo e sua aplicação no estudo das <i>Orchidaceae</i>	15
1.6 Área de estudo.....	18
1.7 Objectivos.....	20
2. Materiais e Métodos.....	23
2.1 Território/Área de estudo.....	25
2.2 Sistema de estudo.....	27
2.3 Diversidade florística e de <i>Orchidaceae</i>	29
2.4 Êxito reprodutivo de <i>Orchis anthropophora</i>	30
2.5 Citometria de fluxo.....	31
2.6 Análises estatísticas.....	32
3. Resultados.....	35
3.1 Caracterização das parcelas.....	37
3.2 Diversidade de orquídeas.....	38
3.3 Efeito do pastoreio na diversidade florística e orquídeas.....	45
3.4 Efeito do pastoreio na espécie <i>Orchis anthropophora</i>	48
4. Discussão.....	55
5. Conclusão e perspectivas futuras.....	65
6. Referências.....	69
7. Anexos.....	81

Resumo

As actividades humanas têm hoje em dia um grande peso nos habitats naturais e na sua biodiversidade. A prática de pastoreio extensivo é uma técnica que tem sido descrita como uma boa forma de gestão de habitats, apesar das opiniões sobre os seus efeitos serem contraditórias.

Este trabalho teve como objectivo avaliar o impacto do pastoreio na diversidade florística e no êxito reprodutivo de uma espécie bioindicadora dos habitats estudados. Para isso foi estudada uma área da Serra de Candeeiros na qual foi desenvolvido o projecto para a conservação da Gralha-de-bico-vermelho e onde foram criadas 10 parcelas vedadas (sem pastoreio) e 10 não vedadas (com pastoreio). Nessas parcelas foram realizados 1) inventários florísticos de todo o coberto; 2) avaliada a diversidade de espécies, a caracterização citogenética e o número de indivíduos da família *Orchidaceae*; e 3) quantificado o sucesso reprodutivo de uma espécie da família *Orchidaceae* existente na maioria das parcelas, *Orchis anthropophora*.

Com estes estudos foi possível observar que o pastoreio tem uma ação positiva no desenvolvimento de espécies vegetais, em particular nas *Orchidaceae*. Quanto ao sucesso reprodutivo de *Orchis anthropophora*, verificou-se que este não é afetado pelo pastoreio, sendo o sucesso reprodutivo baixo quer na presença quer na ausência de pastoreio.

As análises de citometria de fluxo tiveram como objectivo a caracterização das espécies existentes e a confirmação da classificação taxonómica feita no local. Através destes estudos foi possível obter informação sobre o tamanho de genoma para duas espécies para as quais ainda não existem quaisquer dados na literatura. Para além disso, conseguimos demonstrar usando duas espécies, *Serapias strictiflora* e *Serapias parviflora*, que a utilização das polínias como material vegetal é um método muito mais eficaz de

quantificar o tamanho de genoma na família *Orchidaceae*, em comparação com a utilização de material foliar.

Concluindo, estes resultados reafirmam a teoria de que o pastoreio extensivo pode ser utilizado como estratégia de manutenção de alguns habitats, uma vez que no presente estudo houve um aumento da diversidade de espécies e das espécies bioindicadores da família *Orchidaceae*. Assim, este estudo pode ser a base de outros trabalhos sobre este tema e até ajudar a promover esta técnica de manutenção, para que possa ser posta em prática noutros locais.

Palavras-chave: citometria de fluxo, gestão de habitats, *Orchidaceae*, pastoreio, sucesso reprodutivo, Serra de Candeeiros, diversidade florística

Abstract

Nowadays, natural habitats and their biodiversity are widely affected by human activities. The practice of extensive grazing has been described as a good technique of habitat management, although the opinions about their results are contradictory.

The objective of this study was to evaluate the impact of grazing in floral diversity and reproductive success of a bioindicator species of the studied habitats. In this context, an area in Serra dos Candeeiros was chosen, in which a conservation project of the species *Gralha-de-bico-vermelho* was developed and where 10 plots without grazing and other 10 plots with grazing had been established. The following parameters were assessed in the established plots: 1) overall plant species diversity; 2) diversity of species, cytogenetic characterization and number of individuals of *Orchidaceae*; and 3) reproductive success of a species of *Orchidaceae* abundant in the study sites, *Orchis anthropophora*.

With this work we observed that grazing has a positive effect in the development of plant species, in particular the ones from *Orchidaceae* family. The analysis of reproductive success in *Orchis anthropophora* showed that grazing has no effect in the fruit production, which revealed to be low in both cases.

Flow cytometric analysis were used with the objective of a better characterization of the species and to confirm the taxonomic classification. Through these studies it was possible to obtain information on the genome size of two species for which there was no information available. Furthermore, using the species *Serapias strictiflora* e *Serapias parviflora*, we could support the hypothesis that the use of pollinium in flow cytometry is a much more effective method for genome size quantification for species of *Orchidaceae*.

In conclusion, the results obtained support the theory that extensive grazing can be used as an effective technique of habitat management, since we observed an increase of species diversity, in particular in the bioindicator species of *Orchidaceae*. Therefore, this work can be used as a starting point for other studies about habitat management by grazing.

Key words: floral diversity, flow cytometry, grazing, habitat management, *Orchidaceae*, reproductive success, Serra de Candeeiros.

1. Introdução

1.1. Impactes antropogénicos e manutenção de habitats

Desde sempre que o ser humano tem vindo a alterar as paisagens conforme as suas necessidades. Seja para atividades agrícolas, importantes para a alimentação da população, ou para desenvolvimento industrial, existe um crescente aproveitamento das zonas que servem de habitats para muitas espécies de animais e plantas. Numa altura em que se discute cada vez mais na conservação de locais de elevado interesse para a biodiversidade é importante perceber os impactos reais que algumas práticas humanas têm nas espécies desses locais. Isto porque, apesar de muitas vezes não ser explícito, algumas atividades de cariz antropogénico poderão contribuir para a gestão de habitats e das suas espécies.

Em Portugal, algumas das principais ações antropogénicas nos ecossistemas naturais incluem a construção de estruturas de energia renovável, como parques eólicos e barragens, e a exploração de pedreiras (Antunes *et al*, 2004; Coelho, 2007; Delicado *et al*, 2013; Germano *et al*, 2014). Estas ações ocorrem até em zonas protegidas, como por exemplo, no Parque Nacional da Serra de Aire e Candeeiros. Na ausência de estudos de impacto ambiental antes da construção destas estruturas, pode ocorrer a destruição de muitos habitats prioritários, definidos pela Diretiva 92/43/CEE (Diretiva Habitats) como os habitats existentes no nosso território que estão em risco de desaparecer. A construção de parques eólicos e barragens tem levado à fragmentação destes habitats, processo que muitas vezes leva a perdas de biodiversidade (Coelho, 2007; International Rivers, 2016). Para além disso, estas construções afetam a migração de espécies de peixes, por fragmentação do rio no caso das barragens (International Rivers, 2016), e aves que muitas vezes embatem nas pás das turbinas das eólicas em movimento (Coelho, 2007). Adicionalmente, estas duas estruturas têm, em conjunto com as pedreiras, um grande impacto visual na paisagem.

Um outro impacte controverso é a atividade do pastoreio. Quando o pastoreio é realizado em larga escala de modo intensivo pode levar à degradação de vários habitats, principalmente no que respeita a pastoreio com caprinos, que são capazes de consumir quase toda a vegetação de uma área (Rosa García *et al*, 2012; Watkinson & Ormerod, 2001). A sua ação pode ser de tal forma devastadora que estes animais já foram considerados uma praga em alguns locais da Austrália, tendo sido erradicados de pelo menos 120 ilhas por todo o mundo (Rosa García *et al*, 2012). Por outro lado, quando feito de modo moderado, o pastoreio com caprinos pode ajudar na gestão da paisagem, permitindo, por sua vez, manter a biodiversidade local. Por exemplo, em Tenerife (Espanha), o maneio das pastagens é feito deste modo, tendo levado à conservação de várias espécies nativas, incluindo alguns endemismos (Fernández *et al*, 2009).

Assim, é importante ter em conta que, em muitos casos, o impacte negativo do pastoreio na paisagem e na biodiversidade se deve apenas ao resultado de más estratégias de gestão (Rosa García *et al*, 2012). Quando realizado de forma controlada e quando se têm em conta as características de vegetação de cada local, o pastoreio pode ajudar a controlar o desenvolvimento de algumas espécies, possibilitando o desenvolvimento de outras que não existiriam nesse habitat, caso não tivesse sofrido qualquer tipo de intervenção; isto é, o pastoreio favorece plantas herbáceas que não existiriam num habitat onde não há outras formas de controlo da progressão da sucessão ecológica (Rosa García *et al*, 2012). Muitos autores defendem também que esta gestão deve estar ligada a um contexto socioeconómico, de modo a se manterem as necessidades dos pastores e agricultores locais através da produção de produtos como leite, iogurtes e queijo (Rosa García *et al*, 2012; Watkinson & Ormerod, 2001). Para além disso, a prática de pastoreio deve ser acompanhada por uma monitorização científica periódica, de modo a se criar um melhor plano de gestão dos habitats (Rosa García *et al*, 2012).

Uma estratégia de gestão recorrendo ao pastoreio controlado poderá ser uma das soluções para conservar vários habitats pertencentes à Diretiva 92/43/CEE (Diretiva Habitats). Os habitats presentes nesta diretiva são considerados os mais importantes em termos de biodiversidade e apresentam espécies bioindicadoras específicas. Estas espécies bioindicadoras são aquelas que vão determinar o estado de conservação de um habitat. Em locais onde o bom estado de conservação depende de uma gestão controlada do pastoreio extensivo para controlo do coberto vegetal, esses bioindicadores são normalmente as plantas herbáceas aí existentes. Tomando como exemplo dois dos habitats da Diretiva 92/43/CEE (Diretiva Habitats), o habitat 6210 “Prados secos seminaturais e facies arbustivas em substrato calcário (*Festuco - Brometalia*)”, apresenta como bioindicadores a dominância de *Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. & Schult. e a presença de diversas espécies de orquídeas como *Ophrys fusca* Link, *O. Scolopax* Cav. e *Orchis italica* Poir. (ALFA, 2004). Outro habitat que também beneficia de ações de pastoreio controlado é o 8240 “Lajes calcárias” (ALFA, 2004), para o qual não foram ainda identificados bioindicadores. A não existência de estratégias de pastoreio pode levar a duas situações extremas indesejadas. A não ocorrência de pastoreio resulta numa progressão sucessional intensa, que leva à destruição da sua paisagem característica. Por outro lado, o pastoreio descontrolado levará à destruição do habitat devido à eliminação do coberto vegetal.

Tendo em conta a diversidade de habitats e a necessidade de desenvolver práticas de pastoreio apropriadas, torna-se premente desenvolver estudos prolongados que permitam avaliar o impacto da estratégia de conservação. A identificação e monitorização das comunidades vegetais, com especial atenção para os bioindicadores de cada habitat, em estudos ao longo de vários anos permitirão quantificar o impacto do regime de pastoreio na estrutura do habitat.

1.2. Família *Orchidaceae*

A família *Orchidaceae* Juss. é das mais diversificadas entre as plantas com flor, estando reconhecidos cerca de 736 géneros (Chase *et al*, 2015) que incluem cerca de 26567 espécies (Kew Database, 2016). Para além de ser uma das maiores famílias de Angiospérmicas, é também uma das mais antigas. O primeiro registo fóssil de uma orquídea, encontrado em 2007 na Republica Dominicana, tem entre 15 e 20 milhões de anos, e foi descrito como *Meliorchis caribea* (Ramírez *et al*, 2007). Esta descoberta permitiu datar o aparecimento do ancestral da família *Orchidaceae* para cerca de 76-84 milhões de anos, no Cretáceo superior (Ramírez *et al*, 2007).

1.2.1. Taxonomia e Classificação

O contínuo avanço dos estudos moleculares tem levado a sucessivas revisões da sistemática dos grupos vegetais e a família *Orchidaceae* não é exceção. A última revisão efetuada (Chase *et al*, 2015) divide a família *Orchidaceae* em 5 sub-famílias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* e *Epidendroideae*.

Em Portugal só encontramos representantes das duas maiores sub-famílias, *Orchidoideae* e *Epidendroideae*. A sub-família *Apostasioideae* ocorre apenas no sudeste asiático, a *Vanilloideae* é mais comum em climas tropicais, e a *Cypripedioideae*, apesar de ter uma vasta distribuição e ser encontrada por toda a Europa, não ocorre na Península Ibérica.

A sub-família *Orchidoideae* compreende 4 tribos, *Orchideae*, *Codonorchideae*, *Diurideae* e *Cranichideae*, que apresentam espécies maioritariamente terrestres e distribuídas por todo o mundo, excepto na Antártida. Em Portugal encontramos, por exemplo, os géneros *Ophrys* L., *Orchis* Tourn. ex L. e *Serapias* L. Quanto à sub-família *Epidendroideae*, esta apresenta 16 tribos, sendo principalmente constituída por espécies tropicais e epífitas (Chase *et al*, 2015). *Epipactis helleborine* (L.) Crantz e *Neottia nidus-*

avis (L.) Rich. são as duas espécies representantes desta sub-família que ocorrem em Portugal.

Através de estudos de DNA ribossomal e de análises cladísticas (Bateman *et al*, 2003; Pridgeon *et al*, 1997) conseguiu-se avaliar a relação entre os diferentes géneros de orquídeas e assim redistribuir espécies que não estariam corretamente classificadas recorrendo somente aos caracteres morfológicos. Alguns exemplos são a reclassificação de 15 espécies do género *Orchis* para o género *Anacamptis* Rich., a reclassificação de *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter como *Himantoglossum robertiana* (Loisel.) Delforge e *Aceras antropophorum* (L.) W.T.Aiton como *Orchis anthropophora* (L.) All.

O género *Ophrys* L. também tem sido muito estudado devido às semelhanças morfológicas entre as suas espécies (Bernardos *et al*, 2003, Garcia-Barriuso, *et al*, 2010). Este género divide-se nas secções *Ophrys* e *Pseudophrys*. Esta última tem sido muito estudada devido à existência de espécies taxonómicas críticas, difíceis de classificar devido às suas afinidades morfológicas (Bernardos *et al*, 2005), sugerindo o fenómeno de hibridação em populações naturais. De fato, a hibridização é um fenómeno muito comum nesta família, acontecendo entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes. A ocorrência destes híbridos naturais pode dificultar a classificação dos mesmos, podendo levar a que se classifique erradamente um híbrido como sendo uma nova espécie. Segundo Tyteca (1997), em Portugal a ocorrência de híbridos não é frequente, uma vez que não existe densidade suficiente de indivíduos para que a hibridização ocorra e os géneros com maior taxa de formação de híbridos não são muito comuns no nosso país. Ainda assim, em Portugal foram registados alguns destes híbridos, entre eles *Orchis anthropophora* x *Orchis italica*, *Ophrys bombyliflora* x *Ophrys picta* e *Serapias cordigera* x *Serapias lingua* (Tyteca, 1997). Também, a espécie *Ophrys lenae* é considerada um paleohíbrido entre *Ophrys dyris* e *Ophrys fusca* (Lowe & Tyteca, 2012).

No entanto, estudos mais recentes com o objetivo de avaliar o efeito da hibridação na diversificação de espécies na secção *Pseudophrys* no Oeste da Península Ibérica, mostram que este fenómeno pode ser mais frequente do que se esperava (Cotrim *et al.*, 2016). Examinando populações das espécies *Ophrys dyris* Maire, *O. fusca*, e *O. Lutea* Cav. utilizando marcadores nucleares microssatélites Cotrim *et al.* (2016) revelaram que *O. dyris* é pouco diferenciada geneticamente de *O. fusca*, e que a existência de populações puras é rara. Ainda, embora *Ophrys fusca* e *O. lutea* sejam espécies distintas, estes estudos mostraram a ausência de barreiras fortes ao fluxo génico entre as mesmas no território estudado denotando hibridação/ ou introgressão. Também, a presença de híbridos foi detetada em várias populações de *Ophrys fusca* e *O. dyris*.

Para além de hibridação/ou introgressão, nesta família também podem ocorrer diversos polimorfismos florais, que também poderão dificultar a classificação de algumas espécies. Na espécie *Orchis mascula*, por exemplo, é possível observar três cores diferentes de tépalas, branca, rosa e fúcia (Dormont, 2010). Também podemos observar casos de albinismo em muitas outras espécies, como no género *Serapias* e *Ophrys* (Tyteca, 1997).

1.2.2. Distribuição e ecologia

As espécies desta família distribuem-se por todo o mundo, estando apenas ausentes nas regiões polares e em zonas desérticas muito secas (Merckx *et al*, 2013). A maior parte destas espécies são perenes e epífitas, isto é, desenvolvem-se apoiadas noutras plantas, sem lhes retirar nutrientes, sendo este comportamento mais comum em espécies tropicais. As restantes espécies podem ser terrestres ou litófilas, sendo que estas últimas crescem em rochas ou em solos com rocha à superfície. A maior parte das espécies europeias e existentes no nosso país pertencem a estas duas últimas categorias. Estas espécies preferem solos calcários, que são alcalinos, secos e pobres em nutrientes e são em geral muito sensíveis a alterações ecológicas dada a sua dependência de condições especiais e a sua forte ligação a polinizadores e a fungos do solo. Em Portugal é usual encontrá-las associadas à gramínea *Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. et Schult., pelo que é muito frequente a ocorrência de numerosas espécies de orquídeas em prados vivazes sujeitos a pastoreio extensivo e que correspondem ao habitat prioritário da Directiva Habitats identificado pelo código 6210 “Prados secos seminaturais e fâcies arbustivas em substrato calcário (*Festuco - Brometalia*)” (ALFA, 2004; ICNF, 2016). Para ser considerado este habitat precisa de cumprir um dos critérios descritos, sendo estes: composição rica em espécies de orquídeas (> 4 espécies); presença de uma população importante (> 20 indivíduos) de uma ou mais espécies de orquídeas; ou apresentar uma ou mais espécies de orquídeas consideradas raras ou ameaçadas no território nacional (ALFA, 2004).

1.2.3. Morfologia

As plantas desta família apresentam rizomas ou tubérculos radiculares, sendo geralmente autotróficas. Os caules são simples e as folhas são, geralmente, alternas, dísticas ou helicoidais. A inflorescência é em espiga, por vezes com flores zigomorfas solitárias, frequentemente hermafroditas. A morfologia floral desta família está representada na Figura 1. As flores estão organizadas em seis peças designadas tépalas. Entre as tépalas, a do meio diferencia-se das laterais e tem o nome de labelo (Rossi, 2002). As flores apresentam apenas um estame e uma antera fértil onde se encontram as polínídias, estruturas das quais fazem parte os grãos de pólen, que se encontram quase sempre agrupados em massas cerosas, ligados a um filamento, a caudícula, que por sua vez se une a um disco viscoso, o retináculo. Esta estrutura de órgãos reprodutivos masculinos (androceu) encontra-se fundida com os órgãos reprodutivos femininos (gineceu), formando uma estrutura central chamado ginostémio. O rostelo separa os estames do gineceu, o que normalmente previne a auto-fecundação, e o bursículo é uma fina membrana que protege o retináculo (Róis, 2005). O ovário é ínfero, tricarpelar e o pseudo-fruto desenvolve-se com o engrossamento do ovário na base da flor, abrindo quase na totalidade através de fendas longitudinais durante a maturação, mantendo-se sempre ligado à inflorescência (Rossi, 2002). As sementes das orquídeas, habitualmente dispersas pelo vento, são muito pequenas e cada fruto encerra muitas sementes, podendo em certos casos atingir cerca de um milhão (Rossi, 2002).

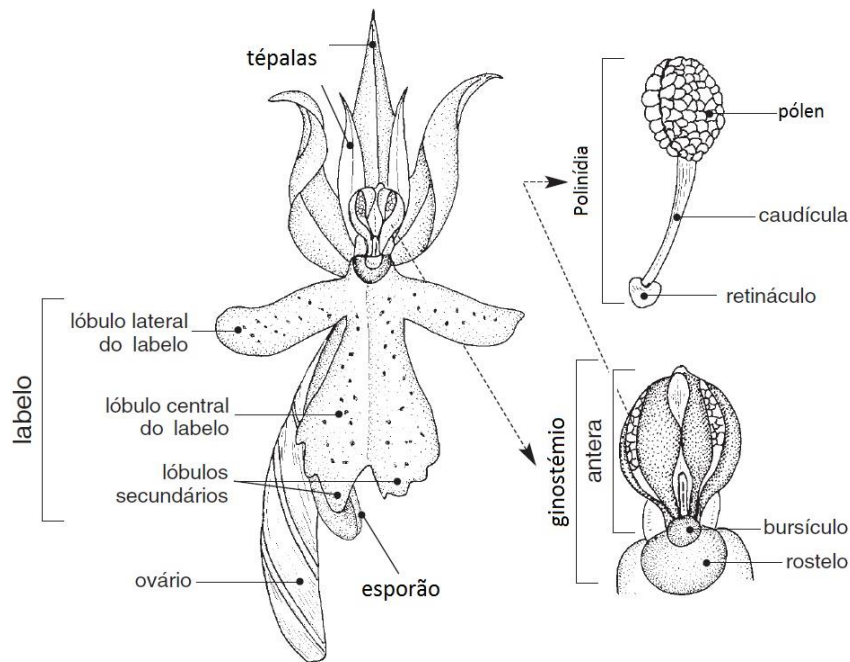


Figura 1 - Estrutura geral da flor de *Orchidaceae* (adaptado de Aedo *et al*, 2005).

Uma vez que as sementes das orquídeas apresentam muito poucas reservas, estas só se conseguem desenvolver com o auxílio de fungos presentes no solo, que irão fornecer às sementes os nutrientes necessários ao seu crescimento (Brundrett *et al*, 2003). No caso das espécies epífitas esta relação é mantida apenas nos estados iniciais do desenvolvimento, até a planta conseguir realizar fotossíntese. Noutras espécies, este comportamento é mantido em todas as fases de desenvolvimento da planta, tornando estas espécies em micoheterotróficas que não realizam fotossíntese. Algumas das espécies terrestres combinam a capacidade fotossintética com a absorção de hidratos de carbono com a ajuda de micorrizas (Rasmussen, 1995). Estes fungos pertencem maioritariamente ao grupo dos basidiomicetes (Batty *et al*, 2004; Dearnaley, 2007; Rasmussen, 2002), com exceção das plantas do género *Epipactis* Zinn. O microbiota destas é maioritariamente constituído por *Tuber* spp. e outros fungos do grupo dos ascomicetes, havendo pouca presença de basidiomicetes (Dearnaley, 2007; Selosse *et al*, 2004). Análises feitas ao microbiota de 5 espécies do género *Orchis* (*O. anthropophora*, *O. mascula* L., *O. militaris*

L., *O. purpurea* Huds., e *O. simia* Lam.), mostraram que os fungos presentes pertenciam maioritariamente à família *Tulasnellaceae* (Jacquemyn *et al*, 2010). Foram igualmente encontrados, se bem que em menor quantidade, membros das famílias *Thelephoraceae*, *Cortinariaceae* e *Ceratobasidiaceae*. Destas espécies, apenas *O. mascula* não estava associada a mais de uma família de basidiomicetes.

1.3. Estratégias de reprodução e sucesso reprodutivo

O que distingue a família *Orchidaceae* das restantes famílias vegetais é a variedade de características florais existentes, que correspondem a diferentes estratégias de polinização. A maioria das orquídeas oferece aos seus polinizadores recompensas como óleos, fragrâncias e néctar. Apesar disso, estima-se que cerca de um terço das espécies desta família sejam decetivas, isto é, que não ofereçam qualquer tipo de recompensa aos polinizadores que as visitam (Pellegrino *et al*, 2005). O mecanismo de decepção mais conhecido é o sexual, no qual a planta produz feromonas femininas e atrai os insetos macho, que irão polinizar a flor enquanto a tentam copular (pseudo-copulação). A este mecanismo de decepção correspondem as flores mais evoluídas e completas, as do género *Ophrys* (Jersáková *et al*, 2006). Um outro exemplo, é o mecanismo de decepção alimentar. Este é utilizado por plantas dos géneros, *Orchis* e *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski que, por possuírem esporão, aparentam ter néctar. Este mecanismo consiste em atrair os polinizadores através da forma, cor e odor da flor (Jersáková *et al*, 2006). Outro mecanismo é o de oferta de proteção ou abrigo, que ocorre no género *Serapias*, cuja flor forma um tubo onde os polinizadores se podem proteger de condições adversas e realizar termorregulação (Jersáková *et al*, 2006). Todos estes mecanismos determinam o sucesso reprodutivo de cada uma das espécies desta família.

O sucesso reprodutivo individual é frequentemente quantificado como o número de frutos e sementes produzidas por um indivíduo, ou o número de sementes que conseguem germinar (Vandewoestijne *et al*, 2009). Como nas orquídeas é difícil quantificar a produção de sementes pelo seu elevadíssimo número e determinar as taxas de germinação pela necessidade de associações com fungos, o sucesso reprodutivo individual é muitas vezes avaliado como o número de frutos produzidos pelo indivíduo (Vandewoestijne *et al*, 2009). O sucesso reprodutivo é calculado como a proporção de flores que originaram fruto, uma vez que nas orquídeas a presença de fruto é quase sempre uma indicação do sucesso da fecundação (Vandewoestijne *et al*, 2009). De modo geral, todas as espécies decetivas apresentam um sucesso reprodutivo muito baixo (Murren, 2002; Tremblay *et al*, 2005; Vandewoestijne *et al*, 2009), mas ainda assim os mecanismos de decepção continuam a persistir e a evoluir. As características florais são das que mais influenciam o sucesso reprodutivo, uma vez que são elas que levam a que a planta atraia polinizadores (Ehlers, 2002). Ao longo da evolução das espécies de orquídeas decetivas, ocorreu o aumento da longevidade das flores e do pólen, assim como, modificações da morfologia floral de forma a atrair um maior número de polinizadores. Para além dos parâmetros individuais (e.g., tamanho do escapo floral), o tipo de habitat e a demografia da população são também tidos como tendo influência no sucesso reprodutivo (Vandewoestijne *et al*, 2009).

Num trabalho de revisão, Neiland e Wilcock (1998) juntaram dados de vários estudos à escala global, relacionados com o sucesso reprodutivo de orquídeas com a finalidade de perceber como é que diferentes tipos de estratégia de polinização poderiam afetar o sucesso reprodutivo dessas espécies. Esta revisão mostrou que a maior parte das plantas que não ofereciam néctar aos polinizadores apresentaram um sucesso reprodutivo abaixo dos 50%, sendo que duas das espécies que apresentaram valores superiores,

pertencem ao género *Serapias*, que não oferecem nenhuma recompensa aos seus polinizadores (Bellusci *et al*, 2009), e apresentavam como mecanismo de polinização a proteção, ou seja, ofereciam abrigo aos insetos.

1.4. Conservação

As orquídeas ocorrem frequentemente em habitats afetados pela progressão sucessional. Esta progressão pode, a longo prazo, afetar o desenvolvimento e sucesso reprodutivo das populações de orquídeas, uma vez que um coberto vegetal mais cerrado não permite que as plantas herbáceas recebam luz solar. Neste contexto o pastoreio poderá fornecer uma alternativa sustentável no controlo do coberto vegetal e gestão da diversidade se efetuado de forma controlada e monitorizada. Apesar do pastoreio ser ainda uma estratégia pouco aceite, há estudos que comprovam que este pode ajudar na gestão das populações (Hutchings 1987a; Hutchings, 2010; Kull & Hutchings, 2005). Por exemplo, os estudos realizados em populações de *Ophrys sphegodes*, numa reserva natural em East Sussex entre 1975 e 2006 (Hutchings, 2010), basearam-se na gestão deste território por gado caprino entre 1975 e 1979, e por gado ovino entre 1980 e 2006 (Hutchings 1987a; Hutchings, 2010) fornecem dados de base pertinentes quanto à gestão do pastoreio e seus impactes. No início, o pastoreio foi efetuado por gado caprino sem interrupções, levando à ingestão das estruturas reprodutoras da espécie monitorizada que não produziu frutos e sementes (Hutchings 1987a). Estas perdas geraram impactes negativos na dinâmica populacional da planta, podendo eventualmente conduzir à diminuição no tamanho das suas populações a longo termo. Após estas observações, a estratégia de pastoreio foi alterada e passou a ser realizada com gado ovino e restrita aos meses de inverno. Com esta estratégia verificou-se um aumento do número de indivíduos de *O. sphegodes*, impedindo o desenvolvimento de outras espécies de plantas que podiam

competir com esta orquídea (Hutchings 1987a,b; Hutchings, 2010). A interrupção do pastoreio nas épocas de floração e frutificação permitiram às plantas completarem o seu ciclo de vida, contribuindo para a renovação da população no ano seguinte.

1.5. Citometria de fluxo e sua aplicação no estudo das *Orchidaceae*

A citometria de fluxo é uma técnica muito usada em estudos de biologia vegetal, evolução e sistemática, uma vez que permite estimar o conteúdo relativo de DNA de uma determinada espécie. Através desta tecnologia é possível efetuar uma quantificação rápida e precisa do tamanho de genoma e deteção do nível de ploidia (Loureiro *et al*, 2010) e assim fazer estudos em larga escala a nível local, populacional, ou até individual pela análise de diferentes tipos de tecidos (Doležel *et al*, 2007; Trávníček *et al*, 2015).

Nesta técnica, o material vegetal é processado e analisado no citómetro de fluxo, sendo que a metodologia mais usada é a descrita já em 1983 por David W. Galbraith, representada da Figura 2. Este procedimento consiste em fazer *chopping* de amostra de estudo juntamente com uma planta padrão num tampão de isolamento nuclear. A solução obtida é depois filtrada e é adicionado iodeto de propídio, como fluorocromo específico para marcar o DNA. A suspensão com núcleos é então analisada num citómetro de fluxo, que irá quantificar as partículas marcadas, neste caso o DNA no interior dos núcleos extraídos, permitindo-nos estimar o tamanho de genoma da amostra analisada, e mediante comparação com contagens cromossómicas, o seu nível de ploidia. À quantidade de DNA contabilizada para um determinado genótipo dá-se o nome de *C-value* (Loureiro *et al*, 2010).

Introdução

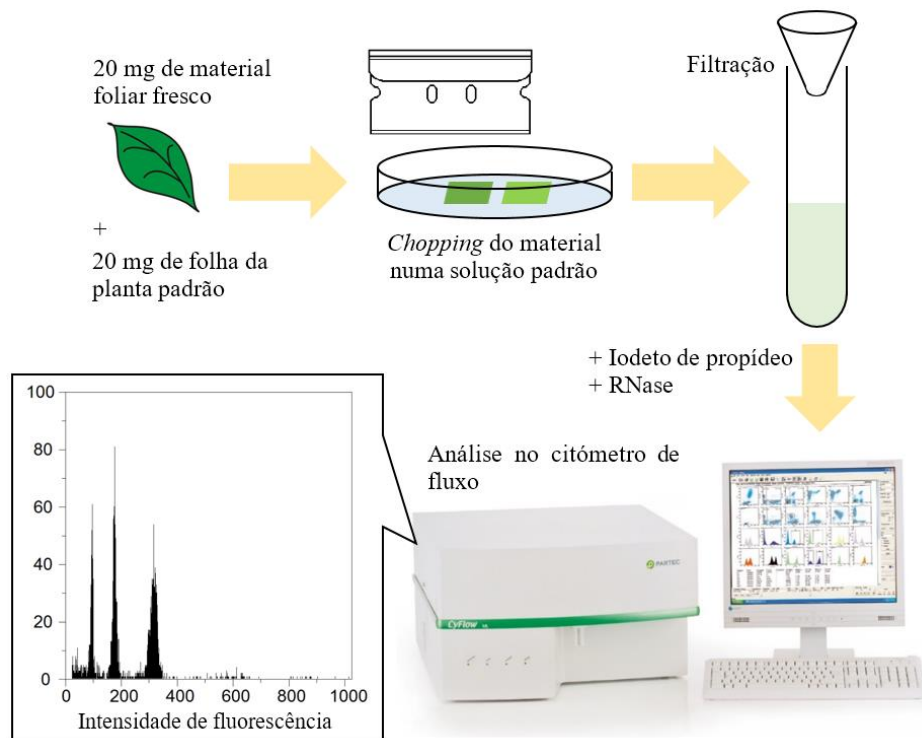


Figura 2 - Protocolo geral para análises em citometria de fluxo, descrito por David W. Galbraith, 1983.

Em famílias específicas das Angiospérmicas, nas quais se incluem os membros da família das orquídeas, ocorrem diferentes níveis de ploidia em tecidos de um mesmo organismo, que são gerados por endoreduplicação ou por endomitose (Doležel *et al*, 2007). Ao resultado destes processos dá-se o nome de endopoliploidia. Os níveis de endopoliploidia podem variar entre famílias, espécies, variedades e ecótipos, sendo que num determinado indivíduo o nível de endopoliploidia pode ser diferente entre os vários órgãos e tecidos (Doležel *et al*, 2007). Para além disso, no mesmo órgão vegetal, como por exemplo, numa folha, pode ocorrer um gradiente no nível de endopoliploidia, sendo, por exemplo, mais elevado no topo da folha do que na base (Doležel *et al*, 2007; Trávníček *et al*, 2015). Quando se estuda este tipo de processos é preciso ter em atenção que os diferentes níveis de endopoliploidia vão depender de fatores como o tamanho de genoma da espécie, ambiente e hormonas vegetais (Doležel *et al*, 2007).

A família *Orchidaceae* é uma das que apresenta este tipo de fenómeno, sendo uma das famílias mais estudadas para tentar perceber os padrões de endoreduplicação das células. Isto deve-se ao facto de se ter verificado que muitas espécies de orquídeas apresentam padrões incompletos de endoreduplicação, isto é, em vez de todo o genoma ser copiado, a endoreduplicação só acontece em partes do mesmo (Trávníček *et al*, 2015). Este processo torna complicadas as estimativas de tamanho de genoma desta família, uma vez que originam resultados de citometria de fluxo com padrões difíceis de interpretar. Para além disso, em vários tecidos ou órgãos dos indivíduos desta família o pico 2C (fase diploide) pode estar ausente, tornando assim a estimativa de genoma ainda mais difícil (Trávníček *et al*, 2015). No entanto, a utilização das polinídias das orquídeas pode facilitar a análise dos resultados uma vez que os histogramas obtidos através de amostras com polinídias apresentam apenas e sempre os picos 1C (fase haploide) e 2C (fase diploide) (Trávníček *et al*, 2015). Os padrões incompletos de endoreduplicação podem também ajudar a distinguir espécies, uma vez que os rácios entre picos parecem ser específicos para cada espécie, podendo assim ser utilizados como marcadores taxonómicos. Adicionalmente, o tamanho de genoma pode ser ainda uma ferramenta útil na distinção de espécies homoploides que difiram no seu conteúdo de DNA (Loureiro *et al*, 2010).

1.6. Área de estudo

O território de estudo está inserido no Parque Natural Serra d’Aire e Candeeiros, que apresenta grande riqueza natural, mas também várias evidências de ação antropogénica. Entre elas estão a existência de pedreiras, umas em funcionamento e outras já encerradas, de campos agrícolas e de pastoreio. Estas atividades moldam a paisagem desta área, que é caracterizada por apresentar predomínio de formações cársicas e vales com muros de pedras com pequenas parcelas cultivadas (Costa *et al*, 2010).

As escarpas, falhas e afloramentos rochosos, que se devem à falta de cursos de água superficiais, e os campos de lapiás e algares, originados pela erosão cársica, marcam a paisagem do Parque Natural, tornando-a agreste (ICNF, 2016). A sua fauna é caracterizada por várias espécies de morcegos e numerosas aves, entre elas a gralha-de-bico-vermelho (*Pyrrhocorax pyrrhocorax*), uma espécie em perigo no nosso território (Cooperativa Terra Chã & Quercus, 2011).

A componente arbórea do Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros é composta por carvalhais de *Quercus faginea* Lam., zonas de *Quercus pyrenaica* Willd. e outras, mais restritas, de *Quercus rotundifolia* Lam., *Quercus suber* L., *Castanea sativa* Mill. e *Ulmus* L. spp. A ação humana foi destruindo a floresta, facilitando o aparecimento de matos onde predominam *Quercus coccifera* L. e subarbuscivas de *Rosmarinus officinalis* L. A oliveira, *Olea europaea* L., domina a vegetação não espontânea, tendo-se desenvolvido depois das suas culturas terem sido abandonadas (ICNF, 2016).

Em toda a área do Parque, com cerca de 39 mil ha, é possível observar cerca de 600 espécies de plantas, o que corresponde a um quinto da diversidade vegetal de Portugal (ICNF, 2016), sendo algumas delas raras e com estatuto especial de conservação da natureza, como as espécies endémicas *Arabis sadina* (Samp.) Cout. e *Narcissus calcicola* Mendonça. Sinal evidente desta diversidade é a identificação de muitos habitats, alguns

deles com estatuto de conservação prioritária, como o 6110 “Prados rupícolas calcários ou basófilos da *Alysso-Sedion albi*” e o 8240 “Lajes calcárias” (Cooperativa Terra Chã & Quercus, 2011; ICNF, 2016). Para além disso existe uma grande diversidade de espécies da família *Orchidaceae*. Um estudo recente contabilizou a ocorrência de 26 espécies de orquídeas (Costa *et al*, 2010), distribuídas um pouco por todo o Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros, sendo que a maior parte destas espécies pertence aos géneros *Ophrys* e *Orchis*, estando associadas ao complexo *Brachypodium phoenicoidis* (Costa *et al*, 2010).

A área de estudo, a sul do Parque Natural, apresenta 372 ha e nela é feita uma gestão do pastoreio, com a intenção de manter os habitats prioritários existentes, com um rebanho de 150 cabras que faz um trajeto de pastagem definido. Esta gestão foi iniciada no âmbito do projecto de Conservação da Gralha-de-bico-vermelho (Cooperativa Terra Chã & Quercus, 2011), que tinha como objetivo conservar o habitat desta ave com recurso à manutenção e incremento de áreas de pastagens extensivas para o pastoreio de gado caprino e que durou 5 anos, de 2008 a 2012. No início deste projeto foram criadas 10 parcelas controlo, que não são pastoreadas e mantêm a vegetação não controlada pelo pastoreio. Essas parcelas, e a manutenção da área limítrofe através do pastoreio mantiveram-se mesmo após o fim do projeto. Apesar desta gestão continuada, não existem trabalhos científicos de acompanhamento do impacte do pastoreio na diversidade do coberto vegetal e na gestão de grupos bioindicadores dos habitats prioritários existentes neste território.

1.7. Objetivos

O pastoreio foi considerado durante muitos anos uma atividade destrutiva para muitos habitats naturais (Fernández-Lugo *et al*, 2009; Rosa García *et al*, 2012; Watkinson & Ormerod, 2001). Ainda assim, tem sido descrito como uma atividade que contribui para a gestão de habitats, quando feito de forma controlada. No entanto, são ainda poucos os trabalhos de monitorização que permitiram quantificar os efeitos do pastoreio na diversidade das comunidades vegetais. Neste contexto, com este estudo pretendeu-se analisar os efeitos do pastoreio num território em que o pastoreio é gerido pela Cooperativa Terra Chã do Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros. A necessidade de estratégias de pastoreio no território prende-se com a necessidade de gerir os habitats existentes para que não haja evolução da vegetação natural para uma etapa arbustiva, permitindo assim que a gralha se alimente adequadamente. Em particular, este estudo foi desenvolvido na Serra dos Candeeiros, onde é realizado pastoreio extensivo com um rebanho de cabras desde há 8 anos, e onde existem parcelas vedadas – sem pastoreio – e parcelas não vedadas – com pastoreio. A gestão há 8 anos destas parcelas permite avaliar a relação entre o pastoreio e o estado da vegetação e seus impactos na dinâmica das populações. Selecionou-se a família *Orchidaceae* como sistema de estudo pelo facto de incluir muitas espécies bioindicadoras de habitats prioritários à conservação (ICNF, 2016), tendo também sido usadas noutros estudos que avaliaram os efeitos da ação do pastoreio extensivo no desenvolvimento e sucesso reprodutivo (Hutchings 1987a,b, 2010; Jacquemyn *et al*, 2011). Dentro desta família, selecionou-se ainda a *Orchis anthropophora*, espécie com populações representativas neste território, de forma a avaliar em maior detalhe vários parâmetros.

Tendo em conta esta contextualização, o objetivo desta Tese de Mestrado foi avaliar o impacto do pastoreio na diversidade e êxito reprodutivo de espécies de orquídeas,

o grupo bioindicador dos habitats estudados no Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros. Os objetivos específicos foram: 1) inventariar a diversidade de espécies vegetais, em parcelas com e sem pastoreio; 2) estimar a diversidade de *Orchidaceae* e caracterizar as espécies de orquídeas existentes em parcelas com e sem pastoreio; e 3) quantificar o êxito reprodutivo da espécie *Orchis anthropophora*. Para perceber o efeito do pastoreio na diversidade vegetal foi feito um levantamento das espécies vegetais existentes em todas as parcelas. No caso específico da diversidade de orquídeas, foram contabilizados e identificados todos os indivíduos observados, e caracterizados em detalhe todos os indivíduos de *O. anthropophora*. De forma a evitar classificações taxonómicas erróneas dos indivíduos de *Orchidaceae*, dado existirem semelhanças e ocorrência de hibridização entre várias espécies, as identificações foram complementadas com análises de conteúdo de DNA do material vegetal recolhido nas parcelas. Através da recolha de flores de duas espécies foi também possível otimizar o uso de polinídias para estudos de tamanho de genoma. Os resultados deste trabalho são importantes no sentido de desenvolver práticas sustentáveis de manejo da vegetação natural, valorização da biodiversidade vegetal para além da redução do risco de incêndio nesta área da Serra dos Candeeiros, e podem servir de base a estudos mais complexos e em larga escala para avaliar impactos do pastoreio noutros locais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Território/Área de estudo

A área onde o estudo foi desenvolvido perfaz um total de 372 hectares, pertencentes à Serra dos Candeeiros, num território sob gestão da Cooperativa Terra Chã. Como referido anteriormente, nessa área existem, 10 parcelas vedadas com 10x10 m, que constituem as parcelas controlo (área não pastoreada) no estudo. Ao lado de cada uma destas parcelas, com uma área tampão de 10 metros, foram definidas outras parcelas de 10x10 m onde é feito pastoreio regular (Figura 3). Nesta zona é feita a gestão dos habitats com um rebanho de 150 cabras, através de um trajeto de pastagem previamente definido que passa em todas as áreas não vedadas.

Desde 2009 até janeiro de 2016 que o trajeto de pastagem foi realizado todos os dias sempre que as condições meteorológicas o permitiam, desde o estábulo, até ao topo da serra, onde se situam as parcelas. A volta completa tem uma duração aproximada de 5 horas, sendo que o rebanho passava cerca 25 minutos em cada parcela não vedada. O pastoreio foi interrompido a partir de janeiro para permitir o desenvolvimento das plantas e suas estruturas reprodutoras, tendo sido retomado no final do mês de maio.

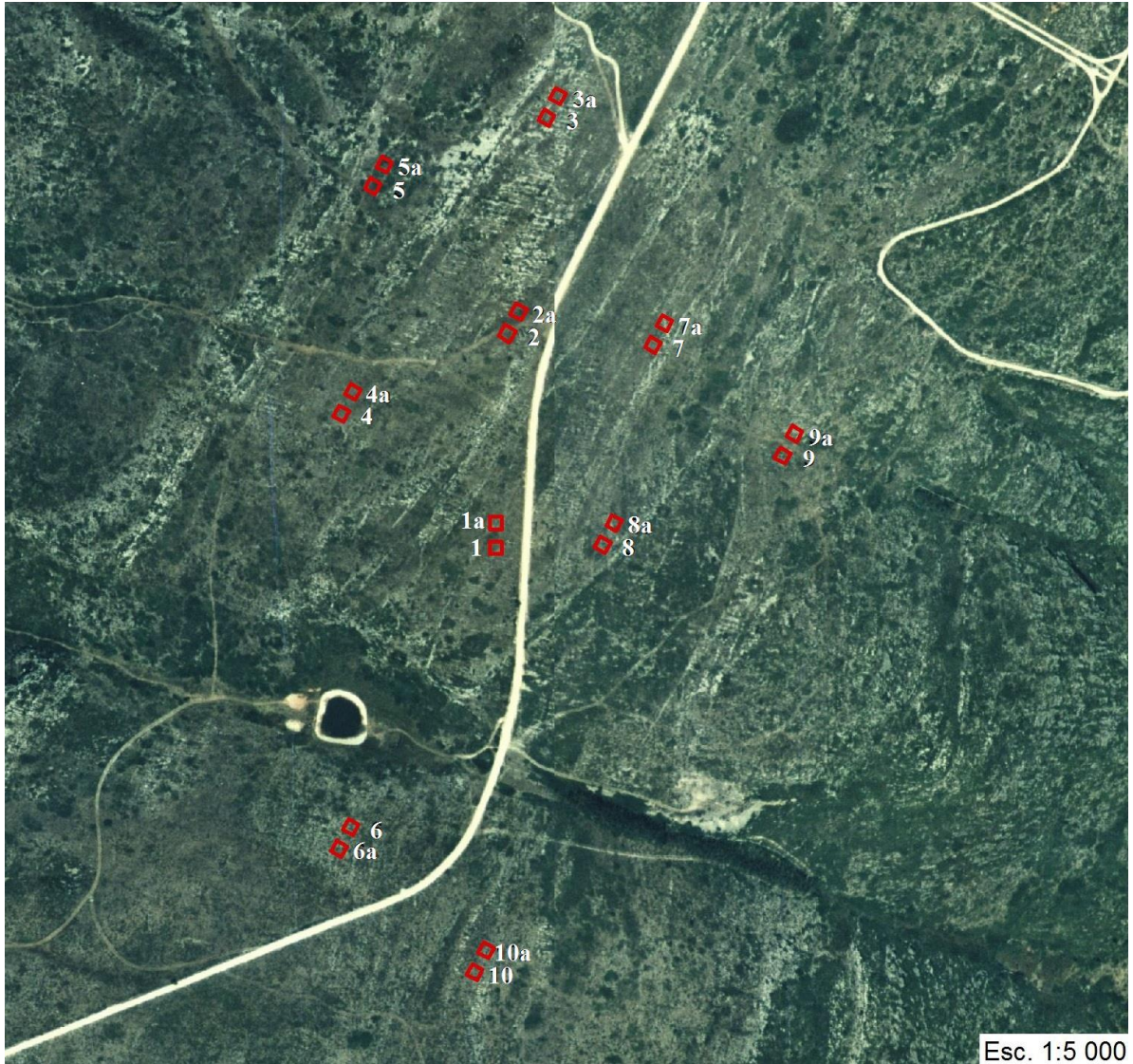


Figura 3 - Área de estudo na Serra dos Candeeiros com indicação dos 10 locais de amostragem (quadrados a vermelho) cada um contendo uma parcela pastoreada (1a – 10a) e não pastoreada (1 – 10).

2.2. Sistema de estudo

Selecionou-se a família *Orchidaceae* como grupo bioindicador dos habitats compreendidos nas parcelas do projeto de Conservação da Gralha-de-bico-vermelho, por existirem espécies desta família nestes habitats onde a gralha se alimenta e cuja presença depende muito de um bom estado de conservação dos seus habitats. O fato de já existirem estudos desta índole com espécies desta família permitiu realizar análises comparativas. Dentro desta família e após as observações preliminares de campo, selecionou-se *Orchis anthropophora* para estudar o impacto do pastoreio no êxito reprodutivo desta planta, devido à sua abundância no campo e ocorrência em todos os pontos de amostragem.

A espécie *Orchis anthropophora* é constituída por plantas herbáceas perenes e autotróficas distribuídas pela Europa e norte de África (Figura 4). No nosso país pode ser encontrada na Estremadura, Ribatejo, Beira litoral e também no Algarve, preferindo solos calcários (Jacquemyn *et al*, 2011). Na altura da floração, entre fevereiro e maio (FloraOn, 2016), esta planta apresenta dois tubérculos subterrâneos (Jacquemyn *et al*, 2011). Um deles, que acaba por diminuir de tamanho e desaparecer, foi o que deu origem à roseta desse ano; o outro, mais pequeno, firme e coberto de pequenos tricomas, é o que dará origem à roseta do ano seguinte (Jacquemyn *et al*, 2011) (Figura 5). Esta espécie é decetiva, isto é, não oferece qualquer tipo de recompensa aos polinizadores que a visitam, e os seus índices de polinização e produção de frutos são normalmente muito baixos (Jacquemyn *et al*, 2011). Os estudos feitos aos seus polinizadores são maioritariamente referentes a populações de França, onde as plantas são polinizadas por duas espécies de *Hymenoptera* (*Tenthredopsis* sp. e *Arge thoracica*) e três espécies de *Coleoptera* (*Cantharis rustica*, *Cidnopus pilosus* e *Isomira murina*) (Schatz, 2006).



Figura 4 - Mapa de distribuição europeia da espécie *Orchis anthropophora* (adaptado de Jacquemyn *et al*, 2011).

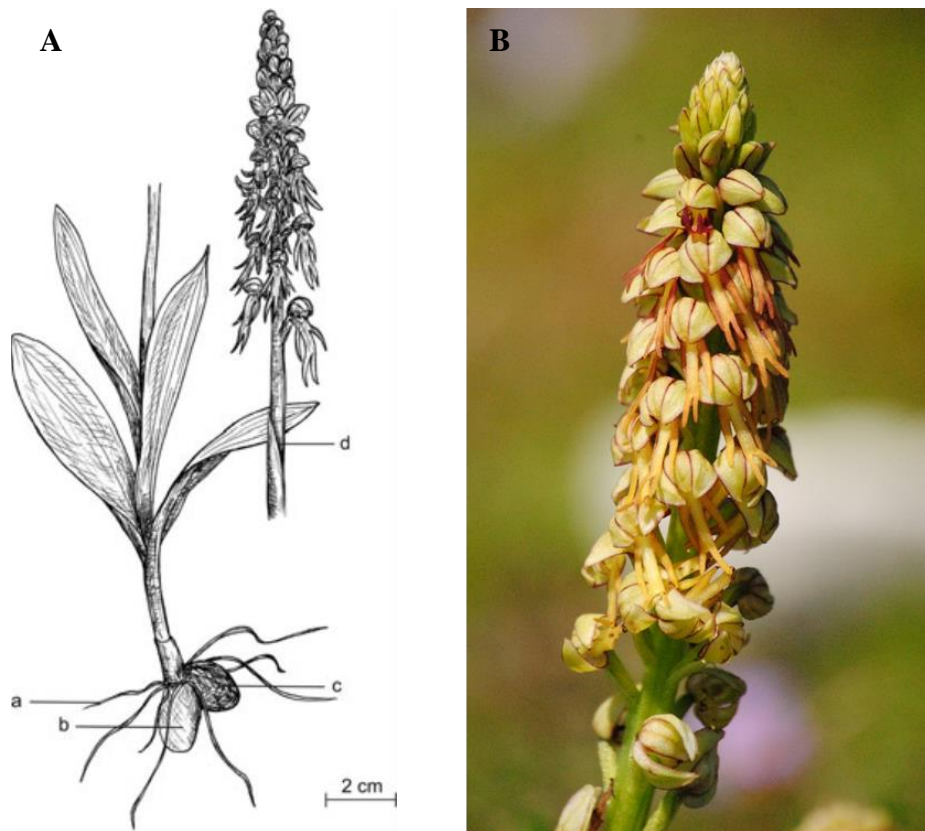


Figura 5 - A) Planta adulta de *Orchis anthropophora*: (a) raízes, (b) tubérculo novo, (c) tubérculo velho, (d) escapo floral (adaptado de Jacquemyn *et al*, 2011); B) Inflorescência de *Orchis anthropophora* (Joana Gonçalves).

2.3. Diversidade florística e de *Orchidaceae*

Para efetuar a análise da diversidade florística e de *Orchidaceae*, realizaram-se saídas regulares uma vez por mês a partir de fevereiro, quando se observou a primeira espécie de orquídea em floração, até maio, momento em que todas as espécies se encontravam em frutificação. Durante cada saída de campo, todas as parcelas foram visitadas e a inventariação de todas as espécies vegetais das parcelas foi efetuada por observação e classificação do coberto vegetal. Quando necessário, foram colhidos espécimes para herborizar e identificar. A identificação das espécies teve como base a Flora Ibérica (Castroviejo *et al*, 1986-2014) e a Nova Flora de Portugal (Franco & Afonso, 1971-2003). Cada parcela foi ainda caracterizada para as espécies dominantes, e a espécie que ocupava mais de 70% da área total foi considerada a espécie dominante.

A quantificação de indivíduos de orquídeas foi efetuada de forma sistemática observando corredores de 30 cm dentro de toda a parcela, de modo a observar toda a sua área e evitar contagens repetidas. Todos os indivíduos de orquídeas encontrados foram identificados usando a Flora Ibérica (Castroviejo *et al*, 1986-2014), sinonimizando-se de seguida com classificações mais recentes (Bateman *et al*, 2003; Lowe & Tyteca, 2012). Adicionalmente, 3-5 indivíduos de cada espécie foram amostrados para quantificação do tamanho de genoma (ver secção 2.4. dos Materiais e Métodos). Foi ainda detetado um polimorfismo na cor das corolas de *Orchis mascula*. Assim procedeu-se também a amostragens de plantas com tépalas branca, rosa e fúcsia para avaliação do tamanho de genoma e padrões de endoreduplicação.

Os dados de levantamento florístico das parcelas serviram para perceber a diversidade de espécies de orquídeas da área e se essa diversidade dependia da vegetação envolvente.

2.4. Êxito reprodutivo de *Orchis anthropophora*

As populações de *Orchis anthropophora* foram avaliadas no pico de floração da espécie, no dia 6 de abril, e o êxito reprodutivo no pico da frutificação, dia 15 de maio, no ano de estudo (apesar de existirem ainda alguns indivíduos com as últimas flores abertas). A proporção de indivíduos que se tornou reprodutor foi calculada através da seguinte fórmula: $\frac{\text{Número de indivíduos no pico da frutificação}}{\text{Número de indivíduos no pico da floração}}$. A contagem dos indivíduos

foi efetuada no levantamento acima descrito tendo permitido a localização e a marcação das plantas. As plantas foram caracterizadas para o número de flores na inflorescência, número de frutos e altura da planta, medida em centímetros com o auxílio de uma régua.

A produção de frutos foi calculada pela fórmula:

$\frac{\text{Número de frutos}}{(\text{Número total de flores} - \text{Número de flores abertas})}$. O número de flores abertas foi removido

do cálculo da produção de frutos para contabilizarmos apenas as flores passadas que tinham, ou não, evoluído para fruto. A altura da planta e a dimensão da inflorescência, medida em número de flores, permitiram explorar o efeito destas variáveis no êxito reprodutivo.

2.5. Citometria de fluxo

A recolha do material durante as saídas de campo foi feita através da colheita de folhas de 3-5 indivíduos de cada espécie. Para as duas espécies de *Serapias* foram ainda recolhidos botões florais para testar o uso de polinídias na estimativa de tamanho de genoma. Cada amostra de cada indivíduo foi armazenada num saco de plástico hermético e identificada com nome da espécie e parcela onde foi colhida. As amostras foram mantidas a 4 °C até serem processadas e analisadas no citómetro de fluxo.

Para as espécies *Himantoglossum robertianum*, *Ophrys lenae*, *O. pintoii*, *O. scolopax*, *Orchis anthropophora*, *O. italica*, *O. mascula*, os núcleos foram isolados usando o procedimento descrito por Galbraith *et al* (1983) no qual 0.5 cm² de tecido foliar fresco foi submetido a *chopping* com uma lâmina, simultaneamente com 0,5 cm² de tecido foliar fresco da planta padrão, numa caixa de Petri contendo 1 mL de tampão WPB (Loureiro *et al*, 2007). O padrão utilizado foi *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg) (Doležel *et al*, 1998). No caso das espécies *Serapias parviflora* e *S. strictiflora*, a técnica utilizada foi a mesma, mas foram usadas as duas polinídias em vez de tecido foliar. Estas polinídias foram retiradas de flores fechadas com o auxílio de uma pinça, tendo sido usado neste caso como padrão *Vicia faba* (2C = 26,9 pg) (Doležel *et al*, 1998). A suspensão de núcleos foi filtrada utilizando um filtro de nylon 50 µm a que foram adicionados 50 µg.mL⁻¹ de iodeto de propídeo para marcar o DNA. Foram também adicionados 50 µg.mL⁻¹ de RNase para evitar que o RNA de cadeia dupla fosse marcado. Depois de um período de incubação as amostras foram analisadas no citómetro CyFlow® Space da Partec. A estabilidade do aparelho foi verificada antes de qualquer análise, utilizando esferas fluorescentes ou correndo uma amostra de núcleos de uma das plantas padrão marcados com iodeto de propídeo. Através do software FloMax® foram obtidos seis gráficos de resultados: fluorescência (FL), difusão frontal da luz (FS) vs difusão lateral da luz (SS),

FL vs FS, FL vs tempo e FL vs SS. No último gráfico foi quase sempre desenhada uma região poligonal para incluir apenas os núcleos intactos, sendo esta aplicada aos restantes gráficos. As estimativas de tamanho de genoma com valores de CV superiores a 5% foram descartadas e a amostra repetida até se obterem valores inferiores. O tamanho de genoma foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$\left(\frac{\text{média G1 Orchidaceae}}{\text{média G1 planta padrão}} \right) \times \text{tamanho de genoma da planta padrão}$. O rácio 4C/2C foi calculado

com a fórmula: $\frac{\text{Fluorescência (FL) pico 4C}}{\text{Fluorescência (FL) pico 2C}}$. Por sua vez, o rácio 2C/1C foi calculado com a

fórmula: $\frac{\text{FL pico 2C}}{\text{FL pico 1C}}$, apenas nas espécies *Serapias parviflora* e *S. strictiflora*.

2.6. Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados (número total de indivíduos de espécies de orquídeas e de tamanho de população de *Orchis anthropophora*) foi contabilizado apenas o número máximo observado em cada parcela, ao fim das quatro visitas. Este método evita sobre contagens e parte do princípio que os indivíduos contados anteriormente estão presentes na contagem seguinte.

As diferenças entre parcelas com e sem pastoreio para os dados recolhidos de número total de espécies vegetais, número de indivíduos de orquídeas e número de indivíduos de *Orchis anthropophora* foram avaliadas através de modelos lineares generalizados (GLM), ajustados a uma distribuição de *Poisson* e com uma *log link function*. O efeito dos fatores, espécie dominante e pastoreio no número de indivíduos de orquídeas, foi avaliado através de uma ANOVA de análises repetidas.

No caso do efeito do pastoreio na produção de frutos, os valores da variável foram transformados através da fórmula arcseno e avaliados através de GLM, ajustados a uma

distribuição Gaussiana e com uma *identity link function*. O efeito do pastoreio na altura das plantas e no número total de flores foi também avaliado através de GLM, ajustados a uma distribuição Gaussiana e com uma *identity link function*. Para além disso, o efeito do tamanho da planta e do número total de flores na produção de frutos foi avaliado através de matrizes de correlação de Pearson.

Para estudar o tamanho de genoma dos indivíduos de *Orchis mascula* com três cores de tépalas diferentes foi feita uma ANOVA de uma via, utilizando as distintas cores (fúcsia, rosa e branco) como fator e o tamanho de genoma como variável resposta. Este teste também foi usado no estudo das diferenças de genoma entre todas as espécies de *Orchidaceae* amostradas, usando a espécie como fator e o tamanho de genoma como variável resposta.

As análises estatísticas e gráficos apresentados nos resultados foram realizadas no programa Statistica 13 (Dell Inc.).

3. Resultados

3.1. Caracterização das parcelas

Através do levantamento florístico realizado para todas as parcelas (Anexo I) conseguimos perceber que tipos de habitats existiam na área estudada. As 20 parcelas apresentavam diferenças notórias em termos de vegetação. As existentes no topo da serra (Parcelas 1-4) eram dominadas pela espécie *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* e *Brachypodium phoenicoides*, dois hemicriptófitos da família *Poaceae*. As parcelas 5, delimitadas na encosta da serra, apresentavam o caméfito *Quercus coccifera* como espécie dominante. As parcelas 7 e 9 apresentavam em igual percentagem as espécies *Thymus sylvestris* e *Rosmarinus officinalis*, dois caméfitos da família *Lamiaceae*, e as restantes (Parcelas 6, 8 e 10) eram dominadas por *Rosmarinus officinalis* (Anexo II).

Em todas as parcelas foi possível observar um mosaico de 2 a 3 habitats (Tabela 1). A maioria das parcelas apresentavam no seu mosaico o habitat “6210 *Prados secos seminaturais e fâcies arbustivas em substrato calcário (*Festuco-Brometalia*)”. Este habitat é caracterizado pela dominância de gramíneas como *Brachypodium phoenicoides* e pela existência de diversas espécies de orquídeas. Outro habitat muito comum, presente em várias parcelas, foi o “6220pt1 *Arrelvados anuais neutrobasófilos”, apresentando uma composição florística muito variável. Metade das parcelas existentes apresentavam o habitat “5330pt7 Matos baixos calcícolas” como o seu habitat principal, sendo dominadas por *Rosmarinus officinalis* ou por *Thymus sylvestris* e *Rosmarinus officinalis*. Por outro lado, o habitat “5330pt5 Carrascais”, espargueiras e matagais afins basófilos, foi apenas observado na parcela 5. Este habitat corresponde maioritariamente a formações de espécies arbustivas, sendo dominado por *Quercus coccifera*. Por último, o habitat “6110 Prados rupícolas calcários ou basófilos da *Alysso-Sedion albi*”, estava presente em 6 das parcelas e era caracterizado pela presença das espécies *Sedum album*, *Thymus sylvestris* e *Rosmarinus officinalis*.

Tabela 1 – Habitats existentes em cada uma das parcelas em estudo. Cada parcela engloba parcelas com e sem pastoreio, uma vez que os dados não diferiram entre estas.

Parcela	Espécie(s) dominante(s)	Habitats presentes
1	<i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> e <i>Brachypodium phoenicoides</i>	*6110, *6210 e *6220pt1
2	<i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> e <i>Brachypodium phoenicoides</i>	5330pt7, *6210 e *6220pt1
3	<i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> e <i>Brachypodium phoenicoides</i>	5330pt7, *6110 e *6210
4	<i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> e <i>Brachypodium phoenicoides</i>	*6210 e *6220pt1
5	<i>Quercus coccifera</i>	5330pt5 e *6210
6	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5330pt7 e *6220pt1
7	<i>Thymus sylvestris</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	5330pt7, *6210 e *6220pt1
8	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5330pt7 e *6210
9	<i>Thymus sylvestris</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	5330pt7, *6110 e *6210
10	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5330pt7 e *6220pt1

* habitat prioritário segundo a Rede Natura 2000 (ICNF).

3.2. Diversidade de orquídeas

A diversidade de orquídeas existente nas parcelas foi contabilizada ao longo das quatro saídas realizadas. No total, entre fevereiro e maio, foram observadas as seguintes nove espécies: *Himantoglossum robertianum*, dois taxa crípticos de *Ophrys* dos grupos *O. fusca* e *O. omegaifera*, respetivamente *O. lenae* e *O. pintoi* (Figura 7), *O. scolopax*, *Orchis anthropophora*, *O. italica*, *O. mascula.*, *Serapias parviflora* e *S. strictiflora* (Figuras 6). Nas saídas de campo foi sempre possível observar quatro ou mais espécies simultaneamente em floração. A espécie *Orchis anthropophora* foi a única a ser observada ao longo de todas as saídas, enquanto as espécies *H. robertianum*, *O. italica*, *S. parviflora* e *S. strictiflora* foram observadas em apenas uma das visitas (Tabela 2). O número de orquídeas registado foi aumentando gradualmente, sendo possível estimar o

pico de floração de cada espécie, sendo este mais alargado na espécie *Orchis anthropophora* (Tabelas 2 e 3). Em relação à espécie *H. robertianum*, o único indivíduo observado nas parcelas já se encontrava em frutificação. Finalmente, a espécie com maior número de indivíduos registados nas parcelas foi a *S. strictiflora*, superando largamente o número de indivíduos de qualquer uma das outras espécies.



Figura 6 – Espécies observadas nas parcelas estudadas. A: *Ophrys scolopax*; B: *Serapias strictiflora*; C: *Serapias parviflora*; D: *Orchis italica*; E: *Orchis anthropophora*; F: *Orchis mascula*. Fotografias de Joana Gonçalves.



Figura 7 – Morfologia floral dos dois taxa crípticos do género *Ophrys*. A: *Ophrys lenae*; B: *Ophrys pintoii*. Fotografias de Daniel Tyteca.

Tabela 2 – Espécies de orquídeas observadas durante os meses das saídas de campo (fevereiro a maio de 2016).

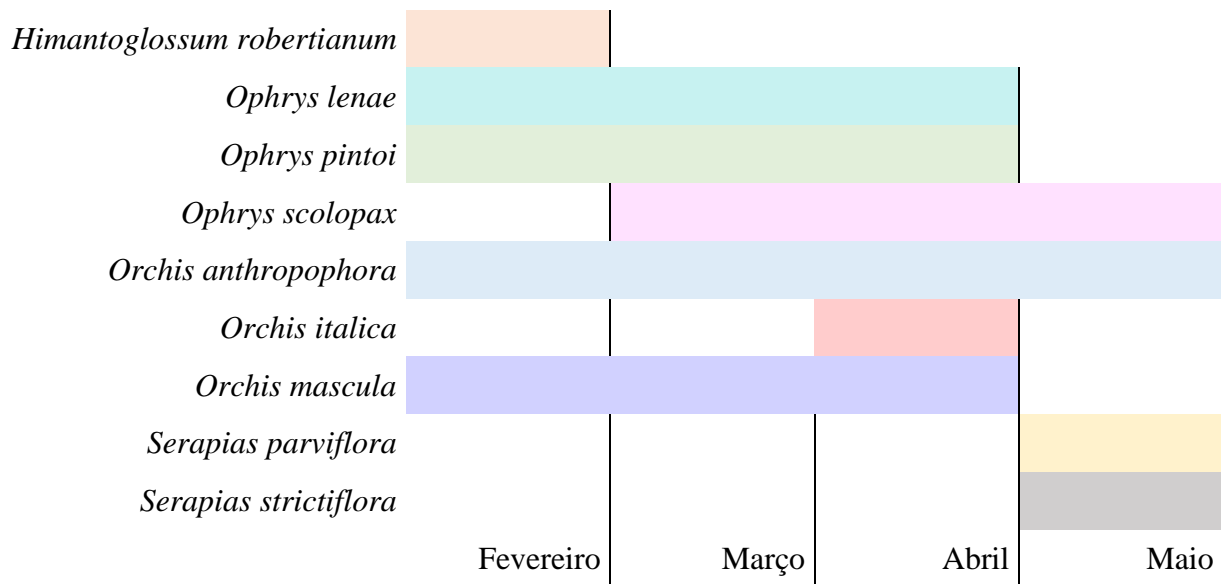


Tabela 3 – Número de indivíduos de cada espécie de orquídea observados durante as saídas de campo (fevereiro a maio de 2016).

	Fevereiro	Março	Abril	Maió
<i>Himantoglossum robertianum</i>	1	0	0	0
<i>Ophrys lenae</i>	3	10	2	0
<i>Ophrys pintoii</i>	4	14	2	0
<i>Ophrys scolopax</i>	0	1	12	6
<i>Orchis anthropophora</i>	2	26	77	32
<i>Orchis italica</i>	0	0	24	0
<i>Orchis mascula</i>	3	12	6	0
<i>Serapias parviflora</i>	0	0	0	14
<i>Serapias strictiflora</i>	0	0	0	214

Para complementar a identificação das espécies em campo, foram também realizadas análise de genoma por citometria de fluxo. Estas análises foram especialmente importantes para a espécie *Orchis mascula*, onde se observaram tépalas com 3 cores diferentes: rosa, fúcia e branco (Figura 8). Para perceber se estas diferenças correspondiam a um polimorfismo ou a diferentes espécies, a morfologia das flores e o tamanho de genoma de indivíduos correspondentes a diferentes cores foram analisados. Quer a morfologia das flores quer as análises de tamanho de genoma mostraram que não existem diferenças significativas entre os três tipos de indivíduos que se possa admitir que constituem espécies diferentes (Tabela 4), tratando-se então de um polimorfismo floral dentro da espécie *Orchis mascula*.



Figura 8 – Indivíduos da espécie *Orchis mascula*, apresentando tépalas de cor fúcsia, rosa e branca. Fotografias de Ramona Irimia.

Tabela 4 – Tamanho de genoma (2C/pg) obtidos para *Orchis mascula* com diferentes cores das estruturas florais.

Espécie	Cor das tépalas	Tamanho de genoma 2C/pg	CV (%)
<i>Orchis mascula</i>	Fúcsia	18,73 ^a	1,45
	Rosa	18,90 ^a	1,28
	Branca	18,74 ^a	1,45

Letras iguais correspondem a diferenças não significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Com exceção das espécies *O. scolopax* e *O. pintoii*, todas as outras espécies apresentam diferenças significativas de tamanho de genoma entre si (Tabela 5), o que poderá sugerir a presença de diferentes números cromossômicos e níveis de ploidia entre as espécies estudadas. As espécies com tamanho de genoma superior foram as do género *Ophrys*, *O. pintoii* e *O. scolopax*. A espécie com o tamanho de genoma inferior foi *Serapias parviflora*. Através dos histogramas obtidos foi também possível observar os

padrões de endoreduplicação existentes nesta família (Figuras 9 e 10), caracterizados pela presença de picos 4C que apresentam um tamanho de genoma menor que o esperado (hipoduplicação do genoma). A utilização de polinídias em vez de folhas nas espécies *S. parviflora* e *S. strictiflora*, resultou em gráficos que não apresentavam estes padrões de endoreduplicação, observando-se apenas dois picos, 1C e 2C (Figura 11). Para caracterizar os padrões de endoreduplicação, foram calculados os rácios entre os dois picos dominantes (Tabela 5). Em relação ao rácio 4C/2C, existem diferenças significativas entre os géneros *Ophrys* e *Orchis*, e mesmo dentro do género *Orchis* foram observadas diferenças entre as espécies *Orchis anthropophora* e *O. mascula* e a espécie *O. italica* (Tabela 5). Entre as duas espécies de *Serapias* não foram encontradas diferenças significativas no rácio 2C/1C (Tabela 5).

Tabela 5 – Tamanho de genoma (2C/pg) e rácios 2C/1C e 4C/2C obtidos para as espécies de orquídeas amostradas. Informação sobre o coeficiente de variação do tamanho de genoma e sobre o número de cromossomas de cada espécie de acordo com a literatura é igualmente fornecida.

Espécie	n	Material	2C/1C	4C/2C	Tamanho de genoma 2C/pg	CV (%)	2n
<i>Ophrys scolopax</i>	1	folha	-	1,93 ^a	22,68 ^a	-	36 ¹
<i>Ophrys pintoii</i>	3	folha	-	1,86 ^a	22,13 ^a	0,47	-
<i>Orchis anthropophora</i>	5	folha	-	1,74 ^b	17,92 ^c	0,57	42 ²
<i>Orchis italica</i>	1	folha	-	1,60 ^c	12,68 ^e	-	42 ³
<i>Orchis mascula</i>	9	folha	-	1,70 ^b	18,79 ^b	2,20	42 ⁴
<i>Serapias strictiflora</i>	10	polinídia	1,81 ^a	-	14,99 ^d	2,44	-
<i>Serapias parviflora</i>	7	polinídia	1,77 ^a	-	7,36 ^f	1,57	36 ⁴

Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). (1) Bernardos *et al* (2003), (2) Cozzolino *et al* (2004), (3) Bianco *et al* (1991), (4) Bernardos *et al* (2004).

Resultados

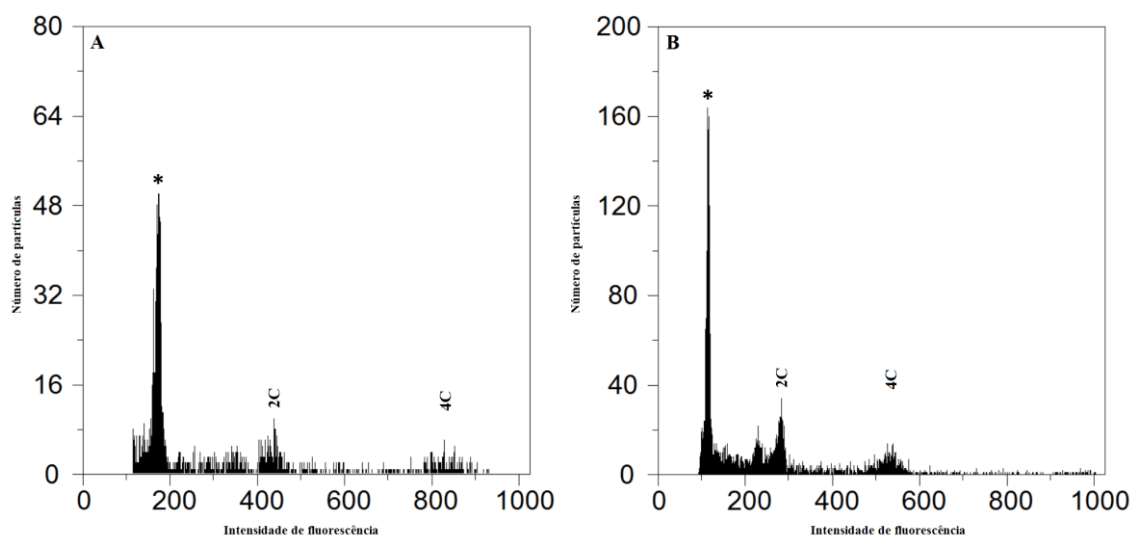


Figura 9 - Histogramas obtidos após isolamento e marcação de núcleos de folhas de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) e de folhas de: A) *Ophrys scolopax* e B) *Ophrys pintoii*. O símbolo * identifica o pico do padrão, *Pisum sativum*, 2C e 4C correspondem a núcleos da espécie em estudo (diploide e hipotetraploide, respectivamente).

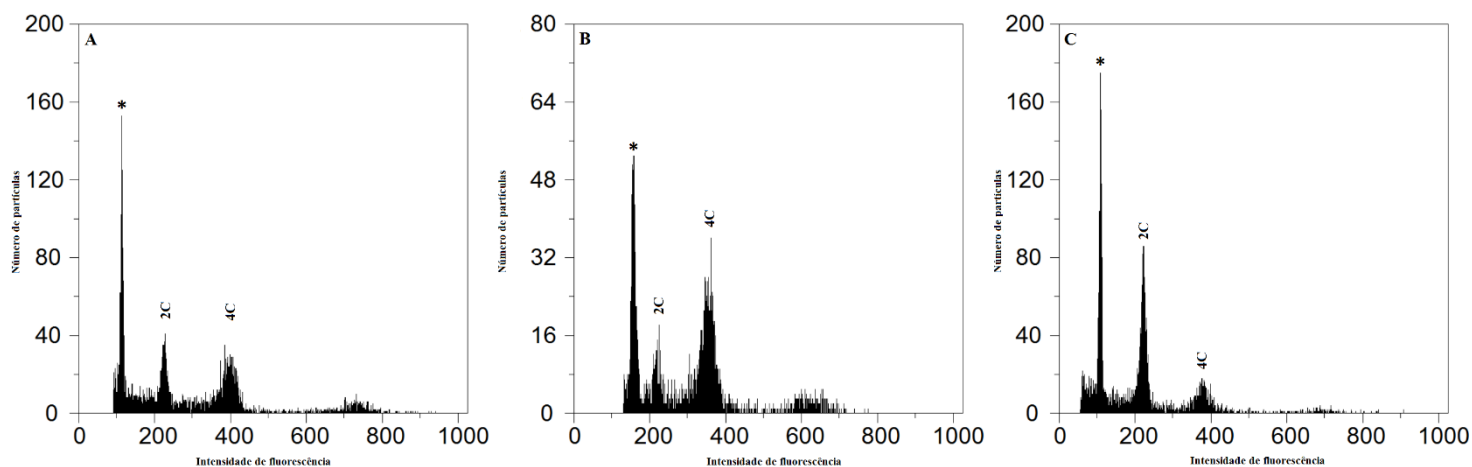


Figura 10 - Histogramas obtidos após isolamento e marcação de núcleos de folhas de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) e de folhas de: A) *Orchis anthropophora* e B) *Orchis italica*, e C) *Orchis máscula*. O símbolo * identifica o pico do padrão, *Pisum sativum*, 2C e 4C correspondem a núcleos da espécie em estudo (diploide e hipotetraploide, respectivamente).

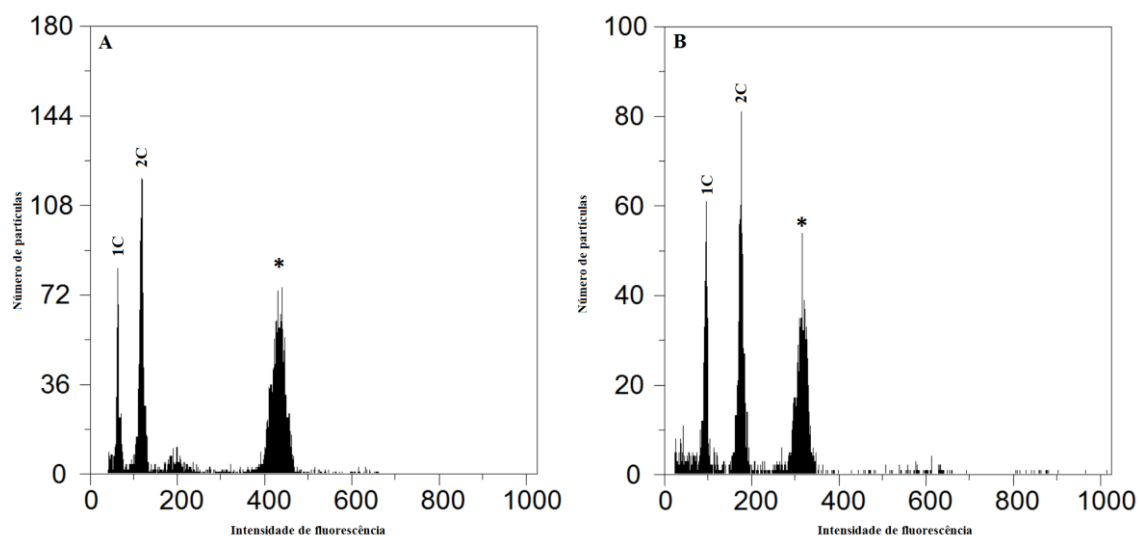


Figura 11 - Histogramas obtidos após isolamento e marcação de núcleos de folgas de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) e de polinídias de: A) *Serapias parviflora* e B) *Serapias strictiflora*. O símbolo * identifica o pico do padrão, *Pisum sativum*, 1C e 2C correspondem a núcleos da espécie em estudo (haploide e diploide, respetivamente).

3.3. Efeito do pastoreio na diversidade florística e orquídeas

O levantamento florístico realizado nas parcelas permitiu não apenas reconhecer os vários habitats presentes na área de estudo, mas também verificar o efeito do pastoreio na diversidade florística. Apesar da espécie dominante não diferir entre parcelas com e sem pastoreio, há um número significativamente maior de espécies vegetais nas parcelas com pastoreio ($\chi^2 = 5,37$; $P = 0,02$) (Figura 12). A parcela que apresentou um número maior de espécies foi a parcela 1 com pastoreio, sendo esta dominada pelas espécies *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* e *Brachypodium phoenicoides*. Por outro lado, o menor número de espécies foi observado na parcela 7 sem pastoreio, dominada por *Thymus sylvestris* e *Rosmarinus officinalis* (Anexo II).

Resultados

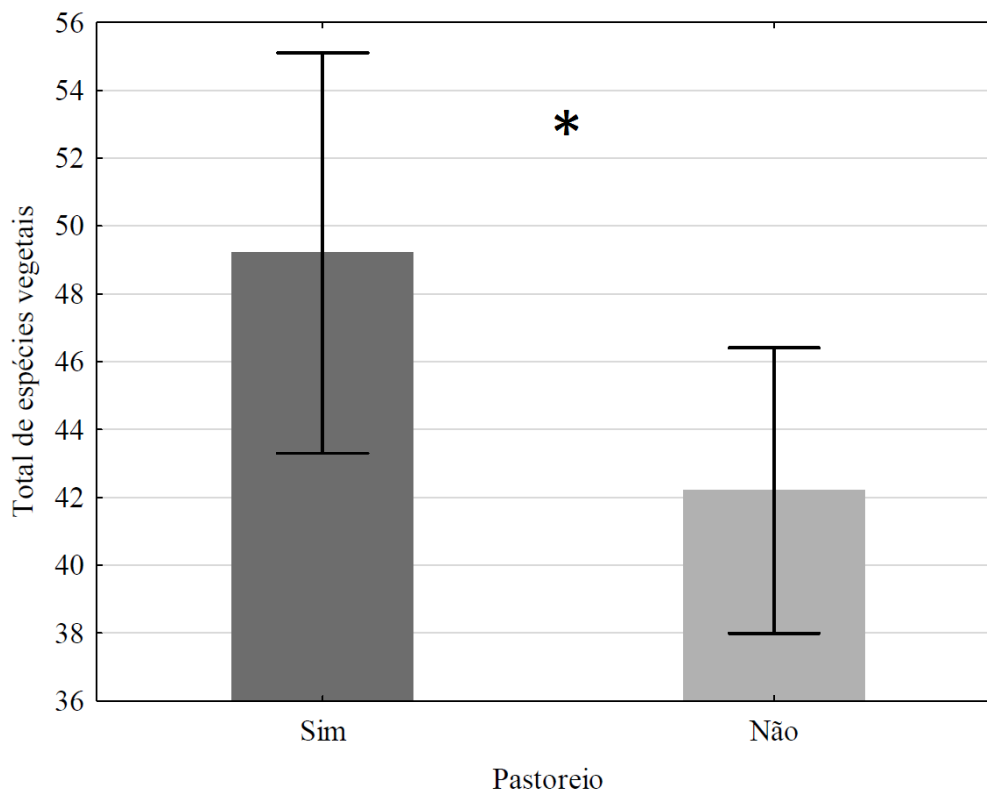


Figura 12 - Valores médios (\pm desvio padrão) do número total de espécies vegetais observados em parcelas com e sem pastoreio. * $P < 0,05$.

Quanto ao número total de indivíduos de orquídeas, foi possível observar que este era significativamente superior nas parcelas com pastoreio ($\chi^2 = 41,11$; $P < 0,001$) (Figura 13). Para além disso foi possível perceber que, independentemente de existir ou não pastoreio, há mais orquídeas nas parcelas dominadas por *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* e *Brachypodium phoenicoides* ($29,8 \pm 11,4$) e *Rosmarinus officinalis* ($25,3 \pm 16,8$), apesar de não existirem diferenças significativas entre nenhuma delas ($P \geq 0,05$) (Figura 14). As parcelas 4, 6 e 7 foram as exceções, tendo-se observado um número superior de orquídeas nas parcelas sem pastoreio (Anexo II).

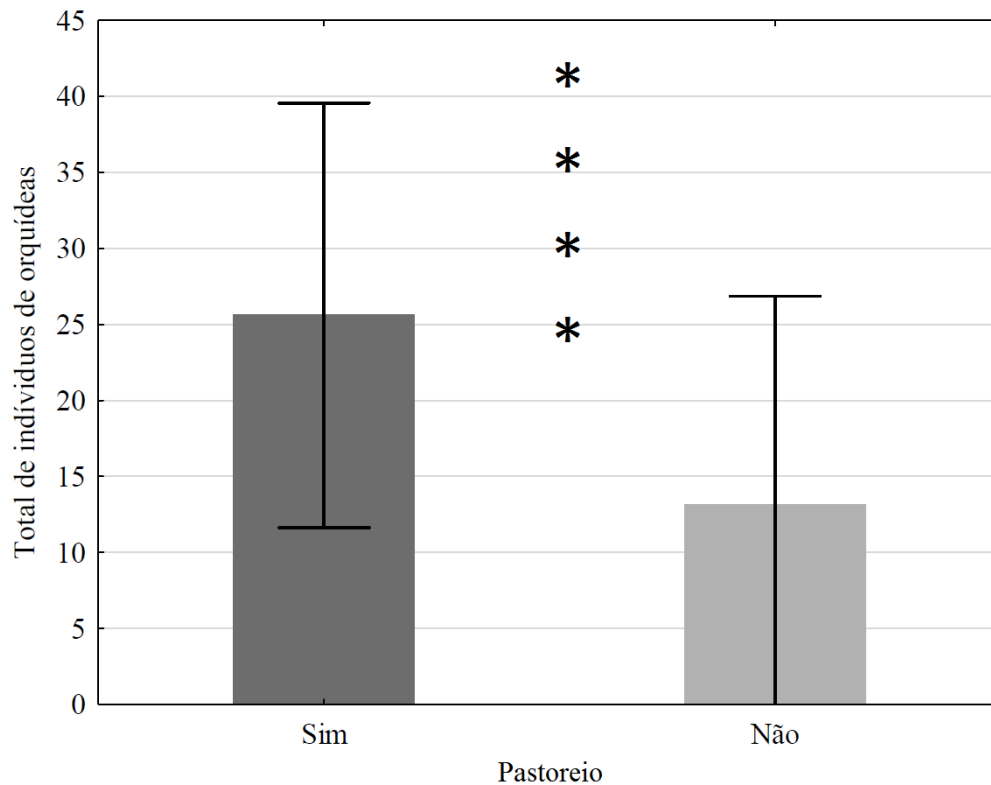


Figura 13 - Valores médios (\pm desvio padrão) do número total de indivíduos de orquídeas observados em parcelas com e sem pastoreio. **** $P < 0,0001$

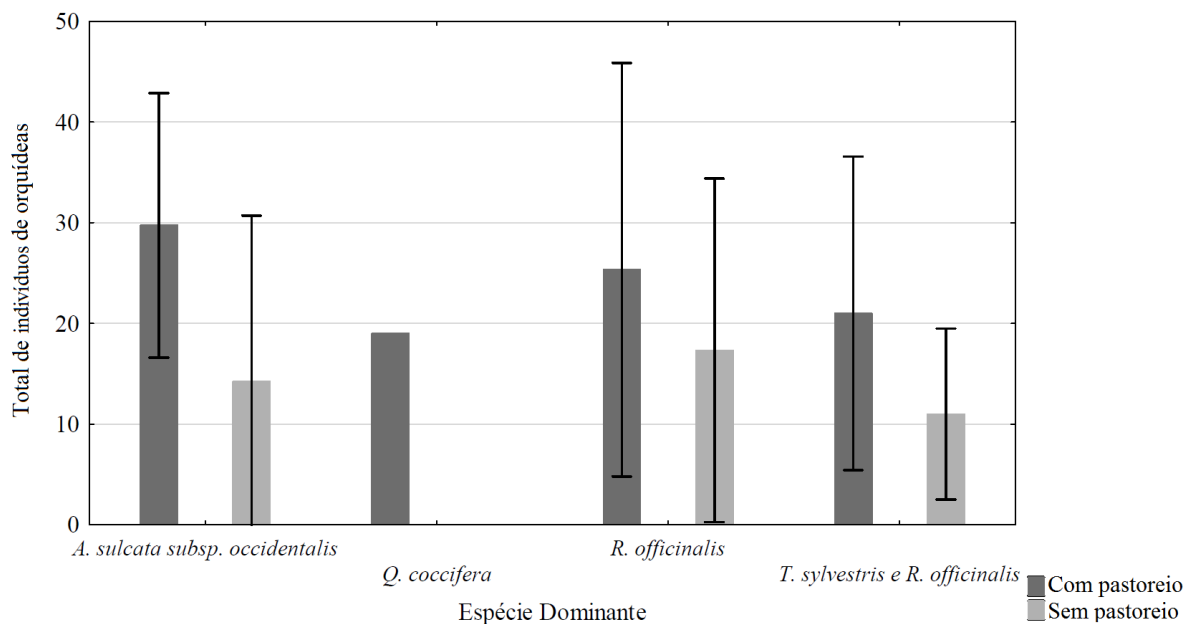


Figura 14 - Valores médios (\pm desvio padrão) do número total de indivíduos de orquídeas para parcelas em que as espécies dominantes são diferentes (*A. sulcata subsp. occidentalis*, *Q. coccifera*, *R. officinalis* e *T. sylvestris e R. officinalis*) em parcelas com e sem pastoreio. Como apenas existia uma parcela era dominada por *Quercus coccifera*, os dados dessa parcela não apresentam desvio padrão.

3.4. Efeito do pastoreio na espécie *Orchis anthropophora*

A espécie *O. anthropophora*, escolhida para os estudos de sucesso reprodutivo, estava presente na maioria das parcelas, existindo um número significativamente maior de indivíduos de *O. anthropophora* nas parcelas com pastoreio em comparação com as parcelas não pastoreadas ($\chi^2 = 23,51$; $P < 0,001$) (Figura 15).

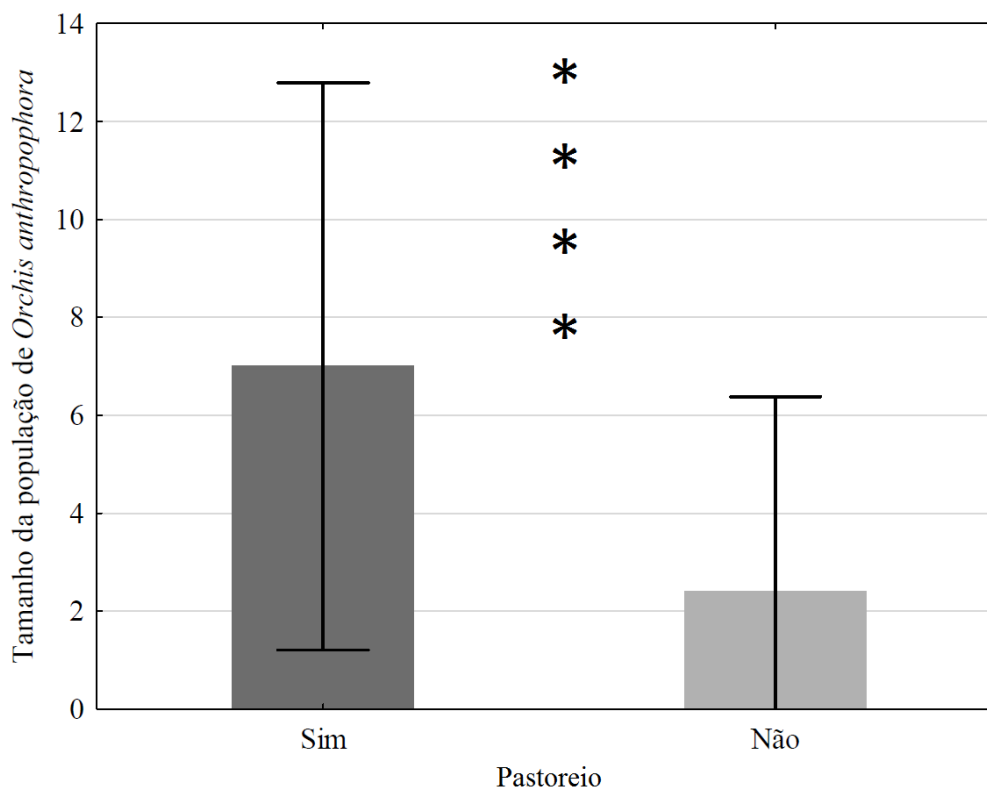


Figura 15 - Valores médios (\pm desvio padrão) da população de *Orchis anthropophora* observada em parcelas com e sem pastoreio. **** $P < 0,0001$

Entre a saída de dia 6 de abril, onde se registou o pico da floração de *O. anthropophora*, e a de dia 16 de maio, pico de frutificação, houve um decréscimo no número de indivíduos desta espécie. A proporção de indivíduos de *O. anthropophora* que se tornou reprodutora mostrou que o pastoreio não tem um efeito significativo sobre esta proporção ($\chi^2 = 0,37$; $P = 0,54$) (Figura 16), apesar de, em média, existirem mais indivíduos reprodutores em parcelas com pastoreio ($0,42 \pm 0,46$). A maior proporção de

indivíduos reprodutores registou-se nas parcelas 6 e 9 sem pastoreio e na parcela 7 com pastoreio onde todos os indivíduos entraram em frutificação (Anexo II).

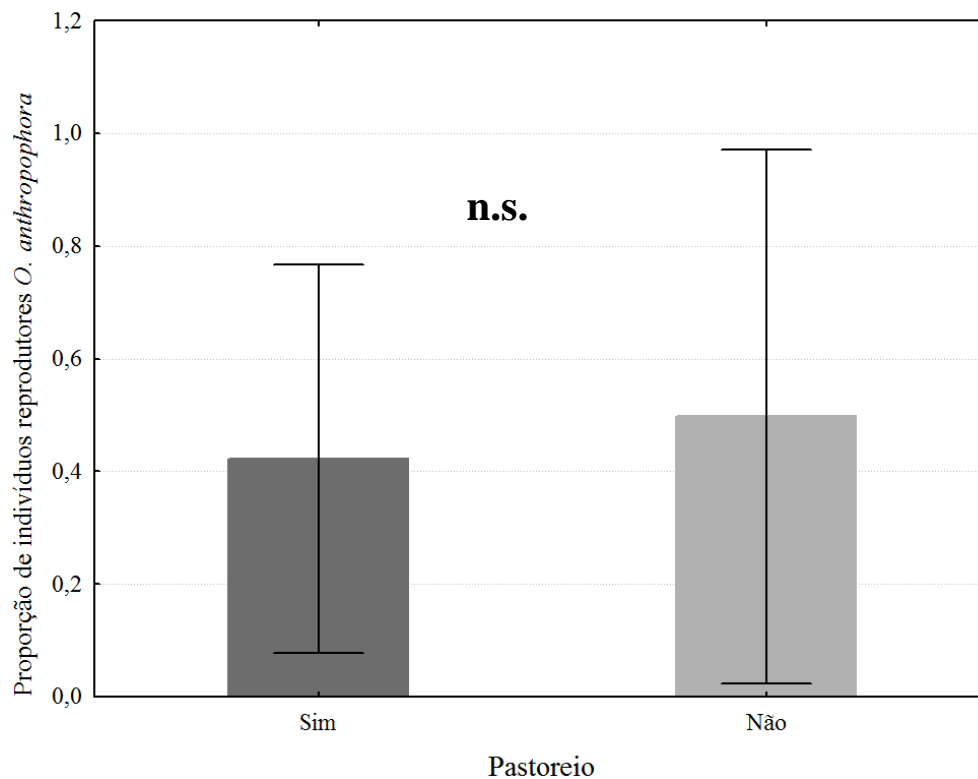


Figura 16 - Valores médios (\pm desvio padrão) de proporção de indivíduos reprodutores em parcelas com e sem pastoreio. n.s. $P \geq 0,05$.

Todos os dados usados para estudo do sucesso reprodutivo de *Orchis anthropophora* encontram-se no Anexo III. Estes valores foram recolhidos num total de 31 indivíduos da espécie que estavam presentes na maioria das parcelas. Nas parcelas 1, 2, 3, 4 e 5 sem pastoreio, e nas parcelas 9 com pastoreio e 10 com e sem pastoreio, não foram observados indivíduos em frutificação (Anexo II).

O sucesso reprodutivo desta espécie foi em geral baixo, apresentando em média uma produção de frutos de 0,26, registando-se apenas dois indivíduos com uma produção de frutos superior a 0,5 (Anexo III). Quando comparamos o sucesso reprodutivo entre indivíduos desta espécie que ocorrem em parcelas com pastoreio versus parcelas sem

Resultados

pastoreio, observou-se que este foi significativamente mais elevado em parcelas sem pastoreio ($\chi^2 = 9,16$; $P = 0.002$) (Figura 17).

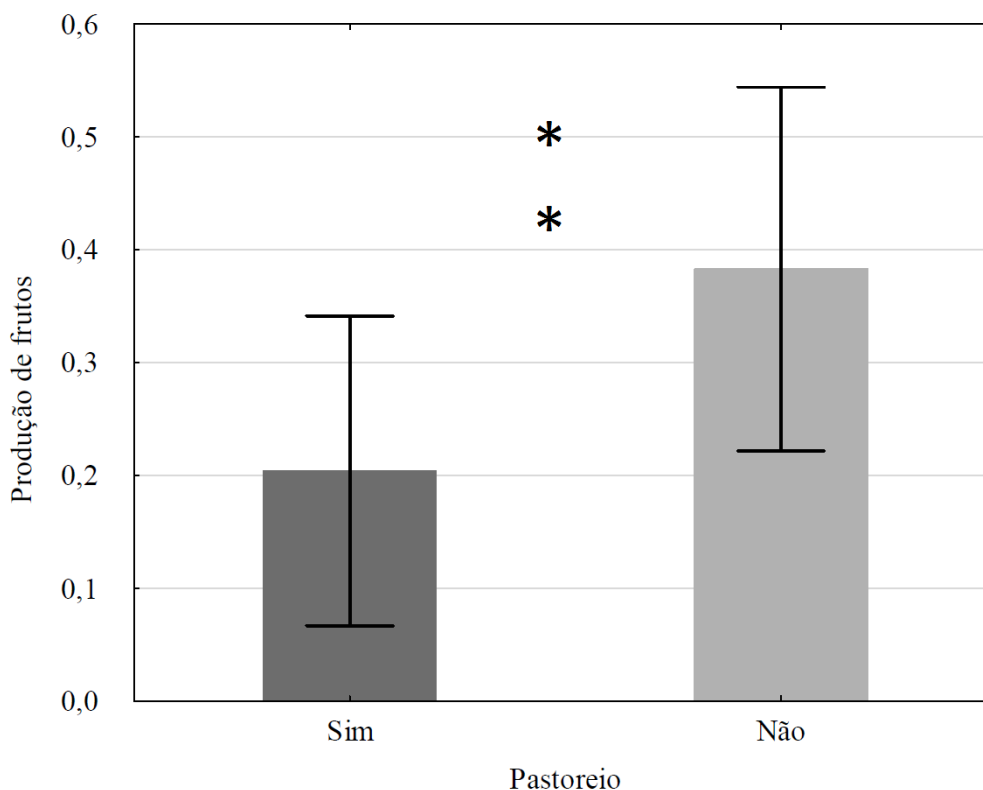


Figura 17 - Valores médios (\pm desvio padrão) de produção de frutos em parcelas com e sem pastoreio. ** $P < 0,01$.

Quanto à altura da planta, em média os indivíduos de *Orchis antropophora* apresentaram 14,5 cm de altura. A planta mais alta com 22 cm, e a mais baixa com 6,5 cm, pertenciam ambas à mesma parcela (parcela 8 na presença de pastoreio). Aliás, o pastoreio não aparenta ter influência significativa na altura das plantas ($\chi^2 = 0,24$; $P = 0,63$) (Figura 18). Para além disso, não se observou uma correlação significativa entre a altura das plantas e a produção de frutos ($r = 0,26$; $P = 0,155$) (Figura 19), apesar de existir uma tendência para plantas de maiores dimensões apresentarem uma produção de frutos igualmente superior.

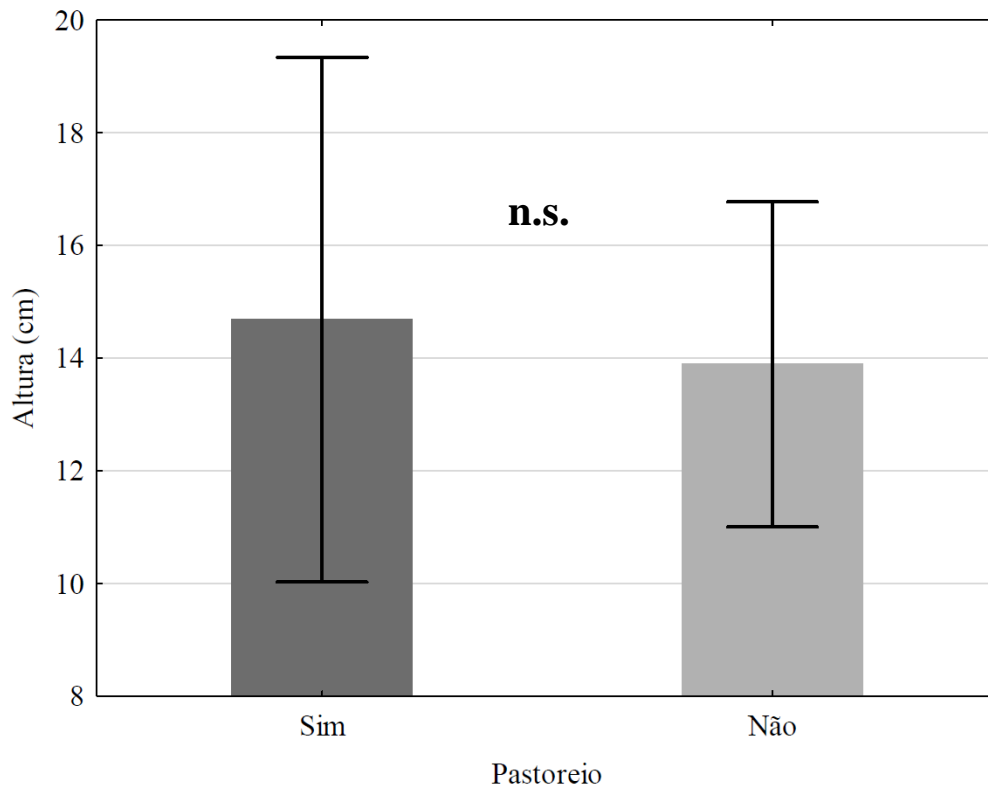


Figura 18 - Valores médios (\pm desvio padrão) de altura dos indivíduos de *Orchis anthropophora* a crescer em parcelas com e sem pastoreio. n.s. $P \geq 0,05$.

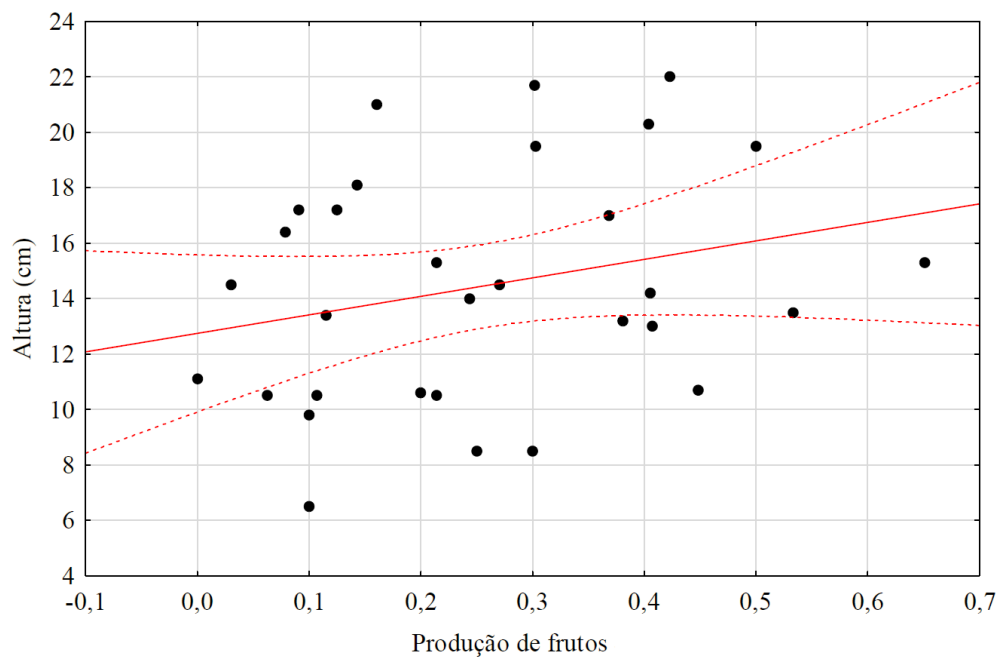


Figura 19 - Correlação entre a altura dos indivíduos de *O. anthropophora* e a produção de frutos de *O. anthropophora*: $r = 0,26$; $P = 0,155$.

Resultados

No que diz respeito ao número total de flores, em média os indivíduos desta espécie apresentaram 33 flores, sendo os valores mínimos e máximos, de 10 e 73 flores, respetivamente. O efeito do pastoreio no número total de flores não é significativo ($\chi^2 = 0,82$; $P = 0,37$) (Figura 20) e tal como no caso da altura da planta, não foi possível observar uma correlação significativa entre número total de flores e a produção de frutos ($r = 0,31$; $P = 0,089$), apesar de se observar a mesma tendência, isto é, inflorescências com maior número de flores apresentaram um êxito reprodutivo superior (Figura 21).

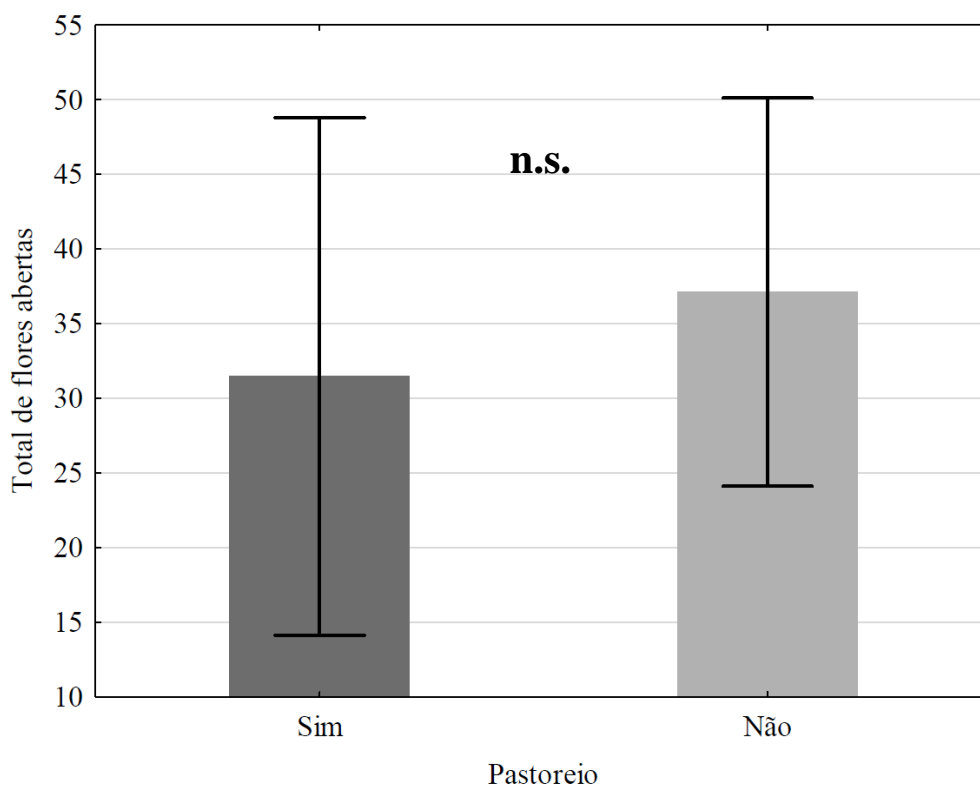


Figura 20 - Valores médios (\pm desvio padrão) de número total de flores abertas dos indivíduos de *Orchis anthropophora* em parcelas com e sem pastoreio. n.s. $P \geq 0,05$.

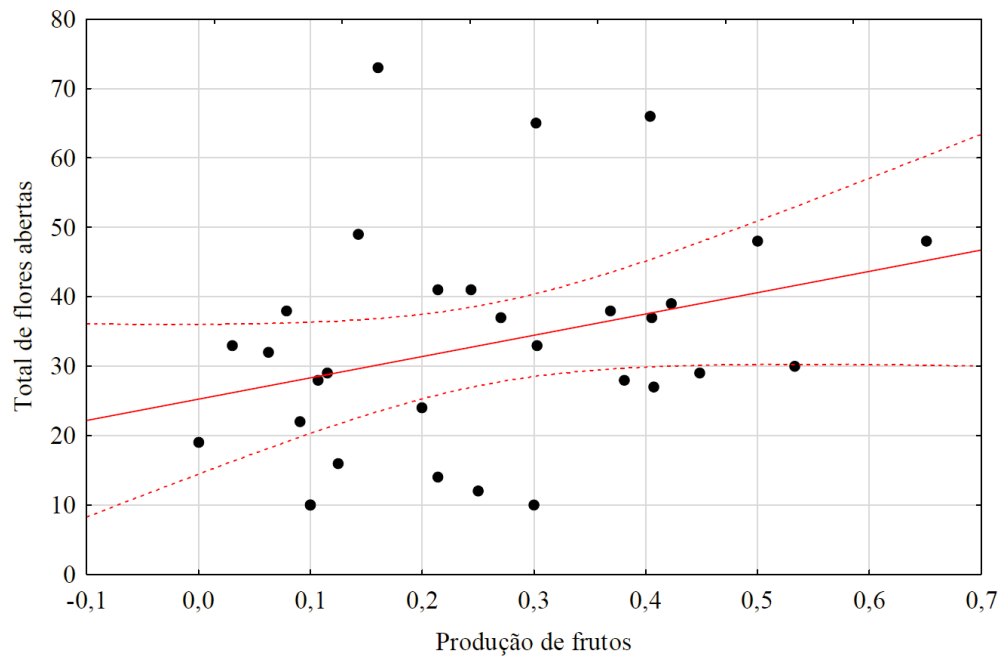


Figura 21 - Correlação entre o número total de flores abertas de *O. anthropophora* e a produção de frutos de *O. anthropophora*: $r = 0,31$; $P = 0,089$.

4. Discussão

O pastoreio extensivo tem sido usado como estratégia de gestão de habitats naturais, mas os seus efeitos nem sempre são consistentes (Fernández-Lugo *et al*, 2009; Rosa García *et al*, 2012; Watkinson & Ormerod, 2001). A falta de acompanhamento científico das parcelas estabelecidas após o projeto de Conservação da Gralha-de-bico-vermelho na Serra de Aire teve como consequência o desconhecimento dos resultados da gestão por pastoreio dos habitats presentes na área estudada. Assim, estudos do efeito do pastoreio na componente florística de cada parcela, em especial em espécies bioindicadoras dos habitats existentes como as pertencentes à família *Orchidaceae*, são fundamentais para perceber a eficácia deste tipo de gestão nos habitats e em espécies importantes para a biodiversidade.

O estado de conservação dos habitats de prados, arrelvados e de matos baixos é perturbado pela progressão sucessional, existência de pastoreio excessivo e de infraestruturas (ICNF, 2016). Neste trabalho, através do levantamento florístico e identificação da espécie dominante de todas as parcelas, em que foram observados cinco habitats diferentes, verificou-se um maior número de espécies vegetais em parcelas com pastoreio relativamente às parcelas não pastoreadas (controlo). Estes resultados vão ao encontro de outros obtidos em estudos anteriores onde se mostrou que o pastoreio extensivo é capaz de controlar as sucessões ecológicas e ajudar o desenvolvimento de outras espécies (Barbaro *et al*, 2001; Dostálek & Frantík, 2008; Klimek *et al*, 2007; Sternberg *et al*, 2000). Por exemplo, Dostálek & Frantík (2008) observaram, em reservas naturais na República Checa, que a gestão dos habitats estudados (compostos por *Festuco-Brometea*) através de pastoreio de baixa intensidade, diminuía a progressão de espécies arbustivas. Consequentemente, este tipo de gestão aumentou a cobertura das espécies bioindicadoras, sem afetar o desenvolvimento das espécies em risco de extinção presentes nos locais estudados.

A nível mais específico, procurámos perceber o efeito do pastoreio em espécies vegetais da família *Orchidaceae*, que são bioindicadoras de um bom estado de conservação do habitat mais frequentemente encontrado nas parcelas, o habitat 6210 “Prados secos seminaturais e fâcies arbustivas em substrato calcário (*Festuco-Brometalia*)” (ALFA, 2004). Ao todo foram observadas 9 espécies de orquídeas, sendo *Serapias strictiflora* a espécie com maior número de exemplares. Este número pode parecer baixo quando comparado com as 26 espécies de orquídeas descritas para a totalidade do Parque Natural das Serras de Aire e Candeeiros (Costa *et al*, 2010), mas também poderá ser característico do local estudado. Para além disso, o facto de ter havido precipitação até muito tarde no ano de estudo pode ter condicionado o desenvolvimento de algumas espécies. Sendo assim, é importante realizar novos levantamentos florísticos nos próximos anos, e obter dados que permitam ter uma melhor caracterização do local em termos do número de espécies *Orchidaceae*. Na espécie *Orchis mascula* foi observado um polimorfismo floral, registando-se indivíduos com três cores de tépalas diferentes: fúcsia, rosa e branco. As análises de citometria e a observação das características florais ajudaram a confirmar que os indivíduos eram todos na mesma espécie. Este tipo de polimorfismo foi anteriormente estudado na espécie decetiva *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soò, sendo que segundo alguns autores (Gigord *et al*, 2001), esta característica é mantida por um processo de seleção dependente de frequência negativa. Isto é, neste caso, plantas do morfotipo mais comum (tépalas fúcsia) apresentam um sucesso reprodutivo inferior às plantas menos frequentes (tépalas brancas). Esta característica pode ser mantida pelos polinizadores, que ao visitarem uma flor de *D. sambucina* pela primeira vez sem receber qualquer recompensa, vão alternar entre plantas de cores diferentes. Outros estudos realizados nesta espécie (Jersáková *et al*, 2006b) não apoiam esta hipótese, não tendo sido observada qualquer relação entre número de indivíduos com tépalas

brancas e sucesso reprodutivo, sendo aliás o sucesso reprodutivo das plantas com tépalas fúcsia superior ao das plantas com tépalas brancas. O mesmo se verifica para a espécie *O. mascula*, onde a existência de plantas com tépalas de cor branca em populações maioritariamente fúcsia conduzem ao aumento do sucesso reprodutivo das últimas, enquanto que o sucesso reprodutivo de indivíduos de tépalas brancas é sempre mais baixo (Dormont *et al*, 2009). São necessários mais estudos em populações que apresentem este tipo de polimorfismo para perceber como é que os indivíduos com tépalas brancas se mantêm na população, sendo por vezes mais frequentes que os indivíduos fúcsia, como é o caso de algumas populações de *O. mascula* na Serra dos Candeeiros.

Os estudos de genoma foram importantes para fazer uma melhor caracterização das *Orchidaceae* e para perceber se os rácios entre os picos 4C/2C poderiam ajudar a discriminar entre espécies. Ao relacionar os resultados obtidos com dados de tamanho de genoma e de cromossomas existentes na bibliografia, podemos prever que *Ophrys scolopax* terá 36 cromossomas (Bernardos *et al*, 2003; Greilhuber & Ehrendorfer, 1975). Uma vez que não existiram diferenças significativas dos valores 2C de tamanho de genoma para as espécies estudadas do género *Ophrys*, podemos estimar que *Ophrys pintoii* apresente um valor de $2n = 4x = 36$. O facto de outras espécies próximas de *Ophrys pintoii*, como por exemplo *Ophrys fusca*, também apresentarem 36 cromossomas (Greilhuber & Ehrendorfer, 1975; Lowe & Tyteca, 2012; Vereecken *et al*, 2010) sustenta esta hipótese, sendo sempre necessária uma confirmação por contagem cromossomática. Para as espécies *Orchis anthropophora*, *O. italica* e *O. mascula* existem dados de número de cromossomas iguais, sendo este de $2n = 6x = 42$ para todas elas (Bernardos *et al*, 2004; Bianco *et al*, 1991; Cozzolino *et al*, 2004; Jacquemyn *et al*, 2011). Apesar disso, no nosso estudo obtivemos estimativas significativamente diferentes dentro do género, podendo isto dever-se à grande discrepância de valores registados para *Orchis italica*. Estes valores

poderão ser resultado de uma diminuição do conteúdo cromossômico desta espécie no local, sendo necessária uma maior amostragem de indivíduos de *Orchis italica* para tentar obter resultados mais precisos, uma vez que no nosso estudo só foi possível contabilizar um indivíduo. Em relação ao gênero *Serapias*, foram apenas encontrados dados cromossômicos para *Serapias parviflora*, que reportam um número de cromossomas de $2n = 4x = 36$ (Bernardos *et al*, 2004). Uma vez que ocorreram diferenças significativas entre as duas espécies no que diz respeito ao valor $2C$ de tamanho de genoma, sendo o valor $2C$ obtido para *Serapias strictiflora* o dobro do obtido em *Serapias parviflora*, será de esperar que esta espécie apresente $2n = 8x = 72$ cromossomas. A existência de espécies descritas como tendo estes números de cromossomas dentro do gênero (Bernardos *et al*, 2004) poderá suportar esta hipótese, sendo, tal como para *Ophrys pintoii*, necessário realizar confirmar estas inferências através de contagens cromossômicas. Os rácios $4C/2C$ parecem ser homogêneos dentro dos gêneros estudados (*Ophrys* e *Orchis*), havendo mais uma vez discrepância nos dados para *Orchis italica*. O mesmo acontece para o rácio $2C/1C$ para o gênero *Serapias*, onde não se registaram diferenças significativas. Através destes estudos de tamanho de genoma foi possível verificar que ao utilizarmos as polinídias destas plantas, a estimativa de tamanho de genoma é bastante facilitada, como descrito por Trávníček *et al* (2015), resultando em gráficos de maior qualidade, uma vez que as polinídias apenas apresentam dois picos, correspondentes à fase haploide e diploide do pólen, não se observando padrões de endoreduplicação. Sendo assim, as polinídias são uma boa solução para estudos mais aprofundados de tamanho de genoma em *Orchidaceae*.

Relativamente ao estudo do efeito do pastoreio na família *Orchidaceae*, o maior número de indivíduos foi observado em parcelas com pastoreio. Para além disso, as parcelas dominadas por *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* e *Brachypodium*

phoenicoides foram, a par com parcelas dominadas por *Rosmarinus officinalis*, as que apresentaram um número maior indivíduos de orquídeas, independentemente de haver pastoreio ou não. Isto significa que, para além da gestão destes habitats por pastoreio extensivo permitir um melhor desenvolvimento das espécies de *Orchidaceae*, o tipo de habitat também influencia o seu número de espécies existentes. O habitat 6210, maioritário nas parcelas dominadas pelas gramíneas, mas também representado nas restantes, é o mais importante para o desenvolvimento de orquídeas, muito devido à sua restante composição florística e ao substrato calcário (ALFA, 2004; Landi *et al*, 2009). Estes resultados apoiam estudos anteriores (Hutchings, 2010; Jacquemyn *et al*, 2006; Kull & Hutchings, 2005) que mostraram que a gestão do coberto vegetal com pastoreio, feito de forma controlada e fora dos períodos de floração e frutificação dos indivíduos, promove o desenvolvimento dos indivíduos de *Orchidaceae*. A interrupção do pastoreio a partir do mês de janeiro é importante, pois favorece o desenvolvimento dos escapos florais, não havendo perdas por herbivoria, e permite que haja floração, frutificação e formação de sementes.

A escolha da espécie *Orchis anthropophora* para os estudos de sucesso reprodutivo deveu-se ao facto de esta estar presente na maioria das parcelas permitindo análises comparativas. Tal como para as restantes espécies de orquídeas, houve um maior número de indivíduos desta espécie em parcelas com pastoreio. Uma vez que esta espécie é bastante afetada por destruição dos habitats e aumento da componente arbustiva, não tolerando ambientes com muita sombra (Jacquemyn *et al*, 2011), os resultados obtidos foram os esperados. Para além disso, das estratégias de conservação apontadas para esta espécie é a gestão do seu habitat por pastoreio extensivo (Jacquemyn *et al*, 2011). Em relação ao estudo de sucesso reprodutivo na espécie *Orchis anthropophora* podemos dizer que foi, em geral, baixo, o que é frequente em espécies decetivas de *Orchidaceae*

(Jersáková *et al*, 2006a; Matsui *et al*, 2001; Neiland & Wilcock, 1998, Vandewoestijne *et al*, 2008). O maior índice de sucesso reprodutivo foi observado nas parcelas sem pastoreio, mas este resultado é independente desta estratégia de gestão, uma vez que este foi cessado antes da maior parte dos escapos florais se desenvolverem. Para além disso, uma boa estratégia de gestão dos habitats e a observação de grandes populações não parecem estar diretamente ligadas a sucessos reprodutivos muito altos (Hutchings, 2010; Jacquemyn *et al*, 2011). Sendo assim, o sucesso reprodutivo, neste caso, poderá ter dependido das condições atmosféricas, da abundância de polinizadores e da quantidade de recursos disponíveis (Hutchings, 2010; Pellegrino *et al*, 2010). A elevada perda de indivíduos entre o pico de floração e o pico de frutificação poderá também ser explicada por condições menos propícias ao desenvolvimento de frutos durante este ano. O baixo sucesso reprodutivo das orquídeas decetivas é muitas vezes compensado com um aumento do período de floração (Neiland & Wilcock, 1998; Vandewoestijne *et al*, 2008), o que foi possível verificar neste caso, uma vez que foram observadas flores desta espécie de fevereiro a maio. Para além disso, possivelmente estas plantas também racionam os seus recursos, utilizando-os na produção de um maior número de sementes (Sonkoly *et al*, 2016). Apesar das análises ao tamanho da planta e número de flores mostrarem que estes parâmetros têm tendência para afetar a produção de frutos através de um aumento de atrativos visuais para os polinizadores (Cruzan *et al*, 1988; Eckhart, 1991; Lobo *et al*, 2016; Mitchell *et al*, 2004), a sua correlação não foi significativa neste estudo. Para além disso, os estudos realizados para o efeito destes parâmetros no sucesso reprodutivo de espécies de *Orchidaceae* são muito divergentes. Para três espécies decetivas – *Anacamptis papilionacea*, *Orchis italica* e *Orchis anthropophora* – Pellegrino e colaboradores (2005) mostraram que não houve qualquer relação entre tamanho da planta e produção de frutos e número total de flores e produção de frutos. Por outro lado, em

espécies em que a estratégia de polinização é a pseudo-copulação, o tamanho da inflorescência poderá ter um efeito positivo na produção de frutos, uma vez que, com maior número de flores, haverá uma maior concentração de feromonas, que conseqüentemente irão atrair um maior número de polinizadores (machos) (Vandewoestijne *et al*, 2008). Jersáková, *et al* (2006a) num trabalho realizado com várias espécies decetivas, obtiveram resultados muito diversos sobre estes parâmetros, mostrando-se a influência do número de flores apenas em 3 das 12 populações estudadas. Em geral, podemos afirmar que plantas pequenas e com poucas flores não irão favorecer a polinização e produção de fruto, uma vez que não serão visíveis nem atrativas para os polinizadores. Por outro lado, inflorescências muito grandes poderão levar a um elevado uso de recursos, afetando conseqüentemente a produção de frutos (Jersáková *et al*, 2006a).

5. Conclusão e perspetivas futuras

Os resultados descritos neste trabalho vêm confirmar que a gestão feita através de pastoreio aumenta significativamente a diversidade florística observada nos habitats estudados, ao promover um maior número de espécies vegetais. Em particular, também promove um aumento da diversidade de espécies de *Orchidaceae*, que são bioindicadoras de bom estado de conservação, e do número de indivíduos desta família. Quanto ao sucesso reprodutivo, desde que a gestão seja interrompida durante os meses de floração e frutificação dos indivíduos, este parece não ser afetado pelo pastoreio, podendo esta ser dependente de outras condições do habitat, como disponibilidade de recursos e abundância de polinizadores.

Através dos estudos de citometria foi possível prever o número de cromossomas de duas espécies para a qual ainda não se encontravam dados na bibliografia, apesar de serem necessárias contagem cromossomáticas para confirmar estes resultados. Para além disso, foi possível confirmar que a utilização de polínias como material vegetal para os indivíduos desta família é uma melhor estratégia metodológica, uma vez que resulta em gráficos mais fáceis de analisar.

O trabalho desenvolvido foi importante para obter mais informações sobre o impacto da gestão por pastoreio nos habitats e espécies existentes no local estudado. A realização de estudos durante um maior período temporal será importante para perceber o real impacto deste tipo de estratégia de gestão nas comunidades vegetais ao longo do tempo. Estudos mais aprofundados da espécie *Orchis mascula*, onde se observa um polimorfismo floral e diversos tipos de populações – mistas, com flores fúcsia, rosa e brancas, e puras, com flores fúcsia ou brancas – serão interessantes para compreender a dinâmica populacional e avaliar o sucesso reprodutivo dos diferentes indivíduos.

6. Referências

- Aedo, C., Aizpuru, I., Alarcón, M. L., Aldasoro, J. J., Andrés, J.V., Benito Ayuso J., Catalán, P., Crespo, M. B., e Güemes, J. (2005). *Flora Iberica*, 21 (Madrid: Real Jardín Botánico, C.S.I.C).
- ALFA (2004). Tipos de Habitat Naturais e Semi-Naturais do Anexo I da Directiva 92/43/CEE (Portugal continental): Fichas de Caracterização Ecológica e de Gestão para o plano Sectorial da Rede Natura 2000.
- Antunes, M. de A., Duarte, L.C., e Reino, J.P. (2004). Barragens de Portugal: de Vilarinho da Furna à Aldeia da Luz, com passagem pelo Douro Internacional (Tortosa – Espanha).
- Barbaro, L., Dutoit, T., e Cozic, P. (2001). A six-year experimental restoration of biodiversity by shrub-clearing and grazing in calcareous grasslands of the French Prealps. *Biodiversity & Conservation* 10, 119–135.
- Bateman, R.M., Hollingsworth, P.M., Preston, J., Yi-Bo, L., Pridgeon, A.M., e Chase, M.W. (2003). Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (*Orchidaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142, 1–40.
- Batty, A.L., Dixon, K.W., Brundrett, M.C., e Sivasithamparam, K. (2004). Orchid Conservation and Mycorrhizal Associations. In *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*, K. Sivasithamparama, K.W. Dixon, and R.L. Barrett, eds. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 195–226.
- Bellusci, F., Pellegrino, G., e Musacchio, A. (2009). Different levels of inbreeding depression between outcrossing and selfing *Serapias* species. *Biologia Plantarum* 53, 175–178.

Referências

- Bernardos, S., Amich, F., e Gallego, F. (2003). Karyological and taxonomic notes on *Ophrys* (Orchidoideae, *Orchidaceae*) from the Iberian Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142, 395–406.
- Bernardos, S., Tyteca, D., e Amich, F. (2004). Cytotaxonomic study of some taxa of the subtribe Orchidinae (Orchidoideae, *Orchidaceae*) from the Iberian Peninsula. *Israel Journal of Plant Sciences* 52, 161–170.
- Bernardos, S., Crespi, A., Del Rey, F., e Amich, F. (2005). The section *Pseudophrys* (*Ophrys*, *Orchidaceae*) in the Iberian Peninsula: a morphometric and molecular analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148, 359–375.
- Bianco, P., D'emerico, S., Medagli, P., e Ruggiero, L. (1991). Polyploidy and aneuploidy in *Ophrys*, *Orchis*, and *Anacamptis* (*Orchidaceae*). *Plant systematics and evolution*, 178(3-4), 235-245.
- Brundrett, M.C., Scade, A., Batty, A.L., Dixon, K.W., e Sivasithamparam, K. (2003). Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycological Research* 107, 1210–1220.
- Castroviejo, S. (e colaboradores) (1986-2014). *Flora Iberica* (Madrid: Real Jardín Botánico, C.S.I.C).
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., van den Berg, C., e Schuiteman, A. (2015). An updated classification of *Orchidaceae*: Updated Classification of *Orchidaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177, 151–174.
- Coelho, C.I. (2007). Avaliação dos impactes ambientais dos parques eólicos em áreas protegidas: o caso de estudo do parque natural das Serras de Aire e Candeeiros. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências.

- Cooperativa Terra Chã, e Quercus (2011). Projecto de Conservação da Gralha-de-bico-vermelho na Serra dos Candeeiros.
- Costa, J.C., Espírito Santo, D., e Arsénio, P. (2010). Guia geobotânico da excursão ao Parque Natural da Serras de Aire e Candeeiros. *Quercetea* 10, 5–106.
- Cotrim, H., Monteiro, F., Sousa, E., Pinto, M.J., e Fay, M.F. (2016). Marked hybridization and introgression in *Ophrys* sect. *Pseudophrys* in the western Iberian Peninsula. *American Journal of Botany* 103, 677–691.
- Cozzolino, S., D’Emerico, S., e Widmer, A. (2004). Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271, S259–S262.
- Cruzan, M.B., Neal, P.R., e Willson, M.F. (1988). Floral Display in *Phyla incisa*: Consequences for Male and Female Reproductive Success. *Evolution* 42, 505.
- Dearnaley, J.D.W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17, 475–486.
- Delicado, A., Silva, L., Junqueira, L., Horta, A., Fonseca, S., e Truninger, M. (2013). Ambiente, paisagem, património e economia: os conflitos em torno de parques eólicos em Portugal. *Revista Crítica de Ciências Sociais* 100, 11–36.
- Directiva 92/43/CEE do Conselho, de 21 de Maio de 1992, relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M.A., Nardi, L., e Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82, 17–26.

Referências

- Doležel, J., Greilhuber, J., e Suda, J. (2007). Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. (Weinheim: John Wiley & Sons.)
- Dormont, L., Delle-Vedove, R., Bessière, J.-M., Hossaert-Mc Key, M., e Schatz, B. (2010). Rare white-flowered morphs increase the reproductive success of common purple morphs in a food-deceptive orchid. *New Phytologist* 185, 300–310.
- Dostálek, J., e Frantík, T. (2008). Dry grassland plant diversity conservation using low-intensity sheep and goat grazing management: case study in Prague (Czech Republic). *Biodiversity and Conservation* 17, 1439–1454.
- Eckhart, V.M. (1991). The effects of floral display on pollinator visitation vary among populations of *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evolutionary Ecology* 5, 370–384.
- Ehlers, B.K., Olesen, J.M., e Ågren, J. (2002). Floral morphology and reproductive success in the orchid *Epipactis helleborine*: regional and local across-habitat variation. *Plant Systematics and Evolution* 236, 19–32.
- Fernández-Lugo, S., de Nascimento, L., Mellado, M., Bermejo, L.A., e Arévalo, J.R. (2009). Vegetation change and chemical soil composition after 4 years of goat grazing exclusion in a Canary Islands pasture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 132, 276–282.
- Franco, J., e Afonso, M.L. (1971-2003). *Nova Flora de Portugal* (Lisboa: Escolar Editora).
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., e Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220, 1049–1051.
- García-Barriuso, M., Bernardos, S., Amich, F. (2010). Chromosomal evolution in Mediterranean species of *Ophrys* sect. *Pseudophrys* (Orchidaceae): An analysis of karyotypes and polyploidy. *Taxon* 59, 525–537.

- Germano, D., Lopes, L., Pinto-Gomes, C., Pedro Santos, A., e Martins, R. (2014). O Impacte das Pedreiras Inactivas na Fauna, Flora e Vegetação da Zona dos Mármore: Problema ou Benefício?. *Callipole - Revista de Cultura* 21, 149-171.
- Gigord, L.D., Macnair, M.R., e Smithson, A. (2001). Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6253–6255.
- Greilhuber, J., e Ehrendorfer, F. (1975). Chromosome numbers and evolution in *Ophrys* (*Orchidaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 124(2), 125-138.
- Hutchings, M.J. (1983). Plant diversity in four chalk grassland sites with different aspects. *Vegetatio* 53, 179–189.
- Hutchings, M.J. (1987a). The Population Biology of the Early Spider Orchid, *Ophrys sphegodes* Mill. I. A Demographic Study from 1975 to 1984. *The Journal of Ecology* 75, 711.
- Hutchings, M.J. (1987b). The Population Biology of the Early Spider Orchid, *Ophrys sphegodes* Mill. II. Temporal Patterns in Behaviour. *The Journal of Ecology* 75, 729.
- Hutchings, M.J. (2010). The population biology of the early spider orchid *Ophrys sphegodes* Mill. III. Demography over three decades. *Journal of Ecology* 98, 867–878.
- Jacquemyn, H., Honnay, O., Cammue, B.P.A., Brys, R., e Lievens, B. (2010). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology* 19, 4086–4095.
- Jacquemyn, H., Brys, R., e Hutchings, M.J. (2011). Biological flora of the British Isles: *Orchis anthropophora* (L.) All. (*Aceras anthropophorum* (L.) W.T. Aiton): *Orchis anthropophora* (L.) All. *Journal of Ecology* 99, 1551–1565.

Referências

- Jersáková, J., Johnson, S.D., e Kindlmann, P. (2006a). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* 81, 219.
- Jersáková, J., Kindlmann, P., e Renner, S.S. (2006b). Is the colour dimorphism in *Dactylorhiza sambucina* maintained by differential seed viability instead of frequency-dependent selection? *Folia Geobotanica* 41, 61–76.
- Klimek, S., Richtergenkemmermann, A., Hofmann, M., e Isselstein, J. (2007). Plant species richness and composition in managed grasslands: The relative importance of field management and environmental factors. *Biological Conservation* 134, 559–570.
- Kull, T., e Hutchings, M.J. (2006). A comparative analysis of decline in the distribution ranges of orchid species in Estonia and the United Kingdom. *Biological Conservation* 129, 31–39.
- Landi, M., Frignani, F., Lazzeri, C., e Angiolini, C. (2009). Abundance of orchids on calcareous grasslands in relation to community species, environmental, and vegetational conditions. *Russian Journal of Ecology* 40, 486–494.
- Lobo, J.A., Lacerda Ramos, D., e Cabral Braga, A. (2016). Visitation rate of pollinators and nectar robbers to the flowers and inflorescences of *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae): effects of floral display size and habitat fragmentation. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Loureiro, J., Eleazar Rodriguez, Jaroslaz Dolezel, e Conceição Santos (2007). Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of Botany* 100, 875–888.

- Loureiro, J., Trávníček, P., Rauchová, J., Urfus, T., Vit, P., Štech, M., Castro, S., Suda, e J., Pyšek, P. (2010). The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 82, 3–21.
- Lowe, M.R., e Tyteca, D. (2012). Two new *Ophrys* species from Portugal. *Journal Europaischer Orchideen: Mitteilungsblatt Des AHO Baden-Württemberg* 44, 207–229.
- Matsui, K., Ushimaru, T., e Fujita, N. (2001). Pollinator limitaton in a deceptive orchid, *Pogonia japonica*, on a floating peat mat. *Plant Species Biology* 16, 231–235.
- Merckx, V.S.F.T., Freudenstein, J.V., Kissling, J., Christenhusz, M.J.M., Stotler, R.E., Crandall-Stotler, B., Wickett, N., Rudall, P.J., Maas-van de Kamer, H., e Maas, P.J.M. (2013). Taxonomy and Classification. In *Mycoheterotrophy*, V. Merckx, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 19–101.
- Mitchell, R.J., Karron, J.D., Holmquist, K.G., e Bell, J.M. (2004). The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* 18, 116–124.
- Murren, C.J. (2002). Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. *Journal of Ecology* 90, 100–107.
- Neiland, M.R.M., e Wilcock, C.C. (1998). Fruit set, nectar reward, and rarity in the *Orchidaceae*. *American Journal of Botany* 85, 1657–1671.
- Pellegrino, G., Bellusci, F., e Musacchio, A. (2010). The effects of inflorescence size and flower position on female reproductive success in three deceptive orchids. *Botanical Studies* 51, 351–356.
- Pridgeon, A. M., Bateman, R. M., Cox, A. V., Hapeman, J. R, e Chase, M. W. (1997). Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, *Orchidaceae*) based on nuclear ITS

Referências

- sequences: 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* 12, 89–109.
- Ramírez, S.R., Gravendeel, B., Singer, R.B., Marshall, C.R., e Pierce, N.E. (2007). Dating the origin of the *Orchidaceae* from a fossil orchid with its pollinator. *Nature* 448, 1042–1045.
- Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant* (Cambridge University Press).
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244, 149–163.
- Róis, A.S. (2005). The effects of population demography parameters on the reproductive success in the *Ophrys* genus (*Orchidaceae*). Tese de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia.
- Rosa García, R., R., Celaya, R., García, U., e Osoro, K. (2012). Goat grazing, its interactions with other herbivores and biodiversity conservation issues. *Small Ruminant Research* 107, 49–64.
- Rossi, W. (2002). *Quaderni di Conservazione della Natura - Orchidee d'Italia* (Itália: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare).
- Schatz, B. (2006). Fine scale distribution of pollinator explains the occurrence of the natural orchid hybrid \times *Orchis bergonii*. *Ecoscience* 13, 111–118.
- Selosse, M.-A., Faccio, A., Scappaticci, G., e Bonfante, P. (2004). Chlorophyllous and Achlorophyllous Specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, *Orchidaceae*) Are Associated with Ectomycorrhizal Septomycetes, including Truffles. *Microbial Ecology* 47, 416–426.

- Sonkoly, J., E. Vojtkó, A., Tökölyi, J., Török, P., Sramkó, G., Illyés, Z., e Molnár V., A. (2016). Higher seed number compensates for lower fruit set in deceptive orchids. *Journal of Ecology* *104*, 343–351.
- Sternberg, M., Gutman, M., Perevolotsky, A., Ungar, E.D., e Kigel, J. (2000). Vegetation response to grazing management in a Mediterranean herbaceous community: a functional group approach. *Journal of Applied Ecology* *37*, 224–237.
- Trávníček, P., Ponert, J., Urfus, T., Jersáková, J., Vrána, J., Hřibová, E., Doležel, J., e Suda, J. (2015). Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication: Genome Size Estimation in Orchids. *Cytometry Part A* *87*, 958–966.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K., e Calvo, R.N. (2005). Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* *84*, 1–54.
- Tyteca, D. (1997). The Orchid Flora of Portugal. *Journal Europäischer Orchideen* *29*, 185–581.
- Vandewoestijne, S., Róis, A.S., Caperta, A., Baguette, M., e Tyteca, D. (2009). Effects of individual and population parameters on reproductive success in three sexually deceptive orchid species. *Plant Biology* *11*, 454–463.
- Vereecken, N.J., Cozzolino, S. e Schiestl, F.P. (2010). Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. *BMC Evolutionary Biology* *10*, 103.
- Watkinson, A. R., e Ormerod, S. J. (2001). Grasslands, grazing and biodiversity: editors' introduction. *Journal of Applied Ecology* *38*, 233–237.
- Flora-On – Flora de Portugal interativa. Disponível em: <http://flora-on.pt/>. Acedido a 14 de junho de 2016

Referências

ICNF - Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. Disponível em:
<http://www.icnf.pt/portal>. Acedido a 5 de junho de 2016

International Rivers – People, Water, Life. Disponível em: <https://www.internationalrivers.org/>.
Acedido a 6 de julho de 2016

World Checklist of Selected Plant Families: Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em
<http://apps.kew.org/wcsp/incfamilies.do>. Acedido a 14 de junho de 2016

7. Anexos

Anexo I – Tabela com o levantamento florístico realizado nas 20 parcelas estudadas. As espécies em destaque são as espécies consideradas dominantes na parcela.

Parcela	Pastoreio	Espécies
P1	Sim	<i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophylla</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Andryala integrifolia</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Arrhenatherum album</i> (Vahl) Clayton, <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i> , <i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco , <i>Bellis sylvestris</i> Cirillo, <i>Brachypodium phoenicoides</i> (L.) Roem. & Schult. , <i>Briza maxima</i> L., <i>Bromus madritensis</i> L., <i>Catapodium maritimum</i> (L.) C.E.Hubb., <i>Centaurea pullata</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Euphorbia segetalis</i> var. <i>segetalis</i> L., <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Helianthemum apenninum</i> subsp. <i>apenninum</i> (L.) Mill., <i>Hypericum linarifolium</i> Vahl, <i>Lathyrus cicera</i> L., <i>Leontodon taraxacoides</i> subsp. <i>taraxacoides</i> (Vill.) Mérat, <i>Linaria amethystea</i> (Lam.) Hoffmanns. & Link, <i>Narcissus bulbocodium</i> subsp. <i>obesus</i> (Salisb.) Maire, <i>Malva hispanica</i> L., <i>Medicago mínima</i> (L.) L., <i>Ononis spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> L., <i>Orchis anthropophora</i> (L.) All., <i>Orchis italica</i> Poir., <i>Ornithogalum orthophyllum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boiss.) Zahar. = <i>Ornithogalum bourgareanum</i> , <i>Plantago afra</i> var. <i>afra</i> L., <i>Plantago bellardii</i> All., <i>Plantago lagopus</i> L., <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Sangisorba minor</i> subsp. <i>balearica</i> (Bourg. ex Nyman) Muñoz Garm. & C. Navarro, <i>Scorpiurus sulcatus</i> L., <i>Sedum album</i> L., <i>Senecio vulgaris</i> L., <i>Serapias strictiflora</i> Welw. ex Veiga, <i>Sideritis hirsuta</i> L., <i>Silene gallica</i> L., <i>Silene scabriflora</i> Brot., <i>Stachys arvensis</i> L., <i>Trifolium campestre</i> Schreb., <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>syvestris</i> (Hoffmanns. & Link) Cout., <i>Tuberaria guttata</i> (L.) Fourr., <i>Urginea maritima</i> (L.) Baker, <i>Vicia angustifolia</i> L., <i>Vicia lutea</i> L., <i>Vicia parviflora</i> Cav., <i>Vicia sativa</i> L.
	Não	<i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophylla</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Andryala integrifolia</i> , <i>Anemone palmata</i> L., <i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco , <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i> , <i>Bellis sylvestris</i> Cirillo, <i>Brachypodium phoenicoides</i> (L.) Roem. & Schult. , <i>Briza maxima</i> L., <i>Bromus madritensis</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis</i>

glomerata L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis* var. *segetalis* L., *Helianthemum apenninum* subsp. *apenninum* (L.) Mill., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Lathyrus cicero* L., *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Medicago minima* (L.) L., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.= *Ornithogalum bourgareanum*, *Rosmarinus officinalis* L., *Scorpiurus sulcatus* L., *Sideritis hirsuta* L., *Silene scabriflora* Brot., *Trifolium campestre* Schreb., *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker, *Vicia angustifolia* L., *Vicia lutea* L., *Vicia sativa* L.

P2	Sim	<p><i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophyllea</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco, <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i>, <i>Bellis perennis</i> L., <i>Brachypodium phoenicoides</i> (L.) Roem. & Schult., <i>Briza maxima</i> L., <i>Centaurea pullata</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Genista tounefortii</i> Spach, <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Jasione montana</i> L., <i>Jonopsidium abulense</i> (Pau) Rothm., <i>Lathyrus sphaericus</i> Retz., <i>Lotus ornithopodioides</i> L., <i>Leontodon taraxacoides</i> subsp. <i>taraxacoides</i> (Vill.) Mérat, <i>Linaria amethystea</i> (Lam.) Hoffmanns. & Link, <i>Muscari comosum</i> (L.) Mill., <i>Narcissus bulbocodium</i> subsp. <i>obesus</i> (Salisb.) Maire, <i>Ononis reclinata</i> L., <i>Orchis anthropophora</i> (L.) All., <i>Orchis italica</i> Poir., <i>Ornithogalum orthophyllum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boiss.) Zahar.= <i>Ornithogalum bourgareanum</i>), <i>Pimpinella villosa</i> Schousb., <i>Plantago afra</i> var. <i>afra</i> L., <i>Plantago bellardii</i> All., <i>Plantago lagopus</i> L., <i>Polygala vulgaris</i> L., <i>Romulea bulbocodium</i> (L.) Sebast. & Mauri, <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Sanguisorba minor</i> (Bourg. ex Nyman) Muñoz Garm. & C. Navarro, <i>Sanguisorba verrucosa</i> (Link ex G. Don) Ces., <i>Scilla monophyllos</i> Link, <i>Serapias parviflora</i> Parl., <i>Serapias strictiflora</i> Welw. ex Veiga, <i>Silene galica</i> L., <i>Silene scabriflora</i> Brot., <i>Thapsia villosa</i> L., <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>syvestris</i> (Hoffmanns. & Link) Cout., <i>Trifolium campestre</i> Schreb.,</p>
----	-----	--

Trifolium stellatum L., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker, *Vicia sativa* L., *Vulpia* sp. L.

Não *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Avenula sulcata* subsp. **occidentalis** (Gervais) **Romero Zarco**, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Bellis perennis* L., ***Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. & Schult.**, *Briza maxima* L., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Genista tounefortii* Spach, *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Hypericum linariifolium* Vahl, *Jasione montana* L., *Jonopsidium abulense* (Pau) Rothm., *Lathyrus sphaericus* Retz., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Ononis reclinata* L., *Orchis anthropophora* (L.) All., *Orchis italica* Poir., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, *Rosmarinus officinalis* L., *Scilla monophyllos* Link, *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Trifolium campestre* Schreb., *Trifolium stellatum* L., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Silene scabriflora* Brot., *Urginea maritima* (L.) Baker, *Vulpia* sp. L., *Vicia sativa* L.

P3 Sim *Ajuga iva* (L.) Schreb. var. *iva*, *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata* subsp. **occidentalis** (Gervais) **Romero Zarco**, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, ***Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. & Schult.**, *Briza maxima* L., *Bromus madritensis* L., *Centaurea pullata* L., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium aethiopicum* (Lam.) Brumh. & Thell, *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis* var. *segetalis* L., *Helianthemum apenninum* subsp. *apenninum* (L.) Mill., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.)

Chouard ex Rothm., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Sedum album* L., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Sideritis hirsuta* L., *Silene scabriflora* Brot., *Trifolium campestre* Schreb., *Trifolium hispidus*, *Trifolium scabrum* L., *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker

Não *Ajuga iva* (L.) Schreb. var. *iva*, *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., ***Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco**, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, ***Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. & Schult.**, *Briza maxima* L., *Bromus madritensis* L., *Centaurea pullata* L., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis* var. *segetalis* L., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Helianthemum apenninum* subsp. *apenninum* (L.) Mill., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Orchis italica* Poir., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Sedum album* L., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Sideritis hirsuta* L., *Silene scabriflora* Brot., *Trifolium campestre* Schreb., *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maitima* (L.) Baker

P4 Sim *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., ***Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco**, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*,

Brachypodium phoenicoides (L.) Roem. & Schult., *Briza maxima* L., *Carduus lusitanicus* subsp. *broteroi* (Welw. ex Mariz) Devesa, *Chaenorrhinum origanifolium* (L.) Kostel. , *Cistus salviifolius* L., *Clinopodium vulgare* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér. *Euphorbia exigua* L., *Genista tounefortii* Spach, *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, *Rosmarinus officinalis* L., *Scilla monophyllos* Link, *Serapias parviflora* Parl., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Sideritis hirsuta* L., *Silene galica* L., *Silene scabriflora* Brot., *Trifolium campestre* Schreb., *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritimo* (L.) Baker

Não *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Arenaria conimbricensis* Brot., *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, ***Brachypodium phoenicoides* (L.) Roem. & Schult.**, *Briza máxima* L., *Centaurea pullata* L., *Cistus salviifolius* L., *Clinopodium vulgare* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Genista tounefortii* Spach, *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Parentucellia viscosa* (L.) Caruel, *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, *Rosmarinus officinalis* L., *Scilla monophyllos* Link, *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Sideritis hirsuta* L., *Silene galica* L., *Silene scabriflora* Brot., *Trifolium campestre* Schreb., *Thymus zygis*

		<i>subsp. syvestris</i> (Hoffmanns. & Link) Cout., <i>Tuberaria guttata</i> (L.) Fourr., <i>Urginea maritima</i> (L.) Baker
P5	Sim	<i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophyllea</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Anthyllis vulneraria</i> L., <i>Avenula sulcata subsp. occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco, <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Arrhenatherum album</i> (Vahl) Clayton, <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i> , <i>Bellis perennis</i> L., <i>Briza maxima</i> L., <i>Centranthus calcitrapae</i> (L.) Dufur., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Clinopodium vulgare</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Genista tounefortii</i> Spach, <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench, <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Lathyrus cicera</i> L., <i>Lathyrus sphaericus</i> Retz., <i>Leontodon taraxacoides subsp. taraxacoides</i> (Vill.) Mérat, <i>Linaria amethystea</i> (Lam.) Hoffmanns. & Link, <i>Linum bienne</i> Mill., <i>Lotus omithopodioides</i> L., <i>Muscari comosum</i> (L.) Mill., <i>Narcissus bulbocodium subsp. obesus</i> (Salisb.) Maire, <i>Orchis anthropophora</i> (L.) All., <i>Orchis italica</i> Poir., <i>Orchis mascula</i> L., <i>Ornithogalum orthophyllum subsp. baeticum</i> (Boiss.) Zahar.=(<i>Ornithogalum bourgareanum</i>), <i>Ononis reclinata</i> L., <i>Plantago afra</i> var. <i>afra</i> L., <i>Plantago bellardii</i> All., <i>Plantago lagopus</i> L., <i>Polygala microphylla</i> L., <i>Quercus coccifera</i> L. , <i>Romulea bulbocodium</i> (L.) Sebast. & Mauri, <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Sanguisorba minor</i> (Bourg. ex Nyman) Muñoz Garm. & C. Navarro, <i>Scilla monophyllos</i> Link, <i>Scorpiurus sulcatus</i> L., <i>Sideritis hirsuta</i> L., <i>Stipa gigantea</i> Link, <i>Silene scabriflora</i> Brot., <i>Trifolium campestre</i> Schreb., <i>Thymus zygis subsp. syvestris</i> (Hoffmanns. & Link) Cout., <i>Tuberaria guttata</i> (L.) Fourr., <i>Urginea maritima</i> (L.) Baker, <i>Vicia parviflora</i> Cav.
	Não	<i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophyllea</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Avenula sulcata subsp. occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco, <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i> , <i>Bellis perennis</i> L., <i>Briza maxima</i> L., <i>Centranthus calcitrapae</i> (L.) Dufur., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Clinopodium vulgare</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Euphorbia segetalis</i> var. <i>segetalis</i> L., <i>Genista tounefortii</i> Spach, <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench, <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Lathyrus</i>

sphaericus Retz., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Lotus omithopodioides* L., *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire
Ornithogalum orthophyllum subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Ononis reclinata* L., *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., ***Quercus coccifera* L.**, *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, *Rosmarinus officinalis* L., *Scilla monophyllos* Link, *Sideritis hirsuta* L., *Scorpiurus sulcatus* L., *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Sanguisorba minor* (Bourg. ex Nyman) Muñoz Garm. & C.Navarro, *Silene scabriflora* Brot., *Urginea maritima* (L.) Baker, *Vicia parviflora* Cav.

P6	Sim	<p><i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophyllea</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Anthyllis vulneraria</i> L., <i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco, <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Aristolochia paucinervis</i> Pomel, <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i>, <i>Bellis perennis</i> L., <i>Briza maxima</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Euphorbia segetalis</i> var. <i>segetalis</i> L., <i>Gagea lusitânica</i> A.Terracc., <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Jonopsidium abulense</i> (Pau) Rothm., <i>Juncus capitatus</i> Weigel, <i>Koeleria crassipes</i> Lange, <i>Leontodon taraxacoides</i> subsp. <i>taraxacoides</i> (Vill.) Mérat, <i>Linaria amethystea</i> (Lam.) Hoffmanns. & Link, <i>Muscari comosum</i> (L.) Mill., <i>Narcissus bulbocodium</i> subsp. <i>obesus</i> (Salisb.) Maire, <i>Ophrys pintoii</i> M.R. Lowe & D. Tyteca, <i>Orchis anthropophora</i> (L.) All., <i>Ornithogalum orthophyllum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boiss.) Zahar., <i>Plantago afra</i> var. <i>afra</i> L., <i>Plantago bellardii</i> All., <i>Parentucellia latifolia</i> (L.) Caruel, <i>Parentucellia viscosa</i> (L.) Caruel, <i>Romulea bulbocodium</i> (L.) Sebast. & Mauri, <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Scilla monophyllos</i> Link, <i>Senecio vulgaris</i> L., <i>Serapias parviflora</i> Parl., <i>Serapias strictiflora</i> Welw. ex Veiga, <i>Sideritis hirsuta</i> L., <i>Silene scabriflora</i> Brot., <i>Stachys arvensis</i> L., <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>syvestris</i> (Hoffmanns. & Link) Cout., <i>Tuberaria guttata</i> (L.) Fourr., <i>Tulipa sylvestris</i> subsp. <i>australis</i> (Link) Pamp. <i>Urginea maritima</i> (L.) Baker</p>
----	-----	--

Não	<p><i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophyllea</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Anthyllis vulneraria</i> L., <i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco, <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Aristolochia paucinervis</i> Pomel, <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i>, <i>Bellis perennis</i> L., <i>Briza maxima</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Euphorbia segetalis</i> var. <i>segetalis</i> L., <i>Gagea lusitanica</i> A.Terracc., <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Jonopsidium abulense</i> (Pau) Rothm., <i>Juncus capitatus</i> Weigel, <i>Koeleria crassipes</i> Lange, <i>Leontodon taraxacoides</i> subsp. <i>taraxacoides</i> (Vill.) Mérat, <i>Linaria amethystea</i> (Lam.) Hoffmanns. & Link, <i>Muscari comosum</i> (L.) Mill., <i>Narcissus bulbocodium</i> subsp. <i>obesus</i> (Salisb.) Maire, <i>Ophrys lenae</i> M.R. Lowe & D. Tyteca, <i>Ophrys pintoii</i> M.R. Lowe & D. Tyteca, <i>Orchis anthropophora</i> (L.) All., <i>Ornithogalum orthophyllum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boiss.) Zahar., <i>Plantago afra</i> var. <i>afra</i> L., <i>Plantago bellardii</i> All., <i>Parentucellia latifolia</i> (L.) Caruel, <i>Parentucellia viscosa</i> (L.) Caruel, <i>Romulea bulbocodium</i> (L.) Sebast. & Mauri, <i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Scilla monophyllos</i> Link, <i>Senecio vulgaris</i> L., <i>Serapias strictiflora</i> Welw. ex Veiga, <i>Sideritis hirsuta</i> L., <i>Silene scabriflora</i> Brot., <i>Stachys arvensis</i> L., <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>syvestris</i> (Hoffmanns. & Link) Cout., <i>Tuberaria guttata</i> (L.) Fourr., <i>Tulipa sylvestris</i> subsp. <i>australis</i> (Link) Pamp., <i>Urginea maritima</i> (L.) Baker</p>	
P7	Sim	<p><i>Allium roseum</i> L., <i>Aira caryophyllea</i> L., <i>Anagallis arvensis</i> L., <i>Anagallis monelli</i> L., <i>Anemone palmata</i> L., <i>Anthyllis vulneraria</i> L., <i>Avenula sulcata</i> subsp. <i>occidentalis</i> (Gervais) Romero Zarco, <i>Arenaria conimbricensis</i> Brot., <i>Asterolinum linum-stellatum</i> (L.) Duby, <i>Avena barbata</i> Pott ex Link subsp. <i>barbata</i>, <i>Blackstonia perfoliata</i> (L.) Huds., <i>Briza maxima</i> L., <i>Bromus madritensis</i> L., <i>Centaurea pullata</i> L., <i>Crupina vulgaris</i> Cass., <i>Euphorbia exigua</i> L., <i>Euphorbia segetalis</i> var. <i>segetalis</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L., <i>Hypericum linariifolium</i> Vahl, <i>Hyacinthoides hispanica</i> (Mill.) Chouard ex Rothm., <i>Leontodon taraxacoides</i> subsp. <i>taraxacoides</i> (Vill.) Mérat, <i>Linaria amethystea</i> (Lam.) Hoffmanns. & Link, <i>Orchis anthropophora</i> (L.) All., <i>Ornithogalum orthophyllum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boiss.) Zahar.=(<i>Ornithogalum bourgareanum</i>), <i>Malva hispânica</i> L., <i>Narcissus bulbocodium</i> subsp. <i>obesus</i> (Salisb.) Maire,</p>

Pimpinella villosa Schousb., *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Quercus coccifera* L., *Ranunculus arvensis*, ***Rosmarinus officinalis* L.**, *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Trifolium campestre* Schreb., *Trifolium stellatum* L., ***Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout.**, *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker

Não *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Bellis perennis* L., *Briza maxima* L., *Centaurium maritimum* (L.) Fritsch, *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis* var. *segetalis* L., *Gagea lusitânica* A.Terracc., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Jonopsidium abulense* (Pau) Rothm., *Juncus capitatus* Weigel, *Koeleria crassipes* Lange, *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Orchis italica* Poir., *Orchis mascula* L., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar., *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, ***Rosmarinus officinalis* L.**, *Scilla monophyllos* Link, *Serapias parviflora* Parl., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, ***Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout.**, *Trifolium campestre* Schreb., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker

P8 Sim *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Bellis perennis* L., *Blackstonia perfoliata* (L.) Huds., *Briza maxima* L., *Centaurium maritimum* (L.) Fritsch, *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis* var. *segetalis* L.,

Gagea lusitânica A.Terracc., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Jonopsidium abulense* (Pau) Rothm., *Juncus capitatus* Weigel, *Koeleria crassipes* Lange, *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, ***Rosmarinus officinalis* L.**, *Scilla monophyllos* Link, *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Silene scabriflora* Brot, *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Trifolium campestre* Schreb., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker

Não *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Bellis perennis* L.
Briza maxima L., *Centaurium maritimum* (L.) Fritsch, *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L.
Erodium cicutarium (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L.
Euphorbia segetalis var. *segetalis* L., *Gagea lusitânica* A.Terracc., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Jonopsidium abulense* (Pau) Rothm., *Juncus capitatus* Weigel, *Koeleria crassipes* Lange, *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Orchis mascula* L., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, ***Rosmarinus officinalis* L.**, *Scilla monophyllos* Link, *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Trifolium campestre* Schreb., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker

P9 Sim *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria*

L., *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Briza maxima* L., *Bromus erectus* Huds., *Bromus madritensis* L., *Daphne gnidium* L., *Centranthus calcitrapae* (L.) Dufur., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Chaenorrhinum organifolium* (L.) Kostel. , *Conopodium marianum*, *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis* var. *segetalis* L., *Cistus salviifolius* L., *Gladiolus communis* L., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Linum trigynum* L., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Medicago mínima* (L.) L., *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Ononis cossoniana* Boiss. & Reut., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*, *Pistacia lentiscus* L., *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Quercus coccifera* L., ***Rosmarinus officinalis* L.**, *Sanguisorba verrucosa* (Link ex G.Don) Ces., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Silene gálica* L., *Sedum álbum* L., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Sideritis hirsuta* L., *Silene scabriflora* Brot., *Scorpiurus sulcatus* L., *Trifolium campestre* Schreb., ***Thymus zygis* subsp. *syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout.**, *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker, *Vicia sativa* L.

Não *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata* subsp. *occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Briza maxima* L., *Bromus erectus* Huds., *Bromus madritensis* L., *Daphne gnidium* L., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Euphorbia exigua* L., *Cistus salviifolius* L., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Linum trigynum* L., *Leontodon taraxacoides* subsp. *taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Ornithogalum orthophyllum* subsp. *baeticum* (Boiss.) Zahar.=(*Ornithogalum bourgareanum*), *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (Salisb.) Maire, *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii* All., *Plantago lagopus* L., *Quercus coccifera* L., ***Rosmarinus***

officinalis L., *Sideritis hirsuta* L., *Serapias strictiflora* Welw. ex Veiga, *Silene scabriflora* Brot., *Thymus zygis subsp. syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Urginea maritima* (L.) Baker

P10 Sim *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata subsp. occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Bellis perennis* L., *Briza maxima* L., *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis var. segetalis* L., *Gagea lusitânica* A.Terracc., *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex Rothm., *Jonopsidium abulense* (Pau) Rothm., *Juncus capitatus* Weigel, *Koeleria crassipes* Lange, *Leontodon taraxacoides subsp. taraxacoides* (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus bulbocodium subsp. obovatus* (Salisb.) Maire, *Ophrys lenae* M.R. Lowe & D. Tyteca, *Ophrys pintoii* M.R. Lowe & D. Tyteca, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Orchis mascula* L., *Ornithogalum orthophyllum subsp. baeticum* (Boiss.) Zahar. =(Ornithogalum bourgareanum), *Plantago afra var. afra* L., *Plantago bellardii* All., *Parentucellia latifolia* (L.) Caruel, *Parentucellia viscosa* (L.) Caruel, *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri, ***Rosmarinus officinalis* L.**, *Scilla monophyllos* Link, *Thymus zygis subsp. syvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout., *Trifolium campestre* Schreb., *Trifolium stellatum* L., *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., *Silene scabriflora* Brot., *Urginea maritima* (L.) Baker

Não *Allium roseum* L., *Aira caryophyllea* L., *Anagallis arvensis* L., *Anagallis monelli* L., *Anemone palmata* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Avenula sulcata subsp. occidentalis* (Gervais) Romero Zarco, *Arenaria conimbricensis* Brot., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Asterolinum linum-stellatum* (L.) Duby, *Avena barbata* Pott ex Link subsp. *barbata*, *Bellis perennis* L., *Briza maxima* L., *Cistus salviifolius* L., *Crupina vulgaris* Cass., *Dactylis glomerata* L., *Erodium cicutarium* (L.) L'Hér., *Euphorbia exigua* L., *Euphorbia segetalis var. segetalis* L., *Gagea lusitânica* A.Terracc., *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P.Delforge, *Hyacinthoides hispanica* (Mill.) Chouard ex

Rothm., *Jonopsidium abulense* (Pau) Rothm., *Juncus capitatus*
Weigel, *Koeleria crassipes* Lange, *Leontodon taraxacoides*
subsp. taraxacoides (Vill.) Mérat, *Linaria amethystea* (Lam.)
Hoffmanns. & Link, *Muscari comosum* (L.) Mill., *Narcissus*
bulbocodium subsp. obesus (Salisb.) Maire, *Ornithogalum*
orthophyllum subsp. baeticum (Boiss.) Zahar. =(Ornithogalum
bourgareanum), *Plantago afra* var. *afra* L., *Plantago bellardii*
All., *Parentucellia latifolia* (L.) Caruel, *Parentucellia viscosa*
(L.) Caruel, *Romulea bulbocodium* (L.) Sebast. & Mauri,
***Rosmarinus officinalis* L.**, *Scilla monophyllos* Link, *Thymus*
zygis subsp. syvestris (Hoffmanns. & Link) Cout., *Trifolium*
campestre Schreb., *Trifolium stellatum* L., *Tuberaria guttata*
(L.) Fourr., *Silene scabriflora* Brot., *Urginea maritima* (L.)
Baker

Anexo II – Dados referentes ao levantamento de espécies para as parcelas estudadas, com informações sobre a parcela, coordenadas geográficas, nº total de espécies observadas, presença ou ausência de pastoreio, espécie dominante, e nº de espécies e de indivíduos de Orchidaceae e *Orchis anthropophora* em particular.

Parcela	Coordenadas geográficas	Pastoreio	Total de espécies observadas	Espécie dominante	Orchidaceae		Orchis anthropophora		
					Nº de espécies	Nº total de indivíduos	Tamanho da população no pico da floração	Tamanho da população no pico da frutificação	Proporção de indivíduos reprodutores
P1	39.428106; -8.924635	Sim	59	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	3	30	13	2	0,15
		Não	39	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	0	0	0	0	-
P2	39.429538, -8.924359	Sim	54	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	4	23	4	1	0,25
		Não	46	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	2	9	2	0	0
P3	39.431293, -8.923990	Sim	45	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	2	48	13	3	0,23
		Não	41	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	2	10	0	0	-
P4	39.429041, -8.925870	Sim	44	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	3	18	7	5	0,71
		Não	41	<i>A. sulcata subsp. occidentalis</i> e <i>B. phoenicoides</i>	1	38	0	0	-

P5	39.430851, - 8.925619	Sim	54	<i>Quercus coccifera</i>	3	19	17	2	0,12
		Não	46	<i>Quercus coccifera</i>	0	0	0	0	-
P6	39.425731, - 8.926048	Sim	51	<i>Rosmarinus officinalis</i>	5	20	3	1	0,33
		Não	50	<i>Rosmarinus officinalis</i>	4	16	3	3	1
P7	39.429590, - 8.923280	Sim	42	<i>Thymus sylvestris e Rosmarinus officinalis</i>	4	10	1	1	1
		Não	36	<i>Thymus sylvestris e Rosmarinus officinalis</i>	3	17	3	1	0,33
P8	39.428439, - 8.923709	Sim	43	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	48	9	6	0,67
		Não	42	<i>Rosmarinus officinalis</i>	3	35	13	2	0,15
P9	39.429088, - 8.922202	Sim	54	<i>Thymus sylvestris e Rosmarinus officinalis</i>	1	32	0	0	-
		Não	38	<i>Thymus sylvestris e Rosmarinus officinalis</i>	2	5	3	3	1
P10	39.425353, - 8.924502	Sim	46	<i>Rosmarinus officinalis</i>	4	8	3	0	0
		Não	43	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1	1	0	0	-

Anexo III – Dados de sucesso reprodutivo (nº total de flores, nº de flores abertas, nº de frutos e produção de frutos. A produção de frutos foi calculada dividindo o nº de frutos pela diferença entre nº total de flores e nº de flores abertas) obtidos para os indivíduos de *Orchis anthropophora*. Informações sobre a parcela onde ocorreram, presença ou ausência de pastoreio e altura da planta são igualmente fornecidas.

Parcela	Pastoreio	Indivíduo	Altura da planta (cm)	Nº total de flores	Nº de flores abertas	Nº de frutos	Produção de frutos
P1	Sim	1	15,3	41	13	6	0,21
P1	Sim	2	18,1	49	0	7	0,14
P2	Sim	3	17,2	16	0	2	0,13
P3	Sim	4	11,1	19	0	0	-
P3	Sim	5	9,8	10	0	1	0,10
P3	Sim	6	19,5	33	0	10	0,30
P4	Sim	7	21,0	73	17	9	0,16
P4	Sim	8	10,5	32	0	2	0,06
P4	Sim	9	10,5	14	0	3	0,21
P4	Sim	10	8,5	10	0	3	0,30
P4	Sim	11	16,4	38	0	3	0,08
P5	Sim	12	21,7	65	12	16	0,30
P5	Sim	13	17,0	38	0	14	0,37
P6	Sim	14	14,2	37	0	15	0,41
P6	Sim	15	8,5	12	0	3	0,25
P6	Não	16	13,0	27	0	11	0,41
P6	Não	17	14,0	41	0	10	0,24
P6	Não	18	20,3	66	14	21	0,40
P7	Sim	19	17,2	22	0	2	0,09
P7	Não	20	14,5	37	0	10	0,27
P8	Sim	21	14,5	33	0	1	0,03
P8	Sim	22	6,5	10	0	1	0,10
P8	Sim	23	19,5	48	26	11	0,50
P8	Sim	24	10,6	24	9	3	0,20
P8	Sim	25	22,0	39	13	11	0,42
P8	Sim	26	13,4	29	3	3	0,12
P8	Não	27	10,7	29	0	13	0,45
P8	Não	28	10,5	28	0	3	0,11
P9	Não	29	15,3	48	5	28	0,65
P9	Não	30	13,5	30	0	16	0,53
P9	Não	31	13,2	28	7	8	0,38

