

ITALY. *Cruciferae-Brassicaceae*, 18: A. ENGLISH (ed.) *Das Pflanzenreich*. PLATE II  
*Sisymbrium officinalis* IV, 165, 1-200.

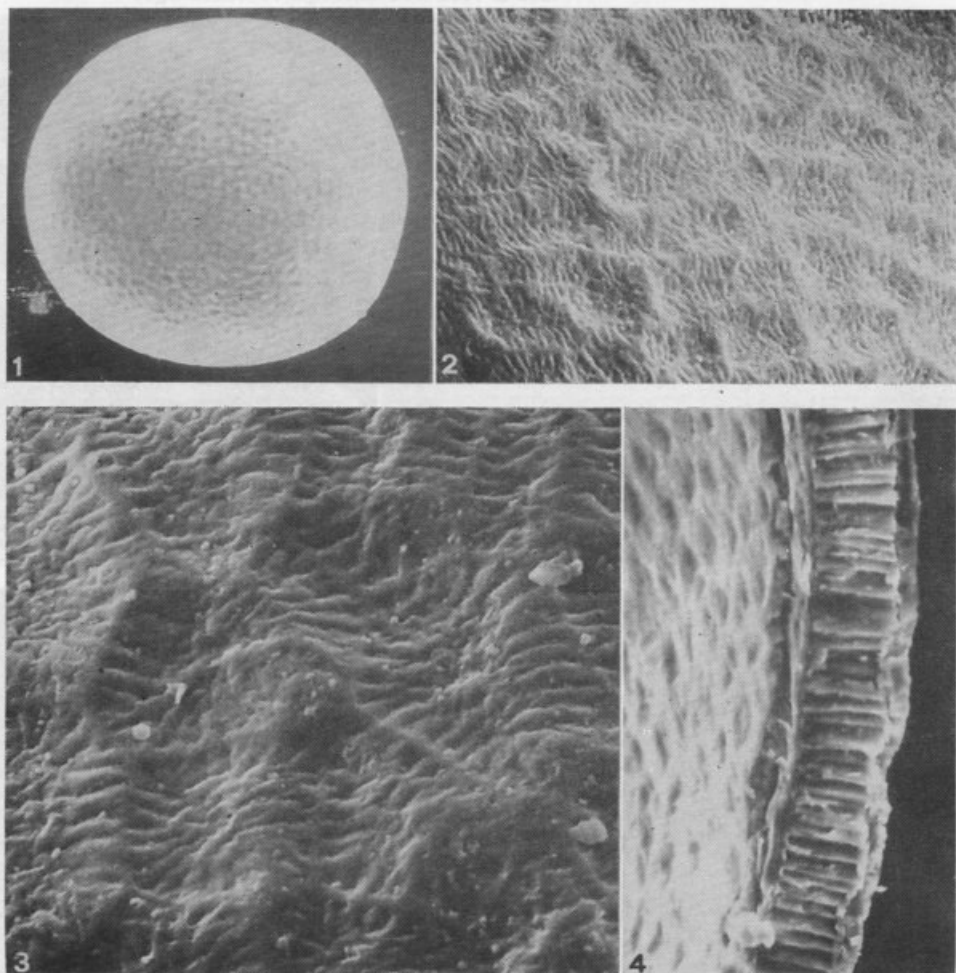
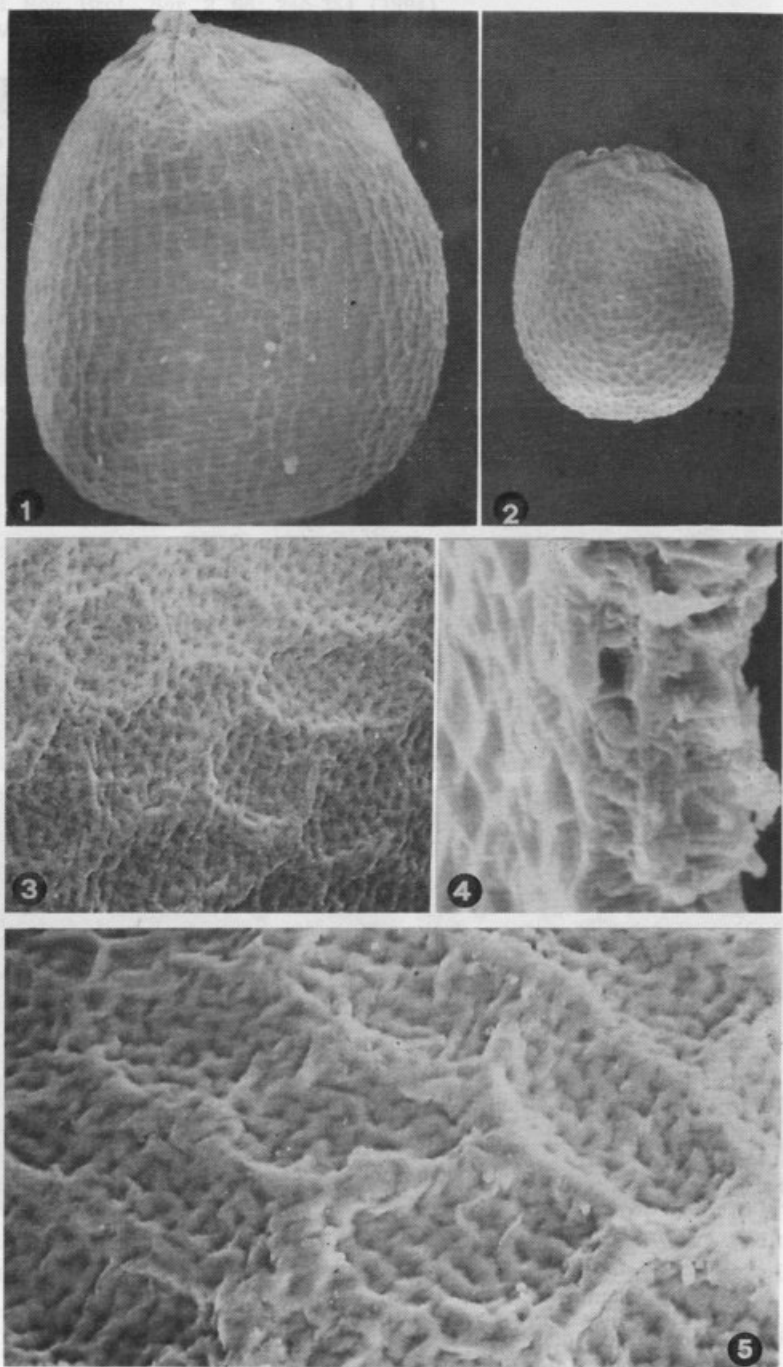


Fig. 1.—*S. arvensis*: whole seed ( $\times 35$ ). Figs. 2-3.—Ornamentation with folds which delimit barely distinguishable depressions ( $\times 250$ ;  $\times 500$ ).  
 Fig. 4.—Section ( $\times 300$ ).

Fig. 1.—*S. arvensis*: whole seed ( $\times 35$ ). Figs. 2-3.—Ornamentation with folds which delimit barely distinguishable depressions ( $\times 250$ ;  $\times 500$ ).  
 Fig. 4.—Section ( $\times 300$ ).



Figs. 1-2. — *S. pubescens*: whole seed ( $\times 75$ ;  $\times 35$ ). Figs. 3, 5. — Ornamentation reticulate with pits delimited by slightly raised walls  $< 1 \mu\text{m}$  thin ( $\times 250$ ;  $\times 500$ ). Fig. 4. — Section ( $\times 1200$ ).

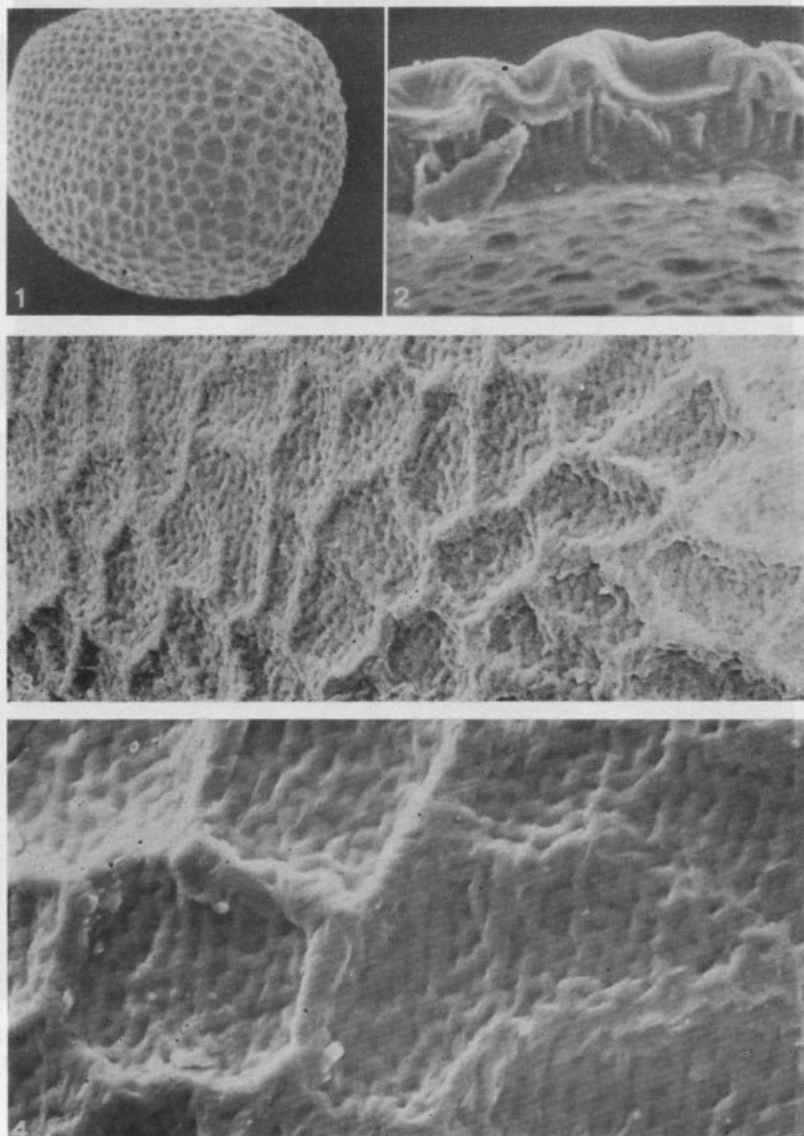


Fig. 1.— *B. nigra*: whole seed ( $\times 35$ ). Fig. 2.— Section ( $\times 300$ ).  
 Figs. 3-4.— Ornamentation reticulate with pits delimited  
 by prominent walls  $1-2\mu\text{m}$  thick ( $\times 250$ ;  $\times 500$ ).

Fig. 1.— *B. nigra*: whole seed ( $\times 35$ ). Fig. 2.— Section ( $\times 300$ ).  
 Figs. 3-4.— Ornamentation reticulate with pits delimited by prominent walls  $1-2\mu\text{m}$  thick ( $\times 250$ ;  $\times 500$ ).

## ESTUDO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO DE *TRICHODERMA KONINGII* OUDESMAN

### INDUÇÃO POR SOLKA-FLOC

NATÉRCIA TEIXEIRA RODEIA \*

Departamento de Biologia Vegetal, Bloco C2, 4.º piso, Faculdade de Ciências  
da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1700 Lisboa

Recebido em 28-1-1994.

#### SUMMARY-ABSTRACT

1. Cell-free culture filtrates from *Trichoderma koningii* were concentrated with ammonium sulphate 85 % saturation. 2. Fraccionation of concentrated samples by chromatography on Ultrogel AcA44 separated high-molecular-weight components ( $\beta$ -glucosidases, endoglucanases and celobiohydrolase I) from low-molecular-weight samples (endoglucanase I, xylanases). 3. Further chromatography of the high molecular-weight samples on DEAE-Sephrose separated one component, celobiohydrolase I (CBH I) from endo-1,4- $\beta$ -glucanases (endoglucanases or carboxymethylcellulases). 4. The endoglucanase components were further fractionated on PBE 94 into fractions containing carboxymethylcellulase and Avicelase activities (endoglucanases II, III, IV, V and celobiohydrolase II).

#### OBJECTIVO DO TRABALHO

Este trabalho teve como objectivo separar numa forma altamente purificada, um número elevado de enzimas de origem fúngica que degradem celulose e xilano, de modo a identificar aquelas enzimas que efectuam alterações desejáveis nas propriedades de desperdício do polpa de papel ou em papel para reciclar. Pretendia-se, pois, identificar no extracto extracelular de *T. koningii*

\* Parte deste resultados foram apresentados no 9.º Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Bioquímica, de 5-8 de Dezembro de 1993, em Albufeira, Portugal.

entre as enzimas induzidas por diferentes fontes de carbono (testámos inicialmente celulose Whatman, celulose Avicel nas concentrações de 1, 3, 6 %) e a diferentes temperaturas, as específicas que produzissem o efeito de melhoramento e que simultaneamente oferecessem a possibilidade de se reciclar um maior número de vezes polpa de papel de proveniências diferentes (de folhosas como por exemplo de eucalipto ou de resinosas como de pinheiro).

## INTRODUÇÃO

### Porque é que as celulasas e as xilanases são estudadas?

Um número de exemplos específicos pode ser citado de como as celulasas e xilanases microbianas podem ser exploradas em processos agrícolas e industriais; assim entre mais algumas utilizações, passamos a enunciar as seguintes:

(i) Pré-tratamento de resíduos de culturas vegetais e de outra biomassa celulósica com celulasas e xilanases para melhorar a qualidade nutricional e a digestibilidade dos alimentos para ruminantes ou para facilitar a compostagem.

(ii) Adição de celulasas e de xilanases a rações (com base em cereais) para porcos e para galináceos, para elicitar um aumento significativo na utilização de nutrientes, através da hidrólise de  $\beta$ -glucano de cevada e de arabinoxilanos.

(iii) Melhoramento do processo de ensilagem pela introdução de capacidade celulolítica em bactérias ensiladas e pré-tratamento de forragens ensiladas por celulasas e hemicelulasas.

(iv) Sacarificação enzimática de desperdícios agrícolas, industriais ou municipais para produção de xaropes de açúcar para consumo humano ou animal ou para a produção de produtos de química fina através de fermentações industriais.

(v) Pré-tratamento de polpa de papel por xilanases para remover o xilano enquanto se preserva o teor celulósico e reduzir a dependência de cloro no processo de branqueamento e de melhoramento da qualidade do papel.

(vi) Digestão enzimática de desperdícios industriais como alternativa aos depósitos de lixo.

(vii) Uso de xilanases como um produto para melhorar a farinha para produtos de panificação.

### O complexo celulolítico (Wood & Bhat, 1988)

As celulases extracelulares de certos microrganismos celulolíticos são sistemas multicompostos compreendendo endo-(1,4)- $\beta$ -glucanase [(1,4)- $\beta$ -D-glucano glucano hidrolase, EC 3.2.1.4], exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanase [(1,4)- $\beta$ -D-glucano celobio hidrolase EC 3.2.1.91] e  $\beta$ -D-glucosidase [celobiase ou  $\beta$ -D-glucósido gluco hidrolase, EC 3.2.1.21], podendo a actividade de cada enzima existir em múltiplas formas. Tais enzimas e suas isoformas são diferenciadas, geralmente, na base da sua especificidade para o substrato e no seu modo de acção sobre uma grande variedade de substratos celulósicos.

**Endo-1,4- $\beta$ -glucanases** — Estas enzimas hidrolizam, ao acaso, cadeias de celulose produzindo uma rápida alteração no grau de polimerização do referido polímero. Os substratos para tais enzimas são carboximetilcelulose (CMC), celulose inchada pelo ácido orto-fosfórico (segundo o método de WALSETH, 1952, e designada como  $H_3PO_4^-$ ) ou celulose amorfa inchada por processo alcalino (álcalis celulose). A celulose cristalina, tal como fibras de algodão ou a celulose Avicel, não é atacada em extensão significativa por estas enzimas. Por hidrólise de celulose amorfa libertam-se glucose, celobiose e outros oligossacáridos solúveis.

**Exo-1,4- $\beta$ -glucanases** — Tais enzimas removem glucose ou celobiose da extremidade não redutora da cadeia de celulose. As celobio hidrolases (CBH) são as enzimas mais comuns deste grupo. A maior parte das CBH parece libertar pequenas quantidades de glucose a partir de celulose. Não atacam algodão mas a celulose  $H_3PO_4^-$  é hidrolizada, caracteristicamente, com uma lenta perda no grau de polimerização. A CMC e a celobiose não são substratos para tais enzimas. A celulose Avicel é um substrato que tem sido provado ser útil para isolar e medir a actividade de celobio-hidrolases.

**$\beta$ -glucosidases** — Estas enzimas não são celulases no sentido estricto do termo mas são componentes muito importantes do sistema celulolítico porque completam a hidrólise para glucose a partir de celo-oligossacáridos de cadeia curta e de celobiose, compostos que são libertados pelas outras enzimas. Os sistemas celulásicos que contêm baixos níveis de  $\beta$ -glucosidase têm pobre

poder sacarificante porque as endoglucanases e as celobio hidrolases são inibidas pela celobiose.

As  $\beta$ -glucosidases hidrolizam celo-oligossacáridos numa taxa que diminui com o aumento do grau de polimerização, mas não atacam celulose.

**Endo-1,4- $\beta$ -glucanases usando como substrato carboximetilcelulose** — A carboximetilcelulose (CMC) não é um substrato natural, é um derivado da celulose, largamente usado para ensaios de actividade celulásica mas o ataque deste derivado da celulose, solúvel e completamente hidratado, não pode ser interpretado como indício de que o mesmo sistema enzimático será capaz de atacar celulose cristalina. A actividade sobre CMC pode ser determinada medindo o aumento do poder redutor de uma solução ou a perda de viscosidade dessa mesma solução. Estrictamente falando estes métodos não podem ser sempre olhados como alternativos. Na enzima que produz, apenas, uma ou duas clivagens em locais distantes da extremidade da cadeia de CMC produzirá uma grande modificação na viscosidade da solução (parâmetro relacionado com o comprimento da cadeia). Pelo contrário, uma enzima que ataque a extremidade da cadeia de CMC produzindo pouca alteração na viscosidade da solução por unidade de enzima, no entanto aumenta o poder redutor.

Há uma multiplicidade de endo-1,4- $\beta$ -glucanases nos filtrados culturais da maior parte das culturas de fungos e de bactérias (WOOD *et al.*, 1988) e elas variam no seu modo de ataque à CMC. É claro que, em certas circunstâncias, o uso de apenas um tipo de doseamento pode levar a conclusões erradas. Devem avaliar-se ambas as actuações — perda de viscosidade e produção de açúcares redutores para determinar actividade carboximetilcelulásica.

#### **O complexo hemicelulolítico (Gilbert & Hazlewood, 1993)**

O xilano é o principal componente da hemicelulose da parede celular na maior parte das espécies vegetais. É um polissacárido complexo compreendendo uma estrutura de resíduos de xilose ( $\beta$ -1,4-D-xilopiranosose) ligados por pontes  $\beta$ -1,4-glucosídicas.

Consoante a fonte, as unidades de xilopiranosido são substituídas por resíduos acetil, L-arabinosil e glucuronosil (ácido 4-o-metil-D-glucurónico que é ligado glucosidicamente à estrutura do

polissacárido) e pelos ácidos ferúlico, p-cumárico e acético que estão ligados por ligações éster.

O xilano de folhas é tipicamente o-acetil-4-o-metilglucuronoxilano com aproximadamente 10 % das ligações  $\alpha$ -1,2 de unidades de xilose unidas a cadeias laterais do ácido 4-o-metilglucurónico e 70 % de resíduos de xilose são acetilados nas posições C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>. O xilano de resinosas é comumente arabinoxilano em que 10 % das unidades de xilose são substituídas por resíduos arabinofuranose nas ligações  $\alpha$ -2,3.

Enzimas microbianas actuam co-operativamente convertendo o xilano em açúcares simples (seus constituintes); tais enzimas incluem:

**Endo -1,4- $\beta$ -xilanasas** (xilanasas; EC 3.2.1.8), que quebram ligações glucosídicas internas dentro da estrutura do xilano, contribuindo para a formação de oligossacáridos de várias dimensões.

**L-arabinofuranosidase** (EC 3.2.1.55) que hidroliza as cadeias laterais de arabinose.

**Acetil esterases, ferúlico e p-cumárico ácido esterases**, enzimas que têm a capacidade de separar os substituintes da cadeia de xilano.

**$\alpha$ -D-glucuronidase** que remove cadeias laterais de ácido glucurónico das unidades de xilose.

**Xilano esterases** (EC 3.1.1.6) que libertam grupos acetato e finalmente

**$\beta$ -Xilosidase** (EC 3.2.1.37) que hidroliza xilobiose a xilose (ou xiloligómeros gerados por outras enzimas). Há, igualmente, um grau considerável de sinergismo entre estas enzimas tal como acontece no complexo celulolítico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### A — MATERIAL

A cultura de *T. koningii* Oudesman (I. M. I. 73022) foi obtida do Instituto Micológico Commonwealth, Kew, Surrey, pelo laboratório do Dr. Thomas Wood do Rowett Research Institute, Aberdeen, Esócia, Reino Unido (onde realizámos este trabalho durante 10 meses, no uso de uma licença sabática.



## Equipamento

Algumas das culturas, em ensaios prévios ou para preparação de inóculo para o fermentador, foram colocadas num agitador orbital, programado para os 36° C e 150 rpm.

Usámos um fermentador New Brunswick Scientific, New Brunswick N. J. (Microgen SF-16) com a capacidade de 16 l, com controlo automático de temperatura, pH, arejamento e agitação; um potenciómetro Phillips para avaliação do pH; várias centrífugas — uma MSE de bancada, basculante, uma MSE, High Speed 25, da Measuring and Scientific Equipment Limited, London, S.W.1, England; uma Mistral 6L-MSE e uma centrífuga Sorvall. Em certas separações cromatográficas recorreremos a aparelhos HPLC (high performance liquid chromatography) ou FPLC (fast protein liquid chromatography) da Pharmacia ou da LKB. Colectores de fracções ligados a um monitor de ultravioleta, a um sistema multirack e a um sistema de registo de gráficos em função da detecção de resíduos de fenilalanina ou triptofano pelo sistema U. V. a 280 nm.

Algumas das colunas de cromatografia líquida foram obtidas da Pharmacia Fine Chemicals (Grã-Bretanha, Ltd, Londres, W. 13, Reino Unido). As resinas Ultrogel AcA44 (obtida da LKB Produkter AB S-16125 Bromma, Sweden), DEAE Sefarose, Fenil superose e Biogel P6/DG ou P2 foram adquiridas à Bio-Rad, Pharmacia ou à LKB Instruments e preparadas no laboratório referenciado.

As colunas Mono P, Mono S, PBE 94 foram adquiridas na Pharmacia LKB, Biotechnology AR, Upsalla, Sweden.

## Produtos químicos

Usou-se agar n.º 3 da Oxoid (Oxoid Division of Ox Ltd, Londres, W. 1, Reino Unido), a carboximetilcelulose na forma de sal sódico Cellofas B, ICI, Nobre Division, o ortonitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, o xilano de brácteas de aveia e a albumina de soro de feto bovino foram obtidos da Sigma. A celulose Avicel pH 101 é, essencialmente, um agregado de microcristais sendo preparada a partir de celulose de madeira por tratamento ácido, para remoção da componente amorfa e sendo, posteriormente, sujeita a trituração que fragmenta os cristalitos em partículas coloidais e os leva a coalescer. Tween 80 (polyoxiethylen sorbitan

monooleat) da Sigma, Solka Floc cellulose BW-40, reagente de Lowry (Folin-Ciocalteu) da Merck, anti-espuma (emulsão A, Sigma nº A 5758) reagentes para doseamento proteico (método do ácido bissinconínico = BCA, na forma de sal sódico, solúvel em água, nº 23225, Pierce, Illinois, U. S. A.). Todos os restantes produtos químicos usados, quer para preparar o meio de cultura, tampões, soluções ou reagentes eram da Analar ou da BDH sendo sempre de elevado grau analítico. Os anticorpos monoclonais e policlonais foram amavelmente cedidos pelo Dr. KUBICEK da Universidade de Viena de Áustria. Os marcadores de peso molecular usados como padrão nas electroforeses foram obtidos na Amersham, Life Science. Os restantes produtos usados para a execução de electroforese eram da National diagnostics, Kennedy, Manville, Bucks, England.

## B — MÉTODOS

### I — Manutenção e crescimento do organismo

O micélio e os esporos de *T. koningii* foram mantidos por subcultura em frascos de MacCartney em «slants» de batata dextrose e agar ou em malte agar. As culturas foram postas a crescer em estufa a 32° C e depois eram mantidas no laboratório à temperatura ambiente. Para proceder à inoculação de meio líquido (MANDELS & WEBER, 1969) seleccionaram-se culturas com crescimento celular espesso e produzindo cerca de  $10^5$  a  $10^7$  esporos/ml quando suspensos em água adicionada de cloreto de sódio (0,85 %) para se obter melhor dispersão e contagem em hemacitómetro de Neubauer.

### II — Preparação de inóculo para o fermentador

Em primeira instância realizaram-se culturas em balões identados, de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura líquido (MANDELS & WEBER, 1969) usando o micélio e os esporos contidos num frasco de MacCartney para inocular cada balão. Prepararam-se, assim, 10 balões (1 l de cultura no total) que foram incubados a 36° C, durante 6 dias, em agitador orbital (150 rpm).

### III — Inoculação do fermentador

Prepararam-se 11 l de meio de cultura de MANDELS & WEBER (1969) que foram adicionados de 0,2 % de um surfactante (Tween



80), de 1% de Solka-floc e de 0,2% de proteose peptona como fonte de carbono e de energia. Após esterilização do meio de cultura e de todos os componentes do fermentador procedeu-se à inoculação por adição, do litro da cultura de *T. koningii* previamente incubada, aos 11 l de meio de cultura estéril.

Os 12 l de cultura assim obtidos foram incubados a 36° C, durante 8 dias, com 150 rpm de agitação, com controlo automático de pH (entre 5,0 e 3,5 por adição de HCl, 2N ou de água adicionada de amónia — soluções estéreis), arejamento, temperatura, adição de anti-espuma e foram sempre mantidos em condições de esterilidade.

#### IV — Preparação das celulasas e xilanases

Concluída a incubação, parou-se o crescimento desligando-se o fermentador e o meio de cultura foi filtrado (12 l) através de gaze de algodão ficando o filtrado isento de micélio e de esporos de *Trichoderma koningii*. O filtrado cultural foi centrifugado durante 20 min a 13 000 rpm, a 0° C. As proteínas contidas no sobrenadante foram seguidamente concentradas por precipitação com sulfato de amónio sólido, 85% de saturação, com agitação magnética, até completa dissolução do sal, e efectuada a 0° C. A suspensão foi agitada pelo menos durante mais 1 h para se assegurar o equilíbrio antes que o precipitado fosse recuperado por centrifugação. Procedeu-se, então, a nova centrifugação da solução precipitada, a 25 000 rpm durante 20 min a 0° C. O sedimento foi recuperado por ressuspensão em tampão acetato de amónio 0,01 M, pH 5,0 (concentração aproximadamente de 30 vezes — 11 440 ml de meio de cultura obtendo-se, posteriormente, 381 ml de ressuspensão de extracto enzimático). A solução assim recuperada foi adicionada de 0,02% de azida de sódio para completa preservação de contaminação bacteriana.

#### V — Métodos de ensaio — Doseamentos

a) — **Doseamento do teor proteico** — A proteína foi estimada por diferentes métodos: 1) Por absorbância a 280 nm e obtenção de registo dos respectivos espectros; 2) Por medição das distâncias dos gráficos à linha de base e por comparação com uma curva padrão de albumina de soro de feto bovino (BSA), foi estabelecida a correspondência entre  $\mu\text{g}$  de proteína e a altura em mm;

3) Pelo método de LOWRY *et al.*, 1951; 4) Pelo método do BCA (ácido bissinconínico da Pierce — por vezes recorremos a este método dados os reagentes utilizados no método de LOWRY *et al.* darem interferência com certos tampões de eluição, nomeadamente com o «polybuffer 74»).

Nos métodos espectrofotométricos usámos sempre, albumina cristalina de soro de feto bovino para construir as curvas padrão.

b) — **Doseamento da actividade  $\beta$ -glucosidásica** — Este ensaio foi realizado seguindo o método descrito por WOOD & BHAT (1988), definindo-se uma unidade de actividade enzimática como a quantidade de enzima necessária para libertar 1  $\mu$ mole de o-nitrofenol por acção sobre o-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (a  $\beta$ -glucosidase ou celobiase promove a libertação de o-nitrofenol a partir daquele composto, que é possível quantificar por interpolação de uma recta padrão). Dado que este trabalho não tinha por objectivo isolar ou purificar estas enzimas, nem sempre procedemos ao seu doseamento nas múltiplas amostras que obtivemos.

c) — **Doseamento da actividade endoglucanásica (carboximetilcelulásica ou CMCásica)** — O doseamento de endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase envolveu a estimativa de açúcares redutores libertados por acção de amostras enzimáticas sobre uma solução de carboximetilcelulose (CMC; estas são as únicas enzimas que podem hidrolizar significativamente CMC, WOOD & McCRAE, 1986). O substrato é uma solução de CMC 1% em tampão. O ensaio é realizado adicionando 1 ml de substrato (ou de tampão nos brancos), 0,5 ml de tampão (0,2 N acetato de sódio/ácido acético pH 5,4) e 0,5 ml de amostra enzimática (diluída sempre que necessário) num volume total de 2 ml. Os tubos contendo substrato, tampão e água são pré-incubados durante 10 min a 50° C. Então, adiciona-se a solução enzimática, agita-se num vortex e incuba-se a 50° C por mais 15 min. Pára-se a reacção por adição de 2 ml de reagente de Somogyi (1952) e segue-se a metodologia de NELSON (1944) de acordo com a descrição de WOOD & BHAT (1988). É avaliada a D. O. a 520 nm para calcular o teor de açúcares redutores libertados. O cálculo das unidades internacionais é feito do seguinte modo: Peso molecular de glucose é 180 g, 1  $\mu$ mole de glucose corresponde a 180  $\mu$ g, portanto a conversão de D. O. em açúcares redutores é estabelecida através da interpolação de uma recta padrão

construída com glucose (obtivemos um factor de conversão de 217,69). Uma vez calculados os  $\mu\text{g}$  em equivalentes de glucose multiplica-se pelos factores 5,551, por  $10^{-3}$  e divide-se pelo tempo de incubação — 15 min. Uma unidade internacional de enzima corresponde à quantidade de enzima que promove a libertação de 1  $\mu\text{mole}$  de açúcar redutor (equivalente em glucose) por min, a partir do substrato, nas condições de ensaio.

d) — **Doseamento da actividade xilanásica** — A actividade xilanásica é medida usando como substrato uma solução a 1% de xilano em tampão 250 mM, NaOH:ácido acético, pH 5,0 mantida a 4° C e agitada magneticamente sempre que é usada. Os doseamentos foram efectuados adicionando 1 ml de substrato (ou tampão nos brancos), 1 ml de amostra (diluída sempre que necessário) perfazendo um volume total de 2 ml. Os tubos contendo substrato, tampão e água são pré-incubados durante 5 min a 50° C. Adiciona-se, então, a amostra enzimática e levam-se os tubos, novamente, a incubar por mais 15 min, à mesma temperatura. Findo o período de incubação aplica-se o método de doseamento de açúcares redutores de NELSON (1944), SOMOGYI (1952) como descritos por WOOD & BHAT (1988) para avaliação da actividade CMCase. Centrifugam-se as amostras durante 2 min a 2000 rpm, em centrífuga basculante e lê-se a D. O. a 520 nm em espectrofotómetro. Faz-se a conversão dos valores de absorbância em  $\mu\text{g}$  de açúcares redutores, por interpolação de uma recta padrão, construída para o efeito com diferentes concentrações conhecidas de xilose. Obtivemos um factor de conversão de 195 e calculámos as unidades internacionais partindo do conhecimento de que o peso molecular de xilose é 150,13 g, de que 1  $\mu\text{mole}$  de xilose equivale a 150,13  $\mu\text{g}$ . Calculam-se os  $\mu\text{g}$  de açúcares redutores por conversão dos valores de D. O. e multiplicam-se por 6,661, por  $10^{-3}$  e divide-se pelo tempo de incubação — 15 min. Uma unidade de enzima é, pois, definida como a quantidade necessária de enzima necessária para libertar do substrato 1  $\mu\text{mole}$  de equivalente de xilose, por min, nas condições de ensaio.

e) — **Doseamento da actividade celobio-hidrolásica (Avicelase)** — Não há nenhum substrato específico para a celobio-hidrolase (CBH), no entanto, a actividade da enzima purificada pode ser medida usando celulose Avicel. Na verdade a avicelase é

olhada comumente como sendo sinónimo de CBH. Na realidade tem sido afirmado que a CBH é a única enzima que actuando, isoladamente, liberta uma quantidade significativa de açúcares redutores de celulose Avicel. Esta é melhor substrato do que fibra de algodão para medir actividade celobio-hidrolásica, pois tem um grau de polimerização baixo (cerca de 200) e tem muito mais grupos terminais não redutores que podem ser atacados pela enzima que actua na extremidade das fibras de uma forma terminal — retirando-lhes unidades de glucose ou de celobiose. Portanto, a celulose Avicel é, frequentemente, usada como substrato para as CBH (WOOD & McCRAE, 1986) embora sendo, também, atacada em alguma extensão por outras componentes celulásicas (nomeadamente endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases hidrolizam tal substrato numa extensão limitada). A pesquisa da actividade desta componente do complexo celulásico foi levada a efeito de acordo com o método descrito por WOOD & McCRAE (1986) com algumas alterações. Assim, adicionámos 2 ml de uma suspensão de celulose Avicel pH 101,1% em tampão acetato de sódio 0,2N, pH 5,0, a 1 ml de uma mistura de 0,9 ml de água destilada e 0,1 ml de amostra enzimática. Seguiu-se incubação a 50° C durante 18 h, findas as quais se removeram os tubos do banho de água quente, se agitaram num vortex e se centrifugaram durante 2 min, a 2000 rpm em centrífuga basculante. Após a centrifugação pipetaram-se 2 mls da solução assim preparada e nela se dosearam os açúcares redutores libertados, pelos métodos referidos de NELSON (1944), SOMOGYI (1952). O cálculo da actividade enzimática foi efectuado por conversão da D. O. em  $\mu\text{g}$  de açúcares redutores (para glucose 1  $\mu\text{mole}$  = 180,16  $\mu\text{g}$ , portanto 1  $\mu\text{g}$  =  $5,551 \times 10^{-3}$   $\mu\text{moles}$ ), multiplicado pelo mesmo factor que o da CMCCase, por 3/2 (factor de diluição — usámos 2 dos 3 ml que incubámos) por  $10^{-3}$ , dividido pelo tempo de incubação — 1080 min — e vem expresso em  $\mu\text{moles}/\text{min ml}$ .

## VI — Separação e purificação do sistema enzimático

Este processo foi efectuado recorrendo a cromatografia líquida, usando diversos géis e condições, nomeadamente, com cromatofocagem, permuta iónica, cromatografia líquida de alta eficiência em HPLC, ou com separação rápida de proteínas em FPLC.

Tais cromatografias ocorreram à temperatura ambiente e as fracções foram colhidas com colectores de fracções multitrack, acoplados a um sistema de detecção de proteínas com uma fonte de ultravioleta (absorbância a 280 nm) e a um sistema de registo gráfico do perfil proteico correspondente a cada fracção colectada. As tentativas de separação e purificação enzimática foram processadas em vários passos. Após cada separação cromatográfica as fracções recuperadas foram, sempre, conservadas a 4° C até serem feitos os doseamentos.

Para proceder à separação de endo-1,4- $\beta$ -glucanases de alto peso molecular de outras enzimas de baixo peso molecular, inclusivé xilanases, optámos pelo fraccionamento da amostra concentrada por precipitação através de Ultrogel AcA 44.

#### *Passo 1 — Cromatografia em coluna de Ultrogel AcA 44*

Preparou-se uma coluna de perspex da LKB Instruments (Bromma, Suécia) com 5  $\times$  87,5 cm e encheu-se com Ultrogel AcA 44 suspenso em tampão acetato de amónio 0,01 M, pH 5,0, que ficou a equilibrar e compactar durante cerca de um dia. A coluna foi conectada a uma bomba peristáltica que fazia entrar o tampão de eluição (o mesmo do que o de equilíbrio) à taxa de 50 ml/h (200 gotas/tubo) sendo o «void» volume de 579 ml e o «ve» de 1666 ml.

Foram, então, usadas fracções de 40 mls (por vezes previamente concentradas por um sistema Amicon de ultrafiltração, sob pressão de azoto, 50 psi, usando uma membrana com capacidade de retenção de moléculas com peso molecular superior a 10 000 Da) da solução previamente concentrada por precipitação com 85 % de saturação de sulfato de amónio. Recolheram-se cerca de 250 tubos (contendo 12 ml cada um) de cada vez que se aplicou amostra (o total foi aplicado por 7 vezes) tendo sido feita a eluição com tampão acetato de amónio, 0,01 M pH 5,0. A 4.<sup>a</sup> e 5.<sup>a</sup> aplicações foram efectuadas usando, igualmente, um volume de 40 ml (volume máximo possível de aplicar nesta coluna) da mesma solução enzimática mas após concentração de 80 e 90 ml respectivamente para aquele volume, através de uma célula de ultrafiltração da Amicon (com o mesmo tipo de filtro já referido e à mesma pressão de azoto).

As fracções foram sempre analisadas quanto a teor proteico a 750 nm pelo método de LOWRY *et al.* (1951), actividade xilanásica,  $\beta$ -glucosidásica, carboximetilcelulásica e avicelásica segundo os métodos anteriormente descritos (WOOD & BHAT, 1988, com as alterações referidas). Em alguns casos pesquisámos, também, a presença de proteases ou de inibidores proteicos. Em cada passo foram sempre calculadas as % de recuperação de cada uma das componentes do sistema celulásico e de proteína.

No capítulo resultados, representamos a título de exemplo uma figura apenas correspondente a cada uma das separações cromatográficas efectuadas.

As fracções colhidas com alto peso molecular (Endoglucanases II, III, IV, V e celobio-hidrolases I e II), de uma maneira geral, nas 7 separações efectuadas, ficavam contidas nos tubos 80-130 cujos volumes foram adicionados e constituíram um lote e as de baixo peso molecular (contêm Endoglucanase I e xilanases) saíam de um modo geral entre os tubos 137 e 172, sendo igualmente o conteúdo de tais tubos adicionado e constituíram outro lote.

As fracções de alto peso molecular contribuíam, em média, para a obtenção de um volume de cerca de 540 ml (em cada uma das separações) que foi liofilizado. O resíduo foi ressuspenso (num volume que não excedia 25 ml) em tampão NaOH/ácido acético de força iónica  $\mu = 0,1$ , pH 5,0 e as fracções parciais foram sendo congeladas até se atingir o fim da separação.

Constituíram-se, assim, dois lotes, um com os conteúdos da 1.<sup>a</sup>, 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> separações através de Ultrogel e o outro com os das 4.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup> e 6.<sup>a</sup> separações, que vieram a ser fraccionados posteriormente em coluna de DEAE-Sefarose.

As fracções de baixo peso molecular, que contribuíam, de um modo geral, com um volume de 280 ml após cada aplicação, foram sendo precipitadas de novo com sulfato de amónio 90 % saturação (com adição lenta, a 0° C e sob agitação magnética constante, que continuou até 1 h após a total dissolução do sal). Inicialmente recuperou-se toda a proteína por centrifugação durante 20 min a 25 000 rpm a 0° C (a partir da 3.<sup>a</sup> separação, passámos a filtrar as amostras à trompa, usando filtros de vidro sinterizado, uma vez que a presença de Tween 80 durante a cultura, contribuía para a formação de uma fina película à superfície do sobrenadante, pelo que se perdia mais proteína durante a centrifugação).



A recuperação proteica foi feita usando tampão acetato de amónio, pH 5,0, 0,01M, não se excedendo, em cada separação, o volume de 25 ml. Cada uma destas fracções era, posteriormente, agitada magneticamente em câmara fria durante 30 min. No fim de todas as amostras recuperadas, precipitadas e ressuspensas foram combinadas e congeladas aguardando estudo posterior.

*Passo 2 — Cromatografia de permuta iónica — coluna de DEAE-Sefarose CL-6B*

Dadas as características desta resina, as endoglucanases e a celobio-hidrolase II são eluídas nos primeiros tubos, ficando a celobio-hidrolase I adsorvida à coluna, sendo, apenas, possível eluí-la depois de estabelecermos um gradiente de pH. Sabe-se que as  $\beta$ -glucosidases saem também nos primeiros tubos da fracção de alto peso molecular separada em Ultrogel AcA 44. No entanto, como espécies de *Trichoderma*, infelizmente, são fracas sintetizadoras de  $\beta$ -glucosidases (WOOD & McCRAE, 1982, purificaram e caracterizaram  $\beta$ -glucosidase I e II de *T. koningii*) e não estávamos interessados, neste trabalho, em purificá-las, deixámos de proceder ao seu doseamento.

Para proceder à separação enzimática preencheu-se uma coluna de perspex com  $2,5 \times 33,5$  cm, com DEAE-Sefarose na forma de acetato, equilibrada e eluída com tampão acetato de amónio, pH 5,0, força iónica  $\mu = 0,1$ . Aplicou-se amostra por duas vezes (tendo sido reduzido o volume inicial de 75 para 28 ml recorrendo mais uma vez à célula de ultrafiltração Amicon). A bomba peristáltica operou com um fluxo de 20 ml/h (1 gota/9 s, eluição de 160 ou 200 gotas/tubo, 30 min/tubo, 10 ml/tubo). Quando se verificava através do gráfico que não saía mais amostra (após o tubo n.º 55 na 1.ª aplicação ou o 106 na 2.ª aplicação) preparou-se um gradiente de pH com soluções tampão acetato de amónio de pH 5,0 e de pH 3,8 e com a mesma força iónica (o sistema para efectuar o gradiente consistia em dois copos graduados de igual volume contendo 500 ml de tampão num deles pH 5,0 e no outro pH 3,8; os copos foram conectados através de um tubo de vidro dobrado em U a servir de sifão; o tampão no copo de mistura foi agitado magneticamente, obtendo-se, assim, um gradiente linear que ficou sujeito à força da gravidade com um fluxo de 1 gota/9 segundos). De cada vez recolheram-se amostras em 160 tubos, cada um contendo 10 mls de solução;

as fracções que constituíram o 1.º pico (na 1.ª aplicação entre os tubos 8 e 32 e na 2.ª entre os tubos 8 e 44, contribuíram para os volumes de 195 ou 265 ml respectivamente) foram combinadas e precipitadas por 85 % de saturação de sulfato de amónio, procedendo-se de igual modo com as fracções do 2.º pico (entre os tubos 60-92, perfazendo um volume de 310 ml, que foi congelado para estudo posterior) e do 3.º pico (na 2.ª aplicação formaram-se 3 picos; o 3.º entre os tubos 98-120 ou 144-156 obtendo-se os volumes de 200 ou 106 ml respectivamente). Os quatro volumes recuperados da coluna de DEAE-Sefarose foram, após precipitação por sulfato de amónio 85 % de saturação, redissolvidos respectivamente em 6, 12, 10 e 9,4 ml de tampão acetato de amónio 0,01M, pH 5,0. Cada uma das soluções foi, posteriormente, centrifugada a 25 000 rpm durante 20 min a 0° C. As diversas soluções foram combinadas duas a duas (obtendo-se respectivamente 18 e 19,4 ml) e aplicadas, separadamente, numa coluna de Biogel P6/DG para dessalinizar as amostras. As fracções dessalinizadas foram combinadas e liofilizadas e passaram a ser designadas «endo» e «CBH».

### *Passo 3 — Dessalinização em Biogel P6/DG*

Uma coluna de perspex com  $2,6 \times 57$  cm foi compactada com Biogel P6/DG, equilibrado em tampão acetato de amónio 0,01M, pH 5,0 e foi conectada a uma bomba peristáltica com um fluxo de 25 ml/h (200 gotas/tubo). Fizeram-se duas aplicações separadamente dos 18 e dos 19,4 ml (recuperados da coluna de DEAE-Sefarose, adicionados, precipitados, redissolvidos e novamente adicionados os volumes cujas fracções possuíam os mesmos grupos de enzimas). A presença do sal (sulfato de amónio) era reconhecida quando ao se adicionar uma gota de cloreto de bário em HCl, ao conteúdo dos tubos se formava um precipitado branco turvo. Assim dada a presença do sal a partir do tubo 22, combinámos apenas o conteúdo dos primeiros vinte e um tubos.

### *Passo 4 — Tentativas de separação de endoglucanases da celobio-hidrolase II (CBH II)*

Para procedermos a tal tentativa recorreremos à utilização de diferentes tipos de colunas com cromatografia líquida (nomeadamente HPLC = high performance liquid chromatography; ou FPLC = fast protein liquid chromatography, com cromatofocagem,

permuta iónica ou com uma resina PBE 94 que adiante referiremos).

a) Fraccionação em coluna Mono S HR 5/5 em FPLC  
— coluna de permuta catiónica

Foram feitas duas tentativas de separação dos dois grupos de enzimas-endoglucanases e CBH, usando uma coluna Mono S e um aparelho da LKB (Bromma, Suécia) solubilizando de cada vez 20 mg da amostra «endo» em 0,5 ml de tampão acetato de amónio pH 5,0,  $\mu = 0,1$ . A bomba peristáltica operou normalmente à pressão de cerca de 10 bar (1 MPa, 150 psi). Em cada corrida obtivemos apenas 1 pico (no conteúdo dos tubos 2-4 que concorria para o volume de 3 ml — 1.<sup>a</sup> aplicação; e nos tubos 2-6, volume total recuperado de 4,5 ml na 2.<sup>a</sup> aplicação). Dado que as percentagens de recuperação de proteína — 52 % e de enzimas — 49 % eram baixas e não ocorria boa separação de xilanases,  $\beta$ -glucosidases, endoglucanases pois saíam todas no mesmo pico, recorremos ao uso de outras colunas.

b) Fraccionação em coluna de Fenil-superoxe HR 5/5-interacção hidrofóbica

Amostras de 5 mg de «endo» foram dissolvidas em 1 ml de tampão pH 5,0,  $\mu = 0,1$ , OHNa:ácido acético — 1,7M sulfato de amónio, na 1.<sup>a</sup> aplicação ou 1,275M de sulfato de amónio na 2.<sup>a</sup> análise cromatográfica. Na 2.<sup>a</sup> aplicação reduzimos a molaridade de sulfato de amónio dado que na primeira a amostra ficou turva (e ao centrifugá-la e procedendo aos diferentes doseamentos quer no sobrenadante quer no sedimento verificámos que era neste que ficava grande % quer da proteína — 60 %, quer da actividade enzimática — 77 % de CMCCase).

As amostras foram, então, aplicadas a uma coluna de fenil superose (Pharmacia, Fine Chemicals) com  $3 \times 40$  cm previamente equilibrada com o mesmo tampão de solubilização da amostra (tampão A) até estabilização da linha de base. Com um 2.<sup>o</sup> tampão — OHNa:ácido acético pH 5,0  $\mu = 0,1$  (tampão B) estabeleceu-se um gradiente do seguinte modo:

10 min eluição em tampão A (0 % de tampão B)

10-60 min de eluição em 0-100 % tampão B

60-100 min eluição em 100 % de tampão B

O fluxo foi de 0,5 ml/min (2 min/tubo=1 ml/tubo), à pressão de 2,2 mPa no início e 1,7 mPa no fim da corrida. Findos os ensaios a coluna era lavada durante algum tempo com o tampão B. Como obtivemos, igualmente baixa % de recuperação (36 ou 44 % de proteína e 17 ou 25 % de CMCase respectivamente nas duas separações) e os picos ficavam mal definidos, tentámos a cromatofocagem recorrendo a uma coluna mono P em HPLC para tentar mais uma vez, separar as diversas componentes celulásicas.

### c) Cromatofocagem em coluna Mono P HR 5/20-HPLC

Numa coluna da Pharmacia com  $5 \times 200$  mm foram feitas três tentativas de fraccionação enzimática. Para tal solubilizámos 10 mg de «endo» em 0,7-2 ml de tampão 0,025M Bis-Tris ácido iminodiacético pH 7,1, ou em 0,025M Bis-Tris HCl pH 6,3 na 3.ª tentativa (tampão A de eluição) e como tampão B para o gradiente, acetato de amónio pH 4,0 ou «polybuffer 74» pH 4,0 (na 3.ª tentativa e diluído 1:10). Estabeleceu-se, pois, um gradiente entre pH 7,1 e pH 4,0 nas duas primeiras tentativas e entre pH 6,3 e 4,0 na 3.ª tentativa. Estabeleceu-se um fluxo de 0,5 ml/min e uma pressão de 1,3 mPa (ou de 1,4 mPa na 3.ª tentativa) para o tampão A e de 2 min/tubo para o tampão B.

O gradiente estabelecido foi, então, o seguinte:

Tempo (min)	Fluxo (ml)	% B	% A
0	0,5	0	100
4	0,5	0	100
4,1	0,5	100	0
100	0,5	100	0

Verificando-se que a separação não era satisfatória e que as amostras evidenciavam, ainda, presença de sulfato de amónio solubilizou-se a amostra remanescente de «endo» (liofilizada) em tampão acetato de amónio 0,01M, pH 5,0 e procedeu-se a nova dessalinização recorrendo neste caso a Biogel P2. Procedeu-se de igual modo com a solução «CBH I» separada em DEAE-Sefarose.

### Passo 5 — Dessalinização por cromatografia em Biogel P2

Uma coluna com  $25 \times 50$  cm, contendo Biogel equilibrado com tampão acetato de amónio 0,01M, pH 5,0, conectada a um colector de fracções multirack, foi operada com uma bomba de perspex 3:125, 1.150 D, com um fluxo de 20 ml/h (160 gotas/tubo). As soluções tamponadas, quer a «endo» (1,418 g de peso seco) quer a «CBH I» foram aplicadas na coluna, as fracções dessalinizadas recolhidas de cada grupo de enzimas, foram adicionadas e liofilizadas. A amostra de endoglucanase saiu entre os tubos 7 e 17 tendo o respectivo volume sido combinado e liofilizado, recuperando-se 83 % do resíduo seco (1,1566 g). Não incluímos, em resultados, o gráfico obtido, visto o considerarmos de pouco interesse.

### Passo 6 — Cromatofocagem — cromatografia em coluna PBE 94-HPLC

Recorremos a esta coluna fazendo mais uma tentativa de separar as endoglucanases da celobio-hidrolase II. Para tal usámos uma coluna de  $1,6 \times 31$  cm («bed volume» de 62 ml) que foi cheia com PBE 94 depois de lavada, desgazificada e adicionada a um tampão de equilíbrio 25 mM histidina:HCl pH 6,2. Uma amostra dessalinizada de «endoglucanase» (300,6 mg, ou 670,07 mg de peso seco — foram feitas duas aplicações da fracção liofilizada e dessalinizada remanescente) foi dissolvida no mesmo tampão de equilíbrio e aplicada na coluna PBE 94.

A cromatografia processou-se nos seguintes moldes: a coluna foi eluída com tampão «polybuffer 74»:HCl, pH 4,0 (diluído 1:8), com um fluxo de 20 ml/h (1 gota/9 sec — 100 gotas por tubo — 15 min/tubo, 5 ml/tubo, 4 tubos/h). Estabeleceu-se um gradiente entre pH 6,4 e 4,0, o que permitiu resolver as amostras obtendo-se um gráfico com separação de vários picos (a 280 nm).

No fim de cada análise cromatográfica a coluna foi lavada com NaCl 1M durante cerca de 1 h. As fracções separadas, foram analisadas quanto a teor proteico (método do BCA, dado o reagente de Folin dar interferência com o «polybuffer 74»), actividades carboximetilcelulásica e avicelásica assim como avaliado o pH da solução recuperada em cada 2.º tubo.

## VII — Electroforese e «immunoblotting»

Recorremos ao método de LAEMMLI (1970) para analisar alíquotas de fracções «endo» e «CBH I» após liofilização. As amostras foram solubilizadas em tampão de electroforese e aplicadas fracções de 50  $\mu$ l de amostra nos poços do gel de poliacrilamida e submetidas a electroforese em condições desnaturantes com 10 % de SDS. Os padrões de pesos moleculares aplicados foram: miosina (200 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina de soro de bovino (69 kDa), ovalbumina (46 kDa), anidrase carbónica (30 kDa) inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,3 kDa).

As bandas proteicas foram contrastadas com azul de Coomassie.

Para procedermos à técnica de «immunoblotting» usámos o método revisto e usado por Elisabeth Bock de Kopenhams Univer. Protein Lab, Pamen Institute, Dk 2200 Kopenhagen, Danmark. Os anticorpos fornecidos pelo Dr. KUBICEK (Viena de Áustria) contra CBH I e CBH II ou endoglucanases actuaram em pH 7,5 (anticorpos monoclonais) ou pH 10,2 (anticorpo policlonal). Usámos um tampão de transferência diluído 50  $\times$  em 20 % de etanol; o tampão de lavagem após o «blotting», pH 7,5 foi adicionado de 2 % de tween 20; o tampão de lavagem e incubação foram respectivamente 0,05M Tris/HCl, pH 7,5 ou 10,2, 0,45M NaCl, 0,1mM PMSF em metanol e 0,05 % tween 20.

## VIII — Análise de retenção de água e de resistência à trituração de papel reciclado

Cerca de 1 g de papel ou cartão previamente cortado ou desfibrinado com uma pinça, era mergulhado em 40 ml de água destilada e deixado durante cerca de 16 h à temperatura de 20° C. A polpa inchada era, então, triturada num ultraturrax ou por ultrasonicação, durante 5 min, ou 15 min de modo a poder avaliar-se o poder de retenção de água pela amostra ou o efeito de batida dos aparelhos de trituração. Após inchamento e termostatização a suspensão era cuidadosamente filtrada (sem compressão ou sucção) de modo a ser-lhe retirado o excesso de água. Foram sempre efectuadas 4 réplicas ou mais de cada amostra de papel. Seguidamente usando cestos preparados para o efeito (em

rede metálica muito fina, que eram colocados dentro de um cilindro perfurado de perspex) procedia-se à centrifugação da suspensão de papel, em centrífuga basculante a 3000 g, durante 10 min. Em seguida determinou-se o peso húmido e colocaram-se as amostras a secar numa estufa para pesos secos durante, pelo menos 6 h, a 105° C, após o que se calculou o peso seco. O valor de retenção de água (WRV = water retention value) é calculado, para as amostras que foram trituradas durante 5 min, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{WRV} = \frac{(\text{peso húmido} - \text{peso seco}) \times 100}{\text{peso seco}} [\%]$$

Em seguida calculámos o efeito de batida, avaliando o valor de retenção de água ao fim de 15 min de trituração e aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{efeito de batida} = \text{WRV (5 min)} - \frac{\text{WRV (15 min)} - \text{WRV (5 min)}}{2}$$

Também o teor de cinzas é um parâmetro importante na avaliação do valor de retenção de água. Assim colocámos as amostras depois de saídas da estufa em cadinhos de porcelana (devidamente tarados) e levámo-las a incinerar numa mufla a cerca de 560° C.

O peso das cinzas era deduzido quer ao valor de peso seco quer ao de peso húmido, antes de calcularmos o valor de retenção de água, passando a fórmula a ser, então:

$$\text{WRV} = \frac{[(\text{peso húmido} - \text{cinzas}) - (\text{peso seco} - \text{cinzas})] \times 100}{\text{peso seco} - \text{cinzas}} [\%]$$

Não achamos de interesse introduzir resultados dos valores por nós encontrados para os três tipos de papel (ou cartão) ensaiados, uma vez que também, não temos resultados comparativos de tais parâmetros resultantes da acção das diversas enzimas isoladas e purificadas.

## RESULTADOS

A fracção proteica enzimática precipitada por 85 % de saturação de sulfato de amónio tinha, aproximadamente, a actividade do filtrado original. Na realidade 1 ml de suspensão continha

20,14 mg de proteína (num total de 7,67334 g, 62 % de recuperação), 146 U. I. de carboximetilcelulase (num total de 55547 U. I., > a 100 % de recuperação) e 291 U. I. de xilanases (num total de 110 700 U. I., com 62 % de recuperação).

Na Figura 1 apresentamos um diagrama esquematizando todo o processo de separação e purificação das diferentes celulasas presentes no extracto extracelular da cultura de *Trichoderma koningii*.

Na Figura 2 representamos a distribuição proteica e actividades enzimáticas obtidas recorrendo a uma coluna de Ultrogel AcA44 (figura correspondente à 4.ª aplicação) inundada com fracções de 40 ml de extracto concentrado, por sulfato de amónio, 85 % saturação, após eluição com tampão acetato de amónio 0,01M, pH 5,0.

Nesta figura é evidente que este gel promove uma boa separação entre as proteínas enzimáticas de alto (HMW = high molecular weight) peso molecular que saíram, de um modo geral entre as fracções 80 e 130, das de baixo peso molecular (LMW = low molecular weight) que saíram nas fracções recolhidas nos tubos 137 a 172.

No Quadro I inscrevemos os resultados obtidos após fraccionamento do extracto pela coluna Ultrogel AcA44 e os teores correspondentes de proteína (em mg), carboximetilcelulase (em U. I., CMCase) e actividade xilanásica (em U. I.) presentes quer no extracto cultural extracelular, ou no extracto concentrado por precipitação ou após fraccionamento cromatográfica; representamos, também, os valores totais recuperados assim como a % de recuperação em cada caso. Na realidade obtivemos sempre uma percentagem de recuperação elevada (entre 82 e 88 %) após cromatografia por Ultrogel AcA44.

Na Figura 3 representamos a separação das componentes endoglucanásicas da celobio-hidrolase I, através de uma coluna de DEAE-Sefarose CL-6B (2.ª aplicação na coluna). Como já foi referido em material e métodos as diversas fracções de alto peso molecular separadas em coluna de Ultrogel AcA44 foram combinadas, liofilizadas, ressuspensas em tampão e aplicadas por duas vezes em coluna de DEAE-Sefarose. Nesta figura pode verificar-se a representação de diferentes picos proteicos verificando-se um primeiro pico onde se detectou, principalmente actividade carboximetilcelulásica (que saíu nos tubos 8 a 32 ou 8 a 44 — por apli-



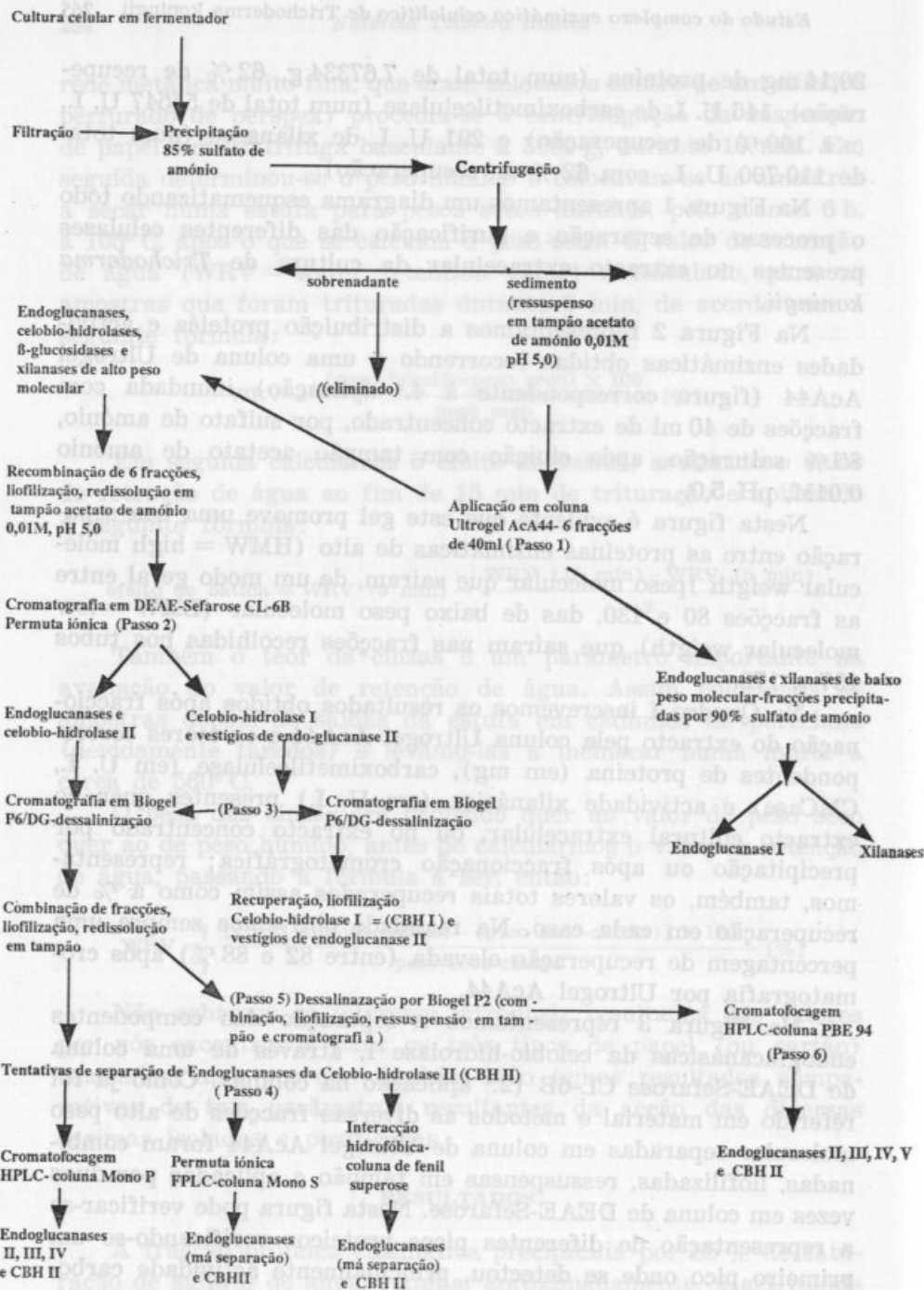


Fig. 1. — Diagrama da separação e tentativa de purificação de endoglucanases, celobio-hidrolases e xilanases de *Trichoderma koningii*, induzidas por Solka-floc como fonte de carbono.

QUADRO I

Actividade enzimática das componentes separadas em Ultrogel Aca44

	Proteína (mg)	CMCase (U. I.)	Xilanase (U. I.)
Extracto cultural extracelular vol. 11 440 ml	12 355	52 395	179 036
Extracto cultural precipitado por sulfato de amónio (85 % saturação). Aplicação total na coluna	7 673	55 547	110 700
Fracção de alto peso molecular após separação e recominação	4 425	45 308	7 479
Fracção de baixo peso molecular após separação e recominação	1 888	3 571	88 868
Total	6 313	48 879	96 347
% de recuperação	82	88	87

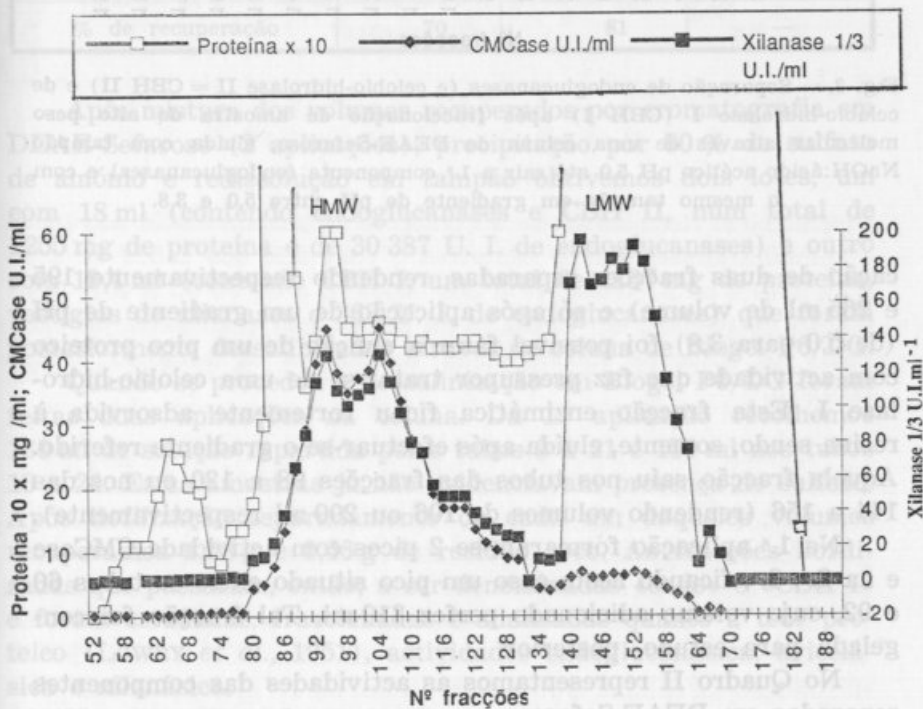


Fig. 2. — Separação de uma amostra de extracto extracelular de *Trichoderma koningii*, concentrada por 85 % de saturação de sulfato de amónio, através de Ultrogel Aca44, eluída com tampão acetato de amónio 0,01 pH 5,0. HMW = proteínas de alto peso molecular; LMW = proteínas de baixo peso molecular.

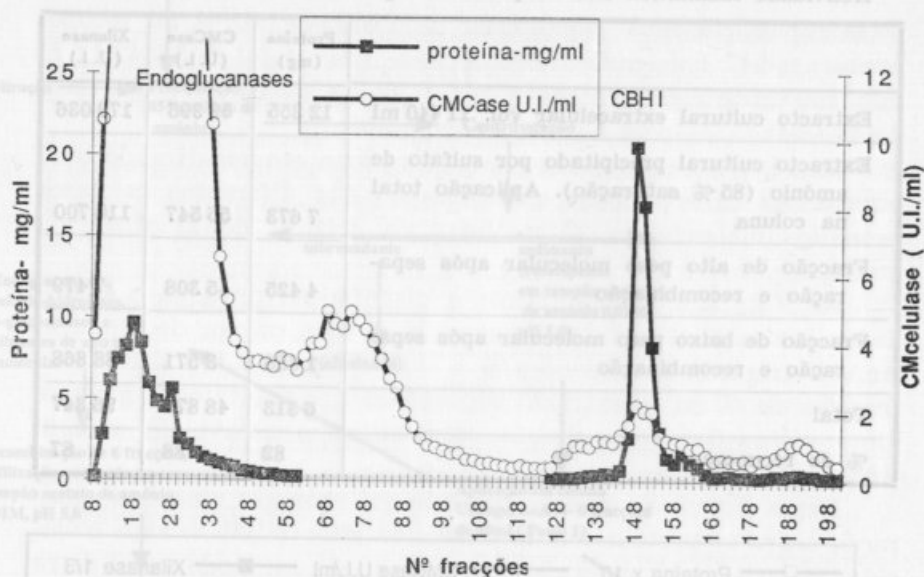


Fig. 3. — Separação de endoglucanases (e celobio-hidrolase II = CBH II) e de celobio-hidrolase I (CBH I) após fraccionamento de amostra de alto peso molecular através de uma coluna de DEAE-Sefarose, eluída com tampão NaOH:ácido acético pH 5,0 até sair a 1.ª componente (endoglucanases) e com o mesmo tampão em gradiente de pH entre 5,0 e 3,8.

cação de duas fracções separadas, rendendo respectivamente 195 e 265 ml de volume) e só após aplicação de um gradiente de pH (de 5,0 para 3,8) foi possível fazer a eluição de um pico proteico com actividade que faz pressupor tratar-se de uma celobio-hidrolase I. Esta fracção enzimática ficou fortemente adsorvida à resina sendo, somente, eluída após efectuar-se o gradiente referido. Aquela fracção saiu nos tubos das fracções 98 a 120 ou nos das 144 a 156 (rendendo volumes de 106 ou 200 ml respectivamente).

Na 1.ª aplicação formaram-se 2 picos com actividade CMCase e na 2.ª, 3.ª, ficando neste caso um pico situado entre os tubos 60 e 92, cujo volume adicionado per fez 310 ml. Tal fracção foi congelada para estudo, posterior.

No Quadro II representamos as actividades das componentes separadas em DEAE-Sefarose.

Nas fracções 8 a 32 ou 8 a 14 detecta-se, essencialmente, actividade carboximetilcelulásica e nas fracções 98 a 120 ou 144 a 156 a actividade encontrada permite admitir tratar-se da CBH I

QUADRO II

Actividades das componentes separadas em DEAE-Sefarose

	Proteína (mg)	CMCase (U. I.)	Xilanase (U. I.)
2 aplicações, total	3 490	39 286 U. I.	4 415 U. I.
<i>N.º das fracções</i>			
8-32; 8-44	1 255	30 387	1 063
60-92	46	1 091	não avaliada
98-120; 144-156	1 137	363	25
Total	2 438	31 841	—
% de recuperação	70	81	—

Após mistura dos volumes recuperados por cromatografia em DEAE-Sefarose (2 aplicações), precipitação por 90 % de sulfato de amónio e redissolução em tampão obtivemos dois lotes, um com 18 ml (contendo endoglucanases e CBH II, num total de 1255 mg de proteína e de 30 387 U. I. de endoglucanases) e outro com 19,4 ml (contendo CBH I, um total de 1137 mg de proteína, vestígios de xilanases e 363 U. I. de endoglucanases) que foram posteriormente dessalinizados através de coluna de Biogel P6/DG.

Quando se procedeu à dessalinização em Biogel P6/DG foram feitas duas aplicações na coluna. Da 1.ª aplicação recolhemos 130 ml de solução repartida pelos tubos 9 a 21 e 150 ml nos tubos 10 a 24. Estas amostras já não evidenciavam presença de sulfato. Após liofilização separadamente de cada um daqueles volumes recuperámos 1,58 g e 0,66 g de resíduo seco. As fracções liofilizadas que passaram, então, a ser denominadas «endo» e «CBH I» e foram estudadas, fraccionadas e analisadas quanto a teor proteico (LOWRY *et al.*, 1951), actividades endoglucanásica, avicelásica e xilanásica.

Nas tentativas de separação em diferentes colunas, quando usámos fenil superose — Figura 4 — (representamos a 2.ª aplicação) em qualquer das aplicações obtivemos um a quatro picos com actividade proteica e dois picos com actividade carboxime-

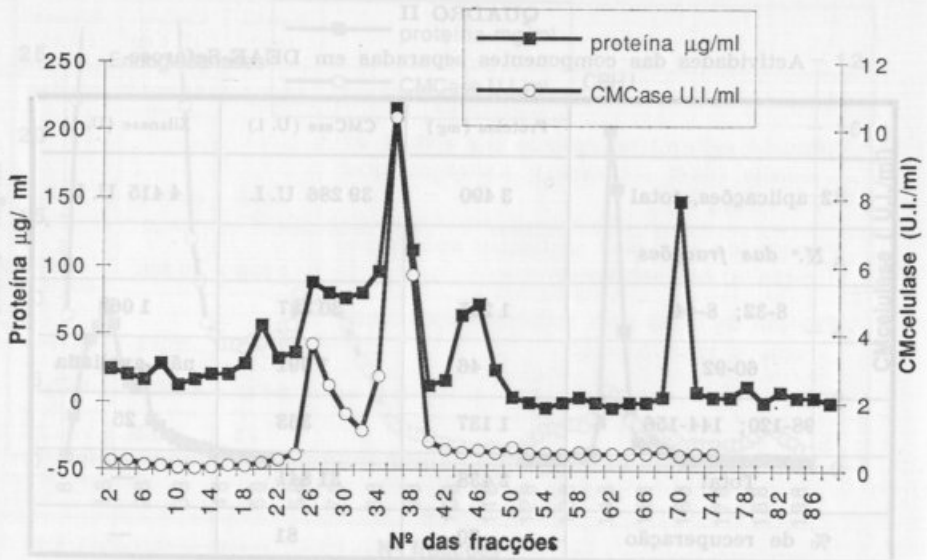


Fig. 4. — Representação de uma tentativa de separação de endoglucanases e de CBH II através de uma coluna de fenil superose. Ver condições de trabalho em material e métodos.

tilcelulásica. Recolheram-se as frações correspondentes aos picos e combinaram-se (na 1.<sup>a</sup> tentativa o conteúdo dos tubos 24 a 33 e 34 a 40 e na 2.<sup>a</sup> tentativa o dos tubos 25 a 31 ou 32 a 40). Após adição obtivemos, em média, 8 ml de solução enzimática de cada pico. As soluções encontram-se congeladas aguardando estudo posterior.

Quando recorremos ao uso da coluna Mono P — Figura 5 — (correspondente à 3.<sup>a</sup> aplicação), realizámos três tentativas de separação. Na realidade na 1.<sup>a</sup> aplicação obtivemos apenas um pico contendo proteína, actividades carboximetilcelulásica e xilánásica e outros picos de proteína sem qualquer destas actividades. Na 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> tentativas após dissolução da amostra em 2 ml de tampão, concentrámo-las através de um filtro 30 KDa antes da introdução na coluna. Obtivemos, assim, na 1.<sup>a</sup> aplicação, seis picos de proteína, dos quais três apresentavam actividade endoglucanásica, dois actividade avicelásica e um outro pico exclusivamente com actividade avicelásica o que leva a admitir corresponder à CBH II. Na 2.<sup>a</sup> aplicação combinámos o conteúdo dos tubos 11

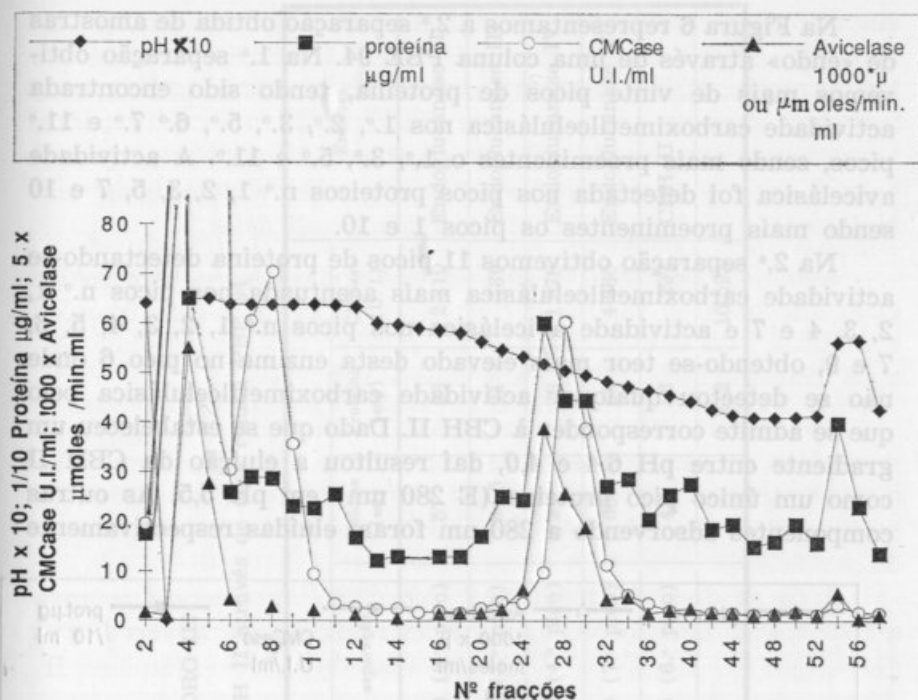


Fig. 5. — Tentativa de separação de endoglucanases e de CBH II através de uma coluna Mono P em HPLC. Ver condições de separação em material e métodos.

a 14 (4 ml de volume), dos 15 a 20 (5,4 ml de volume) e dos 26 a 30 (4,6 ml de volume). Na 3.<sup>a</sup> aplicação combinámos, então, o conteúdo dos tubos 3 a 6 (4 ml) que evidenciava presença de proteína, actividade endoglucanásica e avicelásica («endoglucanase II»), dos tubos 7 a 11 (4 ml) com proteína e actividade endoglucanásica («endoglucanase III»), dos tubos 24 a 27 (4 ml) com proteína e actividade avicelásica (provavelmente será a CBH II), dos tubos 28 a 34 (6,4 ml) com proteína e actividade endoglucanásica («endoglucanase IV»). Além dos doseamentos proteicos e enzimáticos efectuados em cada 2.<sup>a</sup> fracção recolhida, determinámos, ainda, o pH (após termos deixado as amostras algumas horas à temperatura ambiente).

Dado que os resultados obtidos em algumas destas colunas não se nos afiguraram de boa qualidade não fazemos representação gráfica das separações nelas efectuadas.

Na Figura 6 representamos a 2.<sup>a</sup> separação obtida de amostras de «endo» através de uma coluna PBE 94. Na 1.<sup>a</sup> separação obtivemos mais de vinte picos de proteína, tendo sido encontrada actividade carboximetilcelulásica nos 1.<sup>o</sup>, 2.<sup>o</sup>, 3.<sup>o</sup>, 5.<sup>o</sup>, 6.<sup>o</sup>, 7.<sup>o</sup> e 11.<sup>o</sup> picos, sendo mais proeminentes o 1.<sup>o</sup>, 3.<sup>o</sup>, 5.<sup>o</sup> e 11.<sup>o</sup>. A actividade avicelásica foi detectada nos picos proteicos n.<sup>o</sup> 1, 2, 3, 5, 7 e 10 sendo mais proeminentes os picos 1 e 10.

Na 2.<sup>a</sup> separação obtivemos 11 picos de proteína detectando-se actividade carboximetilcelulásica mais acentuada nos picos n.<sup>o</sup> 1, 2, 3, 4 e 7 e actividade avicelásica nos picos n.<sup>o</sup> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9, obtendo-se teor mais elevado desta enzima no pico 6 onde não se detectou qualquer actividade carboximetilcelulásica pelo que se admite corresponder à CBH II. Dado que se estabeleceu um gradiente entre pH 6,4 e 4,0, daí resultou a eluição da CBH II como um único pico proteico (E 280 nm) em pH 5,5. As outras componentes adsorvendo a 280 nm foram eluídas respectivamente

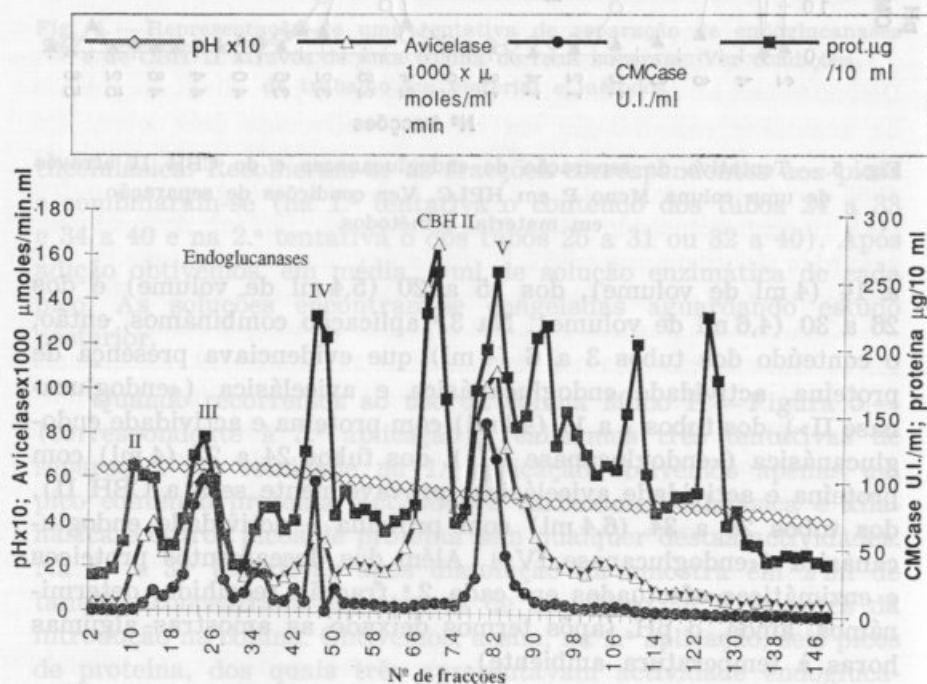


Fig. 6. — Tentativa de separação de endoglucanases e de CBH II através de uma coluna PBE 94, usando gradiente de pH, sendo um dos tampões «polybuffer 74». Ver condições de separação em material e métodos.

QUADRO III

Separação de endoglucanases e CBH II através de uma coluna PBE 94

	N.º das frações						Enzimas	
	1.ª separação	Volume (ml)	Proteína (mg)	CMCase (U.I.)	2.ª separação	Volume (ml)		Proteína (mg)
10-16 (1.º pico)	29	28,50	1 528	18-30 (2.º pico)	57	38	2 819 *	Endoglucanase II
22-32 (3.º pico)	45	12,75	400	31-38 (3.º pico)	34,5	21	739	Endoglucanase III
44-54 (5.º e 6.º picos)	51	20,87	1 076	44-48 (4.º pico)	21	29	1 878	Endoglucanase IV
86-100 (11.º pico)	67	35,03	1 280	76-90 (7.º pico)	66	68	4 860	Endoglucanase V
76-85 (10.º pico)	46	28,47	108	66-75 (6.º pico)	43	56	297	CBH II
Totais		125,62	4 392			212	10 593	



em valores de pH 6,4 (endoglucanase II), pH 6,4 (endoglucanase III), pH 6,2 (endoglucanase IV) e pH 5,3 (endoglucanase V). Nesta mesma figura está representado o perfil de pH de cada 2.º tubo.

Várias componentes proteicas adsorvendo a 280 nm e com valores de pH situados entre 4,9 e 4,2 foram eluídas, mas, virtualmente, são desprovidas de actividade celulásica.

Assim, procedemos às combinações indicadas no Quadro III onde inserimos os valores correspondentes às principais fracções recolhidas, seu teor proteico e actividade carboximetilcelulásica, após cromatografia através da coluna PBE 94.

No Quadro III indicamos, também, as fracções principais recolhidas (e respectivos picos) da coluna PBE 94, durante as duas separações efectuadas cujas actividades e teores proteicos se encontram inseridos no Quadro IV respeitantes a cada enzima de *per se*.

Após as diversas tentativas recorrendo às diversas colunas e sistemas de eluição conseguiu-se uma boa separação das Endoglucanases II, III, IV e V e separadas da celobio-hidrolase II,

#### QUADRO IV

Amostras obtidas após fracçãoação através de PBE 94

Enzimas prováveis	Proteína (mg)	CMCase (U. l.)	Avicelase $\mu$ moles/mnx 10 <sup>3</sup>
Fracção total aplicada	610,411	17 508	não avaliada
Endoglucanase II	66,747	4 347	4 053
Endoglucanase III	34,106	1 139	737
Endoglucanase IV	49,514	2 954	957
Endoglucanase V	102,886	6 140	5 918
CBH II	84,542	405	5 970
Total	337,795	14 985	17 635
% de recuperação	55	86	não determinada

usando a coluna PBE 94 e o tampão anteriormente referido. Foram recolhidas amostras de 5 ml, mais uma vez ensaiadas quanto a teor proteico (método do ácido bicinconínico-BCA, descrito no catálogo Pierce n.º 23220/23225, uma vez que o reagente de Folin, segundo o método de LOWRY *et al.*, 1951, dava interferência com o tampão) e actividades enzimáticas celulásicas.

No Quadro IV inserimos algumas referências relativamente às fracções separadas através de coluna PBE 94.

No Quadro V resumimos os valores parciais de proteína, endoglucanases e xilanase na fracção de alto peso molecular aplicada e respectiva recuperação após as diversas fraccionações cromatográficas.

#### QUADRO V

Recuperação total do teor proteico e das actividades enzimáticas na fracção de alto peso molecular

	Proteína (mg)	CMCase (U. I.)	Xilanase (U. I.)
Teor inicial aplicado	7 673	55 547	4 415
Recuperação na fracção «endo»	994	36 856	1 088
Recuperação na fracção «CBH I»	977	275	20,16
Total recuperado	1 971	37 131	1 108,16
% de recuperação	30	67	26

Possuímos agora 6 fracções purificadas das diferentes enzimas celulolíticas, nomeadamente Endoglucanases II-V, celobio-hidrolases I e II. Na realidade depois de efectuadas as diversas cromatografias dispomos das amostras combinadas e congeladas ou liofilizadas seguintes:

- a) Uma fracção de baixo peso molecular (1.ª a 7.ª separações efectuadas através de Ultrogel AcA44 — 189,5 ml) contendo a Endoglucanase I e xilanases;

- b) Amostra de 310 ml (fracções recuperadas dos tubos 60-92) separada em DEAE-Sefarose e que provavelmente se trata de mais uma endoglucanase;
- c) 0,66 g de peso seco liofilizado de amostra recuperada de DEAE-Sefarose contendo, provavelmente, CBH I;
- d) Duas fracções de 3 ml e 4,5 ml separadas após duas tentativas de purificação em coluna Mono S, correspondentes aos tubos 2-4 e 4-6, contendo em mistura endoglucanases e CBH II;
- e) Fracções separadas através de coluna Fenil-superose, em duas tentativas, sendo os volumes de 9,2 ml (tubos 24-33), 6,8 ml (tubos 34-40) correspondentes à 1.<sup>a</sup> separação e 8,8 ml (tubos 25-31) e 8,4 ml (tubos 32-40) obtidos após a 2.<sup>a</sup> aplicação; em qualquer dos casos devemos ter as endoglucanases e a CBH II em mistura;
- f) Na coluna Mono P obtivemos várias amostras correspondentes às três fraccionações efectuadas; da 1.<sup>a</sup> separação retivemos 4,4 ml do combinado dos tubos 7-13 e as amostras separadas na 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> aplicações (tubos 3-6 = 4 ml, 7-11 = 4,8 ml, 15-20 = 5,4 ml, 24-27 = 4 ml, 26-30 = 4,6 ml, 28-34 = 6,4 ml) foram adicionadas à fracção «endoglucanase» liofilizada remanescente, dessalinizadas em Biogel P2 e aplicadas na coluna PBE 94;
- g) As fracções resumidas nos Quadros III e IV, separadas através de coluna PBE 94 foram combinadas aguardando outros estudos.

As amostras purificadas foram submetidas a imunoelectroforese (western blot) usando anticorpos anti CBH I e II e tendo sido reconhecida afinidade para as referidas enzimas. Verificou-se, pois, boa separação e boa afinidade. As bandas correspondentes às endoglucanases, também, se apresentavam nítidas e bem separadas. Na realidade a CHB I não reage com o anti-soro anti CBH II o mesmo se verificando com a CBH II e o anti-soro CBH I.

#### DISCUSSAO

As condições culturais para produção de celulases de origem microbiana, são de há muito examinadas e em particular as de espécies de *Trichoderma*. Tem sido verificado que a maior acti-

vidade está, sempre, associada com um bom fornecimento de oxigénio. É de todo o interesse encurtar o tempo de incubação, obter enzimas com alto valor de actividade, a 50° C ou até em temperaturas superiores, se se tiver em vista uma aplicação industrial a temperaturas elevadas. Têm, já, sido estudadas diversas fontes de carbono, indutoras de celulasas para espécies de *Trichoderma*. Nós ensaiámos, previamente, diferentes fontes de carbono (celulose Avicel 1, 3 e 6 %, celulose Whatman 1 %, Solka-floc 1 %) antes de seleccionarmos a Solka-floc, diferentes temperaturas e diferentes tempos de incubação para seleccionar as melhores condições de exsudação de celulasas e xilanasas. Optámos pelas condições indicadas em material e métodos. A indução, separação e purificação de celulasas de *Trichoderma* é, já, tentada há alguns anos.

Efectivamente em 1968 WOOD procedeu à fraccionação de extracto extracelular de *T. koningii* contendo celulasas induzidas por fibras de algodão. Recorreu a Sefadex G-75 para fraccionar o extracto que foi concentrado por precipitação por sulfato de amónio (entre 20 e 80 % de saturação). Redissolveu o precipitado em tampão acetato 0,1M pH 5,0, o qual foi, também, usado para eluir as enzimas cromatograficamente. Na realidade, também, separou duas componentes com actividade celulásica, tendo conseguido separar a celobio-hidrolase I (CBH I) quando, após vários tratamentos do extracto, aplicou a primeira fracção colhida de uma coluna de Sefadex G-75 noutra coluna de DEAE-Sefadex e estabeleceu um gradiente salino. Neste trabalho usámos colunas de resinas diferentes e optámos por um gradiente de pH para eluir a CBH I adsorvida à resina, depois de termos efectuado a eluição das componentes endoglucanásicas.

Enquanto que WOOD (1968) fraccionou o complexo endoglucanásico, pelo menos, em três componentes de baixo peso molecular recorrendo a uma coluna de SE-Sefadex, neste trabalho o melhor modo de o conseguir foi utilizando uma coluna de PBE 94 em HPLC tendo sido separadas 4 endoglucanases de alto peso molecular. A endoglucanase de baixo peso molecular está contida numa fracção congelada aguardando posterior purificação.

Em essência a quebra da celulose por *T. koningii* envolve uma acção sequencial em que as endoglucanases iniciam a sua acção ao acaso, as extremidades das novas cadeias geradas são, então, removidas pela celobio-hidrolase que actua nas extremi-

dades, então, geradas (WOOD & McCRAE, 1972). Segundo WOOD & McCRAE (1978) há um ataque instantâneo, primeiro nas porções altamente cristalinas, seguindo-se o das extremidades libertadas, de modo a impedir a reorganização das ligações glucosídicas entre dois resíduos de glucose firmemente estabelecidas em posição por pontes de hidrogénio intra e inter-moleculares. De acordo com estes autores tal quebra é mais efectiva em presença de celobio-hidrolases e de endoglucanases que formam um complexo activo à superfície da cadeia de celulose.

Embora tenhamos obtido várias fracções de endoglucanases (II, III, IV e V) e CBH (I e II), elas não estão completamente purificadas pois contêm vestígios de actividades endoglucanásicas,  $\beta$ -glucosidásicas e xilanásicas. O mesmo aconteceu a WOOD & McCRAE em 1972. Em 1975 WOOD & McCRAE descreveram o complexo celulásico de *T. koningii* tendo fraccionado o seu complexo celulásico em 8 componentes putrificadas por diversos métodos envolvendo filtração em gel, cromatografia de permuta iónica e focagem isoeléctrica. Isolaram, pois, uma exoglucanase-celobio-hidrolase, duas endoglucanases de baixo peso molecular e duas  $\beta$ -glucosidases que estudaram e caracterizaram. Mais tarde os mesmos autores (1977, 1978) descrevem métodos que lhes permitiram caracterizar quatro ou cinco endoglucanases (em vez de duas) das quais duas têm capacidade para actuar sinergisticamente com a CBH produzindo hidrólise extensiva de celulose de algodão. Eles consideram as endoglucanases principais separadas (E I, E IIa, E IIIb e E IV), diferentes, embora tendo substratos carboximetil-celulose, celulose inchada pelo ácido orto-fosfórico e celo-oligossacáridos de cadeia curta. Elas têm larga especificidade para os substratos mas, diferentes modos de acção.

Segundo WOOD a remoção da endoglucanase I (de baixo peso molecular) não afecta a cinética de solubilização pelas restantes celulasas do complexo. WOOD & McCRAE (1978) acharam surpreendente o comportamento da endoglucanase I por apresentar muito pequena capacidade de actuar sinergisticamente com a CBH. No entanto, WOOD & McCRAE (1975, 1977, 1978) demonstraram a acção sinérgica entre a CBH e cada uma das outras endoglucanases isoladas, usando como substrato, especialmente, celulose de fibras de algodão.

Em 1988 WOOD publicou um artigo de revisão, descrevendo a purificação de celulasas de *T. koningii*, no entanto de Junho de 1992 a Março de 1993 realizámos este trabalho e tentámos no seu laboratório, modificar e rentabilizar métodos que nos permitissem melhor recuperação e purificação das diversas componentes do complexo celulásico sem preterir ou danificar as xilanases induzidas, também, pela mesma fonte de carbono no mesmo extracto extracelular e sob as mesmas condições de cultura, uma vez que se pretendia obter os dois complexos integralmente com o objectivo de se promover reciclagem de papel por via enzimática.

Referiremos, então, algumas das alterações introduzidas na purificação de celulasas de alto peso molecular em *T. koningii*, comparativamente ao descrito por WOOD em 1988:

— **Substrato** — Utilizámos Solka-floc cellulose em vez de fibra de algodão como fonte de carbono e de energia;

— **Meio de cultura** — Usámos o meio descrito por MANDELS & WEBER (1969) que é diferente do utilizado por WOOD (1988);

— **Concentração enzimática** — Recorremos ao método da precipitação por 85 % de saturação por sulfato de amónio em vez de precipitação 1.º até 20 % e só depois de centrifugado, precipitação por 80 % de saturação;

— **Redissolução** — O precipitado após centrifugação foi ressuspenso em tampão acetato 0,01M em vez de 0,1M;

— **Dessalinização** — Por Biogel P6/DG efectuada, somente, após duas cromatografias em gel (Ultrogel AcA44 e DEAE-Sefarose) em vez de retirar os iões sulfato logo à partida recorrendo a Sefadex G-25; a 3.ª dessalinização foi efectuada usando Biogel P2 em vez de Sefadex G-25;

— **Doseamentos** — Foram introduzidas algumas alterações quanto aos doseamentos de proteínas e doseamentos enzimáticos (como referido em material e métodos);

— **Eluição cromatográfica** — Separação de endoglucanases e xilanases de alto das de baixo peso molecular por diferentes tipos de resina (gel cromatográfico);

— **Separação e purificação** — Foram introduzidas alterações nestes métodos para separar endoglucanases de alto peso molecular e as celobio-hidrolases I e II. Recorreu-se, igualmente, a DEAE-Sefarose Cl-6B para separar a CBH I mas de uma solução previamente fraccionada em Ultrogel AcA44 (não usámos conca-

navalina A-Sefarose nem o mesmo tampão de eluição). Recorremos, igualmente, ao uso de um gradiente de pH (5,0-3,8) mas não separámos a CBH II. Também a separação de 4 endoglucanases de alto peso molecular e da CBH II foi levada a efeito de modo diferente (após recurso a diferentes resinas — Mono P, Mono S, Fenil superose em cromatografia líquida de alta pressão) sendo o melhor aquele em que utilizámos uma coluna de PBE 94 e «polybuffer 74» na eluição com um gradiente de pH entre 6,0 e 4,0. Embora não completamente purificadas isolámos, também, 5 endoglucanases (uma de baixo e 4 de alto peso molecular) e 2 celobio-hidrolases (CBH I saída após cromatografia em DEAE-Sefarose e a CBH II separada das endoglucanases em coluna de PBE 94, por gradiente de pH estabelecido com o tampão «polybuffer 74»).

Desperdício de papel é usado extensivamente como material sem valor económico acrescentado na indústria da polpa e do papel. Durante a reciclagem de desperdício de polpa de papel várias propriedades criam problemas e limitam o número de vezes que o papel pode ser reciclado. Estudos preliminares com preparados de enzimas não purificadas indicam que as enzimas podem ter um papel activo no melhoramento da qualidade do papel reciclado. É uma necessidade urgente identificar as enzimas específicas que produzem os efeitos desejados.

É bem sabido que enzimas, que degradam a parede celular vegetal, provenientes de fungos ou de bactérias contêm uma larga gama de actividades capazes de atacarem quer a celulose que a hemicelulose. Pasta de papel preparada a partir de madeira de resináceas (a partir por exemplo de madeira de pinheiro) contém os polissacáridos manano e xilano em adição à celulose, enquanto que pasta de papel obtida a partir de folhosas (eucalipto por exemplo) contém xilano como principal componente da hemicelulose. As enzimas que degradam os polissacáridos cellulose e hemicelulose (xilano essencialmente) têm sido particularmente bem estudadas e tem sido estabelecido que cada sistema enzimático contém uma variedade de enzimas com diferentes modos de acção. Parece, igualmente, que uma ou mais destas componentes enzimáticas que degradam celulose e xilano produzirão melhoramento desejável nas propriedades do papel reciclado.

Tratamento de desperdício de polpa de papel tal como retirar fibras, tinta e branqueamento atingiu já um alto padrão de qualidade. Contudo, o problema criado com a introdução de desperdício de papel na polpagem não pode ser resolvido por tais processos físicos. Tratamentos enzimáticos de polpas para aumentar as propriedades físicas do papel já foram descritos em duas patentes (Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63, 135, 597, 1988 e *Eur. Pat. Appl.* EP 262, 040, 1988). Ambas as patentes descrevem o uso unicamente de preparações enzimáticas não purificadas e mencionam que o sistema enzimático deve ser usado com grande cuidado dada a facilidade com que as fibras são prejudicadas por acção enzimática.

Desperdícios de polpa apresentam uma maior área superficial, pois já foi sujeita a tratamentos químicos para remover a lenhina e parte da hemicelulose e parece, igualmente, que o tratamento enzimático será um sucesso nestas circunstâncias.

A deficiência em madeira na CEE é reflectida pela enorme quantidade de papel reciclado (47%) usada para produzir produtos na indústria papeleira. O único país que excede aquela % é o Japão (50%). O papel de embrulho contém uma % notável, 95%, de polpa reciclada e claramente esta proporção não pode ser mais aumentada. Contudo existem possibilidades para aumentar a quantidade de desperdício de papel na polpagem e que pode ser usada na manufatura de papel de alta impressão. Como pré-requisito devem ser introduzidos tratamentos especiais posteriores às polpas com os desperdícios. Tais polpas só podem ser recicladas algumas vezes dado que as fibras da polpa perdem a sua flexibilidade após uso repetido e tal resulta numa diminuição da eficiência das ligações químicas entre as fibras, durante a preparação da pasta para papel e num aumento da sensibilidade Schopper-Riegler. Estas propriedades indesejáveis conduzem a um decréscimo na eficiência das máquinas, a uma redução nas propriedades de perda de água e a um alto consumo de vapor. A degradação controlada da celulose e da hemicelulose com enzimas purificadas melhorará as propriedades do papel reciclado e contribuirá para uma economia no processo industrial.

Assim, o meu trabalho de investigação consistiu no isolamento e purificação parcial e total (de extractos culturais extracelulares de fungos celulolíticos) das componentes enzimáticas possuindo actividade celulásica e xilanásica que podem efectuar a degra-



dação controlada de algumas cadeias dos polissacáridos celulose e xilano. As actividades enzimáticas de interesse incluíram endo e exo-celulases, endo e exo-xilanases com capacidade para produzirem pequenas alterações nas moléculas de celulose e de xilano. A separação das enzimas envolveu a utilização de uma série de técnicas cromatográficas e electroforéticas, nomeadamente filtração por gel, cromatografia por troca iónica, cromatofocagem em colunas e uso de geles de imobilinas.

Antes de ensaiarmos a acção das enzimas purificadas sobre desperdício de papel fizemos alguns ensaios de avaliação de algumas características de papel e de cartão para termos uma possibilidade de comparação entre tais compostos antes e depois de actuados pelo conjunto das enzimas purificadas.

#### CONCLUSÕES

1. — A partir de 12 l de meio de cultura onde se fez crescer *Trichoderma koningii* obtivemos 1,8 g de peso seco de uma amostra contendo actividades endoglucanase II, III, IV e V e actividade celobio-hidrolase II.

2. — Obteve-se, ainda, 0,66 g de peso seco contendo actividade celobio-hidrolase I.

3. — Uma solução contendo a Endoglucanase I e xilanases.

4. — Após fraccionamento e purificação da componente de alto peso molecular recuperámos 4500 Unidades Internacionais de Endoglucanase II, 1200 Unidades Internacionais de Endoglucanase III, 3000 Unidades Internacionais de Endoglucanase IV, 6000 Unidades Internacionais de Endoglucanase V e 6  $\mu$ moles  $\text{min}^{-1}$  de celobio-hidrolase II.

Estas enzimas vão agora ser ensaiadas sobre desperdício de papel para ser tentada a reciclagem.

#### AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho e a permanência na Escócia só foi possível por ter usufruído de licença sabática durante o ano lectivo de 1992/93, de bolsa de investigação de curta duração da Fundação Calouste Gulbenkian (15 dias), de bolsas ao abrigo do convénio INIC/British Council (15 dias de estadia e duas

viagens), do convénio JNICT/British Council (1 viagem e estadia de 15 dias), do Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (1 viagem), cujos subsídios muito agradecemos. Agradecemos, igualmente, a supervisão do Dr. THOMAS WOOD, investigador e chefe do Departamento e a assistência técnica de SHEILA McCRAE e de CATRIONA WILSON, do Rowett Research Institute, Aberdeen, Escócia, Reino Unido.

Reconhecidamente agradecemos ao Prof. Doutor DINIS PESTANA da F. C. U. L., do Departamento de Estatística e Investigação Operacional, pelo ensinamento prestado para a realização dos gráficos que inserimos nas Figuras 1-6.

#### BIBLIOGRAFIA

- GILBERT, H. J.; HAZLEWOOD, G. P.  
1993 Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, **139**: 187-194.
- LAEMMLI, U. K.  
1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 681-685.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.  
1951 Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- MANDELS, M.; WEBER, J.  
1969 The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, **95**: 391-414.
- NELSON, N.  
1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, **153**: 375-380.
- SOMOGYI, M.  
1952 Notes on sugar determination. *Journal Biological Chemistry*, **195**: 19-23.
- WALSETH, C. S.  
1952 Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. *Tappi* **35**: 228-233.
- WOOD, T. M.  
1968 Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. Separation of components attacking native cotton. *Biochemical Journal*, **109**: 217-227.  
1988 Cellulase of *Trichoderma koningii*. *Methods in Enzymology* vol.160 (capítulo 24): 221-233. Biomass, Part A — Cellulose and Hemicellulose. WOOD, W. A. & KELLOGG, S. T., eds.). Academic Press, Inc., London.
- WOOD, T. M.; BHAT, K. M.  
1988 Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, vol. 160 (capítulo 9): 87-112. Biomass, Part A, Cellulose and Hemi-

- cellulose. WOOD, W. A. & KELLOGG, S. T. (eds.). Academic Press, Inc., London.
- WOOD, T. M.; McCRAE, S. I.
- 1972 The purification and properties of the C1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochemical Journal*, **128**: 1183-1192.
- 1975 The cellulase complex of *Trichoderma koningii*. *Symposium on Enzymatic hydrolysis of cellulose*, Aulanko, Finland 12-14 March.
- 1977 Cellulase From *Fusarium solani*: Purification and Properties of the C<sub>1</sub> component. *Carbohydrate Research* **57**: 117-133.
- 1978 The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanases components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochemical Journal*, **171**: 61-72.
- 1982 Purification and some properties of the extracellular  $\beta$ -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *Journal of General Microbiology*, **129**: 2973-2982.
- 1986 Purification of a cellobiohydrolase from *Penicillium pinophilum*. *Carbohydrate Research*, **148**: 331-344.
- WOOD, T. M.; McCRAE, S. I.; WILSON, C. A.; BHAT, K. M.; GOW, L. A.
- 1988 Aerobic and anaerobic fungal cellulases, with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose. *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. FEMS Symposium n° 43 (AUBERT, J. P.; BÉGUIN, P.; MILLET, J. eds.).

## RARE AND THREATNED PLANT SPECIES OF SOUTHERN PORTUGAL

by

**R. GOVAERTS**

Korte St. Annastraat 9, 2000 Antwerpen

Received, 22-II-94.

### SUMMARY

Assessing the status of endemic and rare species in Southern Portugal following field research in april 1992. Additions and alternations to the rare and threatened plant list of Portugal are proposed.

**F**ROM the fifth to the sixteenth of april, I had the opportunity to visit the Algarve and Baixo Alentejo provinces of Southern Portugal. The goal was to look at the status of those plant species that are endemic to Portugal or that have a large part of their distribution in Portugal. With these field observations I propose a list of rare and threatened plants of Portugal together with their conservation status. When appropriate, I collected herbarium specimens for further study and living plant material for ex situ conservation.

I'll give a list of the rare and threatened plants I searched for, together with information on where they could be found and how abundant they were. Herbarium specimens will be cited as (Herbarium code were the specimen has been deposited; collector: Herbarium number).

### CARYOPHYLLACEAE

*Arenaria algarbiensis* Welw. ex Willk., *A. conimbricensis* Brot.  
& *A. emarginata* Brot.

Two rare plants that could be found growing close to *Tuberaria major* were *Arenaria conimbricensis* and *Arenaria algar-*

*biensis*. They are not mentioned in previous works, however, I feel that *A. algarbiensis* deserves the status of vulnerable and *A. coimbricensis* at least rare. These delicate annuals have largely disappeared through a different landuse. They are often mentioned growing in vineyards where I did not see any of them. A third species, *A. emarginata* with pink notched petals I searched for without success. Last year I searched for it in vain in SW-Spain and it is now probably most common in Morocco.

### **Herniaria algarvica** Chaudhri

I could only find a few small specimens some 20 m NE- of the Cabo de São Vicente lighthouse. They grew on sandy soil in between rocks. This area was often trodden on by tourists and local fishermen. I've not seen the species anywhere else. There is a record from near Lagos but it has probably long since disappeared there. Another record is from near Sines, some 120 km to the north this is N- of Vila Nova de Milfontes where I saw *H. lusitanica* which is its closest relative. This species differs in that it is larger in all its parts and the internodal spaces are larger.

### **Loeflingia tavaresiana** G. Samp.

This species may be extinct in Portugal. It is only known from two localities (JALAS, J. & SUOMIN, 1972) which are heavily populated and I did not find any specimens there. There are however recent records from Moroco (BR; J. Lewalle: 12965, 12813) and SW-Spain.

### **Silene rothmaleri** P. Silva

This species is only known from the typus which was collected near the Cabo de São Vicente in april 1945. It has been searched for by other botanists but without success. I didn't find any trace of it either but I would like to make the following remark. In the area and also near Aljezur (BR; R. Govaerts: 142, 143) specimens of *Silene latifolia* occur that look remarkably like *S. rothmaleri* but of course they have male and female flowers and the leaves are less spatulate.

## MALVACEAE

**Lavatera mauritanica** subsp. *davaei* (Cout.) Cout.

Of this species I saw one population of some 30 individuals SW — of Sagres on Foraira.

## BRASSICACEAE

**Biscutella vincentiana** (G. Samp.) Rothm. ex Guinea

This is a common species between Sagres and the Cabo de São Vicente. It grows in different habitats. Compact plants with thick stems could be found growing in between the rocks on the soil (BR; R. Govaerts: 113). Larger plants with thin stems could be seen growing on dunes where they served to fix the sand. These plants had a lot of thin side shoots which all ended in a loose rosette. The plant is considered to be endemic to this area, however, I found a small population some 30 km to the north. They grew inbetween rocks on a steep cliff facing north over the river Cercal, NW- of Aljezur close to the sea (BR; R. Govaerts: 120).

**Diplotaxis vincentiana** (Couth.) Rothm.

This plant is reported from the Cabo de São Vicente and from near Aljezur (LISE; P. Silva, Fontes & B. Rainha: 4375). It is said to differ in its leafless stems and smaller petals (to 6 mm) but these characteristics can also be found in *D. catholica* and thus they should be considered synonymous even if different chromosome numbers are reported (PARKER, P. F., 1981). Between Sagres and Cabo de São Vicente, *D. siifolia* could be found (BR: R. Govaerts: 121) and near Aljezur, *D. catholica* was rather common.

**Iberis sampiana** Franco & P. Silva

A few large colonies could be found between Sagres and the Cabo de São Vicente, some of which had over 100 individuals. The plant remains rare because of its limited distribution.

## ERICACEAE

**Rhododendron ponticum** subsp. **baeticum** (Boiss. & Reut.) Hand.-Mazz.

The species occurs sporadically on the Serra de Monchique. I saw one specimen along the road to Foia at some 800 m and a larger population of some ten specimens somewhat further down along a stream at some 650 m in a small part of what still remains of the natural forest of *Castanea sativa*, *Fagus sylvatica* and *Quercus suber* (BR; R. Govaerts: 118). In april 1991 I searched for this species in Southern Spain, W- of Algeciras but did not find it there. Although the specimens were in good health, I did not see any young plants nor empty seedpods. The species has the status of rare, which is certainly no exaggeration.

## FABACEAE

**Astragalus algarbiensis** Coss. ex Bunge

I did not find this species and it is certainly endangered in Portugal. In SW-Spain it seems to occur at the mouth of the of the rio de las Cañas and rio Guadarranque rivers, N- of Algeciras although it might be extinct there as it is not even mentioned in the Flora vascular de Andalucía occidental (VALDÈS & al., 1987). There is however a recent record from NW-Morocco (BR; J. Lewallé: 12974).

## EUPHORBIACEAE

**Euphorbia monchiquensis** Franco & P. Silva

This species also occurs from SW-Portugal to SW-Spain. It was first described from the Serra de Monchique. I saw two populations, each consisting of some eight plants. This species looks somewhat like *Euphorbia amygdaloides* which is also said to occur here.

The first population I saw grew along the road to Foia at some 600 m. The second grew along a path SE- of Monchique at the W- side of Mt. Picota. With the first population grew one specimen of *Linaria amethystea*. On Mt. Picota one could see

*Quercus canariensis* (BR; R. Govaerts: 133) and *Quercus faginea* (BR; R. Govaerts: 132) which is a small shrub that grew near the top. Other interesting plants growing in the Serra de Monchique are *Myrica faya*, of which I saw one young specimen SW of Monchique. On the NE- side of Mt. Foia a large population of *Dianthus lusitanicus* could be found growing on an outcrop of white rocks.

#### CISTACEAE

##### *Cistus palhinhae* Ingram

This species is related to *Cistus ladanifer* (BR; R. Govaerts: 147) which is common in Southern Portugal. *C. palhinhae* differs clearly in that it lacks the dark basal spot on the petals. The species can be found from Sabres to the Cabo de São Vicente and somewhat further to the north. It is common all along the coast and even forms the dominant vegetation in some parts (BR; R. Govaerts: 139). The plant has the status of rare mainly because it has a very limited distribution.

##### *Tuberaria major* (Willk.) P. Silva

*T. lignosa* is a common plant in the Serra de Monchique, it looks somewhat like *T. major* but is more compact and the leaves more hairy. *T. major* is a critically endangered species close to disappearance, although it is a very vital species that can grow very quickly. Specimens that I took into cultivation grow much faster than my specimens of *T. lignosa*. I found this species in an open forest of *Pinus pinea*, W- of Faro and NW- of the airport. This forest however was being destroyed. One of the large building projects was a new university. This forest is the last of its kind in Portugal and some of the most interesting and beautiful. The area was scattered with bulbs like *Scilla*, *Dipcadi serotinum* and *Leucojum trichophyllum*. Other rare plants like *Thymus lotocephalus*, *Armeria macrophylla* and *Linaria longepedunculata* could be found growing here. The only reason *Tuberaria major* has become that rare is through the disappearance of its natural habitat which is open forest on a sandy soil. Such forests can also be found further west near Quarteira where they are being filled with villas or intensively used by tourists. This results



in a poor forest where only grasses and sometimes *Armeria macrophylla* and *Thymus villosus* can survive. This will probably also result in the disappearance of *Thymus lotocephalus* and *T. carnosus* from this area.

#### PLUMBAGINACEAE

***Armeria arcuata* Welw. ex Boiss. & Reut.**

This species has only once been collected near Vila Nova de Milfontes. Its taxonomic status is still in doubt.

#### LAMIACEAE

***Thymus camphoratus* Hoffm. & Link**

This too is a very beautiful plant that can form perfect round bushes filled with flowers. It is often a common plant in SW-Portugal and large populations could be found all along the coastal area often with many seedlings invading open or disturbed land. This *Thymus* was certainly more common than any *Arenaria* and merely deserves the status of rare. The most inland population I saw grew on hills south of Bensafirm (BR; R. Govaerts: 115). This area is also the locus classicus of *Scorzonera trans-tagana* but this species is now probably extinct in Portugal and the only remaining population must be considered to be near Benadalid in The Malaga province of southern Spain. *Avellara fistulosa* has probably undergone the same fate. I searched for it near Aljezur without succes and its only remaining known localities are in SW-Spain and WC-Portugal, although it should also be searched for in other rivers of Southern Portugal. Some other interesting plants growing south of Bansafirm were *Biarum tenuifolium*, *Serratula alcalae* and *Gennaria diphylla*.

***Thymus lotocephalus* G. Lopez & R. Morales**

As mentioned before, this plant could be found growing with *Tuberaria major* in open forest of *Pinus pinea*. It is a very beautiful plant and was just coming into flower. It sometimes formed the dominant vegetation. The plant only grows in the Faro region and I first searched for it near Loulé and near Quarteira

but was unable to find it. There is also a record from near Luz (MA; R. Morales & al.: 217912) which is near Lagos but I did not search for it there.

#### SCROPHYLARIACEAE

##### *Linaria algarviana* Chav.

This species is critically endangered. I only found two small specimens east of the Cabo de São Vicente. The species is limited to this area and has never been very abundant but is now critically threatened with disappearance. The species is closely related to *Linaria spatea* (BR; R. Govaerts: 127) which grows over a large area in Portugal and SW-Europe. The only differences I could detect are that *L. algarviana* always has purple flowers. *L. spatea* normally has yellow flowers, however, I found some colour variants near Quarteira in a forest of *Pinus pinea* where villas were being built. One had brownish-yellow flowers, the other purple. The second difference is that, generally *L. spatea* is larger and more erect and *L. algarviana* often has more ascending branches and leafy creeping ones.

##### *Linaria ricardoii* Coutinho

Nearly the entire population can be found within a 30 km radius around Beja. One of the most recent collection was made in 1960 by I. MATOS, A. & R. FERNANDES near Olivelas. I too visited this location which is nearly entirely being used for agriculture. I searched the area for some hours but without success. There was however a small unused area facing north over the Olivelas river which had a diverse bulb vegetation including *Fritillaria lusitanica*, *Tulipa sylvestris* subsp. *australis*, *Hyacinthoides hispanica*, *Scilla autumnalis*, *Scilla monophyllos* and others. Most records of this *Linaria* are from the Serpa area. Unfortunately, I didn't have the time to visit this locality where it can probably still be found. The status of this species is clearly endangered.

It is also in this area that *Gratiola linifolia* can be found. I stopped near Castro Verde along the Cobres river and searched along both banks of the river but again without success. Here again bulbs could be found. Some were even growing in the river

like *Narcissus bulbocodium* subsp. *obesus* (BR; R. Govaerts: 135) and *Narcissus willkommii* (BR; R. Govaerts: 136).

#### ASTERACEAE

*Picris comosa* subsp. *lusitanica* (Welw. ex Schlecht) Talavera

This species can be found from SW-Portugal to SW-Spain and was first described from near São Marcos da Serra along the Odelouca river. I found plants growing on a path that went up the mountainside facing the river. I also saw specimens east of Porto de Lagos on a path in a *Eucalyptus* forest. The species occurs only sporadically and deserves the status vulnerable. The plants were not yet in flower and grew together with *Pulicaria odora* (BR; R. Govaerts: 137). Most specimens seem to die after they have flowered. The species also occurs in the Serra de Monchique, but I did not see it there.

#### LILIACEAE

*Hyacinthoides vincentiana* (Hoffm. & Link) Rothm. & Bellevalia  
*hackelii* Freyn

Both species occur sporadically between Sagres and the Cabo de São Vicente, often in very sandy soil. Both species were in fruit when I visited the area in april. The main features of *Hyacinthoides vincentiana* are the few flowered to 10 cm long flowering spike and yellow anthers. Therefore I cannot give any comment on the status of *Hyacinthoides vincentiana*. It is interesting to note that in the Serra de Monchique large colonies of *Hyacinthoides hispanica* were in flower at that time, making cross polination impossible with the specimens of *Hyacinthoides* on the Cabo de São Vicente.

*Bellevalia hackelii* is clearly a rare plant and certainly deserves the status of vulnerable. Although specimens are said to grow all over South West Portugal, I did not find any outside the area between Sagres and the Cabo de São Vicente.

#### POACEAE

*Helictotrichon hackelii* (Henriq.) Herard

This plant was said to be extinct but ROMERO ZARCO (1989), in this review of *Avenula* in the Iberian peninsula said that it

TABLE 1

Rare and threatened plants of Portugal and their local and world status

Plant name & author	Conservation status	
	Portugal	World
<i>Arenaria algarbiensis</i> Welw. ex Willk.	V	V
<i>Arenaria conimbricensis</i> Brot.	R	R
<i>Arenaria emarginata</i> Brot.	E	V
<i>Armeria arcuata</i> Welw. ex Boiss. & Reut.	Ex	Ex
<i>Armeria linkiana</i> Nieto Feliner	E	E
<i>Astragalus algarbiensis</i> Coss. ex Bunge	E	E
<i>Avellara fistulosa</i> (Brot.) G. Blanca & Diaz	E	E
<i>Bellevalia hackelii</i> Freyn	V	V
<i>Biscutella vincentina</i> (G. Samp.) Rothm.	R	R
<i>Bupleurum acutifolium</i> Boiss.	V	V
<i>Centaurea fraylensis</i> Sch. Bip. ex Nyman	E	E
<i>Cistus palhinhae</i> Ingram	R	R
<i>Euphorbia monchiquensis</i> Franco & P. Silva	V	R
<i>Euphorbia transtagana</i> Boiss.	R	R
<i>Helictotrichon hackelii</i> (Henriq.) Herard.	E	E
<i>Helictotrichon hackelii</i> var. <i>algarbiensis</i> (Romero Zarco) Govaerts	E	E
<i>Herniaria algarvica</i> Chaudri	V	V
<i>Hyacinthoides vincentiana</i> (Hoffm. & Link) Rothm.	V	V
<i>Iberis sampiana</i> Franco & P. Silva	R	R
<i>Jonopsidium acaule</i> (Desf.) Reichb.	E	E
<i>Juniperus naviculare</i> Gand.	V	V
<i>Lavatera mauritanica</i> subsp. <i>davaei</i> (Cout.) Cout.	V	V
<i>Linaria algarviana</i> Chav.	E	E
<i>Linaria ricardoi</i> Cout.	E	E
<i>Loeflingia tavaresiana</i> G. Samp.	E/Ex	E
<i>Picris comosa</i> subsp. <i>lusitanica</i> (Welw. ex Schlecht) Talaveca	V	V
<i>Rhododendron ponticum</i> subsp. <i>baeticum</i> (Boiss. & Reut.) Hand.-Mazz.	V	R
<i>Scorzonera transtagana</i> Cout.	Ex	E
<i>Senecio lopezii</i> Boiss.	V	V
<i>Silene rothmaleri</i> P. Silva	Ex	Ex
<i>Thymus carnosus</i> Boiss.	R	R
<i>Thymus camphoratus</i> Hoffm. & Link	R	R
<i>Thymus lotocephalus</i> G. Lopez & Morales	E	E
<i>Trisetaria dufourei</i> (Boiss.) Paunero	V	V
<i>Tuberaria major</i> (Willk.) P. Silva	E	E

Explanation of the code used:

Ex: extinct; E: endangered; V: vulnerable; R: rare.

was still abundant at its locus classicus near Vila Nova de Milfontes. I visited the area and searched for it the whole day but was unable to find it near the coast. The plant is of course not yet in flower in april and can easily be overlooked or confused with *Ammophila arenaria* subsp. *arundinacea* which is very common in these dunes. ROMERO ZARCO also published a new variety from the Cabo de São Vicente region. Here also I searched without success. Here *H. hackelii* var. *algarbiensis* could easily be confused with the very common *Stipa tenacissima* (BR; R. Govaerts: 145). I did however find *H. hackelii* on a new location NW- of Aljezur some 100 m from the coast on top of a plateau S- of the river Cercal (BR; R. Govaerts: 126).

These plants were just coming into flower and grew close to small shrubs on fixed sand. The glumes were hairly only near the base and thus belonging to var. *hackelii*.

#### **Trisetaria dufourei** (Boiss.) Paunero

I saw this species only near Lagos along the road to the station.

#### NEW COMBINATION USED IN THE ARTICLE

**Helictotrichon hackelii** var. *algarbiensis* (Romero Zarco) Govaerts comb. nov.

basionym: *Avenula hackelii* var. *algarbiensis* Romero Zarco in *Lagascalia* 13(1): 136 (1984).

Typus: (SEV; Romero Zarco: 8381).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank D. SILVERANS, A. VIONNE and R. VAN TONGERLOO from the Library of the National Botanic Garden (Meise, Belgium) for supplying the works I needed for the article. G. BEHEYDT and E. ROBBRECHT for critical comments and help in the preparation of the manuscript. My mother for accompanying me on my trip to Portugal and my father for funding the trip.

#### REFERENCES

BERNIS, F.

- 1949 El genero *Armeria* Willd. en Portugal. *Bol. Soc. Brot.* Sér. 2, 23: 225-263.

- BOLOS, O. & VIGO, J.  
 1984 Flora Països Catalans I.  
 1990 Flora Països Catalans II.
- BUNGE, A.  
 1868 Astrag. Gerant. 1. *Mém. Ac. Imp. Sc. St. Petersb. Sér. 7*; 11 (16), 140 pp.
- CHAUDHRI, M. N.  
 1968 A revision of the Paronychiinae. *Meed. Bot. Mus. Rijksuniv. Utrecht* 285: 321-392.
- FRANCO, J. DO A.  
 1971 Nova Flora de Portugal, 2 vol., Soc. Astória, Lisboa.
- GROSSER, W.  
 1903 Englers Pflanzenr. Cistaceae. Verlag von Wilhelm Engelmann Leibzig, 136 pp.
- JALAS, J. & SUOMIEN  
 1972 Atlas Flora Europaea, 2 vol., Fennica Vanamo, Helsinki.
- JAVIER FERNANDEZ, C.  
 1992 De Flora Iberica Index Cahrtogaphicas. Treballs de l'Institut Bot. Barcelona 15.
- JEANMONOD, D.  
 1985 Revision of *Silene* sect. *Siphonomorpha* IV. *Candollea* 40: 20.
- MALATO BELIZ, J.  
 1982 A Serra de Monchique, Flora e vegetation, Servicio Nacional de Parques Reservas e Patrimonia Paisagisto, Lisboa, 92 pp.
- MORALES, R.  
 1986 Taxonomia *Thymus* en la península Iberica. *Ruizia* 3: 177-215.
- PARKER, P. F.  
 1981 The endemic plants of metropolitan Portugal, a survey. *Bol. Soc. Brot. Sér. 2*, 53(2): 943-994.
- ROMERO ZARCO  
 1984 *Avenula* en el Peninsula iberica. *Lagascalia* 13(1): 136.
- SILVA, A. R. PINTO DA  
 1972 O genero *Armeria* Willd. em Portugal. *An. Soc. Brot. Sér. 2*, 38: 293-314.
- TUTIN, T. & al.  
 1964-1980 Flora Europaea, 5 vol., Cambridge University Press, Cambridge.
- VALDÉS, B.  
 1970 Revision de las especies Europeas de *Linaria* con semillas Alodas. *Anal. Univ. Hisp.*
- VALDÉS, B. & al.  
 1987 Flora vascular de Aldalucia occidental, 3 vol., Ketres, Barcelona.
- I. U. C. N. Botanic Gardens Conservation Secretariat  
 1989 Extinct plant species of the world (survey document).
- I. U. C. N. Botanic Gardens Conservation Institution  
 1992 Rare and threatened plants of Portugal (computer printout).

To whom all correspondence should be addressed.



## ACCELERATION OF $\alpha$ -GLUCOSIDASE ACTIVITY BY DILUTED KETONES

KOSHI SAITO<sup>1</sup> & TOSHIYUKI MORI

Department of Bioscience and Technology, School of Engineering,  
Hokkaido Tokai University, Sapporo 005, Japan

Received, 14-IV-94.

### SUMMARY

$\alpha$ -Glucosidase sample from yeast was incubated in a reaction system containing *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and, in the presence or absence of several ketones, the catalytic profiles were monitored spectrophotometrically for assessing their effects on the hydrolysis of the enzyme substrate.  $\alpha$ -Glucosidase was very sensitive, showing its strict sensitivity towards ketones fed. Under the condition of the present study, the promotion of  $\alpha$ -glucosidase activity by ketones observed was as follows: methyl ethyl ketone acted on  $\alpha$ -glucosidase most promotingly (9.1% increase), diethyl ketone followed this with an increment rate of 6.1%, then dimethyl ketone and methyl vinyl ketone came next (both 5.3%), the efficacies from adipic ketone and dibenzyl ketone decreased further (both 3.8% increase). The findings are quoted to interpret briefly a possible biointeraction between  $\alpha$ -glucosidase and ketones.

### INTRODUCTION

A new indication that acetone enhances the activity of  $\beta$ -glucosidase is an introductory evidence driven from our latest studies, where diluted acetone was fed externally to a reaction system containing  $\beta$ -glucosidase sample and *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (SAITO & MORI, 1993). On dosage of 0.0015% (v/v) acetone, 3.3% net increment of the enzyme activity was observed in the presence of 1 unit per millilitre  $\beta$ -glucosidase.

This was suggested originally from our initial studies on cellular compartmentation of precarthamin in the floral tissues

<sup>1</sup> To whom all correspondence should be addressed.



of dyer's saffron (*Carthamus tinctorius* L., Compositae) (SAITO & KATSUKURA, 1993). Works have shown that aqueous acetone facilitates strikingly the dissociation of precarthamin from the triturated flowers (SAITO, 1993), which led us to examine the influence of acetone on  $\beta$ -glucosidase activity. Although the promotion of  $\beta$ -glucosidase activity by acetone was clear at an experimental level, the question whether or not the potential capacity of acetone ranges widely over other hydrolytic enzymes is not clear. For generalizing the promotive action of acetone on  $\beta$ -glucosidase catalysis, additional studies are requisite to be continued in succession.

This paper will inform the data from new investigations on the facilitative capacities of ketones towards  $\alpha$ -glucosidase-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. Here, six different ketones such as dimethyl ketone, methyl ethyl ketone, diethyl ketone, methyl vinyl ketone, adipic ketone and dibenzyl ketone, are to be tested under the similar experimental conditions as reported precedingly (SAITO & MORI, 1993).

## MATERIALS AND METHODS

### CHEMICALS

Dimethyl ketone, methyl ethyl ketone, diethyl ketone, methyl vinyl ketone, adipic ketone, dibenzyl ketone, sodium dihydrogen phosphate dihydrate and disodium hydrogen phosphate 12-water were purchased from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan).  $\alpha$ -Glucosidase (EC 3.2.1.20, specific activity 50.6 units/mg) from yeast was obtained from Oriental Kobo (Tokyo, Japan). *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside was supplied by Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Ultra pure water used to dissolve or to dilute chemicals was prepared by using an ultra-pure water manufacturing device, Toray Pure, model LV-08 (Toray Co., Tokyo, Japan).

### ASSAY OF ENZYME ACTIVITY

$\alpha$ -Glucosidase activity was assayed spectrophotometrically at 37° C for 1-2 min. The reaction mixtures (3.0 ml) contained 0.003 % (v/v) test ketones, 0.4  $\mu$ mol *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and 50 mM phosphate buffer, pH 6.8. They were put into a quartz vessel and kept at a constant temperature (37° C) in a cuvette

holder, whose surroundings were circulated continuously by warm water stream. After 3.0 min pre-incubation, enzyme reaction was initiated by the addition of 1.0 ml  $\alpha$ -glucosidase (0.2 units). A Hitachi automatic doublebeam UV/VIS spectrophotometer, model U-3500 was used to the spectrometric monitoring, which was done at  $\Delta A$  400 nm for 1-2 min with a sensitivity of Pbs at 2. The spectroscopic responses were used to the determination of the enzyme activity. The influence of ketones on  $\alpha$ -glucosidase catalysis was expressed as the net increment of enzyme activity (fmol/ml/sec) or increment rates (%).

### RESULTS AND DISCUSSION

$\alpha$ -Glucosidase sample from yeast acts positively on *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside to generate a yellow reaction product, *p*-nitrophenol, when incubated in a reaction system at 37° C for 1-2 min. *p*-Nitrophenol thus liberated enzymatically could be detected directly by the spectrophotometric monitoring. The influence of test ketones on the enzyme activity was registered by following the absorbance changes at  $\Delta A$  400 nm during the period of the incubation. Fig. 1 A-F shows the activity profiles of  $\alpha$ -glucosidase towards *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside in the presence or absence of ketones at each 0.003 % (v/v) level. In all cases, glucosidase activity in ketone containing systems is more prominent than those of no ketone fed control. Some differences in the data from ketone fed batches are clear. Specific activities of the enzyme observed under ketone co-existence are listed in Table 1. Methyl ethyl ketone acts on glucosidase most promotingly (9.1 % increase). Diethyl ketone follows this with an increment rate of 6.1 %, then dimethyl ketone and methyl vinyl ketone come next (both 5.3 % increase). The efficacies of adipic and dibenzyl ketones decrease further (both 3.8 % increase). In average, 1.1-fold increase in the activity is brought by the ketone feeding under the condition of the present study.

This study provides additional new findings, indicating that diluted ketones affect the catalytic activity of  $\alpha$ -glucosidase acceleratingly. The data clearly show not only dimethyl ketone (acetone), but also other ketones are potential promoters for glucosidase activities, although discrepancies are obvious in the promotion capacities among ketones tested. These are indicative

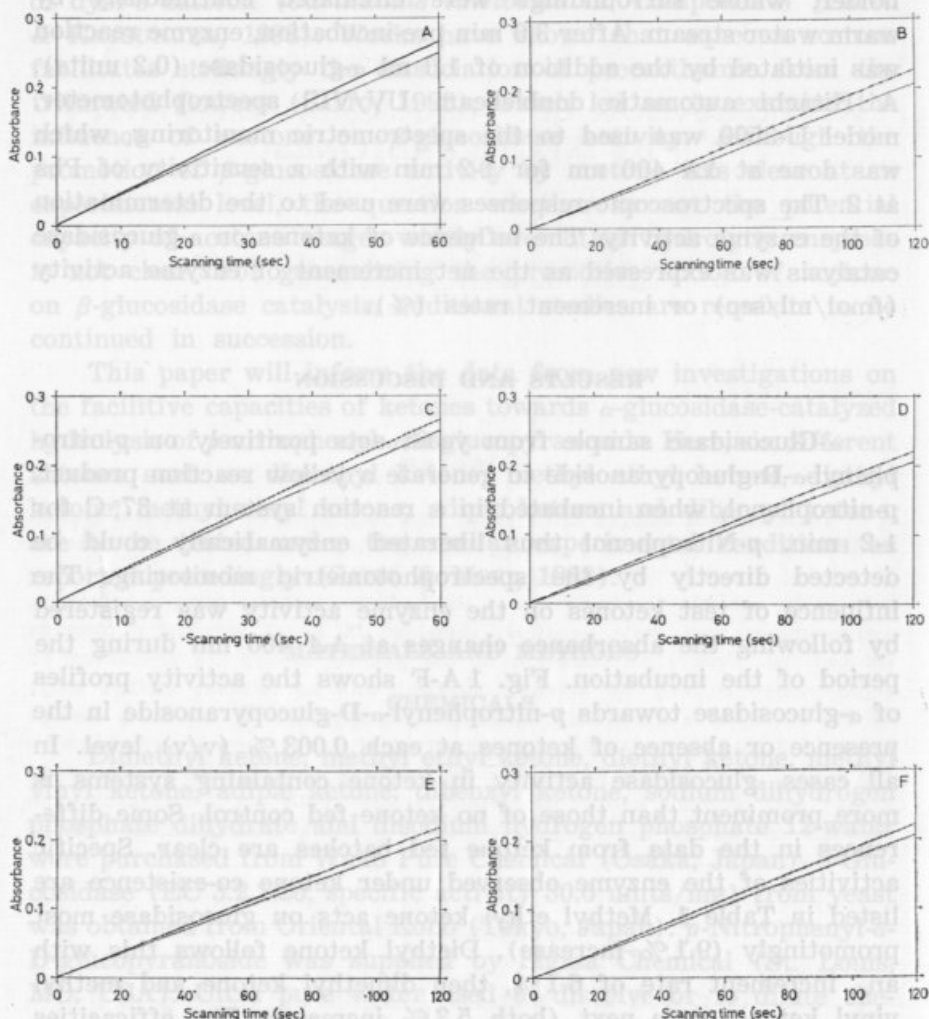


Fig. 1.—Time-dependence on the increment of  $\alpha$ -glucosidase activity by ketones. Each incubation was carried out in a Hitachi spectrophotometer at 37°C for 1-2 min in the presence of 0.003% (v/v) ketones, in addition to the presence of 0.4  $\mu$ mol *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and 50 mM phosphate buffer, pH 6.8 (3 ml). Reactions were initiated just after addition of 0.2 units  $\alpha$ -glucosidase. A. Dimethyl ketone, B. Methyl ethyl ketone, C. Diethyl ketone, D. Methyl vinyl ketone, E. Adipic ketone, F. Dibenzyl ketone.

.....: control.

TABLE 1  
Effect of ketones on  $\alpha$ -glucosidase activity

Ketone	Product yield <sup>1</sup> (fmol <i>p</i> -nitrophenol/ml/sec)	Activity increment (%)
Control	132 ± 0.275	100
Dimethyl ketone	139 ± 0.667	105.3
Methyl ethyl ketone	144 ± 2.502	109.1
Diethyl ketone	140 ± 0.398	106.1
Methyl vinyl ketone	139 ± 1.927	105.3
Adipic ketone	137 ± 2.899	103.8
Dibenzyl ketone	137 ± 3.654	103.8

<sup>1</sup> Data from three repetitions.

of the possibility that molecular forms of ketones are closely related to the glucosidase activity elevation. At present, the mechanism through which the activity increment occurs by ketone supply is not known.

There is a well-recognized reaction in chemical processes to proceed readily. When acetone/sugar mixtures are incubated in acid solutions, acetone binds dehydrolatingly with sugars through the mechanism of di-*O*-isopropylidene derivative formation. Thus, stable acetone/sugar complexes are produced chemically. Perhaps, in part, similar process may operate in the promotion of glucosidase activities by ketones: hydrolytically liberated glucose is bound with ketones and ketone/glucose complexes once appeared, product inhibition of  $\alpha$ -glucosidase is removed, then further hydrolysis of *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside advances. Of course, this does not imply to rule out the direct contribution of ketones. To reveal the interesting mechanism, successive studies are absolutely important. Experimental data from the systematic works alone will bring the secret process of the ketone acceleration to light.

REFERENCES

SAITO, K. & KATSUKURA, M.  
1993 *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 188: 399-404.  
SAITO, K.  
1994 *Biologia Plantarum*, 36: 397-402.  
SAITO, K. & MORI, T.  
1994 *Acta Biochimie Polonica*, submitted.



TABLE I  
Effect of ketones on  $\alpha$ -glucosidase activity

Ketones	Product yield ( $\mu$ mol p-nitrophenol/min)	Activity increment (%)
Control	132 $\pm$ 0.275	100
Dimethyl ketone	130 $\pm$ 0.687	102.3
Methyl ethyl ketone	144 $\pm$ 2.502	109.1
Dibutyl ketone	140 $\pm$ 0.368	106.1
Methyl vinyl ketone	139 $\pm$ 1.937	105.3
Adipic ketone	137 $\pm$ 2.869	103.8
Diphenyl ketone	137 $\pm$ 2.884	103.8

Data from three repetitions.

of the possibility that molecular forms of ketones are closely related to the glucosidase activity elevation. At present, the mechanism through which the activity increment occurs by ketone supply is not known.

There is a well-recognized reaction in chemical processes to proceed readily. When acetone/sugar mixtures are incubated in acid solutions, acetone binds dehydratingly with sugars through the mechanism of di-O-isopropylidene derivative formation. Thus, stable acetone/sugar complexes are produced chemically. Perhaps in part, similar process may operate in the promotion of glucosidase activities by ketones; hydrolytically liberated glucose binds with ketones and ketone/glucose complexes once appeared, product inhibition of  $\alpha$ -glucosidase is removed, then further hydrolysis of p-nitrophenyl-D-glucopyranoside advances. Of course, this does not imply to rule out the direct contribution of ketones. To reveal the interesting mechanism, successive studies are absolutely important. Experimental data from the systematic work alone will bring the secret process of the ketone acceleration to light.

SATO, K.  
1964 Biologia Plantarum, 26: 397-402.  
SATO, K. & MORI, T.  
1964 Acta Biologica Polonica, submitted.



PHENOMORPHOLOGICAL ASPECTS  
OF THREE SPECIES IN A SHRUBLAND OF *GENISTO  
HYSTRICIS-CYTISETUM MULTIFLORI* RIVAS MARTÍNEZ  
IN RIVAS MARTÍNEZ ET AL. IN A DEHESA OF SALAMANCA

F. CARO DOMINGUEZ, M.ª A. SANCHEZ-ANTA, F. GALLEGO MARTIN  
& F. NAVARRO ANDRES

Departamento de Biología Vegetal (Biología General). Campus Miguel de Unamuno.  
Universidade de Salamanca. (37007). Salamanca, España

Received, 9-V-94.

ABSTRACT

Data are provided on the phenology of the flowering and other phenophases of three taxons [*Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet, *Cytisus scoparius* (L.) Link and *Genista hystrix* Lge.] which form part of the *Genisto hystricis-Cytisetum multiflora* shrubland of the dehesa in Salamanca (Spain). These species follow a seasonal flowering pattern characteristic of Mediterranean shrubs. The degree of overlapping and the relationship of the different phenophases with temperature are also analysed. During these two years the activity of these species began when the average monthly temperature exceeded 7.5° C and ended when it exceeded 21.5° C.

Key words: Phenology, *C. multiflorus*, *C. scoparius*, *G. hystrix*, dehesa, Salamanca.

H1. — INTRODUCTION

The type of exploitation in dehesa and dehesa-like land is a complex biotic continental Mediterranean region. In the province of Salamanca, the dehesa, as a system of agricultural exploitation, comprises 23,73 % of the whole in the Iberian Peninsula and acquires particular characteristics due to its geographical location (SW of the High Plateau) and the edapho-climatic factors which condition the existence of an ecosystem in which *Quercus rotundifolia* Lam. is predominant (BALCELLS, 1977).

It has been confirmed that the dehesas are being populated by underbrush, i. e. the shrubland is advancing alarmingly, occupying areas where pastureland was predominant.

Our objective is to find out the degree of invasion of shrubs of *Genisto hystricis-Cytisetum multiflori* Rivas Martínez in Rivas Martínez *et al.*, 1984 in a dehesa in the province of Salamanca («El Campillo»). In order to achieve this aim we consider it necessary to study the phenological behaviour of the species predominant in that shrubland [*Cytisus multiflorus* (L'Hér) Sweer, *Cytisus scoparius* L. Link and *Genista hystrix* Lge.]

In these species, aspects related to their vegetative growth, flowering and fruit-bearing will be studied; we know of no similar studies on Genisteae in the Iberian Peninsula. ORSHAN (1989) studied these aspects in *C. scoparius*, *C. villosus* Pourret, *G. scorpius* (L.) DC. and in *G. pilosa* L. in the south of France.

In the Iberian Peninsula the main studies on phenology known to us are those of MORENO (1984), DEVESA *et al.* (1985), HERRERA, J. (1986, 1987), ARROYO (1988), HERRERA, C. M. (1984, 1988) and JORDANO (1990) who studied shrublands in the south of Spain. GUITIAN *et al.* (1990) have also worked on these aspects in shrublands in the Bierzo, in the north-west of Spain.

## H2. — STUDY AREA AND METHODOLOGY

In order to carry out this study we established a unit of study, a unit of time and the correspondence between biotic and abiotic events and the months of the year.

Our study area was a one-hectare plot on the «El Campillo» ranch (40° 59' N, 2° 23' W), in the province of Salamanca, municipal district of Sando, 841 m above sea level. The plot was fenced off in order to avoid any type of aggression and was divided into 10 m-square sub-plots for better control of the specimens under study. From a geological point of view it is included in the southern part of the Sayago-Ledesma-Vitigudino crystalline batholith, Salamanca-Zamora segment of the Hercynic Massif. The characteristics of the soil correspond to those of distric cambisol. The content of phosphorous and calcium in this soil is low, and that of potassium somewhat higher. The richness in nitrogen is variable, although it tends to be low, resulting in poor soil. The texture is sandy with a predominance of coarse sand,

drainage is rapid and depth varies, generally from shallow to medium (ESCUADERO BERIAN, 1983).

The bioclimatic characteristics of «El Campillo» were determined by data facilitated by the Instituto Meteorológico Zonal of Valladolid taken at the meteorological stations closest to the ranch ( $N > 24$  years), and also by data collected during 1990 and 1991 in a meteorological box installed on the ranch itself.

The mean annual precipitation is 505 mm, the dry period being June, July and August. The mean monthly temperatures of the coldest month (December) and the hottest month (July) are 2.8° C and 21.5° C, respectively. In accordance with these data and in the line of RIVAS MARTINEZ (1987), our study area was situated on the lower level of the supra-Mediterranean floor with dry ombroclimate and cold winters. From a biogeographical point of view it is included in the Salamanca sector.

In order to carry out the phenomorphological observations we visited the study area during the period between March 1990 and July 1991 every one or two weeks up to a total of 54 times. We carefully observed all the specimens on the plot, marking at random 23 of *C. multiflorus*, 21 of *G. hystrix* and 22 of *C. scoparius*, which were all the species on the plot. During the two years we carried out observations in the same area and on the same specimens.

In order to describe the organs and phenophases of the plants we used the terminology of ORSHAN *et al.* (1989).

The overlapping of flowering was calculated according to the method proposed by PRIMACK (1980).

Three phases were considered for the study of the phenology of flowering: initial, maximum and final.

### III. — RESULTS AND DISCUSSION

#### *C. multiflorus*

Budding takes place in March. The dolichoblasts begin to grow during the first days of May, and the majority branch, an occurrence which takes place between the end of May and the beginning of June.

The leaves develop in April, begin to droop in June and by the end of July they have already fallen.



In 1990 flowering began at the end of March in two of the specimens marked (8.69 %). During the first week in April the maximum of specimens in flower was reached, only six, which represents 26.08 %; of these only four bore fruit — although with a very low number of legumes — during the period between the last week in April and the first two weeks in May. Dehiscence of the legumes took place at the end of July. 73.91 % of the specimens monitored did not flower that year.

In 1991 flowering began later (the last week in April) and in greater proportion than the year before (40.9 %). All the specimens had flowered by the middle of May. Fruit-bearing, which exceeded 50 %, began in mid May and the maximum was reached in the last week in June. Dehiscence took place in the month of July (Figs. 1 and 2).

The high temperatures reached in February and in the first twenty days of March in 1990 (up to 22.5° C) led to premature initial flowering of *C. multiflorus*; the generalized frosts at the end of March (reaching -3.5° C) and occasional frosts in April explain the general failure of this species to flower and bear fruit that year.

### **S. scoparius**

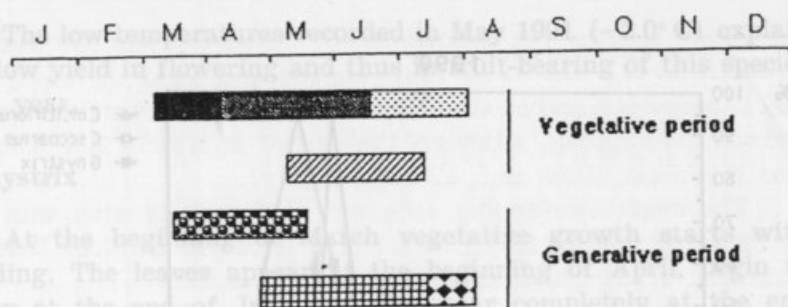
Budding becomes visible at the beginning of March. The dolichoblasts begin to grow in mid May and generally branch some thirty days after the beginning of growth. These young branches may remain as assimilating shoots for two years.

The leaves appear in April, begin to droop in June, and by July they have disappeared from the plant.

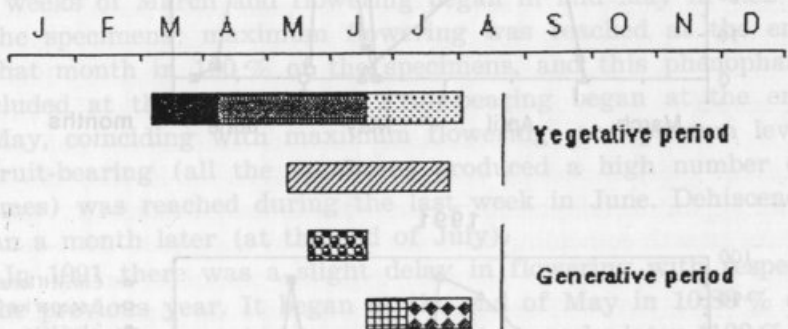
In 1990 flowering began in mid May in 40 % of the specimens and a week later maximum flowering was reached (all the specimens were in flower). The beginning of fruit-bearing coincided with the period of maximum flowering and lasted until the second fortnight in June. The percentage of fruit-bearing reached 56.56 %.

In 1991 the periods for the beginning of flowering, maximum flowering and fruit-bearing coincided with those of 1990 although the percentages reached did not, being 4.5 %, 9 % and 4.34 %, respectively (Figs. 1 and 2).

*Cytisus multiflorus*



*Cytisus scoparius*



*Genista hystrix*

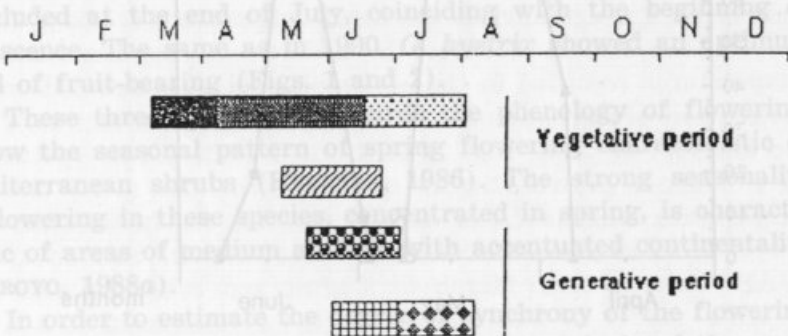
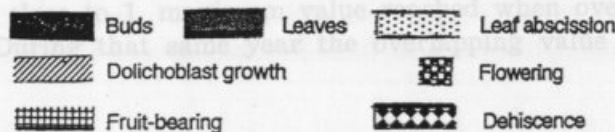


Fig. 1. — Phenomorphological observations in *C. multiflorus*, *C. scoparius* and *G. hystrix*.



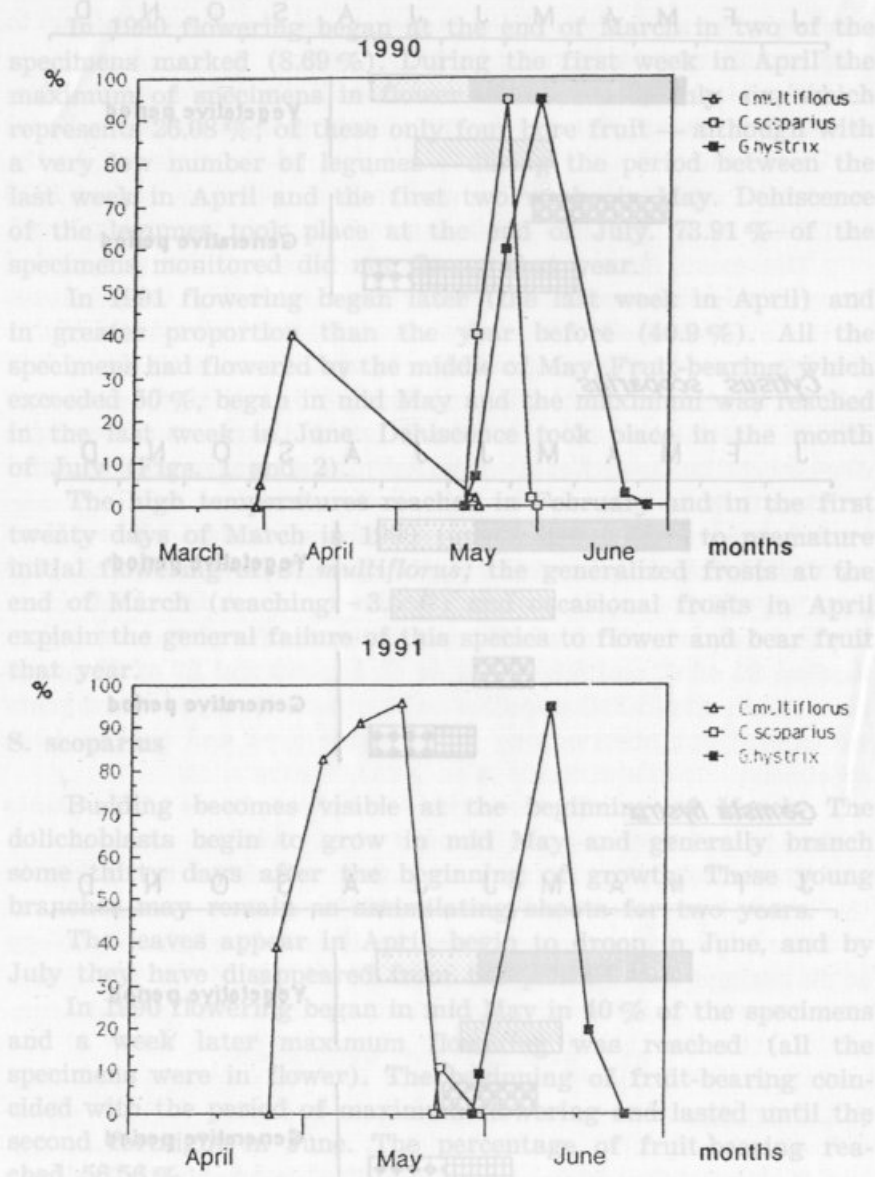


Fig. 2. — Percentage of specimens in flower during flowering in 1990 and 1991 of the three study species.

The low temperatures recorded in May 1991 ( $-2.0^{\circ}\text{C}$ ) explain the low yield in flowering and thus in fruit-bearing of this species that year.

### G. hystrix

At the beginning of March vegetative growth starts with budding. The leaves appear at the beginning of April, begin to droop at the end of June and disappear completely at the end of July. Growth of the dolichoblasts begins in May and ends in the third week in June.

In 1990 the first flower buds appeared during the second two weeks of March and flowering began in mid May in 6.52 % of the specimens; maximum flowering was reached at the end of that month in 100 % of the specimens, and this phenophase concluded at the end of June. Fruit-bearing began at the end of May, coinciding with maximum flowering; an optimum level of fruit-bearing (all the specimens produced a high number of legumes) was reached during the last week in June. Dehiscence began a month later (at the end of July).

In 1991 there was a slight delay in flowering with respect to the previous year. It began at the end of May in 10.80 % of the specimens and reached its maximum two weeks later (100 %); this phenophase concluded at the end of June. Fruit-bearing began in mid June coinciding with maximum flowering; this period concluded at the end of July, coinciding with the beginning of dehiscence. The same as in 1990, *G. hystrix* showed an optimum level of fruit-bearing (Figs. 1 and 2).

These three species, as regards the phenology of flowering, follow the seasonal pattern of spring flowering characteristic of Mediterranean shrubs (HERRERA, 1986). The strong seasonality of flowering in these species, concentrated in spring, is characteristic of areas of medium altitude with accentuated continentality (ARROYO, 1988a).

In order to estimate the degree of synchrony of the flowering of the different taxons in the community, we calculated the overlapping of their flowering. In 1990 the greatest overlapping occurred between *C. scoparius* and *G. hystrix*, with a value of 0.75 (very close to 1, maximum value reached when overlapping is total). During that same year the overlapping value between

the other species (*C. multiflorus*-*C. scoparius* and *G. hystrix*-*C. multiflorus*) was 0. In 1991, on the one hand *C. multiflorus* and *C. scoparius*, and on the other hand, *C. scoparius* and *G. hystrix* showed overlapping, although the degree in which this occurred was minimum (0.14 and 0.2 respectively).

The mean overlapping observed in our study area was 0.12 in 1990 and 0.06 in 1991, from which it can be deduced that the flowering of the three species scarcely coincides.

We consider it of interest to relate the phenophases corresponding to the vegetative and the generative periods.

*C. multiflorus* and *C. scoparius* show a common behaviour pattern in which the vegetative phase precedes the generative phase, although in *C. multiflorus* the generative period is earlier and more prolonged than in *C. scoparius*. This pattern coincides with the one observed by FLORET *et al.* (In ORSHAN, 1989) in *C. scoparius* and *C. villosus* in populations in the south of France.

*G. hystrix* has a behaviour pattern similar to that of the *Cytisus* species studied, although it is different in that the duration of the development of the dolichoblast is shorter, the end of its growth coinciding with the period of maximum fruit-bearing. This pattern does not coincide with the one observed by FLORET *et al.* (l. c.) for *G. scorpius* and *G. pilosa* in populations in the south of France.

RIVAS MARTINEZ *et al.*, 1984, point out that a notable increase is evident in the biomass on the supra-Mediterranean floor of the Mediterranean region when the mean temperature is above 7.5° C.

The relationship between the different phenophases and the temperatures recorded in the meteorological box installed on the ranch itself are given in Tables 1 and 2 (Figures 3 and 4). From the analysis of these data it is deduced that, in the species we have studied, growth begins exactly when the mean monthly temperature exceeds 7.5° C and in general, concludes when this temperature is above 21.5° C, thus their vegetal activity period (VAP) extends from March to August and coincides with that of other plants in these latitudes (RIVAS MARTINEZ l. c.); the phenological phases of these species develop when the precipitation values are low (Tables 1 and 2) (Figures 3 and 4).

Of the three species studied, *G. hystrix* shows the latest flowering, which is massive, with a high number of flowers and an optimum percentage of fruit-bearing, from which we can deduce

TABLE 1

Phenological phases of the species studied in relation to temperature and rainfall (1990)

Month	Temperature (°C)			Rainfall (mm)	<i>C. multiflorus</i>	<i>C. scoparius</i>	<i>G. hystrix</i>
	Min.	Mean	Max.				
J	-0.69	2.88	6.39	29.45	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
F	2.16	7.03	11.94	4.76	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
M	1.25	7.81	14.48	9.61	buds and flowering	buds	buds
A	1.90	7.71	13.30	10.2	leaves and fruit-bearing	leaves developed	leaves developed
M	4.98	12.59	19.34	25.42	dolichoblast growth	flowering, fruit-bearing and dolichoblast growth	flowering and dolichoblast growth
J	8.87	16.79	24.73	20.7	leaf abscission	leaf abscission	fruit-bearing and leaf abscission
J	13.03	21.98	30.90	9.92	absence of leaves and dehiscence	absence of leaves and dehiscence	dehiscence
A	12.76	21.38	29.97	12.9	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
S	10.48	18.64	26.45	15.7	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
O	1.18	10.93	15.73	85.7	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
N	0.58	5.63	10.32	64.41	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
D	-1.79	2.69	7.08	17.0	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves

Fig. 3.—Phenological behaviour of studied species related to air temperature and rainfall (1990).

TABLE 2  
Phenological phases of the species studied in relation to temperature and rainfall (1991)

Month	Temperature (°C)			Rainfall (mm)	<i>C. multiflorus</i>	<i>C. scoparius</i>	<i>G. hystrix</i>
	Min.	Mean	Max.				
J	-1.35	2.61	6.56	58.9	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
F	-1.26	3.53	8.31	61.1	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
M	3.38	7.76	11.87	124.8	buds	buds	buds
A	1.16	7.52	13.88	24.4	beginning of flowering	leaves developed	leaves developed
M	4.62	12.25	19.88	28.7	flowering, fruit-bearing and dolichoblast growth	flowering, fruit-bearing and dolichoblast growth	flowering and dolichoblast growth
J	9.38	17.80	26.18	18.0	leaf abscission	leaf abscission	fruit-bearing and leaf abscission
J	12.3	20.7	29.2	10.0	absence of leaves and dehiscence	absence of leaves and dehiscence	dehiscence
A	13.34	22.3	31.32	15.08	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
S	8.13	15.49	25.1	22.05	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
O	1.15	7.82	14.3	89.4	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
N	0.61	5.60	10.29	48.6	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves
D	-1.64	2.50	7.18	21.5	absence of leaves	absence of leaves	absence of leaves

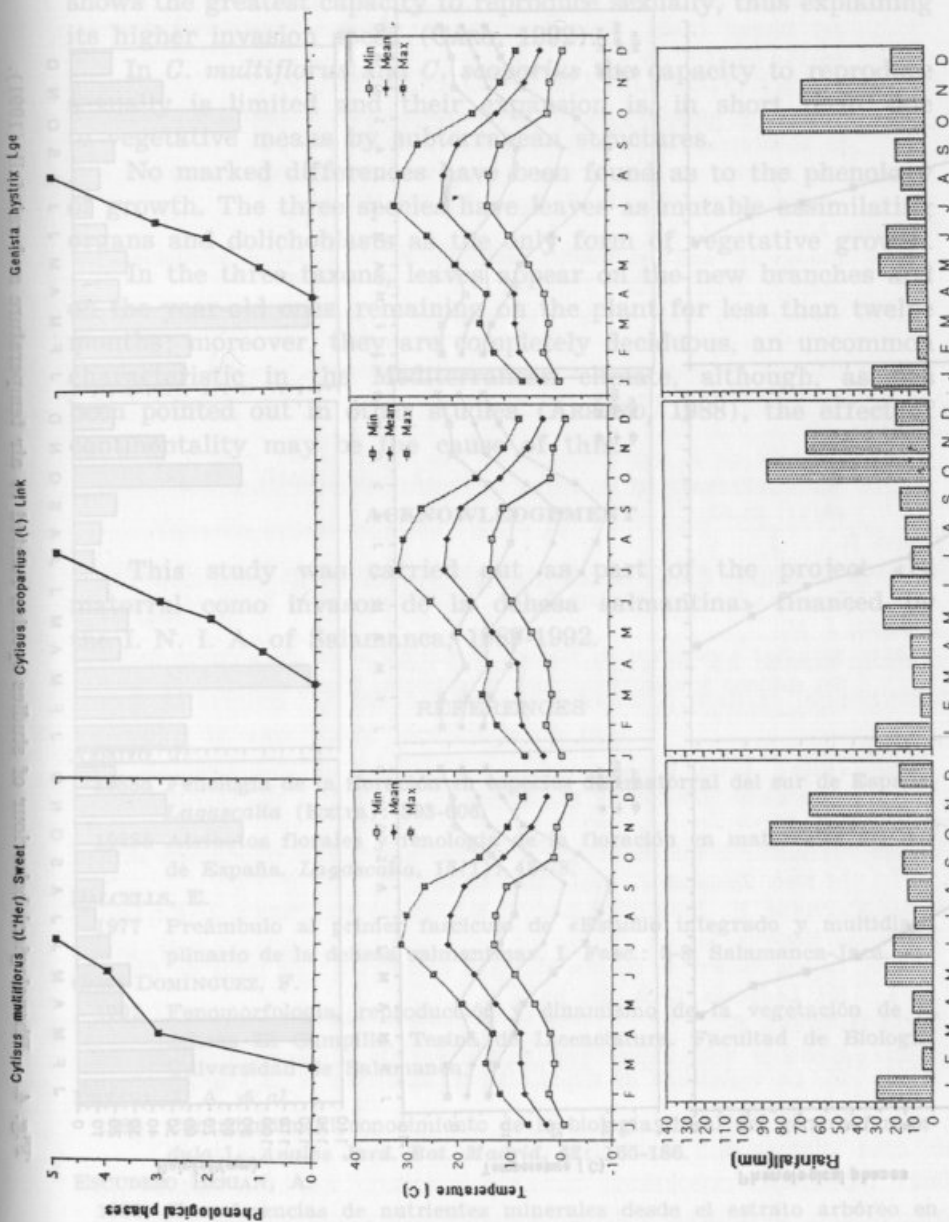


Fig. 3.—Phenological behaviour of studies species related to air temperature and rainfall (1990).



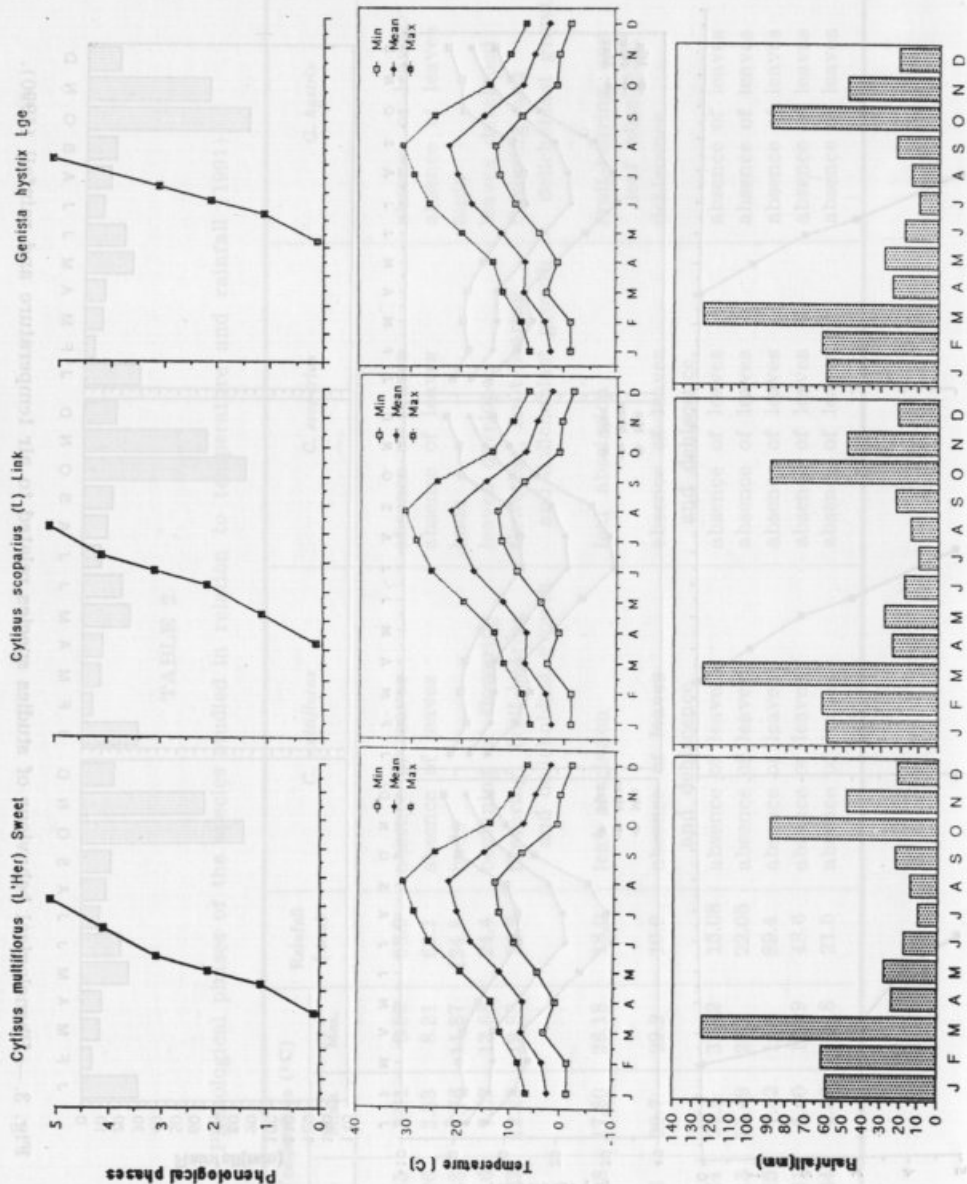


Fig. 4. — Phenological behaviour of studies species related to air temperature and rainfall (1991).

that this endemic Iberian *orensano-sanabriense* is the one which shows the greatest capacity to reproduce sexually, thus explaining its higher invasion speed (CARO, 1992).

In *C. multiflorus* and *C. scoparius* the capacity to reproduce sexually is limited and their expansion is, in short term, due to vegetative means by subterranean structures.

No marked differences have been found as to the phenology of growth. The three species have leaves as mutable assimilating organs and dolichoblasts as the only form of vegetative growth.

In the three taxons, leaves appear on the new branches and on the year-old ones, remaining on the plant for less than twelve months; moreover, they are completely deciduous, an uncommon characteristic in the Mediterranean climate, although, as has been pointed out in other studies (ARROYO, 1988), the effect of continentality may be the cause of this.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study was carried out as part of the project «El matorral como invasor de la dehesa salmantina» financed by the I. N. I. A. of Salamanca, 1989-1992.

#### REFERENCES

- ARROYO, J.  
 1988a Fenología de la floración en especies del matorral del sur de España. *Lagascalia* (Extra): 593-606.  
 1988b Atributos florales y fenología de la floración en matorrales del sur de España. *Lagascalia*, 15(1): 43-78.
- BALCELLS, E.  
 1977 Preámbulo al primer fascículo de «Estudio integrado y multidisciplinario de la dehesa salmantina». I. Fasc.: 5-8. Salamanca-Jaca.
- CARO DOMINGUEZ, F.  
 1992 Fenomorfología, reproducción y dinamismo de la vegetación de la dehesa El Campillo. Tesina de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca.
- DEVESA, J. A. & al.  
 1985 Contribución al conocimiento de la biología floral del género *Lavandula* L. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 42: 165-186.
- ESCUADERO BERIAN, A.  
 1983 Transferencias de nutrientes minerales desde el estrato arbóreo en el monte adehesado (ecosistemas de pastizales semiáridos). Tesis Doctoral. Depto. Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca.

- GUITIAN, J. & GUITIAN, P.  
 1990 Fenología de la floración y fructificación en plantas de un espinal del Bierzo (León, North-west Spain). *Anales Jard. Bot. Madrid*, 48(1): 53-61.
- HERRERA, C. M.  
 1984 A study of avian frugivores bird-dispersed plants and their interaction in Mediterranean shrublands. *Ecol. Monogr.*, 54: 1-23.  
 1988 The fruiting ecology of *Osyris quadripartita* individual variation and evolutionary potential. *Ecology*, 69: 233-249.
- HERRERA, J.  
 1986 Flowering and fruiting phenology in the coastal shrubland of Doñana, south Spain. *Vegetatio*, 68: 91-98.  
 1987a Flower and fruit biology in southern Spanish Mediterranean shrublands. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 74: 69-78.  
 1987b Biología reproductiva del matorral de Doñana. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 44(2): 483-497.
- JORDANO, P.  
 1990 Biología de la reproducción de tres especies del género *Lonicera* (Caprifoliaceae) en la Sierra de Cazorla. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 48(1): 31-52.
- LIETH, H.  
 1974 Phenology and Seasonality Modeling. Chapman & Hall Limited London. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York. 444 pp.
- MORENO, J. M.  
 1984 Estudios ecológicos en jarales: variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas. Fundación J. March, Ser. Universitaria 180.
- ORSHAN, G.  
 1989 (Edit). Plant Pheno-morphological studies in Mediterranean type ecosystems. *Geobotany* 12. 403 pp.
- PRIMACK, R. B.  
 1980 Variation in the phenology of natural populations of montane shrubs in New Zealand. *J. Ecol.*, 68: 849-862.
- RIVAS-MARTINEZ, S.; DIAZ GONZALEZ, T. E.; FERNANDEZ PRIETO, J. A.; LOIDI, J.; PENAS MERINO, A.  
 1984 La vegetación de la alta montaña cantábrica. Los picos de Europa. Ed. Leonesas. León, 295 pp.
- RIVAS-MARTINEZ, S.  
 1987 Nociones sobre fitosociología, biogeografía y bioclimatología. 19-47. In: La vegetación de España. RIVAS-MARTINEZ, S. & PEINADO LOPEZ, M. (Edits.).

## NÚMEROS CROMOSSÓMICOS PARA A FLORA PORTUGUESA. 128-138

por

MARGARIDA QUEIRÓS

Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra

Recebido em 9-5-94.

### 128. *Nigella damascena* L.

Número cromossómico:  $2n = 12$ .

Material: Estremadura, Monsanto. N.º 4863 (coi). N. d. <sup>1</sup>. Det. M. Queirós.

Observações: A nossa contagem confirma as nossas observações anteriores (QUEIRÓS, 1990) referentes a plantas portuguesas, embora de uma outra localidade do país.

#### BIBLIOGRAFIA:

QUEIRÓS, M. 1990 — Notas cariológicas em algumas *Ranunculaceae* portuguesas. *Coll. Bot.* 18: 45-57.

### 129. *Delphinium pentagynum* Lam.

Número cromossómico:  $2n = 16$ .

Material: Estremadura, Serra de Monsanto. N.º 5097 (coi). N. d. Det. M. Queirós.

Observações: O número cromossómico encontrado está de acordo com as nossas contagens anteriores (QUEIRÓS, 1990, op. cit.) em indivíduos colhidos em outra localidade portuguesa.

<sup>1</sup> N. d. Não datado.

130. **Delphinium halteratum** Sm. subsp. **verdunense** (Balbis)  
Graebner & Graebner

*Número cromossómico:*  $2n = 16$ .

*Material:* Beira Alta, estrada Celorico-Guarda, a 12 km da Guarda. N.º 5632 (COI). 7.9.1991. Det. M. Queirós.

*Observações:* Confirmamos os resultados que registámos em 1990 (op. cit.), em indivíduos de uma outra localidade do país.

131. **Clematis campaniflora** Brot.

*Número cromossómico:*  $2n = 16$ .

*Material:* Estremadura, Jardim Botânico de Lisboa. N.º 4859 (COI). N. d. Det. M. Queirós.

*Observações:* Confirmamos o número cromossómico determinado por nós em 1990 (op. cit.) em plantas de uma outra localidade de Portugal.

132. **Ranunculus ficaria** L. subsp. **bulbifer** Lambinon

*Número cromossómico:*  $2n = 24$  (fig. 1);  $2n = 32$  (fig. 2).

*Material:* Beira Litoral, São Paulo de Frades, arredores de Coimbra. N.º 3351 (COI). 10.12.1969. Det. M. Queirós; Algarve, Monchique, Ribeira de Pisões. N.º 2235 (COI). 22.4.1968. Det. M. Queirós.

*Observações:* Os números cromossómicos encontrados estão de acordo com as observações de diversos autores entre os quais citamos NEVES (1942, 1944) cujos estudos se referem a plantas portuguesas diplóides, triplóides e tetraplóides de outras localidades do país. O autor estabelece as guarnições cromossómicas das formas  $2n = 16$ ,  $2n = 24$  e  $2n = 32$ .

BIBLIOGRAFIA:

- NEVES, J. DE B. 1942 — Sobre a cariólogia de *Ranunculus ficaria* L. *Bol. Soc. Brot.*, sér. 2, 16: 169-181.  
— 1944 — Contribuição para o estudo cário-sistemático das espécies portuguesas do género *Ranunculus* L. Diss. Univ. Coimbra, 200 p.

133. *Ranunculus flammula* L.

Número cromossômico:  $2n = 32$  (fig. 3).

**Material:** Douro Litoral, Vila Nova de Gaia, Miramar. N.º 2357 (COI). 21.8.1967. Det. M. Queirós.

**Observações:** São numerosos os autores que estudaram esta espécie com resultados sempre concordantes. NEVES (1944, op. cit.; 1945) determinou o mesmo número cromossômico ( $2n = 32$ ) em indivíduos de várias localidades portuguesas. Os nossos resultados concordam com as contagens anteriores referentes a uma outra localidade de Portugal.

## BIBLIOGRAFIA:

NEVES, J. DE B. 1945 — Sur l'origine de *Ranunculus dichotomiflorus* Lag.  
*Bol. Soc. Brot.*, sér. 2, 19: 729-752.

134. *Ranunculus repens* L.

Número cromossômico:  $2n = 32$ .

**Material:** Douro Litoral, Valongo, Carvoeira. N.º 4033 (COI). N. d. Det. M. Queirós; Beira Litoral, entre Ançã e Portunhos. N.º 3433 (COI). 25.2.1970. Det. M. Queirós.

**Observações:** O número cromossômico encontrado coincide com o indicado nas nossas observações anteriores (QUEIRÓS, 1990, op. cit.) referentes a plantas portuguesas, embora de outras localidades.

135. *Ranunculus bulbosus* L. subsp. *aleae* (Willk.) Rouy & Fouc.  
var. *adscendens* (Brot.) Pinto da Silva

Número cromossômico:  $2n = 16$ .

**Material:** Baixo Alentejo, Santa Margarida da Serra. N.º 5101 (COI). N. d. Det. M. Queirós.

**Observações:** Em 1990 (op. cit.), determinámos para este taxon  $2n = 16$ . Confirmamos, assim, as nossas contagens anteriores em indivíduos de uma outra localidade do país.

136. *Ranunculus trilobus* Desf.

*Número cromossómico*:  $2n = 48$  (fig. 4).

*Material*: Estremadura, Oeiras. N.º 3832 (COI). 25.6.1968.  
Det. M. Queirós; Baixo Alentejo, Monte dos Alhos. N.º 5103 (COI).  
N. d. Det. M. Queirós.

*Observações*: Confirmamos os resultados registados por NEVES (1944, op. cit.) em indivíduos de numerosas localidades portuguesas das regiões norte e centro sob a designação de *R. sardous* Crtz. O material utilizado nesse estudo comporta, segundo o autor, a representação das três sub-espécies incluídas na «Flora de Portugal» de PEREIRA COUTINHO (1939): subsp. *genuinus*, *xatartii* (Lap.) Rouy et Fouc. e *trilobus* (Desf.).

## BIBLIOGRAFIA:

PEREIRA COUTINHO, A. X. 1939 — *Flora de Portugal*, 1.ª e 2.ª ed. Lisboa.

137. *Aquilegia vulgaris* L. subsp. *dichroa* (Freyn) T. E. Díaz

*Número cromossómico*:  $2n = 14$ .

*Material*: Beira Litoral, Buçaco. N.º 3330 (COI). 1.8.1969.  
Det. M. Queirós.

*Observações*: Confirmamos o resultado das nossas observações anteriores (QUEIRÓS, 1990, op. cit.), agora numa população de uma outra localidade portuguesa.

138. *Paeonia broteroi* Boiss. & Reut.

*Número cromossómico*:  $2n = 10$  (fig. 5).

*Material*: Beira Litoral, Souselas. N.º 1817 (COI). 20.3.1968.  
Det. M. Queirós.

*Observações*: O número cromossómico encontrado está de acordo com as observações anteriores (FERNANDES & QUEIRÓS, 1971), referentes a exemplares portugueses, embora de uma outra

localidade. Não nos foi possível encontrar quatro pares de cromossomas satelitíferos observados então em indivíduos de populações de Monchique.

BIBLIOGRAFIA:

- FERNANDES, A. & QUEIRÓS, M. 1971 — Sur la caryologie de quelques plantes récoltées pendant la IIIème Réunion de Botanique Péninsulaire. *Mem. Soc. Brof.* 21: 343-385.

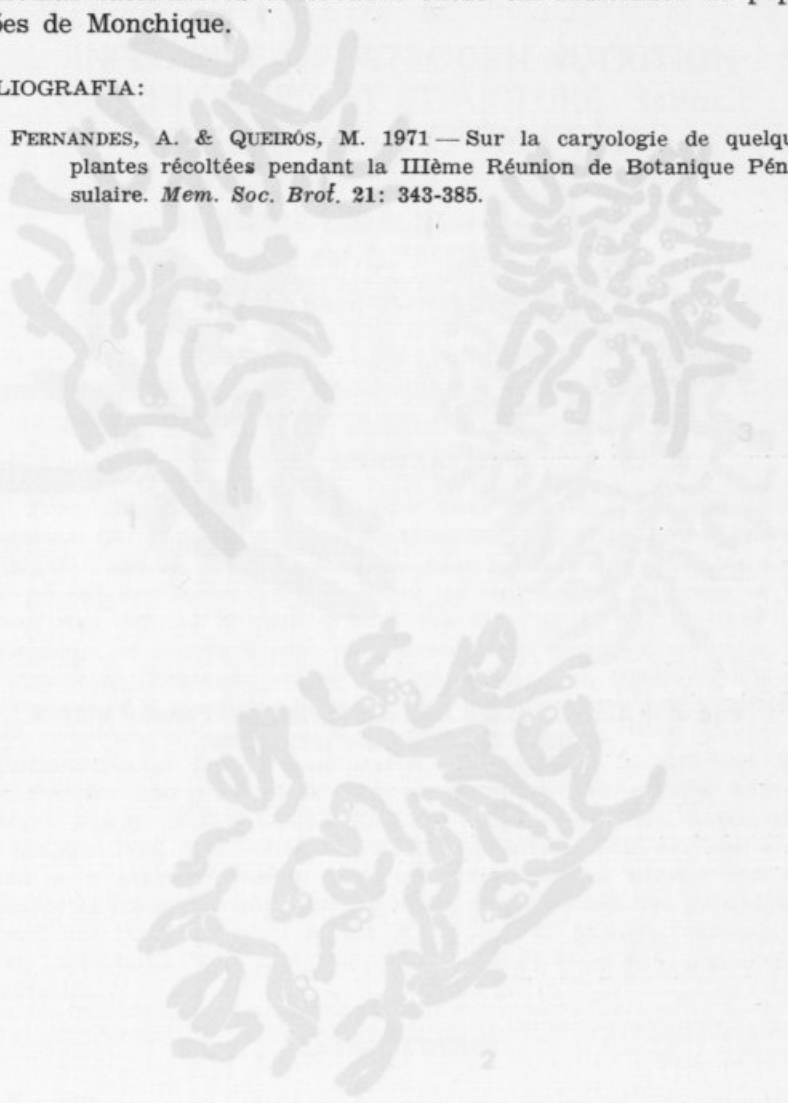


Fig. 1. — *Ranunculus ficaria* L. subsp. *bulbifer* Lombinos (2n = 24).

Fig. 2. — *Idem* (2n = 32). Fig. 3. — *R. flammula* L. (2n = 32).

× 3000.



localidade. Não nos foi possível encontrar quatro pares de cromossomas satelitares observados então em indivíduos de populações de Mondique.

Número cromossômico:  $2n = 48$  (fig. 4).

**Material:** Estremadura, Oeiras, N.º 2832 (col.).  
Det. M. Queirós; Baixo Alentejo, Monte das Albas, N.º 5103 (col.).  
Det. M. Queirós; Baixo Alentejo, Monte das Albas, N.º 5103 (col.).  
FRANXANUS, A. & QUEIRÓS, M. 1971 - Sur la cytologie de quelques plantes récoltées pendant la IIIème Région de Botanique de l'Alentejo.

**Observações:** Confirmamos os resultados registados por NEVES (1944, op. cit.) em indivíduos de numerosas localidades portuguesas das regiões norte e centro sob a designação de *R. sardous* Crz. O material utilizado nesse estudo comporta, segundo o autor, a representação das três sub-espécies incluídas na «Flora de Portugal» de PEREIRA COUTINHO (1939): subsp. *geminus*, *cataliti* (Lap.) Rouy et Fouc. e *trilobus* (Desf.).

#### BIBLIOGRAFIA:

PEREIRA COUTINHO, A. X. 1939 - Flora de Portugal, 1.ª e 2.ª ed. Lisboa.

137. *Aquilegia vulgaris* L. subsp. *dielsiana* (Frey) T. E. Díaz

Número cromossômico:  $2n = 14$ .

**Material:** Beira Litoral, Búgaco, N.º 3330 (col.). 1.8.1969.  
Det. M. Queirós.

**Observações:** Confirmamos o resultado das nossas observações anteriores (QUEIRÓS, 1990, op. cit.), agora numa população de uma outra localidade portuguesa.

138. *Paeonia broteroi* Boiss. & Reut.

Número cromossômico:  $2n = 10$  (fig. 5).

**Material:** Beira Litoral, Souselas, N.º 1817 (col.). 20.3.1968.  
Det. M. Queirós.

**Observações:** O número cromossômico encontrado está de acordo com as observações anteriores (FRANXANUS & QUEIRÓS, 1971), referentes a exemplares portugueses, embora de uma outra

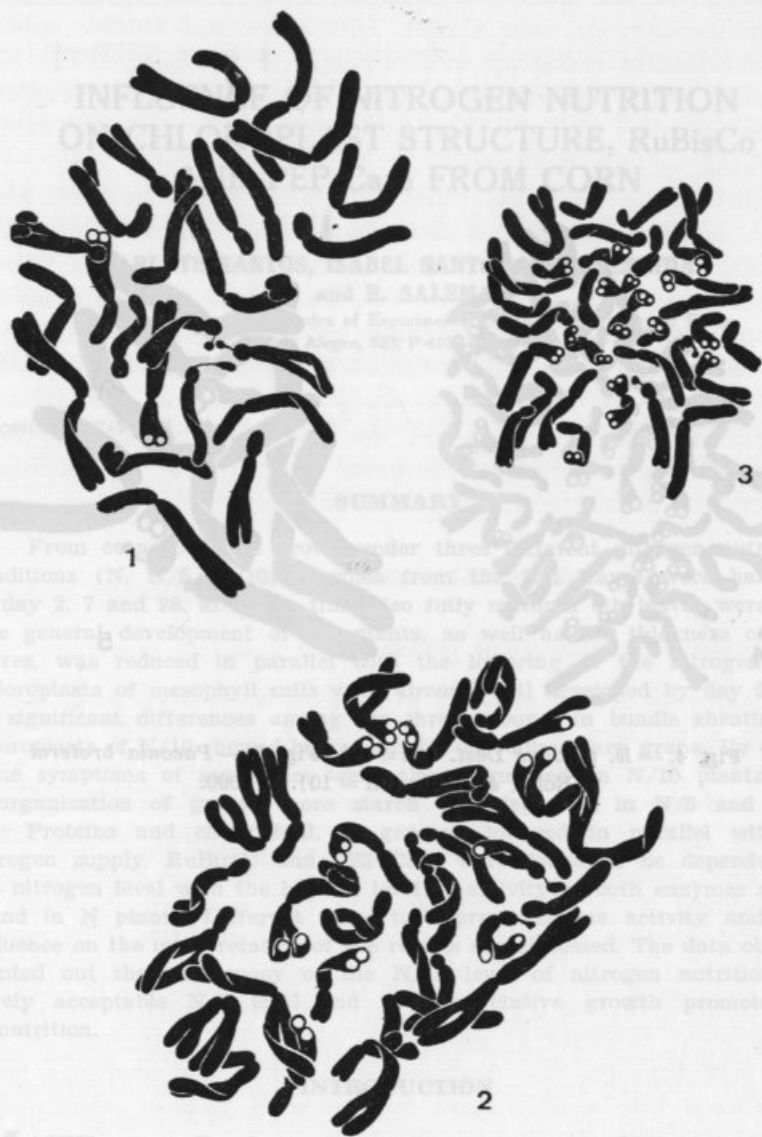


Fig. 1. — *Ranunculus ficaria* L. subsp. *bulbifer* Lambinon ( $2n = 24$ ).  
Fig. 2. — *Idem* ( $2n = 32$ ). Fig. 3. — *R. flammula* L. ( $2n = 32$ ).

× 3000.

MAIZE, as a  $C_4$  plant, possesses two types of photosynthetic  
cooperates in the multi-step ways of  $CO_2$  assimilation. In  
mesophyll cells the photosynthetic membranes are organized like  
their counterparts in  $C_3$  plants, i. e., with grana and stroma



4



5

Fig. 4. — *R. trilobus* Desf. ( $2n=48$ ). Fig. 5. — *Paeonia broteroi* Boiss. & Reut. ( $2n=10$ ).  $\times 3000$ .

Fig. 1. — *Ranunculus ficaria* L. subsp. *bulbosus* Lamb. ( $2n=24$ ).  
 Fig. 2. — *R. ficaria* L. ( $2n=24$ ).  
 Fig. 3. — *R. ficaria* L. ( $2n=24$ ).  
 $\times 3000$ .

## INFLUENCE OF NITROGEN NUTRITION ON CHLOROPLAST STRUCTURE, RuBisCo AND PEP-Case FROM CORN

ARLETE SANTOS, ISABEL SANTOS, J. M. ALMEIDA

and R. SALEMA

Institute of Botany and Centre of Experimental Cytology, University of Porto,  
R. Campo Alegre, 823, P-4100 Porto, Portugal

Received, 17-VI-94.

### SUMMARY

From corn seedlings grown under three different nitrogen nutritional conditions (N, N/5, N/10) samples from the 2nd leaves were harvested at day 2, 7 and 28, at which time also fully matured 6th leaves were used. The general development of the plants, as well as the thickness of their leaves, was reduced in parallel with the lowering of the nitrogen level. Chloroplasts of mesophyll cells were already well developed by day 2, with no significant differences among the three groups; in bundle sheath cells, chloroplasts of N/10 showed higher number of rudimentary grana. By day 28 some symptoms of senescence were already noticed on N/10 plants, with disorganization of grana; more starch was deposited in N/5 and N/10.

Proteins and chlorophyll, in general, lowered in parallel with the nitrogen supply. RuBisCo and PEP-Case were found to be dependent on the nitrogen level with the highest level of activity of both enzymes always found in N plants. Different ways to express enzyme activity and their influence on the interpretation of the results are discussed. The data obtained pointed out the inadequacy of the N/10 level of nitrogen nutrition, the barely acceptable N/5 level and good vegetative growth promoted by N nutrition.

### INTRODUCTION

**M**AIZE, as a C<sub>4</sub> plant, possesses two types of photosynthetic cells (mesophyll and bundle sheath cells) associated with dimorphic chloroplasts (LAETSCH, 1974), which functionally cooperate in the multi-step pathways of CO<sub>2</sub> assimilation. In mesophyll cells the photosynthetic membranes are organized like their counterparts in C<sub>3</sub> plants, i. e., with grana and stroma

thylakoids. In the chloroplasts of the bundle sheath cells grana are rudimentary or even absent. Ultrastructural studies concerning chloroplast ontogeny in *Zea mays* (BRANGEON, 1973; KIRCHANSKI, 1975) indicate that young bundle sheath chloroplasts at first develop grana which are progressively reduced during maturation of the leaf tissue.

Nitrogen is the most important mineral element for plant growth and a strong positive correlation between nitrogen nutrition and plant productivity has been ascertained. It is well known that the level of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation is dependent on the chloroplast activity which eventually conditions plant productivity. Since *Zea mays* is one of the most important cereal crops, the aim of the present work was to study the effects of the different nitrogen nutrition levels on the maturation of the chloroplasts, on protein and chlorophyll contents, on PEP-case and RuBisCo activity and on the general growth of this plant.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Plant material and growth conditions

Caryopsis of *Zea mays* L. cv. LG 12 were sown in pots containing a mixture of vermiculite-quartz sand which had been previously saturated with distilled water; three groups were made and one of them was, henceforth, watered with Hoagland's solution (HOAGLAND and ARNON, 1950) containing, besides other ions, 14.47 mM of  $\text{NO}_3^-$  and 1.04 mM of  $\text{NH}_4^+$  (N group), other set watered with a similar solution but modified in order to have the nitrogen concentration reduced to one fifth (N/5 group) and the third group (N/10 group) received a solution with nitrogen ions reduced to one tenth. All of them were kept in controlled environment cabinets at darkness. After the emergence of the first leaf through the ruptured coleoptile, the seedlings were transferred into a light/dark regime with 13 h of photoperiod of a photon flux density of  $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

After 2, 7 and 28 days of growth under this regime, second leaves were harvested for ultrastructural study and biochemical determinations. The sixth fully expanded leaves from plants 28 days old were also used for ultrastructural and biochemical studies.

### Transmission electron microscopy

For TEM, samples were collected, always at the same distance from the apical region of the leaf. All samples were fixed in 4% glutaraldehyde in 1.25% PIPES buffer pH 7.2 (SALEMA and BRANDÃO, 1973), left for 2 h at room temperature and then for 12 h at 4°C. Washing in the same buffer was followed by a post-fixation in 2% OsO<sub>4</sub> in 1.25% PIPES buffer pH 7.2 for 2 hrs at room temperature. Afterwards, the material was routinely embedded in Epon 812.

### Pigment extraction and quantification

Known amounts of leaf material were carefully homogenized in 80% acetone with 1% v/v of 25% ammonia solution and chlorophyll determined as described by HODGINS and VAN HUUSTEE (1986).

### Protein quantification

Leaf material was homogenized in NaOH 1M; after dilution to 0.1M, protein quantification was determined by the method of BRADFORD (1976).

### Enzyme extraction

PEP-Case (phosphoenolpyruvate carboxylase; EC 4.1.1.31) was extracted as described by ARNOZIS *et al.* (1988), plus 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone. RuBisCo (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase; EC 4.1.1.39) was extracted in media described by SUZUKI *et al.* (1987), plus 20 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (PERCHOROWICZ *et al.*, 1982), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 40 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone. For RuBisCo determination, the homogenate was centrifuged at 10 000 g and 21-22°C for 90 s. In both cases the supernatants were used for the respective assays.

### Enzyme assays

All measurements were done by following the change in absorbance of NADH at 340 nm at 25°C. PEP-Case assay was performed using the method of ARNOZIS *et al.* (1988). In the

assay, 10 U malate dehydrogenase were used according to JIAO and CHOLLET (1988). For RuBisCo, the activation of the enzyme was done according to DELANEY and WALKER (1978) and the quantification according to LILLEY and WALKER (1974) but with 0.21 mM NADH, 7.6U of phosphoglycerate kinase, 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 0.5  $\mu\text{moles}$  of 5-ribose phosphate. The activity of the enzymes was assayed in, at least, six different plants.

### Stereological analysis

Stereological measurements were done according to WILLIAMS (1977). A random sampling of chloroplasts profiles was obtained and enlarged to a final magnification of 7000  $\times$ . Fractional volume (Vv) of starch/chloroplast were estimated using a 0.5 cm square lattice and calculating the frequency of point hits on starch and plastids.

## RESULTS

The growth of the plants was reduced when the nitrogen supply was diminished. Fig. 1, Plate I clearly illustrates that the seedlings after 2 days under light/dark conditions are more developed in group N and much less in group N/10. Indeed, not only the height of the seedlings was affected but the thickness of their leaves as well. In these plants leaf thickness was 0.12 mm, 0.11 mm and 0.10 mm respectively in groups N, N/5 and N/10. From day 2 to day 7 further development of leaves occurred in all groups and their thickness was kept different, albeit by a smaller value (N = 0.13 mm; N/5 = 0.12 mm; N/10 = 0.11 mm).

Ultrastructural observations of leaves from seedlings grown for 2 days, showed plastids already fairly differentiated but the organization of the lamellar system did not differ significantly between the 3 groups.

After 7 days of growth the mesophyll chloroplasts of all 3 groups had a well differentiated membrane system, with increased number of compartments in their grana, a situation which was particularly notorious in N/10 material (Pl. I, figs. 2a, b); plastoglobuli also increased in number and size from day 2 to day 7 but with no noticeable differences between the groups.

A concurrent differentiation was also observed in bundle sheath chloroplasts; their profiles showed an elongated ellipsoidal shape, containing single thylakoids which extend through the entire length of the plastid and only very few rudimentary grana, with two or three adressed thylakoids, as can be exemplified by plastids from N group (Pl. I, fig. 3a). These rudimentary grana were observed in the three groups of plants but a careful screening in various chloroplast profiles showed that they were more frequent in N/10 group (Pl. I, fig. 3b); occasionally, eight thylakoids became adressed and organized in a granum.

The effect of the nitrogen nutrition was also studied in the second leaves after 28 days of growth. By this time leaves displayed visual symptoms of senescence, more prominent in the N/10 group and less so in the N material (Pl. II, fig. 4a). Ultrastructurally the most significant alteration, in comparison with leaves collected after 7 days (Pl. I, fig. 2a), was the increased size of plastoglobuli in the chloroplasts from all groups of plants. Mesophyll chloroplasts from N/10 plants (Pl. II, fig. 4b) showed a certain degree of disorganization of the membrane system with no defined grana, in contrast to chloroplasts from N and N/5 material. By contrast, chloroplasts in bundle sheath cells had grana with some adressed thylakoids persisting.

Since after 28 days the second leaf showed morphological and ultrastructural symptoms of senescence in N/10 material, a much younger leaf (the 6th) was chosen, which still had a typical organization of chloroplasts, in both mesophyll and bundle sheath cells, the latter with abundant starch (Pl. II, figs. 5a, b); the starch content was significantly higher in plants grown under lower nitrogen supply conditions (N/5 and N/10). In fact, the stereological analysis of the fractional volume starch/chloroplast showed a 3 fold and a 4 fold increase of starch in N/5 and N/10 chloroplasts, respectively, relative to the N group (N plants  $V_v=6.5\%$ ; N/5 plants  $V_v=18.03\%$ ; N/10 plants  $V_v=22.96\%$ ).

The influence of nitrogen nutrition was also assessed through the quantification of some biochemical parameters. Since the size of the leaves and their thickness was affected by the three nitrogen levels used, the biochemical results were expressed on a fresh weight basis, per leaf and the activity of the enzymes on a chlorophyll basis.



The amount of protein (Table 1) was significantly different in each plant group after 2, 7 and 28 days when considered on a per leaf basis; the highest level appeared always in N leaf and the lowest always in N/10 material. When expressed on a fresh weight basis the situation appeared different by day 2 since N and N/10 leaves had similar values and N/5 the lowest one. However, after 7 days, leaves of the N group showed the highest content and the other two groups had similar values. At day 28, N and N/5 groups had similar values and the N/10 the lowest one.

Chlorophyll, when expressed on a per leaf basis, always had the highest values in N leaves, and the lowest in N/10 plants (Table 1). When the amounts of these pigments are considered on a fresh weight basis the lowest value appeared in N/10 leaves and no differences were found between the other two groups after 2 days. This pattern of variation was reversed after 7 days, at which time the amount of chlorophyll was similar in N/5 and N/10 and the highest value appeared in N plant group. After 28 days the N group had the highest content of chlorophyll

TABLE 1

Protein and chlorophyll contents in the second leaf of plants grown under different nitrogen conditions (N, N/5, N/10). Values are means  $\pm$  SE. In each line values denoted by different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

	Days	N	N/5	N/10
Proteins	2	3.17 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2.48 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>
mg/leaf	7	6.59 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	5.70 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	4.97 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>
(n = 9)	28	5.80 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	4.16 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	2.77 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>
Proteins	2	15.75 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	13.96 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	15.03 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>
mg/g f. w.	7	16.82 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	14.94 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	15.01 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>
(n = 9)	28	8.86 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	8.66 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	5.78 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
Chlorophyll	2	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
mg/leaf	7	0.95 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
(n = 12)	28	6.48 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	4.71 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	2.97 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
Chlorophyll	2	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
mg/g f. w.	7	2.38 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	1.74 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
(n = 12)	28	10.11 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	8.15 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>	5.46 $\pm$ 0.71 <sup>c</sup>

and the very slight difference observed at the day 7 between N/5 and N/10 appeared now highly increased by an amount of about 37% (Table 1):

As for as enzyme activities are concerned, the highest value of RuBisCo (Pl. III, fig. 6) was always found in N plants. After 2 and 7 days the activity in N/5 plants was higher than in N/10 ones, whereas at the 28th day these two groups showed similar values; the described pattern was observed when the RuBisCo activity was considered on a per leaf basis, as can be seen in Fig. 6A (Pl. III). A different relationship among the 3 groups appeared when the activity was expressed per mg of chlorophyll (Pl. III, fig. 6B). In fact, after 2 and 7 days similar values of RuBisCo activity for both N and N/5 were found; for N/10 a higher value appeared at the 2nd day and a lower one at the 7th day. The activity was similar in all plants after 28 days. When expressed on a fresh weight basis (Pl. III, fig. 6C), no significant difference between N and N/10 was quantified for RuBisCo activity after 2 days; the value was higher than in N/5 material. The activity attained close values in all groups after 7 days and after 28 days increased by about 59% in the N leaves which had the highest level and the other two groups had similar values.

The highest activity for the PEP-Case was always found in N leaves whatever the reference to express it; on a per leaf basis (Pl. III, fig. 7A) similar values appeared in the other two plant groups at day 2 whereas by the 7th day N/5 plants possessed a higher activity than N/10 plants. After 28 days the relationship between these 2 groups (N/5 and N/10) was reversed. Considering the activity per mg of chlorophyll (Pl. III, fig. 7B), no differences between the plants of groups N/5 and N/10 were found, after 2, 7 and 28 days. However, as can be seen in Fig. 7C (Pl. III) when the activity was considered on a fresh weight basis the N/10 group had the highest value. The activity of RuBisCo and PEP-Case were also determined in the sixth leaves (Table 2). The former enzyme showed no differences in the 3 groups when activity was expressed in terms of chlorophyll. On a fresh weight basis, the values decreased from N to N/5 to N/10 leaves, with no significant differences between the latter two. Relating the activity to the leaf area, the figures showed the lowest value in N/10 group.

TABLE 2

RuBisCo and PEP-Case activities from 6th leaves of maize plants grown during 28 days at N, N/5 and N/10 conditions. Values are means  $\pm$  SE. In each column values denoted by different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

RuBisCo	nkat/mg chlorophyll	nkat/g f. w.	nkat/cm <sup>2</sup>
N	3.61 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	14.75 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	0.315 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
N/5	3.26 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	12.81 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>	0.296 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
N/10	3.46 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	11.91 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	0.244 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
PEP-Case	nkat/mg chlorophyll	nkat/g f. w.	nkat/cm <sup>2</sup>
N	56.16 $\pm$ 6.0 <sup>a</sup>	176.60 $\pm$ 20.50 <sup>a</sup>	4.51 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>
N/5	29.84 $\pm$ 3.12 <sup>b</sup>	99.43 $\pm$ 12.75 <sup>b</sup>	2.45 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>
N/10	36.43 $\pm$ 3.10 <sup>c</sup>	99.50 $\pm$ 11.22 <sup>b</sup>	2.45 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>

When the activity of PEP-Case was expressed in terms of chlorophyll the highest value was found in N leaf, the next in N/10 and the lowest in N/5. On a fresh weight basis similar values for N/5 and N/10 plants were obtained although these were exceeded by the N plants by some 77%. When expressing PEP-Case activity on an area basis, the former relationship was maintained, N/5 and N/10 with similar values and N with a value 84% higher.

#### DISCUSSION

The data obtained with the present work showed that the three levels of nitrogen assayed did not impede the structural development of chloroplasts but, nevertheless, did interfere with the acquisition of their functionality as reflected by the interference with chlorophyll and protein levels as well as with activity of RuBisCo and PEP-Case. It was reported by LAWLOR *et al.* (1988, 1989) for wheat that nitrogen deficiency decreased the size of leaves and slowed growth, however in a lesser manner than protein synthesis. In our study *Zea mays* behaved similarly in what concerns plant growth and the size of leaves. Leaf size, reflected in leaf weight, was more affected than the level of proteins which appeared different in each plant group only when expressed on a per leaf basis, although these differences were less pronounced

than those found for leaf weight itself (SANTOS *et al.*, 1992). Protein level on a fresh weight basis appeared lower in N/5 after 2 days, whereas similar values were found for N and N/10. This result can be understood if we take into consideration several aspects including the relative weight, the size and the thickness of the leaves. In fact, due to different growth rate, leaves of N/10 plants have a higher number of cells per unit of fresh weight than the N/5 and N leaves, a situation leading to a higher figure when protein was expressed on a per fresh weight basis. Certainly, the protein synthesis in N leaf is higher than in N/10, as found when expressed as protein/leaf; in the latter plants, when proteins are expressed on a fresh weight basis, the true situation is obscured because the smaller cell development gives rise to values similar to the ones of N group. The relative situation of the protein content in the 3 groups is better perceived when comparing the values expressed on a per leaf basis, where the N plants stand out as the better ones. The increase of protein level with the rise of nitrogen supply as described by others (LAWLOR *et al.*, 1988, 1989; SANTOS and SALEMA, 1991) became more evident with further development.

It is known that in higher plants light serves as an environmental stimulus which regulates development, particularly the development of active chloroplasts from proplastids or etioplasts. The illumination of dark-grown plants causes the accumulation of chlorophyll and synthesis of several proteins (TOBIN and SILVERTHORNE, 1985; GRUISSEM, 1989 and references therein). The accumulation of proteins and the appearance of even new ones in *Zea mays* occurred upon illumination of the etiolated seedlings (SANTOS *et al.*, 1992) together with the accumulation of chlorophyll. The values quantified for protein and chlorophyll led us to admit that during this initial phase of growth (2 days) protein synthesis and development of chloroplasts will prevail upon cell enlargement. In fact, after 2 days both mesophyll and bundle sheath chloroplasts appeared already differentiated and their level of organization was similar in all plant groups and, in general, in agreement with observations described for etioplast-chloroplast transformation in maize leaves (RASCIO *et al.*, 1984). One difference caused by different nitrogen supply concerns the fractional volume of chloroplasts, which appeared diminished by decreasing N level. This result agrees with what has been reported

for other plants (CHONAN *et al.*, 1977; TERASHIMA and EVANS, 1988; SANTOS and SALEMA, 1991).

The amount of photosynthetic pigments decreased with the diminution of nitrogen, similarly to the described for other species (TERASHIMA and EVANS, 1988; EVANS and TERASHIMA, 1988; SANTOS and SALEMA, 1991). Differently to proteins, the lowest value appeared in N/10, after 2 days. From the 2nd to the 7th day chlorophyll increased in the three plant groups reaching a higher value in N leaves. Concomitantly an increase in number of thylakoids per granum occurred in mesophyll chloroplasts, which was more evident in N/10 leaves in spite of the lower level of chlorophyll found in them. As N/10 leaves had chloroplasts with the smallest size (data not shown), the membranes where chlorophyll molecules have to be integrated will possibly have a tendency to be more tightly packed, resulting in a higher number of thylakoids/granum ratio. These results are in disagreement with what was described for spinach (TERASHIMA and EVANS, 1988). Bundle sheath chloroplasts with rudimentary grana were also seen and quite frequently in N/10 leaves they had higher number of adressed thylakoids. Previous study in *Zea mays* (BRANGEON, 1973) showed that chloroplasts of the bundle sheath pass through a grana-forming stage and that grana progressively disappeared along the differentiation. Based on this one can admit that by day 7 these organelles in N/10 plants had not get yet fully differentiated, possibly due to deficient nitrogen supply. Also, as it is known that the degree of grana formation in  $C_4$  plants is dependent on light (Woo *et al.*, 1971) it is possible that the rudimentary grana observed were not only a consequence of the low nitrogen level but also a result of the artificial lighting used. Another difference concerned starch content which was higher in leaves supplied with lower nitrogen level, results concordant with the reports for other species under nitrogen deficiency (RUFTY *et al.*, 1988 and references therein).

The effect of nitrogen supply on the activity of carbon assimilating enzymes has been studied in other species (LAWLOR *et al.*, 1989; EVANS and TERASHIMA, 1988). In maize, SUGIHARTO *et al.* (1990) reported the N-dependent selective change in levels of PEP-Case and pyruvate orthophosphate dikinase; RuBisCo was less affected by nitrogen status of leaves. Under our experimental conditions the PEP-Case activity was also more sensitive to

nitrogen level than RuBisCo. In *Zea mays* leaves RuBisCo appeared only upon illumination (SANTOS *et al.*, 1992) as also observed in *Amaranth* cotyledons (BERRY *et al.*, 1990). Besides this it is also known that light induces the synthesis of numerous nuclear- and plastid-encoded proteins (TOBIN and SILVERTHORNE, 1985; BERRY *et al.*, 1985).

Two days upon illumination the RuBisCo activity in the 3 groups of plants showed a relationship similar as the observed for proteins and these relative activities could be explained based on the same reasons already referred to above in relation to proteins. Also, when expressed per mg of chlorophyll the highest activity appeared in N/10 leaves, certainly as a result of the lowest level of those pigments in these plants. After 7 days RuBisCo activity appeared reversed with the lowest value in N/10 leaves and similar activity in the other 2 groups. It seems that protein RuBisCo is mostly synthesized during the initial period of light growth (2 days) whereas the chlorophyll was not.

PEP-Case behaved differently; its activity was always higher in plants supplied with the highest nitrogen level. However, the difference between N and both N/5 and N/10 plants was much higher than the difference between the two latter groups. It seems that a high level of nitrogen is needed for plants to reach high PEP-Case activity. Considering N and N/10 plants or N and N/5 we can say that our results agrees with the findings of SUGIHARTO *et al.* (1990) who used 2 nitrogen levels, one 20 fold lower than the other. Comparing the relative activities of PEP-Case and RuBisCo, in the 3 groups of plants, a different behaviour for the former was found even when considered on a leaf basis, which could be due to the fact that the former enzyme is involved in other metabolic pathways besides photosynthesis.

The main features of leaf senescence are the breakdown of chlorophyll (KURA-HOTA *et al.*, 1987; EVANS, 1983; MAKINO *et al.*, 1984), change in activity of RuBisCo (EVANS, 1983; MAKINO *et al.*, 1984), disorganization of grana and increase in number and size of plastoglobuli (HASHIMOTO *et al.*, 1989). N/10 leaves after 28 days displayed almost all of the referred to above metabolic symptoms, clearly showing an earlier senescence than in N and N/5 leaves, results which are well correlated with the general aspect of leaves. In fact, N/10 leaves were yellowish with somewhat dried up tips by this time; nevertheless RuBisCo

activity was similar to N/5 group. The early senescence might well be due to the necessity to recycle the nitrogen content to support the growth of the newer leaves (LAWLOR *et al.*, 1987).

The study of the 6th leaf collected after 28 days showed that RuBisCo activity (on chlorophyll basis) was similar in all plants. This is certainly due to different developmental stage of the plants. In fact, attention should be paid to the fact that the 6th leaves have different plastocronic ages in the plants of the 3 groups because time of leaf emergence is affected by the nutritional conditions used. This interpretation was supported by the values found when the activity was considered by leaf area. PEP-Case in this 6th leaf behaved also differently from RuBisCo, as observed for the 2nd leaf.

Some caution should be exercised when comparing data referring activity, as well as protein and chlorophyll contents, since figures can be deeply influenced by the way they were arrived at. Nitrogen strongly affects plant growth and it is also known that, due to the particular pattern of expansion of monocotyledon leaves a growth gradient is established in them which must be considered in comparative studies under conditions provoking different growth rates. It was observed that under our experimental conditions the emergence of leaves is retarded and its further expansion decreased with the diminution of the nitrogen levels, a situation also found in soybean plants (RUFY *et al.*, 1984). It can easily be seen in our results that considering only one method of expressing the results (for instance, per mg of chlorophyll, or g fresh weight, or per leaf) will lead to figures that might give an erroneous picture. Since the aim of the experiments was to know how plants were affected by nitrogen level, the more appropriate data appeared when expressed on a per leaf basis, which was the closest to the whole plant that could be expediently done.

The results taken altogether point to the inappropriateness of the N/10 nutrient solution for sustained growth. In spite of the values found for chlorophyll, proteins and activity of RuBisCo and PEP-Case in N/5 plants, in the long run the N/5 level only allowed an acceptable vegetative development. N level promoted a higher vigor of the plants but it remains to be seen if their yield is sufficiently accrued to compensate the higher energy input.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The skillful assistance of Mrs. ANDREA COSTA is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

- ARNOZIS, P. A.; NELEMANS, J. A.\* and FINDENEGG, G. R.  
 1988 Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in plants grown with either  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  as inorganic nitrogen source. *J. Plant Physiol.* **132**: 23-27.
- BERRY, J. O.; BREIDING, D. E. and KLESSIG, D. F.  
 1990 Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in *Amaranth* cotyledons. *The Plant Cell* **2**: 795-803.
- BERRY, J. O.; NICKOLAU, B. J.; CARR, P. J. and KLESSIG, D. F.  
 1985 Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in light- and dark-grown *Amaranth* cotyledons. *Mol. Cell Biol.* **5**: 2238-2246.
- BRADFORD, M. M.  
 1976 A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-253.
- BRANGEON, J.  
 1973 Compared ontogeny of the two types of chloroplasts of *Zea mays*. *J. Microscopie* **16**: 233-242.
- CHONAN, N.; KAWAHARA, H. and MATSUDA, T.  
 1977 Effect of nitrogen application on ultrastructure of the chloroplasts in rice plants. *Japanese Journal Crop Sci.* **46**: 387-392.
- DELANEY, M. E. and WALKER, D. A.  
 1978 Comparison of the kinetic properties of ribulose bisphosphate carboxylase in chloroplast extracts of spinach, sunflower and four other redutive pentose phosphate-pathway species. *Biochem. J.* **171**: 477-482.
- EVANS, J. R.  
 1983 Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **72**: 297-302.
- EVANS, J. R. and TERASHIMA, I.  
 1988 Photosynthetic characteristics of spinach leaves grown with different nitrogen treatments. *Plant Cell Physiol.* **29**: 157-165.
- GRUISSEM, W.  
 1989 Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* **56**: 161-170.
- HASHIMOTO, H.; KURA-HOTTA, M. and KATOH, S.  
 1989 Changes in protein content and in structure and number of chloroplasts during leaf senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **30**: 707-715.



- HOAGLAND, D. R. and ARNON, D. I.  
1950 The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347: 1-39.
- HODGINS, R. R. and VAN HUYSTEE, R. B.  
1986 Rapid simultaneous estimation of protoporphyrin and Mg-porphyrins in higher plants. *J. Plant Physiol.* 125: 311-323.
- JIAO, J.-A. and CHOLLET, R.  
1988 Light/dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by in vivo phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 261: 409-417.
- KIRCHANSKI, S. J.  
1975 The ultrastructural development of the dimorphic plastids of *Zea mays* L. *Amer. J. Bot.* 62: 695-705.
- KURA-HOTTA, M.; SATOH, S. and KATOH, S.  
1987 Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 28: 1321-1329.
- LAETSCH, W. M.  
1974 The C<sub>4</sub> syndrome: a structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 27-52.
- LAWLOR, D. W.; BOYLE, F. A.; KEYS, A. J.; KENDALL, A. C. and YOUNG, A. T.  
1987 Nitrate nutrition and temperature effects in wheat: photosynthesis and photorespiration of leaves. *J. Exp. Bot.* 38: 393-408.  
1988 Nitrate nutrition and temperature effects on wheat: a synthesis of plant growth and nitrogen uptake in relation to metabolic and physiological processes. *J. Exp. Bot.* 39: 329-343.
- LAWLOR, D. W.; KONTURI, M. and YOUNG, A. T.  
1989 Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *J. Exp. Bot.* 40: 43-52.
- LILLEY, R. McC. and WALKER, D. A.  
1974 An improved spectrophotometric assay for ribulose biphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Acta* 358: 226-229.
- MAKINO, A.; MAE, T. and OHIRA, K.  
1984 Changes in photosynthetic capacity in rice leaves from emergence to senescence. Analysis from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and leaf conductance. *Plant Cell Physiol.* 25: 511-521.
- PERCHOROWICZ, J. T.; RAYNES, D. A. and JENSEN, R. G.  
1982 Measurements and preservation of the in vivo activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaf extracts. *Plant Physiol.* 69: 1165-1168.
- RASCIO, N.; MARIANI, P. and CASADORA, G.  
1984 Etioplast-chloroplast transformation in maize: effects of tissue and light intensity. *Protoplasma* 119: 110-120.
- RUFTY, JR. T. W.; RAPER JR., C. D. and HUBER, S. C.  
1984 Alterations in internal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. *Can. J. Bot.* 62: 501-508.
- RUFTY, JR. T. W.; HUBER, S. C. and VOLK, R. J.  
1988 Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiol.* 88: 725-730.

- SALEMA, R. and BRANDÃO, I.  
1973 The use of PIPES buffer in the fixation of plant cells for electron microscopy. *J. Submicr. Cytol.* 5: 79-96.
- SANTOS, I.; ALMEIDA, J. M. and SALEMA, R.  
1992 Influence of nitrogen nutrition on growth, nitrate reductase and nitrite reductase of seedlings of maize (*Zea mays* L. cv LG 12). *J. Plant Nutrition* 15: 2531-2544.
- SANTOS, I. and SALEMA, R.  
1991 Nitrogen nutrition and the level of Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoe lateritia* Engl. *Plant Cell Environm.* 14: 311-317.
- SUGIHARTO, B.; MIYATA, K.; NAKAMOTO, H.; SASAKAWA, H. and SUGIYAMA, T.  
1990 Regulation of expression of carbon assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. *Plant Physiol.* 92: 963-969.
- SUGIYAMA, T.; MIZUNO, M. and HAYASHI, M.  
1984 Partitioning of nitrogen among ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate orthophosphate dikinase as related to biomass productivity in maize seedlings. *Plant Physiol.* 75: 665-669.
- SUZUKI, S.; NAKAMOTO, H.; KU, M. S. B. and EDWARDS, G. E.  
1987 Influence of leaf age on photosynthesis, enzyme activity and metabolite levels in wheat. *Plant Physiol.* 84: 1244-1248.
- TERASHIMA, I. and EVANS, J. R.  
1988 Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiol.* 29: 143-155.
- TOBIN, E. M. and SILVERTHORNE, J.  
1985 Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 569-593.
- WILLIAMS, M. A.  
1977 Stereological Techniques, in GHUERT (A. M.) *Practical methods in Electron Microscopy*. Vol. 6. North Holland, Amsterdam.
- WOO, K. C.; PYLIOTIS, N. A. and DOWNTOWN, W. J. S.  
1971 Thylakoid aggregation and chlorophyll a/chlorophyll b ratio in C<sub>4</sub> plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 64: 400-413.

- SAIKAWA, R. and HANANO, I. 1973 The use of PIPER buffer in the fixation of plant cells for electron microscopy. *J. Electron Microscop.* **22**: 79-88.
- SANTOS, I.; ALMEIDA, J. M. and SALGADO, J. 1973 Influence of nitrogen nutrition on growth, nitrate reduction and nitrite reduction of seedlings of maize (*Zea mays* L. cv. IAG 12). *J. Plant Nutrition* **15**: 2031-2044.
- SANTOS, I. and SALGADO, J. 1974 Nitrogen nutrition and the level of Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoe latifolia* Engl. *Plant Cell Environment* **14**: 311-317.
- SUNSHIMOTO, H.; MIYATA, M.; NAKAMOTO, H.; SASAKAWA, H. and SUZUKAWA, T. 1970 Regulation of expression of carbon assimilating enzymes in nitrogen fixers. *Plant Physiol.* **52**: 922-928.
- SUZUKAWA, T., MIYATA, M. and NAKAMOTO, H. 1971 Purification of nitrogenase from *Alnus sativifolia* (Leguminosae) and its properties. *Plant Physiol.* **52**: 27-32.
- SWIFT, S.; MAXAMAM, H.; KIM, M. S. B. and LAWSON, D. W. 1972 Influence of leaf age on photosynthetic enzyme activity and nucleotide levels in wheat. *Plant Physiol.* **54**: 1244-1248.
- TERASHIMA, I. and EYAN, J. 1972 Effects of light and nitrogen nutrition on the development of the photosynthetic apparatus in tobacco. *Plant Cell Physiol.* **13**: 143-152.
- TOBIN, E. M. and SILVERTHORN, J. 1974 Leaf regulation of carbon assimilation in higher plants. *Adv. Bot. West London* **22**: 503-522.
- WILLIAMS, M. A. 1977 Stereological Techniques in CHARTER (A.M.L.V.P.) *Methods in Biochemistry and Biophysics*, Vol. 4 (North Holland, Amsterdam) A4-1791.
- WOO, K. C., BYRSON, A. and DOWNING, W. 1971 Triphospho adenosine diphosphate aggregation and chlorophyll a fluorescence in young plants. *Plant Physiol.* **54**: 400-402.
- 1972 Analysis from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and malate dehydrogenase leaf conductance. *Plant Cell Physiol.* **13**: 511-521.
- FRONKOWICZ, J. T., J. T., RAYNER, D. A. and JENSEN, R. G. 1973 Measurements and preservation of the *in vivo* activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaf extracts. *Plant Physiol.* **59**: 1163-1168.
- RABCO, N.; MARIANI, P. and CASADORA, G. 1974 Etioplast-chloroplast transformation in maize: effects of tissue and light intensity. *Protoplasma* **119**: 110-120.
- RUSTY, JR. T. W., RAPER, JR. G. D. and HUNER, S. C. 1984 Alterations in internal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. *Can. J. Bot.* **62**: 201-208.
- RUSTY, JR. T. W., HUNER, S. C. and VOLK, R. J. 1985 Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiol.* **58**: 725-730.

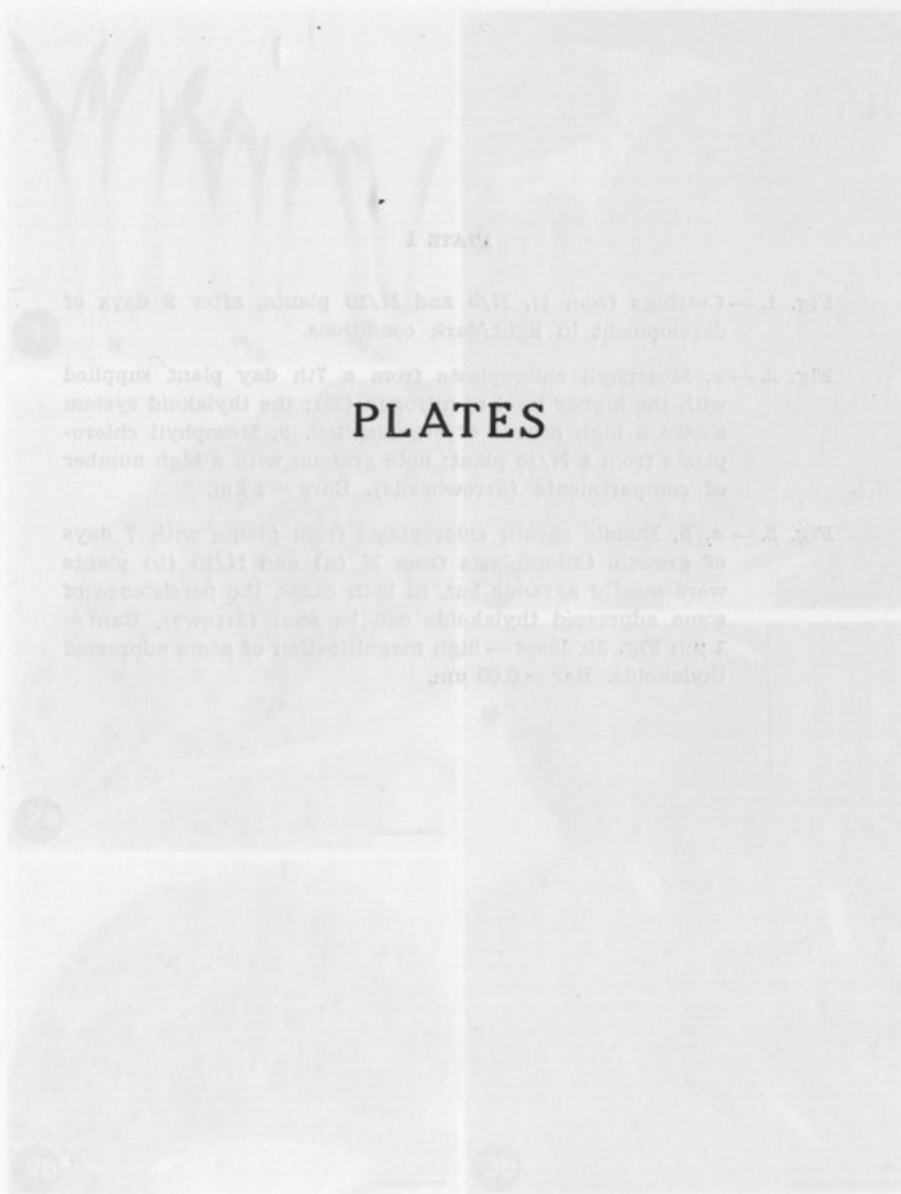


PLATE I

Fig. 1--Cuttings from M, N/A and N/A/D plants after 3 days of development in light/dark conditions.

Fig. 2--a. Mesophyll cytoplasm from a 7th day plant supplied with the highest  $CO_2$  in the light/dark system shows a large, dark, circular area. b. Mesophyll cytoplasm from a N/A/D plant; note cytoplasm with a high number of compartments (arrowheads). Day = 7 day.

# PLATES

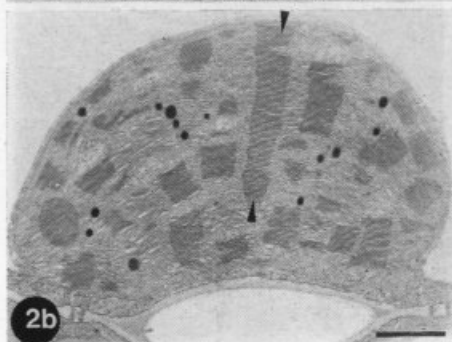
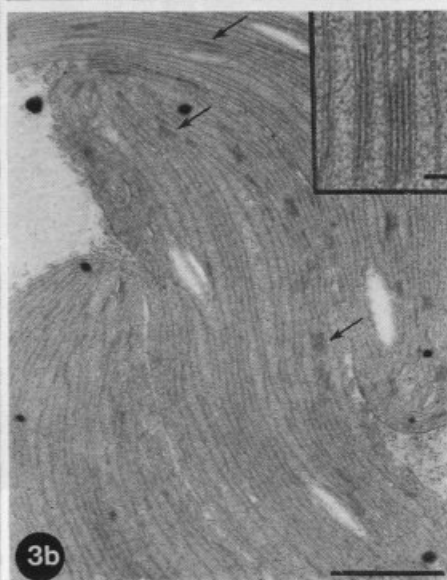
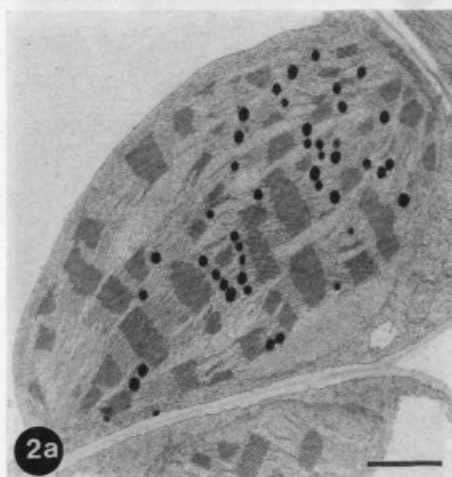
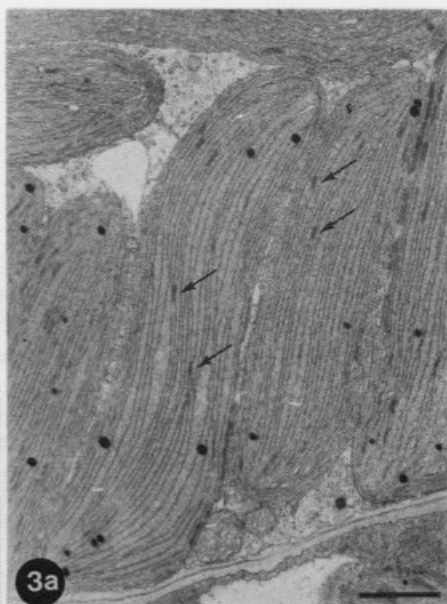
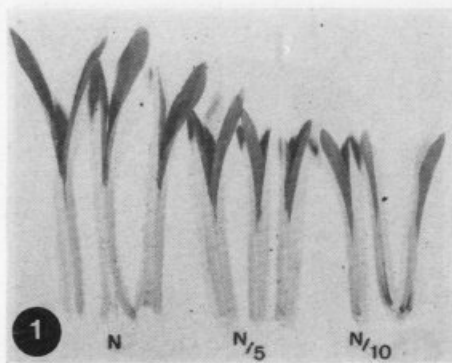
Fig. 3--a. Nucleolar sheath (arrowhead) from plant with 7 days of growth. Cytoplasm from M (a) and N/A/D (b) plants were equally exposed but in both cases the predominant area adjacent to the nucleolus was the same (arrow). Day = 7 day. b. Lower - high magnification of same adjacent cytoplasm. Day = 6-65 hr.

PLATE I

Fig. 1. — Cuttings from N, N/5 and N/10 plants, after 2 days of development in light/dark conditions.

Fig. 2. — *a*, Mesophyll chloroplasts from a 7th day plant supplied with the higher level of nitrogen (N); the thylakoid system shows a high degree of organization. *b*, Mesophyll chloroplasts from a N/10 plant; note granum with a high number of compartments (arrowheads). Bars = 1  $\mu$ m.

Fig. 3. — *a*, *b*, Bundle sheath chloroplasts from plants with 7 days of growth. Chloroplasts from N (*a*) and N/10 (*b*) plants were mostly agranar but, in both cases, the persistence of some adressed thylakoids can be seen (arrows). Bars = 1  $\mu$ m Fig. 3b, inset — high magnification of some adressed thylakoids. Bar = 0.05  $\mu$ m.



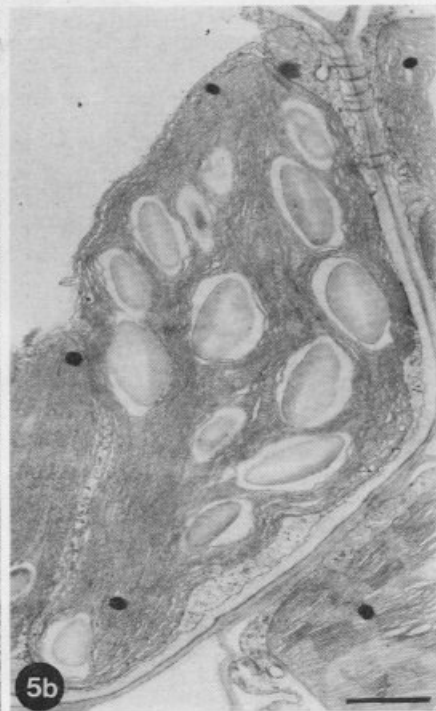
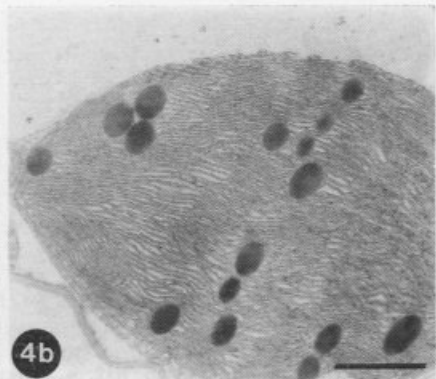
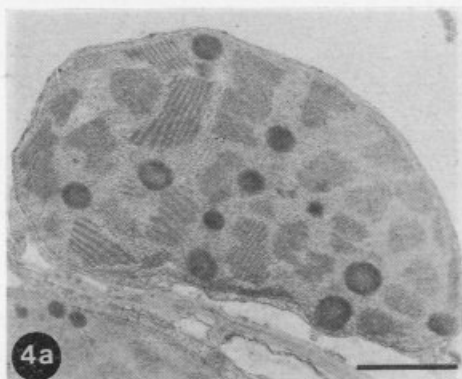


PLATE II

Fig. 4. — *a, b*, Mesophyll chloroplasts from 2nd leaves of plants after 28 days of growth. *a*, Chloroplast from plants supplied with the higher nitrogen level, with visible grana and stroma thylakoids. *b*, Chloroplast from N/10 plant showing the onset of thylakoidal system disorganization. Bars = 1  $\mu$ m.

Fig. 5. — *a, b*, Bundle sheath plastids from 6th leaves from 28th plants. Note the lower starch content in chloroplasts from N plants (*a*) and the higher number of starch grains in chloroplast from N/10 plants (*b*). Bars = 1  $\mu$ m.



## PLATE III

Fig. 6. — Comparison of RuBisCo activity in the 2nd leaves of the three groups of plants (N, N/5, N/10) after 2, 7 and 28 days, expressed on a per leaf basis (A), on chlorophyll basis (B) and on fresh weight basis (C).

Fig. 7. — Activity of PEP-Case from 2nd leaves from plants grown under three nitrogen levels (N, N/5, N/10) after 2, 7 and 28 days. The activity of the enzyme, expressed on a per leaf basis (A), on a chlorophyll basis (B) and on fresh weight basis (C), was always highest in N leaves.

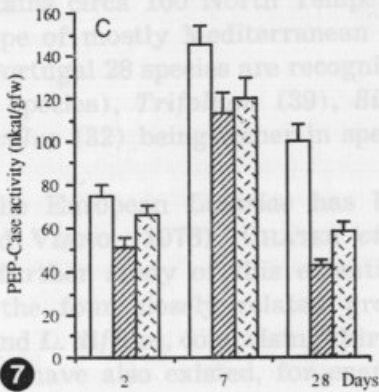
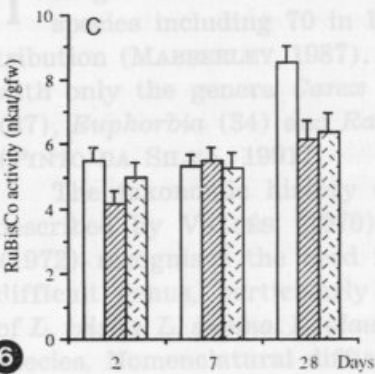
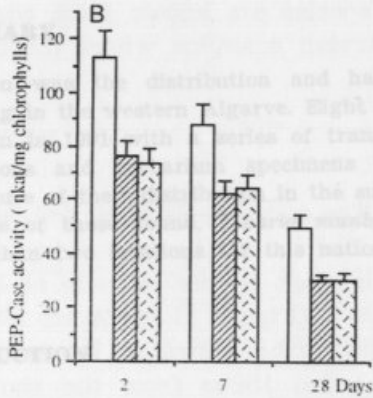
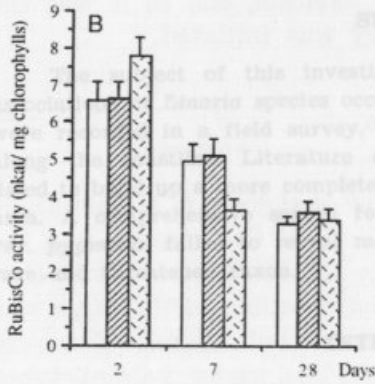
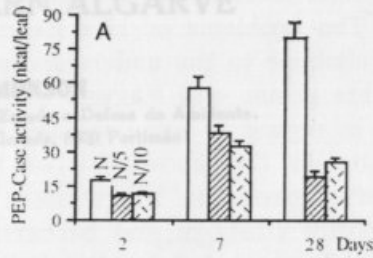
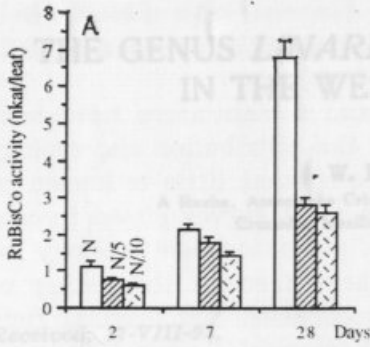




Fig. 6. — Comparison of Rubisco activity in the 2nd leaves of the three groups of plants (N, N/5, N/10) after 2, 7 and 28 days, expressed on a leaf basis (A), on chlorophyll basis (B) and on fresh weight basis (C).

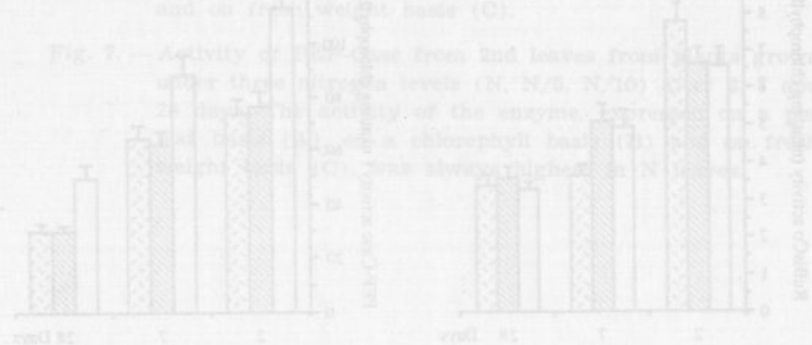
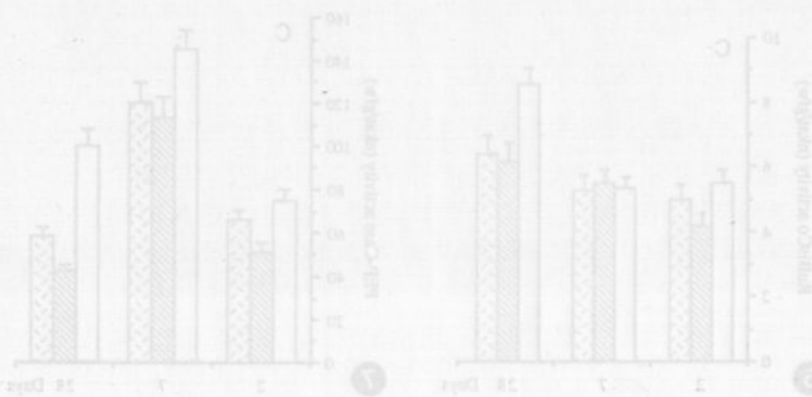


Fig. 7. — Activity of Rubisco from 2nd leaves from three groups of plants (N, N/5, N/10) after 2, 7 and 28 days, expressed on a chlorophyll basis (A) and on fresh weight basis (B).



## THE GENUS *LINARIA* (SCROPHULARIACEAE) IN THE WESTERN ALGARVE

W. D. SIMONSON

A Rocha, Associação Cristã de Estudo e Defesa do Ambiente.  
Cruzinha, Mexilhoeira Grande, 8500 Portimão

Received, 17-VIII-94.

### SUMMARY

The subject of this investigation was the distribution and habitat associations of *Linaria* species occurring in the western Algarve. Eight taxa were recorded in a field survey, began in 1991 with a series of transects along the coastline. Literature citations and herbarium specimens were listed to build up a more complete picture of their distribution in the survey area. A comprehensive search for one of those found, *Linaria munbyana* var. *pygmaea*, failed to reveal more than two locations for this nationally rare and threatened taxon.

### INTRODUCTION

THE genus *Linaria* Miller contains circa 100 North Temperate species including 70 in Europe of mostly Mediterranean distribution (MABBERLEY, 1987). In Portugal 28 species are recognised, with only the genera *Carex* (39 species), *Trifolium* (39), *Silene* (37), *Euphorbia* (34) and *Ranunculus* (32) being richer in species (PINTO DA SILVA, 1991).

The taxonomic history of the European *Linariae* has been described by VALDÉS (1970) and VIANO (1976). CHATER *et al.* (1972) recognised the need for further study of this essentially difficult genus, particularly of the four closely related groups of *L. tristis*, *L. supina*, *L. glauca* and *L. diffusa*, comprising thirteen species. Nomenclatural difficulties have also existed, for example in the case of *L. amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link subsp. *multipunctata* (Brot.) Chater & D. A. Webb and *L. munbyana* Boiss et Reut. var. *pygmaea* (Sampaio) Sampaio, as described

later in the text. Unless stated to the contrary, the taxonomic nomenclature followed in this work is that of FRANCO (1984), based on the revision of European *Linariae* with discoid seeds by VALDÉS (1970). A revision of species with non-discoid seeds has been carried out by VIANO (1976).

The problems of identification and nomenclature have been one obstacle to the understanding of the distribution and ecology of this genus, and PARKER (1981) noted that little is known of this in regard to some species. The current survey aimed to contribute to the knowledge of the distribution and ecology of *Linaria* species in the western Algarve through the listing of literature citations and herbarium specimens, and original field research supported by the British Ecological Society. Many of the species are known from coastal habitats, and so it was the Algarvian coastline where the survey was initiated.

#### METHODS

The survey area stretched from the west coast to the longitude of Albufeira in the east (long. 8° 15' W of Greenwich), and the south coast to the latitude of Monte Clérigo in the north (lat. 30° 20') (Figure 1). In April 1991 the coastline of this area was covered by a series of transects carried out by two observers at 50 and 150 m from the shoreline. The major habitat types and geological zones were sampled in this way, but with more search effort spent on areas of sands rather than limestone geology as it soon became apparent that the genus was not represented in the latter. For every 0.5 km of coastline covered, the *Linaria* species present were recorded together with an assessment of their abundance (numbers seen scored on a log scale: 1 = 1-10, 2 = 11-100, etc.), brief habitat description, and associations with common plant species.

Further searches for *Linariae* on a less systematic basis were made in the following inland areas and years: western barrocal (1991), 'Silves sands' at Bensafrim (1992/3), shale hills at Bensafrim (1991/2/3), sandstone heathland at Porches, Algoz and Tunes (1992), and Serra de Monchique (1993). In addition, the rare *L. munbyana* var. *pygmaea* was looked for in beach dune systems in the eastern Algarve in 1993.

The botanical literature was searched for other records of the genus in the western Algarve, and a number were found in DAVEAU (1882, 1897), ESPÍRITO SANTO (1989), MALATO-BELIZ (1982), MALATO-BELIZ & CASTRO ANTUNES (1984), and TAVARES

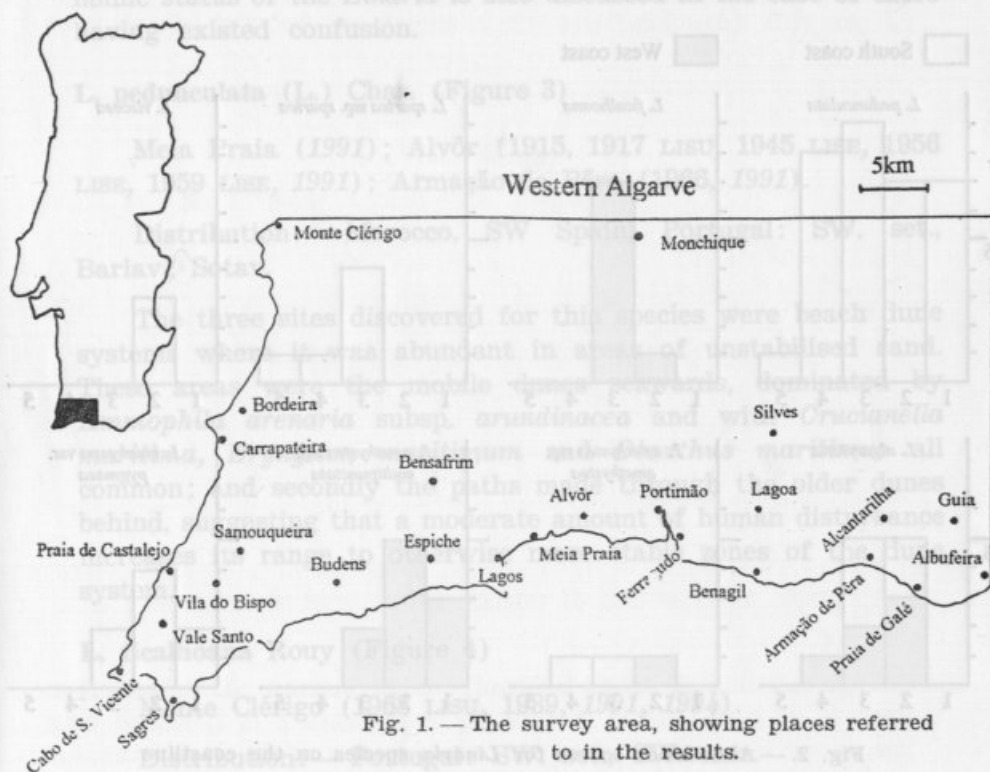


Fig. 1. — The survey area, showing places referred to in the results.

& SACARRÃO (1960). Herbarium specimens of the *Estação Agronómica Nacional* (LISE) and *Museu Botânico, Faculdade de Ciências de Lisboa* (LISU), collected in the study area, were also consulted and listed, together with others referred to by VALDÉS (1970) and VIANO (1987). A catalogue of all the records was compiled and distribution maps produced for each species.

#### RESULTS

Eight taxa were collected in the field by the author and identified. These were: *L. pedunculata* (L.) Chaz., *L. ficalhoana* Rouy, *L. spartea* (L.) Willd. subsp. *spartea*, *L. viscosa* (L.)

Dum.-Courset, *L. algarviana* Chav., *L. amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link subsp. *amethystea* and subsp. *multipunctata* (Brot.) Chater & D. A. Webb, and *L. munbyana* Boiss. et Reut. var. *pygmaea* (Sampaio) Sampaio. All of these were cited in

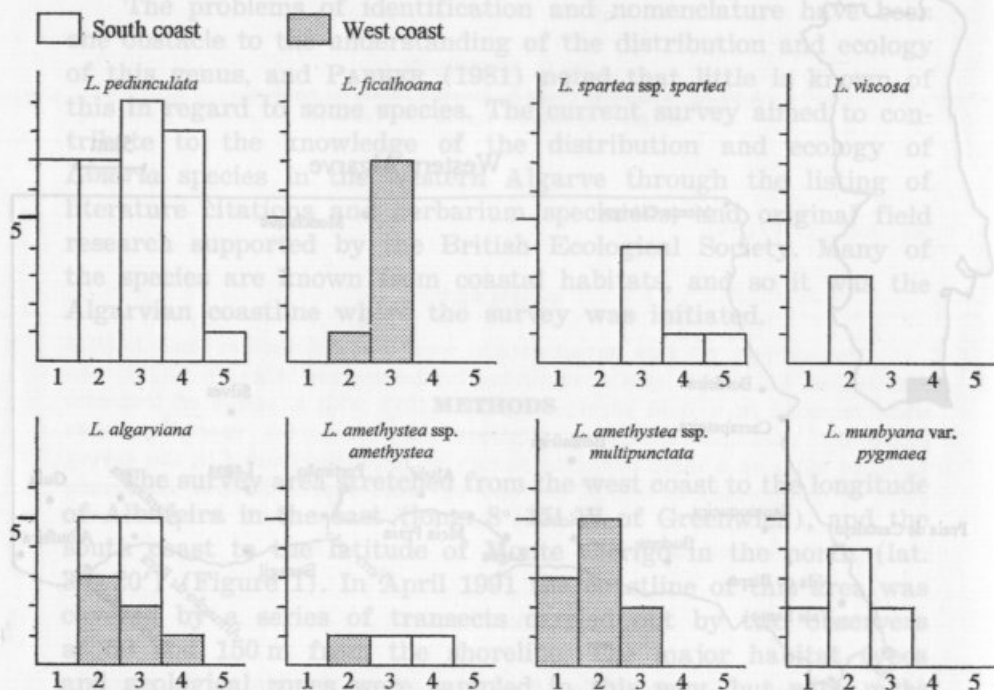


Fig. 2. — Abundance scores for *Linaria* species on the coastline of the western Algarve.

x axis: Abundance score (1 = 1-10, 2 = 11-100, 3 = 101-1000, etc.)

y axis: Number of 0.5 km sections

literature and present in the herbarium collections, and reports of two further species, *L. incarnata* (Vent.) Sprengel and *L. lamarckii* Rouy were considered.

Figure 2 shows the abundance scores of the *Linaria* species recorded in the survey of the western Algarve coastline in 1991.

The distribution of each taxon is described below, with locations listed from west to east together with years cited or collected (*italicised* years are the author's observations).

The distributions are mapped in Figures 3-10. The wider geographical range of the taxon is defined [for Portugal using the geographical abbreviations of FRANCO (1984)], and habitats described from field observations made by the author. The taxonomic status of the *Linaria* is also discussed in the case of there having existed confusion.

**L. pedunculata** (L.) Chaz. (Figure 3)

Meia Praia (1991); Alvôr (1915, 1917 LISU, 1945 LISE, 1956 LISE, 1959 LISE, 1991); Armação de Pêra (1966, 1991).

Distribution: — Morocco, SW Spain, Portugal: SW. set., Barlav., Sotav.

The three sites discovered for this species were beach dune systems where it was abundant in areas of unstabilised sand. These areas were the mobile dunes seawards, dominated by *Ammophila arenaria* subsp. *arundinacea* and with *Crucianella maritima*, *Eryngium maritimum* and *Otanthus maritimus* all common; and secondly the paths made through the older dunes behind, suggesting that a moderate amount of human disturbance increases its range to otherwise more stable zones of the dune system.

**L. ficalhoana** Rouy (Figure 4)

Monte Clérigo (1968 LISU, 1989, 1991, 1994).

Distribution: — Portugal: SW. set., SW. mer.

At apparently the southernmost limit of its range, this species was found in consolidated cliff-top sand dunes at Monte Clérigo. The shrub species which were dominant here were *Cistus salvifolius*, *Corema album*, *Thymus camphoratus*, *Ononis natrix* and *Armeria pungens*.

**L. spartea** (L.) Willd. subsp. *spartea* (Figure 5)

Alcantarilha (1971); Albufeira (1936 LISU, 1991, 1992).

Distribution: — (*L. spartea*) Macaronesia (Tenerife), SW France, Spain, Portugal: (subsp. *spartea*) T. Q., CW. aren. e cintr., Berl., CE. camp., CS. plist., SE., SW. mer., Barlav.



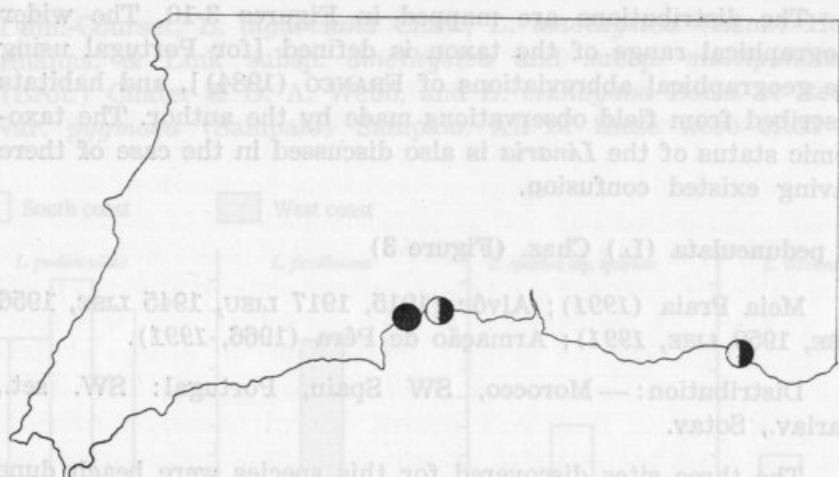


Fig. 3. — The distribution of *L. pedunculata* (L.) Chaz.

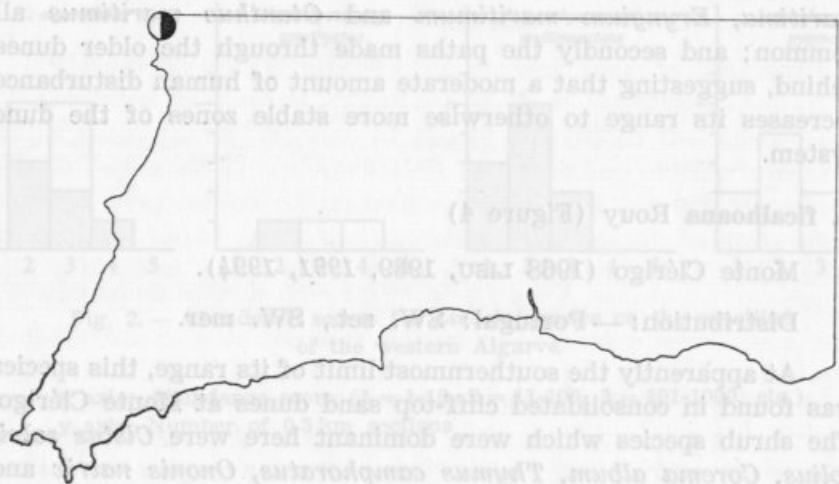


Fig. 4. — The distribution of *L. ficahoana* Rouy.

Key to Figures 3-10:

- Published record or herbarium specimen of the species.
- ◐ As above, relocated by the author (1991-4).
- New location discovered by the author.

On the coastline *L. spartea* was found in nutrient-poor grassland areas, including clearings in pinewoods, waste ground in urbanisations and abandoned vineyards, on quartz-rich sands. It was often associated with *Lupinus angustifolius*, *Ornithopus compressus* and *O. sativus*. At one such locality was found a few closely-grouped specimens with violet-coloured flowers, at

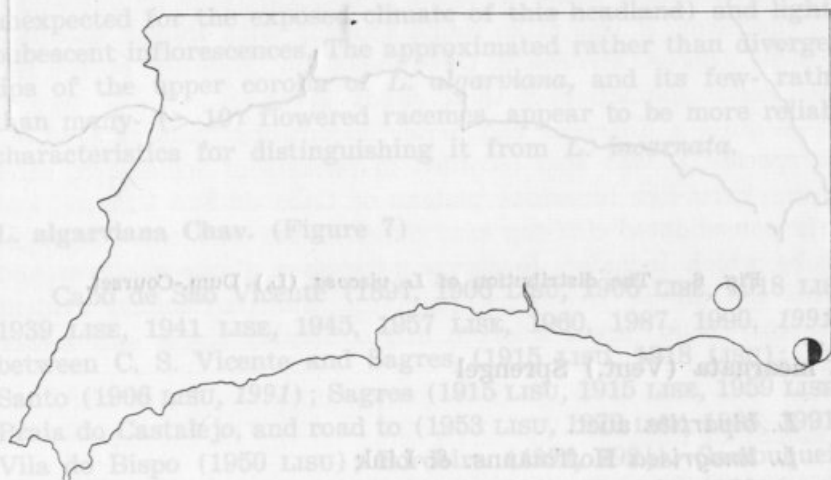


Fig. 5. — The distribution of *L. spartea* (L.) Willd. subsp. *spartea*.

variance to the normal yellow-flowered form. Inland the species was collected in a eucalyptus plantation in 1971 and in a small remnant area of *Quercus suber* woodland on red pliocene sands.

***L. viscosa* (L.) Dum.-Courset (Figure 6)**

Monte Clérigo (1989, 1991).

Distribution: — S Italy and Sicily, S Spain, Portugal: SW set., SE.

In its one location in the study area, the species was found in consolidated cliff-top sand dunes dominated by *Cistus salvifolius*, *Armeria pungens*, *Corema album* and *Halimium lasianthum* subsp. *lasianthum*.

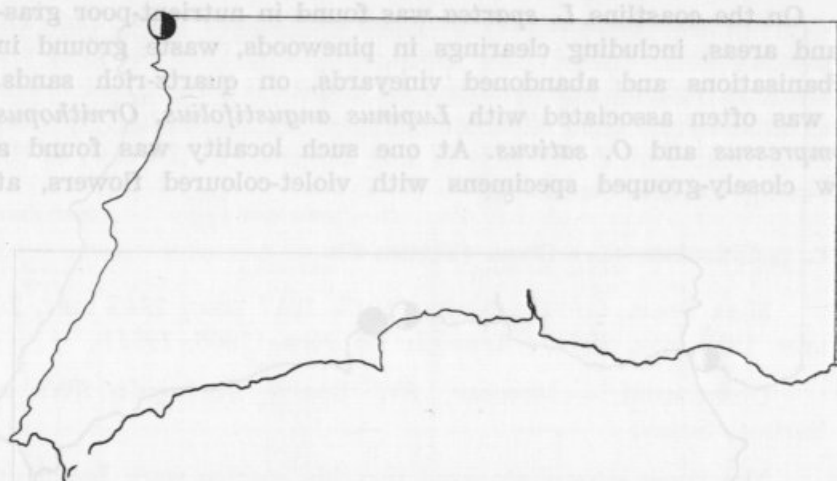


Fig. 6. — The distribution of *L. viscosa* (L.) Dum.-Courset.

### *L. incarnata* (Vent.) Sprengel

*L. bipartita* auct.

*L. linogrisea* Hoffmanns. & Link

Between Cabo de São Vicente and Rio de Seixe (1897); between Carrapateira and Vila do Bispo (1963); Lagos (1988); Portimão (1906); Guia (1882); Albufeira (1881).

Distribution: — NW Africa, W Spain, Portugal: CW. aren., CE., SW. set., SE. set.

The distribution recorded by FRANCO (1984) does not include the western Algarve, and a number of factors put the records listed above in doubt. LISU herbarium specimens of DAVEAU from Espiche and Albufeira have been corrected to the similar *L. algarviana* on the basis of corolla form and in one case habit, and this must also question his reference to it occurring between Cabo de São Vicente and Rio de Seixe and at Guia. The author has not observed *L. incarnata* in the survey area and it may be that all the records for it should refer to *L. algarviana*, known at several of the localities where *L. incarnata* has purportedly been collected.

Confusion between *L. incarnata* and *L. algarviana* is understandable. Particularly in the eastern part of its range, most of the plants of the latter species had almost erect stems and glandular pubescent inflorescences, characteristics more typical of *L. incarnata*. The majority of the herborised specimens of *L. algarviana* are from the area around Cabo de São Vicente where, in contrast, the form is of procumbent to ascending stems (not unexpected for the exposed climate of this headland) and lightly pubescent inflorescences. The approximated rather than divergent lips of the upper corolla of *L. algarviana*, and its few- rather than many- (> 10) flowered racemes, appear to be more reliable characteristics for distinguishing it from *L. incarnata*.

***L. algarviana* Chav. (Figure 7)**

Cabo de São Vicente (1897, 1906 LISU, 1906 LISE, 1918 LISU, 1939 LISE, 1941 LISE, 1945, 1957 LISE, 1960, 1987, 1990, 1991); between C. S. Vicente and Sagres (1915 LISU, 1918 LISU); Vale Santo (1906 LISU, 1991); Sagres (1915 LISU, 1915 LISE, 1959 LISE); Praia do Castalejo, and road to (1953 LISU, 1972 LISE, 1985, 1991); Vila do Bispo (1950 LISU); Bordeira (1991, 1994); Samouqueira (1906 LISU, 1991); Bensafrim (1993, 1994); Espiche (1881 LISU); Lagos (1971); Alvôr (1959 LISE, 1991, 1994); Lagoa (1991, 1994);

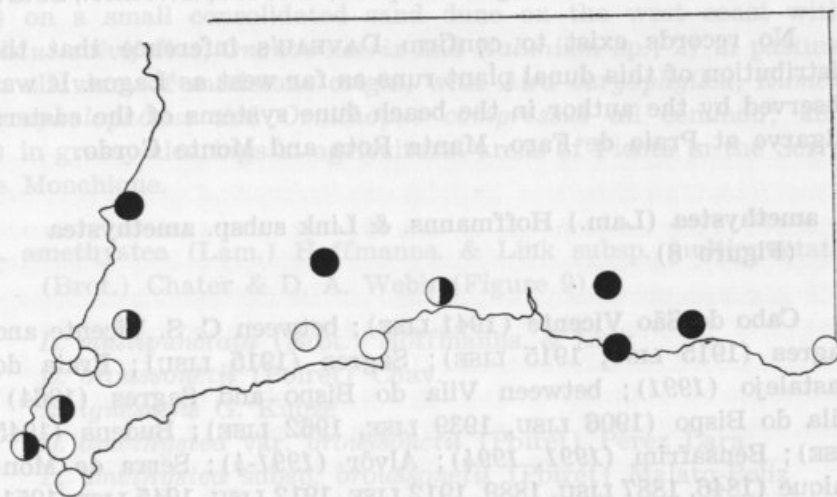


Fig. 7. — The distribution of *L. algarviana* Chav.



Benagil (1991, 1994); Sra da Piedade (1949 LISE); Armação de Pêra (1991); Albufeira (1881 LISU).

Distribution: — Portugal: SW mer., Barrocal alg., Barlav.

Like *L. spartea*, *L. algarviana* had a clear association with coastal quartz-rich sands, replacing the former species on more western sites that again included grassy clearings in pinewoods and vineyards. It was often found growing with *Rumex bucephalophorus*, *Dipcadi serotinum*, *Ornithopus* spp., *Erodium botrys* and other herbs distinctive of these sandy areas.

In quite a different and better documented habitat type for this species, it was also recorded in pockets of windblown sand on the karst-like limestone plateau of Cabo de São Vicente, and in the consolidated cliff-top sand dunes of the west coast amongst shrubs which included *Juniperus phoenicea*, *Corema album* and *Cistus* spp. In the lattermost habitat it was particularly evident in recently burnt areas where it had noticeably larger and darker flowers.

#### ***L. lamarckii* Rouy**

Lagos — Ria Guadiana (1897).

Distribution: — Portugal: CS. plist., SW. set., SW. mer., Sotav.

No records exist to confirm DAVEAU's inference that the distribution of this dunal plant runs as far west as Lagos. It was observed by the author in the beach dune systems of the eastern Algarve at Praia de Faro, Manta Rota and Monte Gordo.

#### ***L. amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link subsp. *amethystea*** (Figure 8)

Cabo de São Vicente (1941 LISE); between C. S. Vicente and Sagres (1915 LISU, 1915 LISE); Sagres (1915 LISU); Praia do Castalejo (1991); between Vila do Bispo and Sagres (1964); Vila do Bispo (1906 LISU, 1939 LISE, 1962 LISE); Budens (1945 LISE); Bensafrim (1991, 1994); Alvôr (1991-4); Serra de Monchique (1846, 1887 LISU, 1889, 1912 LISE, 1912 LISU, 1945 LISE, 1951, 1968 LISE, 1968 LISU, 1982, 1993); west of Silves (1881 LISU).

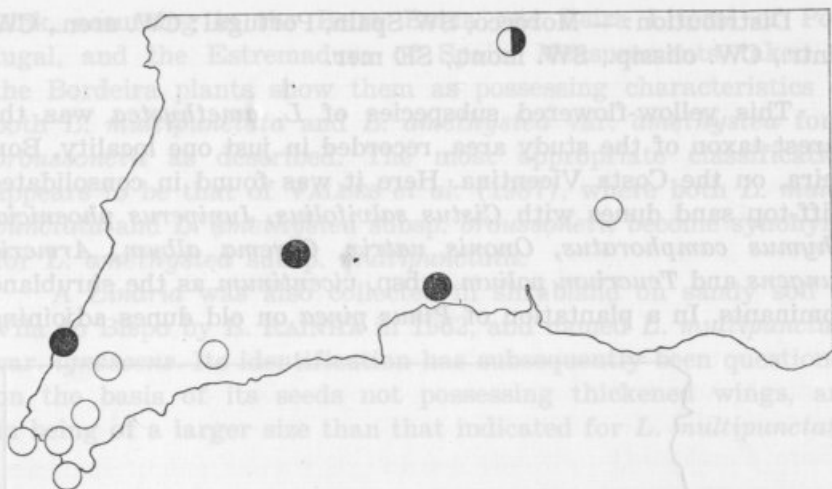


Fig. 8. — The distribution of *L. amethystea* (Lam.) Hoffmanns & Link subsp. *amethystea*.

Distribution: — Spain, Portugal: T. Q., CW. calc., CW. cintr., CW. olissip., CN., CE., Berl., CS. plist., SW. mer., SW. mont., SE.

Although most commonly found in clearings of *Cistus ladanifer* shrubland on the shale hills of the Serra, this species was recorded more widely. In the recent survey it was found: 1) on a small consolidated sand dune on the west coast with *Cistus salvifolius*, *Ononos natrix* and *Halimium* sp.; 2) in pasture on alluvium of sandstone origin, with *Aira caryophyllea*, *Rumex bucephalophorus* and *Ornithopus compressus* all common; and 3) in grassy clearings in agricultural areas of Picota in the Serra de Monchique.

***L. amethystea*** (Lam.) Hoffmanns. & Link subsp. ***multipunctata*** (Brot.) Chater & D. A. Webb (Figure 9)

*L. multipunctata* (Brot.) Hoffmanns. & Link

*L. broussonetii* (Poiret) Chav.

*L. ignescens* G. Kunze

*L. amethystea* var. *broussonetii* (Poiret) Pérez Lara

*L. amethystea* subsp. *broussonetii* (Poiret) Malato-Beliz

Boredira (1984, 1991-4).

Distribution: — Morocco, SW Spain, Portugal: CW. aren., CW. cintr., CW. olissip., SW. mont., SE mer.

This yellow-flowered subspecies of *L. amethystea* was the rarest taxon of the study area, recorded in just one locality, Bordeira, on the Costa Vicentina. Here it was found in consolidated cliff-top sand dunes with *Cistus salvifolius*, *Juniperus phoenicia*, *Thymus camphoratus*, *Ononis natrix*, *Corema album*, *Armeria pungens* and *Teucrium polium* subsp. *vicentinum* as the shrubland dominants. In a plantation of *Pinus pinea* on old dunes adjoining

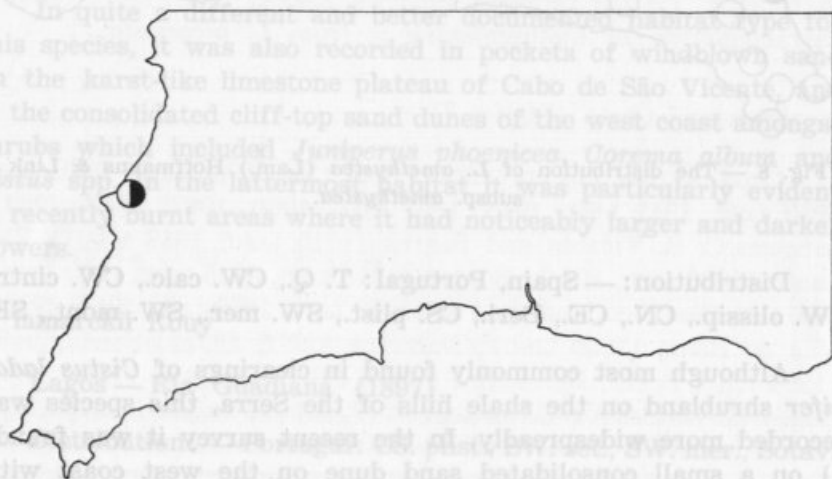


Fig. 9. — The distribution of *L. amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link subsp. *multipunctata* (Brot.) Chater & D. A. Webb.

this site inland, it was growing together with *L. algarviana*. It was first found at this site by MALATO-BELIZ & CASTRO ANTUNES (1984), being recorded as *L. amethystea* (Lam.) Hoffmanns. & Link subsp. *broussonetii* (Poir.) Malato-Beliz, a new record for the Algarve, previously only known in the Estremadura. MALATO-BELIZ & CASTRO ANTUNES criticised the inclusion by CHATER *et al.* (1972) of the Bordeira *Linaria* in *L. amethystea* subsp. *amethystea*, a taxon whose type has bluish-violet flowers. He also disagreed with VALDÉS' (1970) treatment where the plant in question was a mere form of *L. amethystea* var. *amethystea*. In this latter scheme, a second species with the same seed characters is described: *L. multipunctata* (Brot.) Hoffmanns. &

Link, occurring in the Beira Baixa and Beira Litoral of Portugal, and the Estremadura of Spain. Measurements taken of the Bordeira plants show them as possessing characteristics of both *L. multipunctata* and *L. amethystea* var. *amethystea* form *broussonetii* as described. The most appropriate classification appears to be that of VALDÉS *et al.* (1987), where both *L. multipunctata* and *L. amethystea* subsp. *broussonetii* become synonyms for *L. amethystea* subsp. *multipunctata*.

A *Linaria* was also collected in shrubland on sandy soil at Vila do Bispo by B. RAINHA in 1962, and named *L. multipunctata* var. *ignescens*. Its identification has subsequently been questioned on the basis of its seeds not possessing thickened wings, and in being of a larger size than that indicated for *L. multipunctata*.

***L. munbyana*** Boiss. et Reut. var. ***pygmaea*** (Sampaio) Sampaio in VALDÉS *et al.* (1987) (Figure 10)

*L. pygmaea* Sampaio

Meia Praia (1990, 1991-4); Alvôr (1915 LISU, 1959 LISE); Ferragudo (1945 LISE); Praia de Galé (1991, 1993).

Distribution: — Algeria, Portugal: SW. mer.

The nomenclature of this *Linaria* has a complicated history, the early part of which was recounted by PINTO DA SILVA (1947). The point of contention was whether the plant deserved the status of species as *L. pygmaea*, first published by SAMPAIO in 1915 from specimens collected at Alvôr, or was a mere variety of *L. munbyana*. In the *Flora Portuguesa* (COUTINHO, 1939) it was included as the latter, but the inability to find the Alvôr *Linaria* described therein led P. DA SILVA to reassess the evidence available. Examining the characters of herbarium (including type) specimens, he reaffirmed the specific status of *L. pygmaea*. The matter did not rest there, however, for a revision of the European *Linariae* with discoid seeds by VALDÉS (1970) again placed the Alvôr plant with the species described by MUNBY: *L. munbyana* var. *pygmaea*. It was differentiated from variety *munbyana* by having seeds with smooth disks and unthickened wing features, rather than the tuberculate disks and thickened wings found in the latter variety. Other differences between these *Linariae*



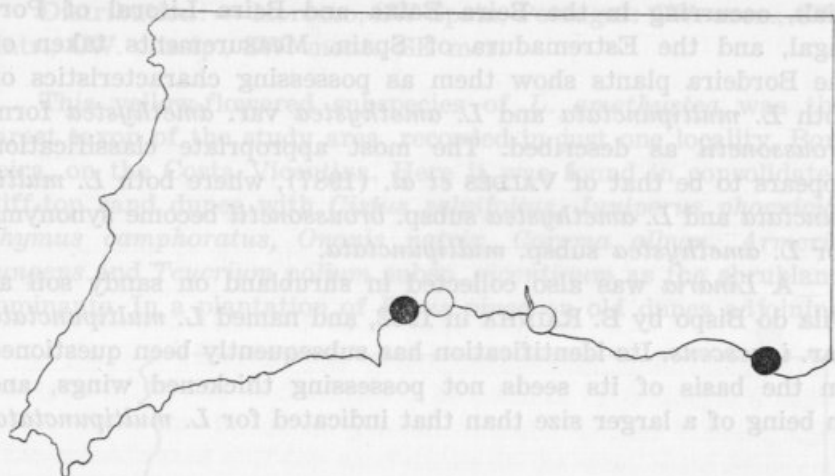


Fig. 10. — The distribution of *L. munbyana* Boiss. et Reut. var. *pygmaea* (Sampaio) Sampaio.

are described but are not warranted as sufficient to separate the plants as species.

According to VALDÉS (1970), the European distribution of *L. munbyana* var. *pygmaea* is restricted to the Algarve, elsewhere only being recorded in Algeria where it occurs together with variety *munbyana*. It is very localised in the Algarve, having only been collected at two localities. In the survey of 1991, it was again found in two localities but interestingly they were not the same ones. The sites where collections had previously been made were the dunes of Alvôr and calcareous beach sands near Ferragudo. In 1991, the taxon was not discovered at either of these but instead was found on the dunes of Meia Praia, on the other side of the mouth of the Alvôr Estuary, and at Praia de Galé. As part of the current study, it was decided to verify the plant's presence/absence in these four localities and to search for it elsewhere on the Algarve south coast. The aim was to establish more exactly its Algarve (and therefore European) distribution and the extent of its rarity.

All of the main beach dune systems were visited in February and March 1993. Two to three kilometre stretches were searched at Meia Praia, Alvôr, Ferragudo, Praia de Galé, Praia de Faro, Praia de Barril, Manta Rota and Monte Gordo. No new sites for

*L. munbyana* var. *pygmaea* were found. Communications with botanists at the *Parque Natural de Ria Formosa* and *Instituto Botânico* in Coimbra failed to reveal any other records of it. The *Linaria* was absent from the site at Ferragudo where it had been collected in 1945, and indeed no suitable habitat was found there. Where there presumably existed small dunes, there only remained flat beach sands sparsely vegetated with *Lotus corniculatus*, *Medicago littorea* and *Cakile maritima*, perhaps as a result of the construction of a breakwater in the estuary affecting sand transport and deposition by the tides.

The two discrete populations of the plant discovered at Praia de Galé in 1991 were again located. One of these, within the confines of a planned seaside urbanisation, owed its continued survival to the failure to develop the site. The plant's absence from the Alvôr dunes was confirmed, its demise probably due to man-made disturbance exacerbated recently by the dumping of dredged estuary sand onto the dunes. On the other side of the estuary mouth, the *Linaria* was again found in the dunes of Meia Praia, reaching almost as far west as Lagos in small numbers.

The *Linaria* was observed in dune slacks particularly along track edges. It was often associated with *Artemisia campestris*, *Silene obtusifolia*, *Medicago littoralis*, *Ononis natrix* and *Paronychia argentea*.

#### DISCUSSION

Soil parent material appeared to be the major influence on the distribution of *Linaria* species. One of the best examples of the substrate effect was seen on a tiny outcrop of sandstone on a predominately limestone coastline, supporting a very dense population of *L. algarviana*. The edge of the outcrop was almost exactly indicated by the boundary of the population.

With the exception of *L. amethystea* subsp. *amethystea* which was typically found in areas of shales, it was the sandy soils which were important for the majority of the species and three sandy-soiled habitats could be broadly distinguished:

1. Cliff-top consolidated sand dunes on the west coast, where *L. ficalhoana* was replaced to the south by *L. amethystea* subsp. *multipunctata* and *L. algarviana*;

2. Large beach dune systems, supporting populations of *L. pedunculata* and, more locally, *L. munbyana* var. *pygmaea*. Small bay dunes on the south coast were devoid of *Linaria* species;
3. Coastal quartz-rich sands, and the 'Silves sands', where *L. algarviana* could be found in high numbers, replaced by *L. spartea* subsp. *spartea* on the coast to the east.

For *L. pedunculata*, *L. ficvalhoana*, *L. amethystea* subsp. *multipunctata* and *L. munbyana* var. *pygmaea*, taxa that only occurred in the coastal habitats, the abundance scores (Figure 2) give a real indication of their abundance in the western Algarve region as a whole. Of these, all occur outside of the survey area apart from *L. munbyana* var. *pygmaea*, the rarest in Portugal and continental Europe of the *Linariae* recorded in this study. With just two sites for it known in the country, and both of them highly disturbed, this taxon merits inclusion in any red data list of threatened higher plants in Portugal. It faces a precarious future if the sensitive and scarce dune habitat in which it occurs is not given some measure of protection. *L. algarviana* is endemic to the survey area, but was seen to occur much more widely and at higher frequencies, both on the coast and in suitable habitats inland.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the British Ecological Society for supporting the study through a Small Ecological Project Grant, Dr. PETER STURGESS for his help in the fieldwork and comments on the text, Eng. ISABEL SARAIVA for her help in the herbarium of the Estação Agronómica Nacional, and Dr. JORGE PAIVA for his help in the identification of *L. amethystea* subsp. *multipunctata*.

#### REFERENCES

- CHATER, A. O.; VALDÉS, B. & WEBB, D. A.  
1972 *Linaria* Miller. In TUTIN, T. G. et al. (Eds.) *Flora Europaea*, Vol. 3. Cambridge University Press, 226-236.
- COUTINHO, A. X. P.  
1939 *Flora Portuguesa*, 2nd ed., Lisboa.

- DAVEAU, J.  
 1882 Aperçu sur la végétación de l'Alentejo et de l'Algarve. *J. Sci. Math. Phys. Nat. Lisboa* 32: 235-280.  
 1897 La Flore Littorale du Portugal. *Bol. Soc. Brot.* 14: 3-54.
- ESPÍRITO SANTO, M. D.  
 1989 *Flora das Dunas e Plataformas Arenosas do Sudoeste Meridional*. Departamento de Botânica do Instituto Superior de Agronomia.
- FRANCO, J. DO AMARAL  
 1984 *Nova Flora de Portugal*, Vol. II. Lisboa, 230-242.
- MABBERLEY, D. J.  
 1987 *The Plant-Book, A portable dictionary of the higher plants*. Cambridge University Press, 335.
- MALATO-BELIZ, J.  
 1982 *A Serra de Monchique. Flora e Vegetação*. SNPRPP, Lisboa.
- MALATO-BELIZ, J. & CASTRO ANTUNES, J. H.  
 1984 Notas de florística — XII. *Bol. Soc. Brot.*, Sér. 2, 57: 226-8.
- PARKER, P. F.  
 1981 The endemic plants of metropolitan Portugal, a survey. *Bol. Soc. Brot.*, Sér. 2, 53(2): 943-994.
- PINTO DA SILVA, A. R.  
 1947 *Notas. Agronomia Lusit.* IX: 29-34.  
 1991 Algumas características da flora de Portugal. *Ciência e Natureza (LPN)* 1: 73-92.
- TAVARES, C. N. & SACARRÃO, G. F.  
 1960 A Protecção à Natureza em Sagres — S. Vicente. Seu Interesse e Urgência. *Protecção da Natureza. Boletim Informativo da LPN*. N.ºs 3-4: 1-18.
- VALDÉS, B.  
 1970 *Revisión de las Especies Europeas de Linaria con Semillas aladas*. Univ. Sevilla, Ser. Ci. No. 7.
- VALDÉS, B., TALAVERA, S. & FERNANDEZ-GALIANO, E. (Eds.)  
 1987 *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*. Vol. 2. Ketres Editora S. A., 508-22.
- VIANO, J.  
 1976 *Les Linaires a Graines Aperes du Bassin Méditerranéen Occidental*. Thèse Doctorat d'Etat Marseille.  
 1987 Contribution à l'étude du genre *Linaria* Miller au Portugal. Clé générale des taxons à graines aptères. *Agronomia Lusit.* 42(3-4): 153-177.
- MATEU, I. & GARCÍA, J. — Estudio carpológico del género *Linaria* Cras. (Asteraceae) en Europa. 35
- CHUR, G. C. & UGBOROMO, R. E. — Mutagenic effects of colchicine on *Vigna sesquialata* (L.) Walpers (Papilionaceae) in Nigeria. 215
- OTLOWKURSKI, J., DEIS, P. & RANCIOWI, G. O. — Leaf epidermal morphology in *Bridelia* (Euphorbiaceae) and its taxonomic significance. 6
- QUEIROZ, MARZARINA — Números cromossómicos para a flora portuguesa. 115-127



## INSTRUÇÕES AOS COLABORADORES

1. O Boletim da Sociedade Brotéria é uma revista destinada à publicação de artigos originais em todos os domínios da Botânica. No entanto, artigos muito extensos sobre florística, fitogeografia e fitosociologia são publicados geralmente nas Memórias, enquanto que os trabalhos de divulgação científica e os referentes à história da Botânica são reservados para o Anuário — as duas outras revistas da Sociedade.

2. Destinado principalmente à publicação dos artigos elaborados pelo pessoal científico do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra, não se inserem todavia trabalhos da autoria de membros da Sociedade, bem como os de outros investigadores, quer portugueses, quer de outras nacionalidades. A publicação de qualquer artigo, porém, está na dependência de aprovação pela Comissão Redactorial.

3. Os originais entregues para publicação devem ser dactilografados a 40% espaço e possuir uma margem para o lado habitual. Poderão ser redigidos em português, inglês, francês, alemão ou espanhol. O nome do autor (ou autores) deverá figurar na primeira página, bem como o endereço da Instituição em que trabalha(m). Um resumo, não excedendo aproximadamente 300 palavras, preferivelmente em inglês, deverá iniciar o artigo.

4. Os nomes latinos dos géneros, espécies e categorias infra-específicas que

## ÍNDICE

AYODELE, A. E. & SHETEOLU, A. O. PEREIRA — Variation in fibres and vessel elements of <i>Delonix regia</i> (Caesalpinaceae) . . . . .	153
BALLERO, M.; SCRUGLI, S.; SCRUGLI, A. — La flora del Tacco di Ticci (Sardegna Centrale) . . . . .	55
BARROS, IVA CARNEIRO LEÃO; MANCILHA, ELIANA SANTOS DE LYRA; SANTOS, KATIA MARIA RIBEIRO DOS; SÁ, PATRÍCIA SHEYLA DE ALMEIDA — Aparelhos estomáticos em <i>Selaginella breynei</i> Spring et Char., <i>Selaginella convoluta</i> (Arnott) Spring e <i>Selaginella muscosa</i> Spring (Pteridophyta) . . . . .	139
CARO DOMINGUEZ, F.; SANCHEZ-ANTA, M. <sup>a</sup> A.; GALLEGO MARTIN, F. & NAVARRO ANDRES, F. — Phenomorphological aspects of three species in a shrubland of <i>Genisto hystricis-cytisetum multiflori</i> Rivas Martínez in Rivas Martínez et al. in a dehesa of Salamanca	303
DIOSDADO, J. C. & PASTOR, J. E. — Contribución al conocimiento cariológico del género <i>Ranunculus</i> en la Península Ibérica — Secciones <i>Physophyllum</i> Freyn y <i>Hecatonia</i> (Lour.) DC. . . . .	29
GIL, MARIA CÂNDIDA P. — Contribuição para o conhecimento da reprodução sexuada em <i>Bacillariophyceae</i> — Auxósporos e células iniciais de <i>Cocconeis placentula</i> Ehr. e <i>Amphora veneta</i> Kutz. . . . .	161
GOVAERTS, R. — Rare and threatned plant species of southern Portugal	285
JUAN, R. & PASTOR, J. — Contribución al estudio cariológico del género <i>Euphorbia</i> L., subgén. <i>Esula</i> Pers. . . . .	41
LEONARDIS, WALTER DE & FICHERA, GIROLAMO — Diagnostic value of seed coat in italian taxa of the genus <i>Sinapis</i> and <i>Brassica nigra</i> . . . . .	235
LOPEZ GUADALUPE, M.; LOSA QUINTANA, J. M.; NEGRILLO GALINDO, A. M. & JIMENEZ ALOT, M. V. — Distribución corológica del género <i>Odonites</i> en la provincia de Granada — Ecología y fitosociología . . . . .	125
MATEU, I. & GÜEMES, J. — Estudio carpológico del género <i>Launaea</i> Cass. ( <i>Asteraceae</i> ) en Europa . . . . .	85
OBUTE, G. C. & UGBOROGHO, R. E. — Mutagenic effects of colchicine on <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walpers ( <i>Papilionaceae</i> ) in Nigeria . . . . .	219
OLWOKUDEJO, J. DELE & BAMGOWU, O. O. — Leaf epidermal morphology in <i>Bridelia</i> ( <i>Euphorbiaceae</i> ) and its taxonomic significance . . . . .	5
QUEIRÓS, MARGARIDA — Números cromossómicos para a flora portuguesa. 116-127 . . . . .	117

Enviar o original e o resumo por separado para o Departamento de Botânica, Universidade de Coimbra.

4212/1982

Serviço de Publicações

# ÍNDICE

QUEIRÓS, MARGARIDA — Números cromossómicos para a flora portuguesa. 128-138 . . . . .	317
REINOSO FRANCO, JUAN; OTERO-SCHMITT, JORGE & VIERA BENITEZ, M. <sup>a</sup> C. — Considerations on cryptogamic flora of a littoral atlantic. Cave: Punta Queixal (Galicia, NW Spain) . . . . .	19
RESENDE, M. <sup>a</sup> EMÍLIA; CAROLINO, M. <sup>a</sup> MANUELA & RODEIA, N. TEIXEIRA — Studies on the $\beta$ -glucosidase from <i>Dichomitus squalens</i> (Karst.) Reid induced by carboxymethylcellulose . . . . .	211
RODEIA, NATÉRCIA TEIXEIRA — Estudo do complexo enzimático celulolítico de <i>Trichoderma koningii</i> Oudesman — Indução por Solka-Floc . . . . .	245
SAITO, KOSHI & MORI, TOSHIYUKI — Acceleration of $\alpha$ -glucosidase activity by diluted ketones . . . . .	297
SANTOS, ARLETE; SANTOS, ISABEL; ALMEIDA, J. M. and SALEMA, R. — In- fluence of nitrogen nutrition on chloroplast structure, RuBisCo and PEP-Case from corn . . . . .	323
SANTOS, M. FÁTIMA; LOURENÇO, OLINDA & CARVALHO, GRAÇA — ACOI — The culture collection of Algae of the Department of Botany University of Coimbra. Supplement — II . . . . .	173
SENA, KÉSIA X. F. RIBEIRO DE; ANDRADE, MARIA SALOMÉ A. S. DE; LIMA, ROSÁLIA C.; SANTOS, EDVALDO R. DOS — Atividades biológicas da <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ( <i>R. latifolius</i> Mill.) . . . . .	97
SIMONSON, W. D. — The genus <i>Linaria</i> (Scrophulariaceae) in the western Algarve . . . . .	343
SOÑORA, X; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J. & ORTIZ, S. — Apontamentos sobre a flora galega — XIV . . . . .	201
VARENNES, AMARILIS DE & SEQUEIRA, JOSÉ C. — Ultrastructural changes in white lupin induced by iron supply . . . . .	111
VICENTE, C. & XAVIER-FILHO, L. — On the biological origin of depsidones (Dalicaceae) in Europe . . . . .	133



## INSTRUÇÕES AOS COLABORADORES

1. O *Boletim da Sociedade Broteriana* é uma revista destinada à publicação de artigos originais em todos os domínios da Botânica. No entanto, artigos muito extensos sobre florística, fitogeografia e fitossociologia são publicados geralmente nas *Memórias*, enquanto que os trabalhos de divulgação científica e os referentes à história da Botânica são reservados para o *Anuário* — as duas outras revistas da Sociedade.

2. Destinado principalmente à publicação dos artigos elaborados pelo pessoal científico do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra, nele se inserem todavia trabalhos da autoria de membros da Sociedade, bem como os de outros investigadores, quer portugueses, quer de outras nacionalidades. A publicação de qualquer artigo, porém, está na dependência de aprovação pela Comissão Redactorial.

3. Os originais entregues para publicação devem ser dactilografados a dois espaços e possuir uma margem da largura habitual. Poderão ser redigidos em português, inglês, francês, alemão, italiano ou espanhol. O nome do autor (ou autores) deverá figurar na primeira página, bem como o endereço da Instituição em que trabalha(m). Um resumo, não excedendo aproximadamente 300 palavras, preferivelmente em inglês, deverá iniciar o artigo.

4. Os nomes latinos dos géneros, espécies e categorias infra-específicas que figurarem no texto devem ser sublinhados uma só vez, enquanto que os nomes dos autores, quando não escritos em maiúsculas, devem ser sublinhados com um traço ondulado. As palavras em negro devem ser sublinhadas duas vezes. Os nomes dos autores citados no texto devem ser seguidos pela data da publicação entre parênteses.

5. No que respeita à ordenação e disposição da bibliografia, seguir as normas utilizadas em um dos volumes recentes desta publicação.

6. As figuras a intercalar no texto, geralmente reproduzidas em zincogravura, não deverão exceder a mancha tipográfica. As estampas *hors-texte* (em regra fotografuras) serão impressas em papel *couché* e não deverão ultrapassar  $13 \times 18$  cm. Sempre que as figuras sejam de pequenas dimensões, aconselha-se a sua reunião em estampas com as dimensões acima indicadas.

7. Cada autor (ou grupo de autores) receberá 50 separatas grátis, sendo as excedentes que pretender fornecidas ao preço do custo e pagas directamente à Tipografia.

## INSTRUCTIONS AUX COLLABORATEURS

1. Le *Boletim da Sociedade Broteriana* est un périodique destiné à la publication d'articles originaux concernant tous les domaines de la Botanique. Cependant, des articles très longs sur floristique, phytogéographie et phytosociologie sont en général publiés dans les *Memórias*, tandis que les travaux de divulgation scientifique et ceux concernant l'histoire de la Botanique sont réservés au *Anuário* — les deux autres revues de la Société.

2. Ayant particulièrement pour but la publication des articles élaborés par le personnel scientifique du Department de Botanique de l'Université de Coimbra, ce périodique publie aussi les travaux des membres de la Société, ainsi que ceux d'autres botanistes, soit portugais, soit de quelque autre nationalité. Toutefois, la publication des articles est sous la dépendance de l'avis de la Commission de Rédaction.

3. Les manuscrits doivent être dactylographiés à deux espaces et avoir une marge. Ils peuvent être rédigés en portugais, anglais, français, allemand, italien ou espagnol. Le nom de l'auteur (ou des auteurs) devra figurer à la première page après le titre du travail, ainsi que l'adresse de l'Institution où il(s) travaille(nt). Un résumé, ne dépassant pas 300 mots, de préférence en anglais, devra ouvrir l'article.

4. Les noms latins des genres, des espèces et des catégories infraspécifiques devront être soulignés une fois, tandis que les noms des auteurs, quand non dactylographiés en lettres majuscules, doivent être soulignés par une ligne ondulée. Les noms des auteurs cités dans le texte doivent être suivis de la date de la publication mise entre parenthèses.

5. En ce qui concerne la bibliographie, voir un des volumes récents du *Boletim*.

6. Les figures du texte, en général des dessins à l'encre de Chine, ne doivent pas, avec les légendes, dépasser  $10,5 \times 18$  cm. Les planches *hors-texte* ne devront pas dépasser  $13 \times 18$  cm. Les figures à petites dimensions doivent être réunies dans des planches aux dimensions ci-dessus mentionnées.

7. Chaque auteur (ou groupe d'auteurs) recevra 50 tirages à part gratuits, tandis que ceux excédant ce nombre lui seront fournis au prix du coût et devront être payés par l'auteur directement à l'Imprimerie.



INSTRUMENTOS DE CREDITACION

El presente es un instrumento de crédito emitido por el Banco de España en virtud de la Ley de 15 de Mayo de 1908, que regula el sistema de crédito en España. Este instrumento tiene un valor nominal de 100 pesetas y es emitido a favor del Sr. D. Juan de Dios García, con domicilio en Madrid, España. El instrumento es válido y tiene plena fuerza de crédito en todo el territorio de España y en las posesiones ultramarinas. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908.

El presente es un instrumento de crédito emitido por el Banco de España en virtud de la Ley de 15 de Mayo de 1908, que regula el sistema de crédito en España. Este instrumento tiene un valor nominal de 100 pesetas y es emitido a favor del Sr. D. Juan de Dios García, con domicilio en Madrid, España. El instrumento es válido y tiene plena fuerza de crédito en todo el territorio de España y en las posesiones ultramarinas. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908.

El presente es un instrumento de crédito emitido por el Banco de España en virtud de la Ley de 15 de Mayo de 1908, que regula el sistema de crédito en España. Este instrumento tiene un valor nominal de 100 pesetas y es emitido a favor del Sr. D. Juan de Dios García, con domicilio en Madrid, España. El instrumento es válido y tiene plena fuerza de crédito en todo el territorio de España y en las posesiones ultramarinas. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908.

El presente es un instrumento de crédito emitido por el Banco de España en virtud de la Ley de 15 de Mayo de 1908, que regula el sistema de crédito en España. Este instrumento tiene un valor nominal de 100 pesetas y es emitido a favor del Sr. D. Juan de Dios García, con domicilio en Madrid, España. El instrumento es válido y tiene plena fuerza de crédito en todo el territorio de España y en las posesiones ultramarinas. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908. El instrumento es emitido en virtud de la autorización concedida al Banco de España por el Real Decreto de 15 de Mayo de 1908.