



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias

Edição 2010/2011

Relatório de Projecto

Avaliação da variação sazonal da evapotranspiração em diferentes grupos funcionais que integram o Montado

Bolseiro(a): Fábio Rodrigues

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Curso: Licenciatura em Biologia
3º Ano

Tutor(a): Prof.^a Cristina Máguas

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer às pessoas que não estão aqui mencionadas (por não me lembrar de todas elas, infelizmente) mas que deram um importante contributo no desenvolvimento deste trabalho.

Quero agradecer ao Dr. Rodrigo Maia do SIIAF, pela paciência que teve a analisar todas as amostras do trabalho e pelo tempo que despendeu a ajudar-me a construir protocolos e a tirar todas as dúvidas, por mais chatas que fossem. Aproveito e agradeço à Marta Pimpão, também do SIIAF que me ajudou nas minhas primeiras extracções e deu todas as dicas necessárias para que tudo corresse de forma, vá, aceitável!

A todo o grupo de doutorandos, e não só, da Universidade de Bielefeld na Alemanha, com os quais fui várias vezes ao campo, sempre num espírito de interajuda, nomeadamente a Maren, o Stephan e a Kathrin.

Quero agradecer à Prof.^a Dra. Margarida Ramos, que mostrou também imensa paciência e deu apoio na construção do protocolo para a utilização do Psicrómetro.

Agradeço também à Ângela Pereira, pelo apoio incansável que prestou durante todo o trabalho que fui desenvolvendo em termos logísticos.

Finalmente, à minha tutora, a Prof.^a Dra. Cristina Máguas, em primeiro lugar por ter apoiado este projecto comigo, mas também por ter despertado em mim a paixão pela ecofisiologia de plantas e por ter aberto portas a uma área da Biologia que me passava totalmente ao lado, algo que só os excelentes educadores e investigadores conseguem fazer; por me ter aberto os olhos a uns organismos que facilmente escapam à vista mas que são de facto extraordinários do ponto de vista adaptativo; por ter esclarecido toda e qualquer dúvida, por mais parva que fosse, que me surgisse; por tudo aquilo que não me lembro!

Índice

INTRODUÇÃO	1
OBJECTIVOS	4
METODOLOGIA	4
Local de estudo	4
1. Determinação das fontes de água dos diferentes grupos funcionais do montado	5
Extracção de água xilémica e nos talos liquénicos	6
Análise do $\delta^{18}\text{O}$	6
Análise Estatística	7
2. Optimização do Protocolo para determinação do Potencial Hídrico de material vegetal (e determinação do mesmo para as espécies Evernia prunastri, Usnea rubicunda e Parmotrema reticulatum)	8
Calibração	8
Análise Estatística	9
Rectas de Calibração e Factores de Correção	9
Determinação do Potencial Hídrico de Líquenes	10
RESULTADOS	11
1. Fontes de Água dos Grupos Funcionais que compõem o montado	11
Dados climáticos	11
Análise do $\delta^{18}\text{O}$	11
Diferenças entre as diferentes datas de amostragem para Quercus suber	12
Diferenças entre as espécies de líquenes e entre datas	12
Comparação entre a água da matéria vegetal e rainwater e groundwater	13
2. Optimização do Protocolo para determinação do Potencial Hídrico de material vegetal (e determinação do mesmo para as espécies Evernia prunastri, Usnea rubicunda e Parmotrema reticulatum)	15
Calibração	15
Diferenças entre câmaras	15
Diferenças Diárias	16
Determinação do Potencial Hídrico dos Líquenes	16
EXECUÇÃO FINANCEIRA DE ACORDO COM O PLANO ORÇAMENTAL PREVISTO	16
CONCLUSÃO/DISCUSSÃO	17
Fontes de água no montado	17
Optimização do protocolo para a determinação do Potencial Hídrico	18
Potencial hídrico dos líquenes e curvas de seca	19
BIBLIOGRAFIA	19



Introdução

O montado português é um ecossistema de grande valor ao nosso país. Não só é uma das maiores fontes de rendimento económico para o país como é também *hot spot* de biodiversidade de flora e fauna. Na base de qualquer ecossistema está a vegetação, a fonte primária de toda a energias que flui ao longo de todas as restantes cadeias tróficas que se seguem. Para estudar um ecossistema como o Montado, uma primeira aproximação envolve o conhecimento de como que a vegetação interage com o meio e de que forma se mantêm apta a lidar com flutuações ambientais, mantendo o ecossistema vivo.

A água é um factor, se não “o” factor que determina o modo como todas as espécies lidam com o meio, constituindo uma gigantesca “fonte adaptativa” no sentido de ser uma força capaz de gerar um vasto número de adaptações. Flutuações na presença desta substância fundamental condicionam o tipo de vegetação bem como as adaptações que estas hão-de apresentar. Num montado, as plantas têm que estar extremamente adaptadas ao tipo de variações que caracterizam o clima da P. Ibérica, Invernos frescos e húmidos e Verões quentes e secos. Assim, face a estas variações, as plantas terão que ter fontes de água disponíveis durante maior parte do ano para poderem subsistir, desenvolvendo adaptações específicas para as poderem aproveitar. Posto isto, é fácil compreender que dentro de uma mesma comunidade de plantas, as espécies podem diferir substancialmente na forma de captação de água – por exemplo, na profundidade das suas raízes – e, como tal, no consumo de água. Desta forma, a composição de espécies num ecossistema pode alterar os padrões de consumo de água no mesmo (Canadell, et al., 1995; Canadell, et al., 1996; Jackson, et al., 1995; Jackson, et al., 2000). No entanto, a proveniência da água ou a profundidade a que esta é captada é algo tradicionalmente difícil de se fazer. Mas com a tecnologia moderna, esta identificação torna-se progressivamente mais simples por meio de análises de isótopos (de Hidrogénio ou de Oxigénio) quando as fontes de água têm assinaturas isotópicas distintas (Phillips, et al., 2001; Ehleringer, et al., 1992; Dawson, 1993; Corbin, et al., 2005).

Os isótopos correspondem a formas atómicas diferentes de um dado elemento cuja massa atómica varia devido à presença de números distintos de neutrões. Um isótopo pode ser considerado estável ou instável conforme a sua velocidade de decaimento (Criss, 1999), sendo que são estes os isótopos preferencialmente utilizados nesta área de estudo. Como na raiz não ocorre fraccionamento de isótopos, um processo de separação de diferentes espécies de isótopos segundo diferentes propriedades químicas como a massa (White, et al., 1985), a composição isotópica da água xilémica da planta reflecte a composição isotópica da água que a planta recolheu do ecossistema (Dawson, et

al., 1991; Dawson, 1993; Corbin, et al., 2005; Dawson, et al., 1996). Como a água do solo (*groundwater*) retém uma assinatura isotópica relativamente estável numa base anual, é possível realizar a identificação da fonte de água que existe é responsável pela recarregamento da *groundwater* quer da água presente no coberto vegetal, nomeadamente, toalhas freáticas ou água da precipitação (Ehleringer, et al., 1991)

Num montado, o apuramento destas fontes de água pode ser realizado ao nível de vários grupos funcionais. A vegetação de porte arbóreo são essencialmente sobreiros que podem ou não ter a capacidade de recolher água a maiores profundidades que outros grupos funcionais como a vegetação herbácea e arbustiva, mais limitadas à presença de água nos estratos mais superficiais do solo. No entanto alguns grupos de plantas, como é o caso das Criptogâmicas, não estabelecem necessariamente um *continuum* entre água do solo e a atmosfera, podendo satisfazer as suas necessidades hídricas a partir do vapor de água atmosférico apenas. Tendo em conta esta particularidade, foram estudadas algumas espécies de líquenes no decorrer deste projecto. Estes organismos são exemplos típicos de simbiose mutualista entre dois ou três organismos. O dominante é o fungo ou micobionte, que compõe maior parte da biomassa do líquen e que controla um ou dois fotobiontes – que podem ser algas verdes ou cianobactérias –, em termos de crescimento (Hartard, 2007). Estes podem tomar morfologias variadas e surgiram de forma independente em várias linhas filogenéticas (Raven, et al., 1992). Nesta associação, o micobionte fornece água e nutrientes para o fotobionte, protegendo-o inclusivamente de excesso de radiação, enquanto o fotobionte produz hidratos de carbono que são móveis, como polióis no caso das algas verdes e glucose em ciano-líquenes, que são utilizados pelo fungo heterotrófico. Esta associação permite, assim, o aumento do *fitness* de ambos os elementos presentes na simbiose (Raven, et al., 1992). As espécies de fungos que compõem as diferentes espécies de líquenes são cerca de 13500, sendo do filo Ascomycota e são encontrados cerca de 40 géneros de fotobiontes em associação, sendo que os mais frequentes são as de algas verdes *Trebouxia*, *Pseudotrebouxia* e *Trentepohlia* para algas verdes e *Nostoc* para Cianobactérias, sendo que certos líquenes podem conter quer uma alga verde que uma cianobactéria. Estes organismos são ubíquos, estando presentes em cerca de 8% de toda a superfície continental terrestre em qualquer tipo de ecossistema, dos quais o montado não é excepção (Hartard, 2007; Raven, et al., 1992). Como organismos não vasculares, não têm uma disponibilidade de água constante e não apresentam nenhuma forma de controlar a perda de água, tornando-os dependentes da água que se encontra disponível no meio – organismos poiquilohídricos. Desta forma, o seu próprio metabolismo encontra-se adaptado à disponibilidade de água, sendo muito reduzido quando esta se encontra ausente e, quando rehidratado, experimenta um aumento metabólico acentuado

(Hartard, 2007). Isto implica que tem que ter capacidade de hidratação extremamente elevada, sendo que esta se encontra predominantemente dependente do fotobionte (Beckett, 1997) e da morfologia do mesmo (Máguas, et al., 1997). As suas características morfológicas e funcionais relativamente simples conferem-lhes a particularidade de poderem funcionar como excelentes indicadores ambientais. No entanto não se encontram muito presentes em investigação ecológica e ecofisiológica, faltando imenso conhecimento acerca do seu funcionamento e influência em termos bióticos e abióticos num ecossistema. As trocas de água compõem uma das muitas interações que estes organismos podem realizar com o meio envolvente, mas por não terem raízes, ficam dependentes das trocas que realizam com o vapor da água da atmosfera (Hartard, 2007). Esta capacidade de recolher vapor de água atmosférica está, em grande parte, dependente das propriedades físicas do organismo, nomeadamente, do seu potencial hídrico (Taiz, et al., 2006).

O potencial hídrico é uma característica, medida em Pascal e que permite explicar a circulação de água em plantas e que contém vários factores que o influenciam: Concentração (Potencial Osmótico), Pressão (Turgescência), Altura (Potencial Gravítico), Capilaridade (Potencial de Matriz) e outros (Taiz, et al., 2006; Hartard, 2007). Assim, o Potencial Hídrico de uma planta resulta da combinação de todos estes factores e são as diferenças no potencial hídrico ao longo de vários compartimentos da planta que permitem o movimento de água de forma ordeira. Os valores do potencial hídrico são negativos ou zero, sendo que um potencial hídrico de valor zero ou relativamente próximo é indicativo da elevada hidratação e da baixa necessidade de água. Por sua vez, quanto mais negativo for o valor do potencial hídrico, maior é a necessidade de água pela planta – indica que esta encontra-se num estado de desidratação tanto maior quanto mais negativo for o potencial. Esta propriedade pode ser aplicada a uma escala microscópica, permitindo a circulação de água ao longo do xilema de regiões de potencial hídrico menos negativo para outras de potencial hídrico mais negativo – a região com potencial hídrico mais negativo exerce uma pressão negativa que conduz ao fluxo de água para essa mesma região (Taiz, et al., 2006). No caso de líquenes, a circulação de água é feita desta forma, visto que não se desenvolvem estruturas especializadas no transporte de água como ocorre em algumas criptogâmicas e em plantas superiores (Raven, et al., 1992). Desta forma, torna-se importante perceber qual a capacidade que um líquen tem de recolher água do meio, sob a forma de vapor de água ou líquida e qual a sua capacidade de equilibrar com o meio. Embora não tenham um sistema de transporte de água especializado, têm capacidade de reter água ao nível extracelular, pelo que apresentarão igualmente um valor de potencial hídrico para diferentes estados de hidratação (Hartard, 2007). Tudo isto é concretizado determinando-se o valor do potencial hídrico destes organismos para diferentes valores de conteúdo hídrico.

Objectivos

O principal objectivo do trabalho, tendo por base o conhecimento descrito anteriormente, foi determinar e quantificar os fluxos de água no montado, tendo em conta os diferentes grupos funcionais (árvores e criptogâmicas) e a utilização de indicadores ecológicos para o vapor de água (líquenes). Este objectivo pode ainda ser dividido em:

- Identificação das fontes de água utilizadas pelos diferentes grupos funcionais e o seu grau de relevância e optimização da sua determinação;
- Optimização do modelo liquénico como indicador ecológico da composição isotópica do vapor de água no ecossistema, através da optimização de um protocolo para determinação do potencial hídrico dos mesmos.

Um dos objectivos previstos inicialmente não pôde ser realizado devido aos atrasos do projecto e na chegada de material necessário para cumprir todos os objectivos a que me propus. Esse ponto que falhou correspondia à quantificação da evapotranspiração dos diferentes grupos funcionais do ecossistema, por “*eddy covariance*”.

Metodologia

De uma forma geral, o trabalho desenvolvido pode ser dividido em duas componentes distintas: uma componente corresponde à análise das fontes de água de dois grupos funcionais do ecossistema, um arbóreo, representado por *Quercus suber*, e outro liquénico, representado essencialmente por *Evernia prunastri*, *Usnea rubicunda* e *Parmotrema reticulatum*; a outra componente corresponde à optimização de um protocolo para a determinação do potencial hídrico de material vegetal bem como a determinação do potencial hídrico dos líquenes para a respectiva optimização do modelo.

Local de estudo

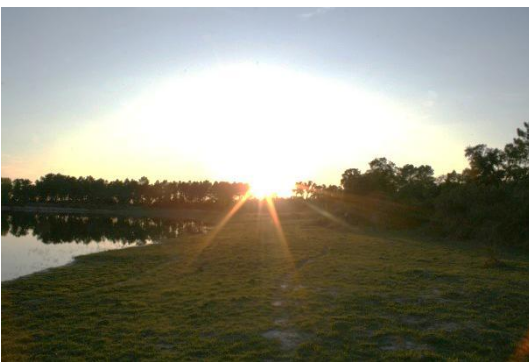


Figura 1 - Fotografia da Herdade da Machoqueira

As amostras foram recolhidas na Herdade da Machoqueira, uma Herdade Ribatejana encontra-se a 25 km da cidade de Coruche (39° 6' 0.00" N, 8° 22' 1.20" W, altitude: 79-173 m). A comunidade vegetal é maioritariamente composta por *Quercus suber*, que apresenta maior cobertura, misturado com *Q. ilex* ssp. *ballota* com um sub-coberto composto por algumas plantas de porte arbustivo (*Ulex* sp., *Cistus* sp.),

apresentando ainda alguns terrenos de pasto com herbáceas anuais e gramíneas decíduas. A temperatura média anual é de 15°C, a precipitação média anual é de 600 mm com Verões muito secos e quentes e Invernos amenos e húmidos. É um típico montado mediterrânico com uma canópia aberta numa paisagem muito homogénea, representando uma zona de baixo impacto ambiental com algum controlo a nível silvo pastoril. Como este trabalho integra um conjunto de universidades – Faculdade de Ciências, Instituto Superior de Agronomia e a Universidade de Bielefeld, foi recolhida informação 24/7 durante todo o período de amostragem, pelo que tive acesso constante a informações vitais na interpretação dos resultados como temperatura, humidade e qualquer outro factor climático.

1. Determinação das fontes de água dos diferentes grupos funcionais do montado

Recolha de amostras

As amostras foram recolhidas nos meses de Outubro a Fevereiro. As espécies usadas foram *Quercus suber* como elemento arbóreo e como exemplares liquénicos foram recolhidos exemplares das espécies *Evernia prunastri*, *Usnea rubicunda* e *Parmotrema reticulatum*. O espaço de tempo para a recolha de amostras ficou limitado apenas àqueles meses pelo facto de toda a linha de extração de água necessária só ter ficado terminada e disponível em Março. Durante o mês de Março, os dias em que se tinha planeado a recolha de mais material foram retirados do calendário de execução pelos períodos de chuva que se deram ao longo dos fins-de-semana desse mês. A hora de colheita do material não foi sempre a mesma, embora maior parte das amostras tenham sido recolhidas por volta das 17 horas. Apenas no último dia de amostragem todo o material vegetal foi recolhido durante a manhã, por volta das 11 horas. As amostras de *Q. suber* foram recolhidas de cinco árvores diferentes, relativamente próximas, através do corte de ramos altos que se encontravam na zona mais voltada para Sul. De cada árvore eram recolhidos quatro réplicas por cada data de amostragem. As amostras de líquenes foram recolhidas do tronco de diferentes espécies do género de *Quercus* da área circundante. Os meses de amostragem limitaram também o número de grupos funcionais analisados. A vegetação herbácea e arbustiva só surge durante o mês de Março após alguma chuva e com o tempo a ficar mais quente, voltando a desaparecer durante o Verão até à Primavera seguinte.

Foi ainda recolhida água da chuva utilizando recipientes associados a um tubo e a um funil construídos no laboratório e recolheu-se inclusivamente água da toalha freática através de um poço afastado alguns metros do local de amostragem. As amostras de água recolhidas de ambos os pontos mencionados foram analisadas do ponto de vista isotópico para determinar de onde é que a vegetação retirava a água de que necessitava.

As amostras de material vegetal recolhidas eram colocadas em Exetainers® da Labco que preservavam toda a água contida nos ramos ou nos talos liquénicos. As amostras de água do subsolo e de água da chuva eram armazenadas em frascos próprios. Durante o período em que não foram analisadas, as amostras foram conservadas ou num congelador ou num frigorífico.

Extracção de água xilémica e nos talos liquénicos

A água contida nos talos liquénicos e nos ramos de *Quercus* foi extraída através uma construção especialmente concebida para esse objectivo, uma adaptação de uma Linha em Vácuo de Crio-Extracção criada por Rolf Siegwolf. A água extraída dos ramos estava predominantemente contida nos tecidos de transporte da planta, nomeadamente o xilema e floema. No caso dos líquenes, a água não tem origem específica pois o grau de organização tecidular nestes organismos não é o mesmo.

A linha de extracção funciona tendo por base a ocorrência de vácuo e um gradiente térmico para permitir uma eficiente extracção da água contida no material e a sua recuperação. Em termos gerais, essa linha de montagem é composta por 4 unidades de extracção, cada uma com capacidade para 5 amostras. Estas 4 unidades têm um sistema de vácuo próprio, gerado por uma bomba apropriada e essas unidades, durante todo o período de extracção, que demora cerca de 90 minutos, tem que permanecer em vácuo constante. As amostras vegetais são então colocadas em tubos simples e estes são, por sua vez, colocados num banho com água a 80°C. Estes tubos encontram-se, por sua vez, associados em continuidade com tubos em “U” colocados num recipiente com Azoto Líquido. Este sistema permite que, em vácuo, a água evapore do material vegetal que está no banho a 80°C e que condense quando chega aos tubos em “U”. Todos os procedimentos e cuidados a ter durante a extracção encontram-se descritos no protocolo em anexo, construídos com a ajuda do Dr. Rodrigo Maia do SIIAF da Faculdade de Ciências.

Como esta linha era altamente requisitada por outros membros da Faculdade, o número de amostragens teve que ser reduzido para aqueles meses apenas, caso contrário ter-se-ia acumulado uma muitas amostras e não teria sido possível realizar todas as extracções e as respectivas análises isotópicas. Para além disso, houve ainda alguns atrasos na recepção materiais necessários para que se pudesse efectuar a experiência.

Análise do $\delta^{18}O$

As análises da composição isotópica do oxigénio ($\delta^{18}O$) nas amostras de água recolhidas foram todas levadas a cabo pelo Dr. Rodrigo Maia no SIIAF da Faculdade de Ciências. Essa determinação foi realizada através de Espectrometria de Massa de Razão Isotópica (IRMS). Este método de análise tem por base a separação de átomos carregados e de moléculas com base na sua massa e no seu

movimento através de campos magnéticos e/ou eléctricos (Hoefs, 2004). Usam-se fluxos gasosos, iónicos e eléctricos para permitir a formação de um fluxo da amostra ao longo de um campo eléctrico e magnético. Com base nestes fluxos, os constituintes atómicos/moleculares de um composto são separados conforme a respectiva relação massa/carga e deflectidos em trajectórias circulares quando passam pelo campo magnético. Esta análise só pode ser realizada quando a quantidade de água total que se extrai do material vegetal é superior a 100 μL , sendo que os valores obtidos são mais fiáveis a partir de 200 μL .

Análise Estatística

A determinação das diferenças entre os valores de $\delta^{18}\text{O}$ das diferentes amostras que recolhi foi feita através do programa de análise estatística IBM® SPSS® Statistics 19.0. O primeiro passo foi testar se as amostras eram normais e homocedásticas, realizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Caso não fossem homocedásticas e/ou normais, prosseguia-se com a realização de testes não paramétricos para determinar diferenças nos valores médios obtidos, nomeadamente teste Kruskal-Wallis para determinar se havia ou não diferenças entre as diferentes espécies de líquenes e entre as diferentes datas de amostragem bem como para as diferentes datas de amostragem para árvores. Caso houvessem diferenças, comparava-se cada situação com outra através do teste Mann-Whitney. No caso de as amostras serem homocedásticas e normais, realizavam-se testes paramétricos análogos aos já mencionados, nomeadamente, ANOVA para verificar se havia diferenças entre espécies ou datas de amostragem. Se se verificassem diferenças significativas, recorria-se ao teste T-Student para comparar cada situação.

Para o caso de *Quercus suber*, embora tenham sido monitorizadas 5 árvores distintas, assumiu-se que em termos ecológicos não ocorreriam diferenças entre estas. Assim, após a determinação da assinatura isotópica da água do xilema das diferentes datas todas as amostras foram tratadas como réplicas para a espécie e não para cada árvore. Desta forma determinou-se o valor médio e o respectivo desvio-padrão da composição em $\delta^{18}\text{O}$ para cada data e efectuou-se a comparação estatística da mesma forma.

Feita esta primeira determinação, comparam-se então os valores obtidos de *rainwater* e *groundwater* com os valores obtidos para a água extraída das diferentes espécies, pelo que é de esperar que a assinatura isotópica da água xilémica em *Quercus suber* seja mais semelhante à da toalha freática na ausência de precipitação e que esta se aproxime mais da assinatura da *rainwater* após alguma precipitação. No caso dos líquenes, é expectável que o valor esteja sempre mais próximo do da *rainwater*, pois estes recolhem a água atmosférica sobre a forma de vapor.

2. *Optimização do Protocolo para determinação do Potencial Hídrico de material vegetal (e determinação do mesmo para as espécies Evernia prunastri, Usnea rubicunda e Parmotrema reticulatum)*

Para tal utiliza-se um Psicrómetro – explicar o mecanismo geral de funcionamento do sistema. Para o cumprimento deste objectivo, foi utilizado o PSYPRO™ desenvolvido pela Wescor (ver Figura 9 nos Anexos) que se encontra ligado a 8 Câmaras C-52™, onde são colocados poços com as amostras (ver Figura 10 nos Anexos), de tal forma que se pode fazer a avaliação do potencial hídrico de 8 amostras em simultâneo. É de referir que o aparelho foi recentemente adquirido pelo grupo de Ecologia da Faculdade. O único trabalho que se tinha efectuado no aparelho não tinha produzido resultados fiáveis e reprodutíveis por membros do grupo. Assim, fez parte do projecto realizar algumas calibrações e alguns testes para verificar se o aparelho estava a funcionar correctamente.

O Psicrómetro PSYPRO™ faz a recolha 50 valores em μV específicos durante a avaliação do potencial hídrico. O operador é responsável por determinar a dimensão do período de amostragem (*Measurement Period*), o tempo entre leituras (*Read Average*) e a duração da corrente de arrefecimento (*Cooling Current*), sendo que estes dois últimos parâmetros estão incluídos no período de amostragem. Conforme as indicações dadas pelo operador, o aparelho faz a amostragem de um total de 50 pontos inclusivamente no período de arrefecimento, sendo que esses pontos são apresentados em μV num intervalo de 10 segundos. O valor do potencial hídrico da amostra que é fornecido pelo aparelho resulta da média do conjunto de valores obtidos fora do período de arrefecimento que são depois convertidos de μV em MPa. No decorrer do trabalho recolheram-se quer os 50 pontos registados pelo aparelho quer os valores de Potencial e, por questões de simplicidade de análise, foram utilizados somente os valores de potencial hídrico para realizar análise estatística.

Os valores registados por cada câmara, segundo o que consta nas instruções fornecidas pelo distribuidor, variam de câmara para câmara. Desta forma procedeu-se à construção de rectas de calibração para obter factores de correcção específicos para cada câmara e à análise da variação nas medições entre câmaras e entre datas.

Calibração

Foram usadas 3 soluções *standard* fornecidas pela empresa, bem como discos de papel de filtro com a mesma origem. Cada uma das soluções tinha potenciais hídricos diferentes, nomeadamente, -0,25 MPa, -0,725 MPa e -2,5 MPa. Todo o protocolo desenvolvido para a calibração e para manuseamento do aparelho e do respectivo *software* encontra-se em anexo.

Para testar o correcto funcionamento de cada uma das câmaras foram realizadas 3 medições para a mesma solução num dia, repetindo-se o mesmo procedimento para outros dias – 3 dias, 3 vezes por dia, 9 medidas de potencial hídrico para cada solução.

Análise Estatística

Obtidos os valores de potencial hídrico e das curvas de registo dos pontos medidos pelo aparelho, procedeu-se à realização de vários testes estatísticos com o intuito de demonstrar e verificar a consistência das medidas e possíveis factores de constrangimento nas medições. Os testes efectuados foram:

- Diferenças entre câmaras para cada solução de calibração. Esta era determinada para cada dia de forma independente, pelo que foram realizados testes estatísticos para cada um dias de forma a determinar se estes eram homocedásticos e normais. De seguida dentro de cada dia, foram analisadas as diferenças entre as diferentes câmaras
- Diferenças entre dias para cada valor de Potencial Hídrico e para cada câmara. Para este passo os testes foram realizados de forma independente para cada câmara de forma a averiguar se, para cada câmara, ocorriam ou não diferenças diárias. Este teste foi necessário devido à suspeita de alguma susceptibilidade a flutuações ambientais diárias – o que não seria expectável para as câmaras considerando que estas são bons isoladores.

Todas estas análises foram feitas utilizando o IBM® SPSS® Statistics 19.0. A lógica dos testes utilizados manteve-se que na análise estatística da composição isotópica da água dos talos liquénicos e dos ramos. As diferenças entre câmaras e entre datas para cada solução podem depois ser cruzadas para inferir sobre qual o grau de consistência dos valores registados pelo aparelho e por cada câmara para diferentes valores de potencial hídrico.

Rectas de Calibração e Factores de Correção

Os diferentes valores que foram registados em MPa foram depois utilizados na construção de rectas de calibração para cada câmara. Tal é feito criando um gráfico que coloca os valores de potencial hídrico observados em função dos valores esperados para as 3 soluções. Constrói-se depois uma linha de tendência e averigua-se a correlação entre os pontos e a recta obtida. Se o grau de correlação for bom, utiliza-se o declive dessa recta para determinar o factor da correcção da câmara. Segundo as instruções fornecidas pelo distribuidor, este factor de correcção corresponde ao inverso do declive dessa mesma recta de calibração, pelo que esses valores são introduzidos no aparelho – via manual ou via o *software* fornecido. Assim, os valores registados em bruto pelo aparelho para cada câmara

são multiplicados por esse valor de forma a que se obtenha um valor de potencial hídrico mais próximo da realidade.

Determinação do Potencial Hídrico de Líquenes

Para este passo do projecto, foram utilizadas duas espécies de líquenes, *Evernia prunastri* e *Usnea rubicunda*, ambas recolhidas no mesmo local de amostragem. Após a recolha dos líquenes no local de amostragem procedeu-se à activação dos mesmos. Tal é realizado colocando, num tabuleiro apropriado, um pouco de papel de laboratório humedecido e são depois colocadas as amostras de líquenes que foram recolhidas no mesmo. Este é depois tapado com um vidro, deixando pequenas frestas para a renovação do ar, e colocado na câmara de crescimento (com temperatura, humidade e fotoperíodo óptimos para a actividade dos líquenes). Ao fim de algumas horas, os líquenes são borrifados com água e deixados durante mais ou menos 24 horas. Ao fim desse período, as amostras a serem utilizadas são pesadas em fresco. Depois, com os factores de correcção que foram obtidos durante a calibração, mede-se o potencial hídrico dos mesmos. No primeiro momento de amostragem os líquenes estarão no seu estado de hidratação máximo por terem sido mantidos durante aquele período com presença de água, pelo que é expectável para este estado o potencial hídrico esteja próximo de zero e que o peso destes seja maior neste primeiro momento devido ao maior conteúdo em água.

Seguem-se depois várias medições do potencial hídrico das amostras de líquenes espaçadas ao longo do tempo com estes expostos ao ar. Os intervalos de tempo em que estes são deixados ao ar permitem que haja alguma desidratação e, imediatamente antes da medição do potencial hídrico, as amostras eram de novo pesadas. Terminadas as medições, os líquenes são colocados na estufa durante 48 horas a 60°C. No fim desse período, são pesados e determina-se o peso seco. Estes valores de referência permitem determinar o conteúdo hídrico – é uma medida relativa da quantidade de água, assumindo que a diferença entre o peso fresco (no máximo de hidratação) e o peso seco (resultante da desidratação na estufa) corresponde à quantidade de água máxima que o organismo pode conter. Constrói-se, seguidamente, uma curva de seca, associando o conteúdo hídrico ao respectivo potencial hídrico medido.

Resultados

1. Fontes de Água dos Grupos Funcionais que compõem o montado

Dados climáticos

Os dados climáticos são importantes para que se compreenda as flutuações em termos de precipitação e humidade que rondam os dias de amostragem. Desta forma consegue-se aumentar a certeza relativamente às conclusões retiradas simplesmente pela análise da composição isotópica da água contida no material vegetal recolhido. Na tabela seguinte encontram-se os valores médios de temperatura, humidade relativa e os valores de precipitação nos dias de amostragem. Os gráficos que mostram as flutuações na precipitação, humidade e temperatura durante todos os meses de amostragem encontram-se nas Figuras 3, 4 e 5 dos anexos.

Análise do $\delta^{18}O$

Tabela 1 - Resultados da análise de $\delta^{18}O$ para as diferentes espécies de líquenes e para os sobreiros, mostrando valores médios e os respectivos desvios-padrões, bem como os valores da composição isotópica para água do solo e água da chuva nos respectivos meses de amostragem

Espécies	07-Out	06-Nov	02-Dez	21-Jan	13-Fev
<i>Quercus suber</i>	$-4,09 \pm 0,48$	$-3,70 \pm 0,87$	$-4,46 \pm 0,32$	$-5,31 \pm 0,32$	$-5,08 \pm 1,03$
<i>Evernia</i>	$-2,57 \pm 1,22$	$-1,87 \pm 3,31$		-4,50	-1,50
<i>Usnea</i>	$-4,13 \pm 0,65$	$-4,85 \pm 3,30$			$-3,33 \pm 0,31$
<i>Parmotrema</i>	-4,00	-5,64			
<i>Rainwater</i>	Em falta	Em falta	-6,56	-5,67	-5,4
<i>Groundwater</i>	Em falta	-5,37	-5,12	-5,37	-4,80

Os valores que não apresentam desvios padrão devem-se ao facto de resultarem de uma única amostragem. As colheitas feitas durante o mês de Dezembro de líquenes bem como as de *Usnea* e *Parmotrema* do mês de Janeiro não continham água suficiente para que pudessem ser analisadas, pelo que não existem valores para essas datas. As amostras de *rainwater* e *groudwater* relativas ao mês de Outubro extraviaram-se. A amostra de *rainwater* do mês de Novembro não foi analisada devido ao excesso de impurezas. A quantidade total de amostras analisadas para cada espécie, não só entre diferentes datas como mesmo entre árvores distintas não foi sempre a mesmas. Tal deve-se a falhas na técnica de extracção que levou à perda de água das amostras de água recolhidas do material vegetal. Para além disso, e como já foi referido, nem sempre a quantidade de água recolhida era suficiente para que se pudesse efectuar a análise (inferior a 100 μ L), sendo que esta foi a situação mais comum para o caso dos líquenes. Posto este problema, uma tentativa de resolução foi eliminar

possíveis réplicas e juntar várias amostras da mesma espécie para que pudesse ser obtido um volume de água suficiente para realizar a análise.

Diferenças entre as diferentes datas de amostragem para Quercus suber

Com o resultado do teste de Levene, determinou-se que a amostra era heterocedástica, pelo que se procedeu a testes não paramétricos. Como resultado do teste Kruskal-Wallis, as diferenças entre datas deram significativas ($P < 0,001$), pelo que se procedeu a análise através de teste de Mann – Whitney.

Tabela 2 - Resultados do teste Mann-Whitney para as diferentes datas de amostragem de Quercus suber (NS – Não Significativo, *** - Significativo)

<i>Q. suber</i>	07-Out	06-Nov	02-Dez	21-Jan	13-Fev
07-Out		0,221 NS	0,210 NS	<0,001 ***	<0,001 ***
06-Nov			0,042 ***	<0,001 ***	<0,001 ***
02-Dez				0,004 ***	0,017 ***
21-Jan					0,861 NS
13-Fev					

Verifica-se que as diferenças são significativas entre os pontos extremos de amostragem, nomeadamente, entre o primeiro mês, o de Outubro, e os últimos. Já para esses últimos meses de amostragem, as diferenças deixa de ser significativas.

Diferenças entre as espécies de líquenes e entre datas

Relativamente aos líquenes, como se verifica nas Tabelas 3 e 4, quando comparadas as espécies verifica-se que não existem diferenças significativas na composição isotópica da água que contêm. Quando comparadas as diferentes datas – cuja análise estatística foi paramétrica – verifica-se igualmente a mesma situação.

Tabela 3 - Resultados do teste Kruskal-Wallis para comparação das diferentes espécies de líquenes em cada data

	07-Out	06-Nov	13-Fev
	0,208 NS	0,251 NS	0,180 NS

Tabela 4 - Resultados da ANOVA para a comparação das diferentes datas segundo as diferentes espécies

<i>Evernia</i>	<i>Usnea</i>	<i>Parmotrema</i>
0,806 NS	0,678 NS	

É de referir que devido às dificuldades já apontadas nos capítulos anteriores relativamente à amostragem de líquenes, os dados obtidos não têm grande poder estatístico. Relativamente aos resultados de *Parmotrema reticulatum*, como o volume de água extraído das amostras não era suficiente para realizar análise isotópica, obteve-se apenas um único valor para o $\delta^{18}\text{O}$ em duas datas apenas. Devido à insuficiência de dados para esta espécie, excluiu-se a análise estatística

Comparação entre a água da matéria vegetal e rainwater e groundwater

Para determinar então qual a fonte de água preferencial das diferentes espécies analisadas compara-se (mais uma vez, através de testes estatísticos) a assinatura isotópica da *rainwater* e da *groundwater* com a do material vegetal. Como as amostras do mês de Outubro perderam-se, essa comparação não pôde ser feita para esse mês e, para o mês de Novembro, apenas se pode comparar a assinatura da *groundwater* com a dos diferentes materiais vegetais. Para a comparação de todas as espécies vegetais com a assinatura isotópica das fontes de água hipotéticas utilizaram-se testes não paramétrico devido à significância dos testes de Levene.

Tabela 5 - Resultados do teste de Mann-Whitney na comparação a assinatura isotópica das espécies vegetais recolhidas e as fontes de água hipotéticas

	06-Nov	02-Dez	21-Jan	13-Fev
<i>Quercus Vs Rainwater</i>		0,143 NS	0,143 NS	0,77 NS
<i>Quercus Vs Groundwater</i>	0,099 NS	0,143 NS	0,77 NS	0,143 NS
<i>Evernia Vs Rainwater</i>			0,317 NS	0,317 NS
<i>Evernia Vs Groundwater</i>	0,180 NS		0,317 NS	0,317 NS
<i>Usnea Vs Rainwater</i>				0,180 NS
<i>Usnea Vs Groundwater</i>	0,480 NS			0,180 NS
<i>Parmotrema Vs Rainwater</i>				
<i>Parmotrema Vs Groundwater</i>	0,317 NS			

Verifica-se então que não se obtiveram assinaturas isotópicas que diferissem significativamente das fontes de água hipotéticas. A espécie de líquen *Parmotrema reticulatum* não tem análise efectuada para todos os meses, pois, como já foi referido, o volume de água extraído da amostra não foi suficiente para se poder determinar a composição isotópica. O mesmo se aplica a algumas datas relativamente às outras espécies de líquenes. A Figura 2 apresenta a representação gráfica da assinatura isotópica das espécies vegetais analisadas (com excepção de *Parmotrema reticulatum* para a qual apenas se obteve um único valor viável).

Figuram aqui os valores médios e respectivos desvios-padrões da assinatura isotópica da água da precipitação e da água da toalha freática. Verifica-se que, para *Quercus suber*, os valores da assinatura isotópica encaixam-se melhor nos valores médios da assinatura da precipitação e da toalha freática nos últimos meses de amostragem, enquanto que os valores da assinatura isotópica dos líquenes permanecem muito acima desse valor. No entanto, nos primeiros meses de amostragem, já não se verifica essa concordância, estando os valores da assinatura isotópica quer as amostras de *Quercus* quer as de líquenes acima do valor da assinatura da precipitação e da toalha freática. Relativamente às espécies de líquenes, verifica-se que estes mantêm-se mais ou menos sempre acima dos valores médios de *rainwater* e *groundwater*, com exceção da *Usnea* na amostragem do mês de Novembro.

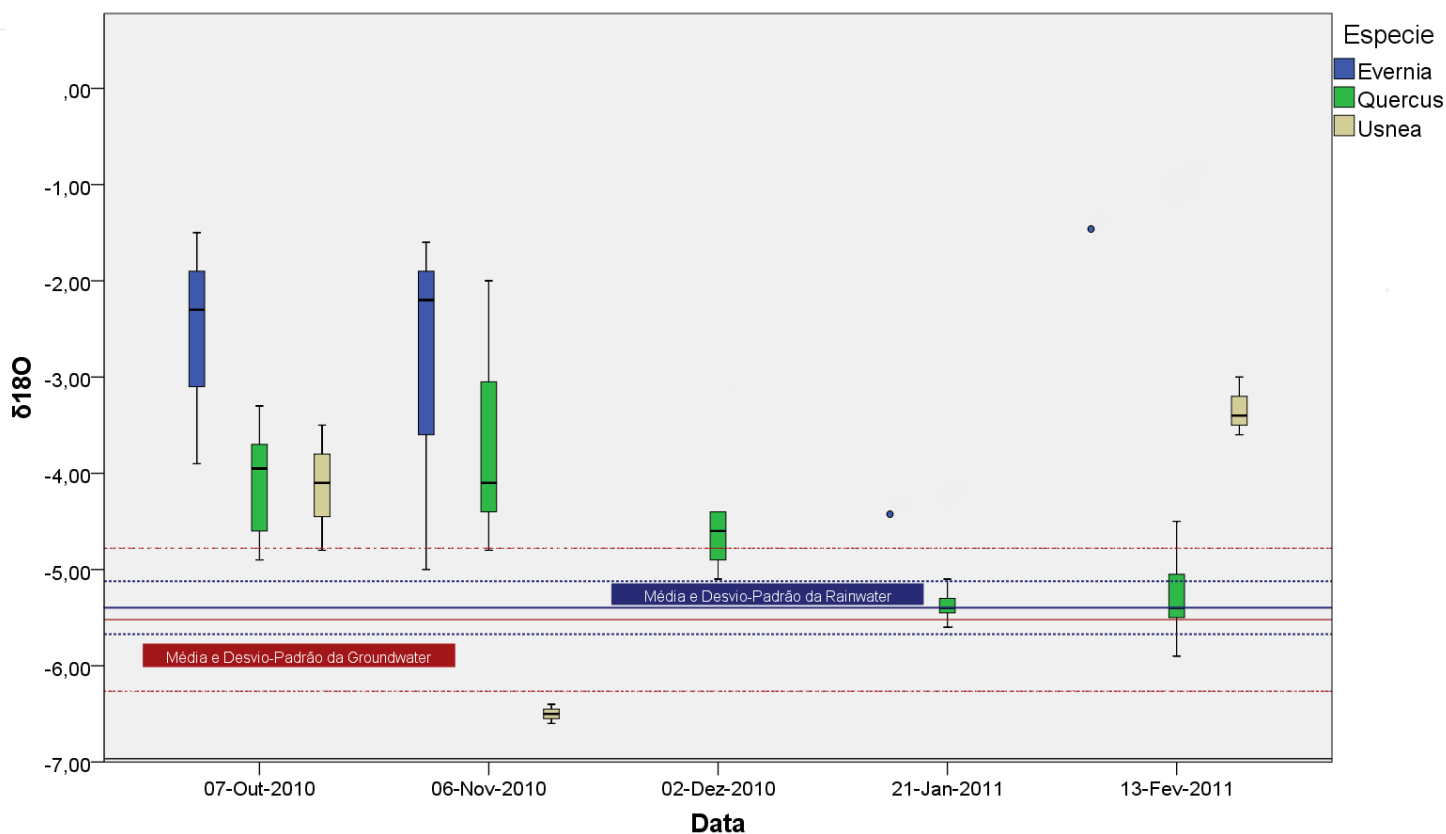


Figura 2 – Representação gráfica das médias e respectivos desvios-padrões do $\delta^{18}O$ para as diferentes espécies analisadas nas diferentes datas, representadas pelas caixas de bigodes (os *outliers* foram removidos para facilitar a compreensão do gráfico). A média e desvio-padrão da *groundwater* encontram-se assinalados a vermelho com linha preenchida e tracejada, respectivamente. O mesmo se aplica para a média e desvio-padrão da *rainwater*, a azul. Os pontos azuis nas duas últimas datas referem-se aos valores do $\delta^{18}O$ para *Evernia*, que são amostras únicas e que, como tal, não são com média e desvio-padrão das caixas de bigodes.

2. *Optimização do Protocolo para determinação do Potencial Hídrico de material vegetal (e determinação do mesmo para as espécies Evernia prunastri, Usnea rubicunda e Parmotrema reticulatum)*

Calibração

Os resultados dos valores do potencial hídrico que foram determinados para as soluções de calibração para o Psicrómetro PSYPRO™ da Wescor permitiram traçar as rectas de calibração para cada uma das câmaras (ver Figura 6 nos Anexos). Estas foram usadas para se obter os declives e os respectivos factores de correcção para cada câmara. É de referir que a câmara 7 encontrava-se avariada e, independentemente da amostra que se colocava nessa câmara, obtinha-se sempre o mesmo valor de Potencial Hídrico – “0,00”.

Tabela 6- Factores de correcção para as câmaras do Psicrómetro PSYPRO™ da Wescor obtidos a partir da determinação do inverso do declive das rectas de calibração

Câmara	1	2	3	4	5	6	8
Factores de Correção	1,230012	1,208751	1,502855	2,056344	2,007629	1,430206	1,497006

Estes valores foram então depois aplicados directamente no *software* do aparelho para que se pudesse determinar os valores de potencial hídrico dos líquenes. Verifica-se desde já alguma discrepância entre os valores devido às diferenças entre câmaras.

Diferenças entre câmaras

Nesta análise verifica-se que os dados eram homocedásticos e normais para as três soluções nos três dias excepto para o terceiro dia na avaliação do potencial hídrico da solução calibrada para -2,5MPa. Assim, os dados puderam ser tratados com testes paramétricos – com excepção do caso já referido. Para a solução a -0,250 MPa, os resultados da ANOVA indicam que não há diferenças significativas entre câmaras para o primeiro dia ($P = 0,078$) mas estas já existem para os outros dois dias ($P < 0,001$). Foram então realizados testes T-Student para estes dois dias (os resultados encontram-se em anexo na Tabela 8). Destes resultados, verifica-se que a câmara 4 é a que apresenta consistentemente diferenças significativas. Para a solução a -0,725 MPa, a ANOVA demonstrou diferenças significativas entre as câmaras para todos os dias ($P < 0,001$) – ver Tabela 9 nos anexos. Os testes T-Student efectuados seguidamente na comparação das câmaras para cada um dos dias, demonstrou claramente que as câmaras mais diferentes eram a 4 e a 5, ou seja, estas continuavam a apresentar os valores que mais contrastavam com os restantes (Tabela 10 nos anexos). Finalmente, para -2,5 MPa, quer para os testes paramétricos efectuados para o primeiro e segundo dias, quer para os não

paramétricos efectuados para o terceiro dia, o panorama foi diferente – ver Tabelas 11, 12, 13 e 14 nos anexos. Verifica-se aqui que, para este valor de potencial, as câmaras respondem de forma mais contrastante, aumentando o número de diferenças que são de facto significativas entre elas.

Diferenças Diárias

Para este parâmetro, os testes efectuados obrigaram à realização de testes não paramétricos que variaram conforme a solução que se mediu. Para a solução de $-0,250$ MPa, verifica-se que só há diferenças significativas para a câmara 2 e que os valores mais contrastantes foram encontrados no terceiro dia (diferença significativa entre o primeiro e terceiro dia e entre o segundo e terceiro dia, com $P = 0,050$). Para a solução a $-0,725$ MPa, não se verifica a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos para cada dia numa dada câmara. Curiosamente, o mesmo padrão já não ocorre para a solução cujo potencial hídrico era de $-2,5$ MPa. As câmaras 4, 5 e 8 não apresentaram diferenças significativas, mas as restantes (1, 2, 3 e 6) tiveram diferenças. Para as câmaras 1 e 2 só os resultados do terceiro dia é que foram diferentes. Para as câmaras 3 e 6, as diferenças entre os diferentes dias foi sempre significativa.

Determinação do Potencial Hídrico dos Líquenes

Com base nos resultados da análise estatística, a determinação do Potencial Hídrico dos líquenes foi apenas feita utilizando as câmaras 1, 2, 3, 6 e 8, por serem as que menos variavam relativamente ao valor esperado. Seguindo o protocolo em anexo, foram determinados os valores do potencial hídrico. No entanto, os valores obtidos não permitem construir uma curva de seca correcta, pois há um aumento do valor do potencial hídrico para valores próximos de zero para ambas as espécies a meio das séries de amostragem no caso de *Usnea* e mais para o final no caso de *Evernia*. Mesmo assim, apresento em anexo os resultados obtidos e uma curva de seca apenas para os pontos que fazem sentido – ver Tabelas 15 a 20 e Figuras 7 e 8. Não foi possível repetir estas experiências correctamente devido à falta de tempo e à requisição do aparelho por outros investigadores.

Execução Financeira de acordo com o Plano Orçamental previsto

Relativamente a este ponto posso afirmar que a execução, em termos financeiros não seguiu o previsto. Tal deve-se essencialmente ao facto de a maioria das idas ao campo de trabalho terem sido reduzidas pelas razões já mencionadas, o que levou a uma redução substancial do valor a ser gasto proposto inicialmente. Com todas as idas ao campo e a estadia durante os meses de campanha seria expectável gastar cerca de 1204€, no entanto, embora tenha realizado ainda 5 viagens das quais 2 foram em meses de campanha, o valor total gasto em viagens e estadia passou para 619€, assumindo que gasto 92€ em viagem, 11€ com a alimentação no local e 23€ pela estadia. No entanto, a este

valor foi necessário acrescentar um disco rígido externo, pois durante o período de análise de dados o disco rígido do computador em que trabalhava deixou de funcionar. Gastei, desta forma, um total de 718,99€ na execução deste projecto.

Conclusão/Discussão

Fontes de água no montado

Não é possível, face aos resultados dos testes estatísticos prever de facto qual será de facto a fonte de água para os dois grupos funcionais analisados. No entanto é possível comparar a assinatura isotópica para a *groundwater* e *rainwater* com os da matéria vegetal e correlacionar esses valores com as variações na precipitação no período de amostragem (ver Figura 3 nos Anexos), disponíveis do mês de Dezembro ao mês de Fevereiro. O facto de ter havido alguns dias de precipitação (entre 29 de Dezembro e 11 de Janeiro) imediatamente antes da amostragem terá sido suficiente para que a assinatura isotópica da água xilémica variasse para valores próximos do valor da precipitação (Figura 2). Este resultado indica uma utilização desta fonte de água por parte dos sobreiros no mês de Janeiro (tal como se vê na Figura 2). Como os níveis de precipitação foram menores durante os dias seguintes, no mês de Fevereiro observou-se uma maior variação no $\delta^{18}\text{O}$, o que pode ser explicado pela maior variação de utilização de fontes de água no solo. Esta observação está de acordo com observações realizadas por outros autores, onde pode haver um fraccionamento na água no solo antes de ser tomada pela raiz devido a fenómenos de evaporação (Dawson and Pate, 1996): Assim a variação neste parâmetro não é analítica mas sim biológica. Embora não existam dados, é possível deduzir que antes do dia de amostragem no mês de Dezembro a precipitação terá levado à aproximação do valor da assinatura isotópica de *Quercus suber* ao da *rainwater*, o que já não ocorre nos meses de Outubro e Novembro, em que o valor se encontra menos negativo, podendo indicar um fraccionamento devido à evaporação da água do solo. Embora tenham sido realizadas colheitas de solo para extracção da água, não foi possível ter essas análises prontas de modo a serem integrados neste estudo. No caso dos líquenes, seria expectável que a sua assinatura isotópica não se aproximasse tão fortemente dos valores de *groundwater* e *rainwater*. No entanto, no caso de *Usnea*, a aproximação é maior do que a esperada. Uma possível explicação será o facto de as amostras ainda conterem água proveniente da precipitação de dias anteriores – embora tal ainda não possa ser confirmado para o mês de Novembro. Uma excelente prova dos líquenes como indicadores ecológicos vem do resultado dos valores da assinatura isotópica de *Evernia* no mês de Janeiro. Nos restantes meses, os valores de $\delta^{18}\text{O}$ são relativamente elevados mas em Janeiro são mais negativos, o que pode ser explicado pelo grau de pluviosidade que antecedeu o dia de amostragem. Se,

provavelmente, a amostragem tivesse sido efectuada uns dias antes, este valor estaria ainda mais próximo do intervalo de variação do $\delta^{18}\text{O}$ da *rainwater*. Pode-se perceber então que os líquenes são bons indicadores ecológicos de alterações no ecossistema a curto prazo devido à sua simplicidade. Já os sobreiros, devido ao seu grau de complexidade, já não são tão bons modelos na mesma escala temporal, para além de que são espécies muito mais conservadoras no que toca às fontes de água. Percebe-se desta forma a importância que estes pequenos organismos simbiotes podem em estudos de impacto ambiental e no quão importante seria melhorar o conhecimento e técnicas de análise dos mesmos. O insucesso dos testes estatísticos na determinação da origem da água que compõe a matéria vegetal pode ser o produto da insuficiência de amostragens. Com uma amostragem mais eficiente, em termos da quantidade de material disponível para que se fizessem extracções mais eficientes, talvez se pudessem ter averiguado diferenças. Para além disso, poder-se-ia ter realizado amostragem do solo mesmo para obter a assinatura isotópica da água que este contém. No caso dos líquenes, conhecendo agora as dificuldades em termos de extracção de água do material liquénico, uma melhor forma de obter melhores e mais assinaturas isotópicas dos mesmos seria através da colheita de mais amostras e aumentar a quantidade de amostra colhida de cada vez. Para além disso, a determinação da composição isotópica da própria estrutura orgânica do líquenes – através da utilização de moinhos, para desfazer o material, acoplado, mais uma vez, ao IRMS – poderia complementar os resultados obtidos pela análise da água extraída do próprio material vegetal e fornecer mais suporte a possíveis resultados que sejam significativos.

Optimização do protocolo para a determinação do Potencial Hídrico

Com base nos resultados dos testes estatísticos, verifica-se em primeiro lugar, que cada câmara responde, de facto de forma diferente a um determinado valor de potencial hídrico, embora as diferenças não sejam significativas para todas as câmaras. Aquelas que de facto são mais distintas em termos dos valores de potencial são as câmaras 4 e 5. No entanto, embora destoantes do esperado, essas mesmas câmaras são consistentes nos valores que medem para um dado valor de potencial – como se verifica na análise das diferenças diárias dos valores medidos para uma dada câmara. Relativamente às outras câmaras, é de referir que parece não haver nenhum padrão definido em termos de diferenças de valores, para além do facto de a câmara 2 ter produzido valores para o terceiro dia de amostragem diferentes das dos outros dois dias para duas soluções com potenciais distintos. De uma forma mais geral verifica-se que para potenciais mais negativos, a consistência dos dados é menor, ou seja, para valores de potencial mais negativos, a fiabilidade dos resultados obtidos em datas diferentes – considerando que as condições de manuseamento se mantiveram constantes – é

menor. Curiosamente, para estes valores de potencial mais negativo, a coerência entre os valores registados por câmaras diferentes aparenta ser maior.

Potencial hídrico dos líquenes e curvas de seca

Este ponto do trabalho não foi bem-sucedido. Embora o próprio aparelho tenha algumas inconsistências, o aumento súbito do potencial hídrico com a concomitante redução do conteúdo hídrico não faz sentido em termos físicos e, por conseguinte, biológicos. Com a diminuição do conteúdo hídrico espera-se que a capacidade de recolher água do meio por aumento da pressão negativa ou potencial hídrico, visto que se dá um aumento da concentração dos solutos – cria-se uma *driving force* que leva ao aumento da capacidade de recolher água (Taiz, et al., 2006). Assim, a súbita variação no potencial hídrico durante o período de análise implica que o problema estará nas leituras ao psicrómetro, visto que a pesagem antes da leitura ao psicrómetro permite detectar redução do conteúdo hídrico. Como os poços onde são colocadas as amostras antes de serem colocadas nas câmaras têm que ser lavados, uma possível explicação destes resultados será uma má secagem dos mesmos. Outra questão pertinente relativamente aos valores medidos é a diferenças nos valores medidos por diferentes câmaras (que corresponde às diferenças entre réplicas num único momento de amostragem) mesmo após a introdução de factores de correcção. A razão disto não vem descrita em nenhuma informação fornecida pela companhia. Uma possível explicação adiantada pela Prof.^a Dra. Otilia Correia do Departamento de Ecologia, será o facto de o aparelho ter sido criado essencialmente para plantas de interesse agrícola e que se encontram, normalmente, bem regadas e com potenciais hídricos mais próximos de zero, pelo que a inconsistência nos valores medidos para plantas que têm que subsistir em ambientes secos, como é o caso das plantas de um montado, pode ser maior. Assim, talvez o aparelho não seja o mais indicado para determinar o potencial hídrico das plantas silvestres do montado. É de referir que as curvas de seca apresentadas em anexo nas figuras 7 e 8 são meramente ilustrativas do que se deveria obter.

Bibliografia

- Barnes, CJ e Allison, GB. 1988.** Tracing of water movement in the unsaturated zone using stable isotopes of hydrogen and oxygen. *Journal of Hydrology*. 1988, pp. 143–176.
- Beckett, RP. 1997.** Pressure–Volume analysis of a range of poikilohydric plants implies the existence of negative turgor in vegetative cells. *Annals of Botany*. 1997, pp. 145–152.
- Canadell, J. e Zedler, P. 1995.** Underground structures of woody plants in Mediterranean ecosystems of Australia, California and Chile. [autor do livro] M. Fox, M. Kalin e P. Zedler. *Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile, California and Australia*. Berlin : Springer-Verlag, 1995, pp. 177-210.

- Canadell, J., et al. 1996.** Maximum rooting depth of vegetation types at the global scale. *Oecologia*. 1996, pp. 583-595.
- Corbin, J., et al. 2005.** Summer water use by California coastal prairie grasses: fog, drought, and community composition. *Oecologia*. 2005, pp. 511-521.
- Criss, RE. 1999.** *Principles of Stable Isotope Distribution*. New York : Oxford University Press, 1999.
- Dawson, T. E. e Ehleringer, J. R. 1991.** Streamside trees that do not use stream water. *Nature*. 1991, pp. 335-337.
- Dawson, T. E. e Pate, J. S. 1996.** Seasonal water uptake and movement in root systems of australian phraeatophytic plants of dimorphic root morphology: A stable isotope investigation. *Oecologia*. 1996, pp. 13-20.
- Dawson, T. E.: 1993.** Water sources of plants as determined from xylem-water isotopic composition: Perspectives on plant competition, distribution and water relations. [autor do livro] J. R. Ehleringer. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. San Diego : Academic Press, 1993, pp. 465-496.
- Ehleringer, J. R. e Dawson, T. E. 1992.** Water-uptake by plants - perspectives from stable isotope composition. *Plant Cell and Environment*. 1992, pp. 1073-1082.
- Ehleringer, J. R., et al. 1991.** Differential utilization of summer rains by desert plants. *Oecologia*. 1991, pp. 430-434.
- Hartard, Britta. 2007.** Tese (Doutoramento em Ecologia). *Characterization of $\delta^{18}O$ in lichens during water exchange processes*. University of Kaiserslautern, Germany; University of Lisbon, Portugal : s.n., 2007. p. 164.
- Hoefs, Jochen. 2004.** *Stable Isotope Geochemistry*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag, 2004.
- Jackson, P. C., et al. 1995.** Partitioning of water-resources among plants of a lowland tropical forest. *Oecologia*. 1995, pp. 197-203.
- Jackson, R. B., Sperry, J. S. e Dawson, T. E. 2000.** Root uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends in plant science*. 2000, pp. 481-488.
- Liu, B, et al. 1995.** Water movement in desert soil traced by hydrogen and oxygen isotopes, chloride, and chlorine-36, southern Arizona. *Journal of Hydrology*. 1995, pp. 91-110.
- Máguas, C, Valladares, F e Brugnoli, E. 1997.** Effects of thallus size on morphology and physiology of foliose lichens: new findings with a new approach. *Symbiosis*. 1997, pp. 149-164.
- Phillips, D. L. e Gregg, J. W. 2001.** Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*. 2001, Vol. 127, pp. 171-179.
- Raven, Peter H., Evert, Ray F. e Eichhorn, Susan E. 1992.** *Biology of Plants*. New York : Worth Publishers, 1992.
- Taiz, Lincoln e Zeiger, Eduardo. 2006.** *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, 2006.
- White, J. W. C., et al. 1985.** The d/h ratios of sap in trees - implications for water sources and tree-ring d/h ratios. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*. 1985, pp. 237-246.

Anexos

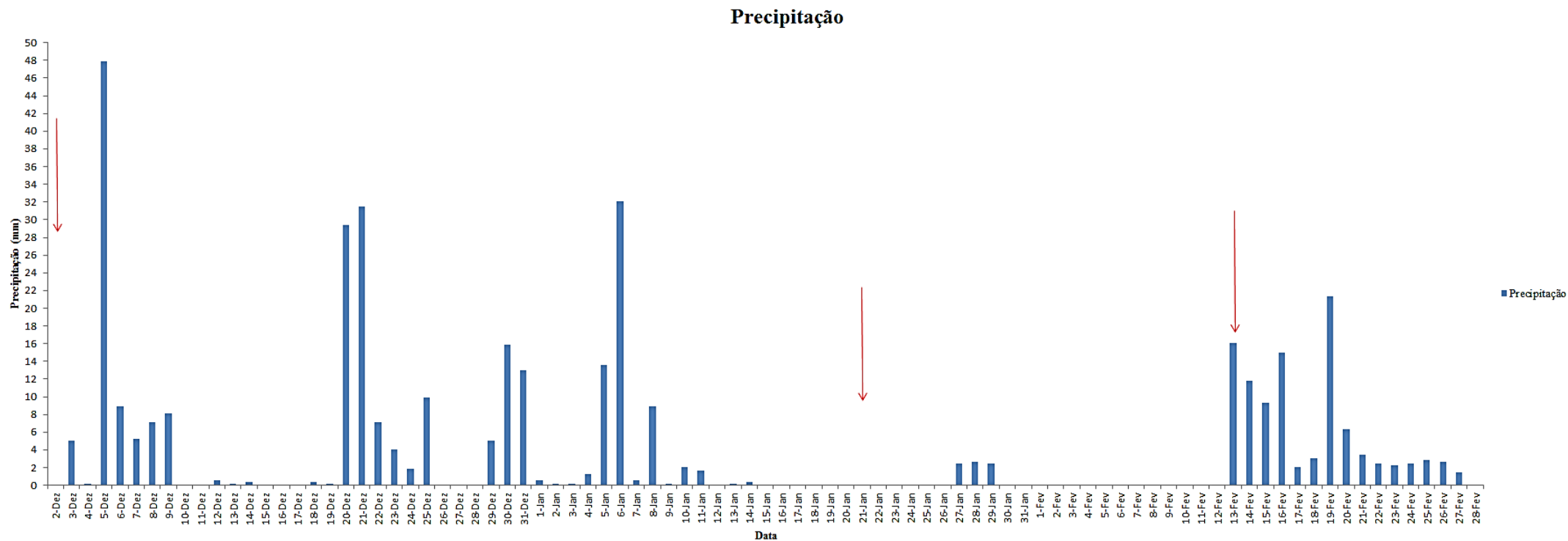


Figura 3 - Representação gráfica da precipitação ao longo dos meses de Dezembro a Fevereiro (os dados de Outubro a Novembro relativos à precipitação não se encontram disponíveis). As setas a vermelho indicam os dias de amostragem

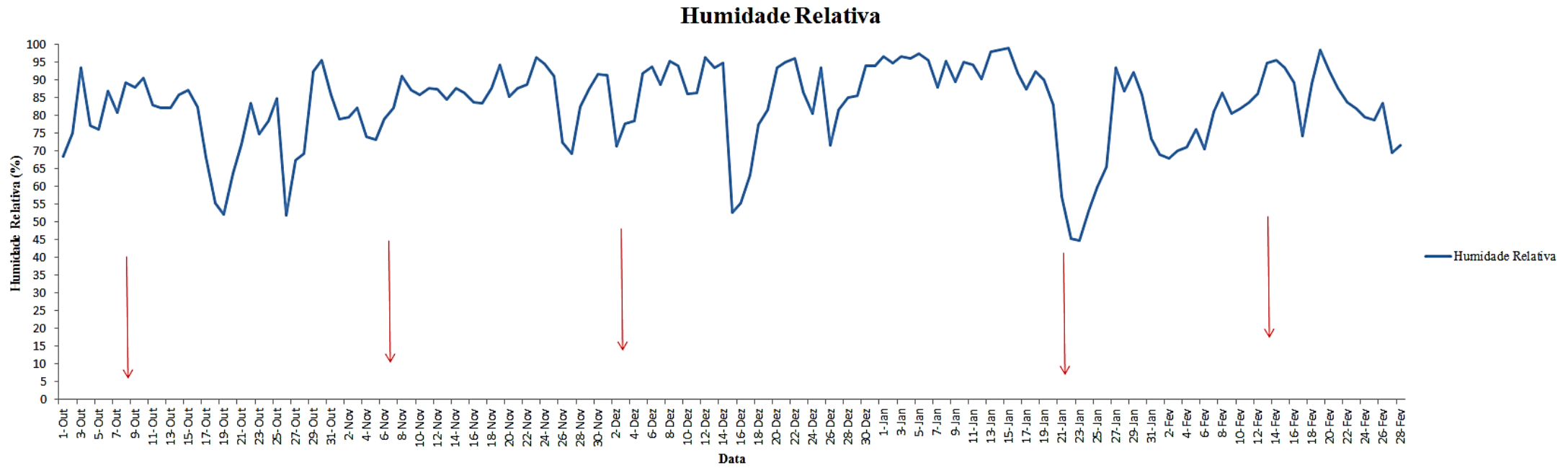


Figura 4 - Variação da humidade relativa durante todos os meses de amostragem. As setas a vermelho indicam os dias de amostragem.

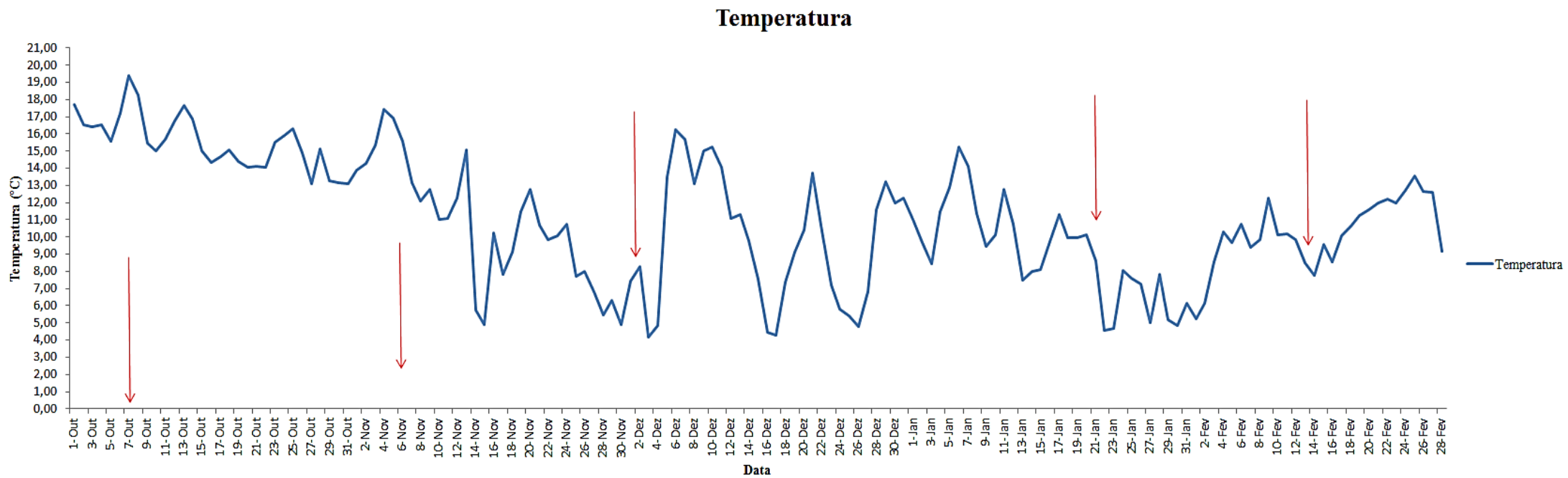


Figura 5 - Variação da temperatura ao longo dos meses de amostragem. As setas a vermelho indicam os meses de amostragem.

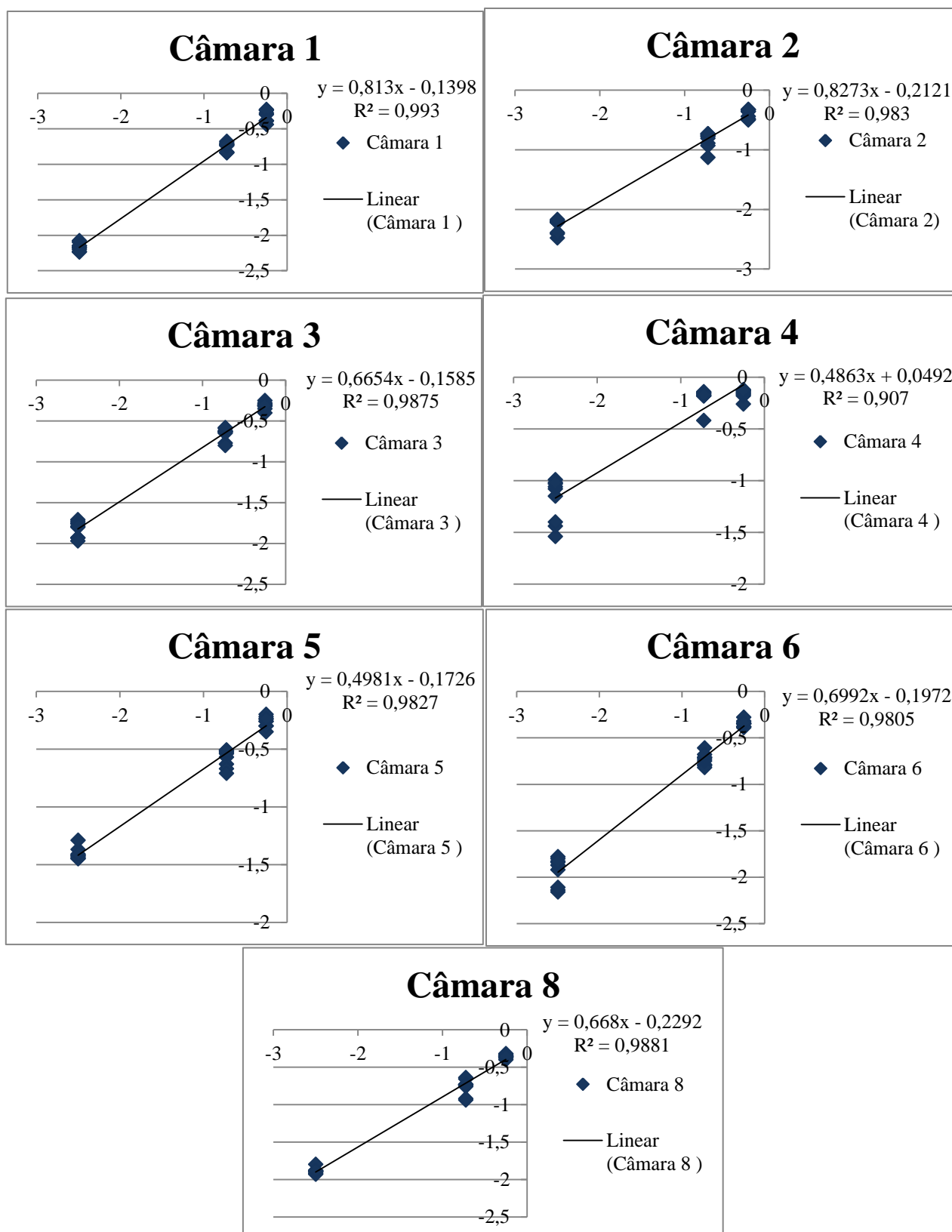


Figura 6 - Representações gráficas das curvas de calibração para cada câmara e respectiva equação de recta. Os factores de correcção obtidos na Tabela 7 resultam do inverso do coeficiente do termo com incógnita. O eixo horizontal representa o valor de potencial hídrico esperado e o eixo vertical o valor de potencial hídrico observado.

Tabela 7 - Resultados da ANOVA na comparação entre câmaras para a solução a -0,250 MPa (***) - Significativo).

ANOVA -0,25 MPa	
Dia 1	0,078
Dia 2	0,000***
Dia 3	0,000***

Tabela 8 - Resultados do teste T-Student na comparação de câmaras para a solução de -0,250 MPa. As câmaras encontram-se identificadas por um "C" com o respectivo número que indica a posição que ocupa no psicrómetro (***) - Significativo).

Dia 2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,410	0,259	0,050***	0,802	0,013***	0,012***
C2			0,079	0,001***	0,031***	0,210	0,219
C3				0,001***	0,176	0,013***	0,009***
C4					0,006***	0,000***	0,000***
C5						0,010***	0,009***
C6							0,795
C8							
Dia 3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,090	0,018***	0,000***	0,004***	0,072	0,09***
C2			0,000***	0,000***	0,000***	0,001***	0,000***
C3				0,000***	0,048***	0,152	0,044***
C4					0,004***	0,000***	0,000***
C5						0,014***	0,006***
C6							0,507
C8							

Tabela 9 - Resultados da ANOVA na comparação entre câmaras para a solução a -0,725 MPa (***) - Significativo)

ANOVA -0,725 MPa	
Dia 1	0,000***
Dia 2	0,000***
Dia 3	0,000***

Tabela 10 - Resultados do teste T-Student na comparação de câmaras para a solução de -0,725 MPa. As câmaras encontram-se identificadas por um "C" com o respectivo número que indica a posição que ocupa no psicrómetro (***) - Significativo)

Dia 1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,486	0,326	0,007***	0,080	0,869	0,768
C2			0,145	0,006***	0,037***	0,464	0,847
C3				0,014***	0,426	0,487	0,347
C4					0,016***	0,011***	0,012***
C5						0,182	0,160
C6							0,699
C8							
Dia 2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,296	0,232	0,000***	0,056	0,588	0,841
C2			0,117	0,002***	0,050***	0,197	0,297
C3				0,001***	0,257	0,346	0,457
C4					0,003***	0,000***	0,002***
C5						0,068	0,139
C6							0,886
C8							
Dia 3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,146	0,002***	0,000***	0,000***	0,279	0,251
C2			0,004***	0,000***	0,001***	0,081	0,226
C3				0,000***	0,012***	0,007***	0,001***
C4					0,000***	0,000***	0,000***
C5						0,000***	0,000***
C6							0,114
C8							

Tabela 11 - Resultados da ANOVA na comparação entre câmaras para a solução a -2,5 MPa (***) - Significativo)

ANOVA -2,5 MPa	
Dia 1	0,000***
Dia 2	0,000***

Tabela 12 - Resultados do teste Kruskal-Wallis na comparação entre câmaras para a solução a -2,5 MPa (***) - Significativo)

Kruskal-Wallis -2,5 MPa	
Dia 3	0,004***

Tabela 13 - Resultados do teste T-Student na comparação de câmaras para a solução de -2,5 MPa. As câmaras encontram-se identificadas por um "C" com o respectivo número que indica a posição que ocupa no psicrómetro (*) - Significativo)**

Dia 1	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,009***	0,000***	0,000***	0,000***	0,002***	0,006***
C2			0,000***	0,000***	0,000***	0,000***	0,001***
C3				0,000***	0,001***	0,005***	0,023***
C4					0,010***	0,000***	0,000***
C5						0,000***	0,001***
C6							1,000
C8							
Dia 2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,184	0,000***	0,000***	0,000***	0,000***	0,000***
C2			0,000***	0,000***	0,000***	0,000***	0,000***
C3				0,000***	0,000***	0,349	0,002***
C4					0,000***	0,000***	0,000***
C5						0,000***	0,000***
C6							0,006***
C8							

Tabela 14 - Resultados do teste Mann-Whitney na comparação de câmaras para a solução de -2,5 MPa. As câmaras encontram-se identificadas por um "C" com o respectivo número que indica a posição que ocupa no psicrómetro (*) - Significativo)**

Dia 3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C8
C1		0,050***	0,046***	0,050***	0,046***	0,050***	0,050***
C2			0,046***	0,050***	0,046***	0,050***	0,050***
C3				0,046***	0,043***	0,046***	0,046***
C4					0,825	0,050***	0,050***
C5						0,046***	0,046***
C6							0,050***
C8							

Tabela 15 - Pesos de 5 amostras de líquenes da espécie *Usnea rubicunda* ao longo de um intervalo de tempo de 2150 minutos (cerca de 36 horas). O primeiro momento de pesagem (t_0) foi realizado após os hidratação, pelo que se assume que estão no máximo do seu conteúdo hídrico. O último momento de pesagem foi após desidratação na estufa a 60°C, pelo que este peso corresponde ao peso apenas da matéria orgânica.

Pesos											
t (min)	0	60	100	140	180	210	310	370	2150	Estufa 48h	
Réplicas	1	0,018	0,018	0,016	0,015	0,011	0,011	0,01	0,008	0,01	0,009
	2	0,017	0,014	0,011	0,009	0,011	0,007	0,009	0,007	0,01	0,008
	3	0,021	0,018	0,017	0,017	0,018	0,015	0,014	0,015	0,014	0,011
	4	0,016	0,018	0,017	0,016	0,014	0,011	0,012	0,014	0,014	0,011
	5	0,017	0,017	0,019	0,017	0,018	0,018	0,014	0,015	0,015	0,013

Tabela 16 - Variação do conteúdo hídrico de *Usnea rubicunda* ao longo de um intervalo de tempo de 2150 minutos. Este é determinado pela diferença entre o peso num determinado momento e o peso seco. Determinou-se a média das diferenças de todas as réplicas e assumiu-se que o conteúdo hídrico máximo seria em t_0 , correspondendo aos 100%. O conteúdo hídrico nos momentos seguintes é determinado em relação ao primeiro.

Conteúdo Hídrico											
t (min)	0	60	100	140	180	210	310	370	2150	Estufa 48h	
Réplicas	1	0,50	0,50	0,44	0,40	0,18	0,18	0,10	-0,13	0,10	0
	2	0,53	0,43	0,27	0,11	0,27	-0,14	0,11	-0,14	0,20	0
	3	0,48	0,39	0,35	0,35	0,39	0,27	0,21	0,27	0,21	0
	4	0,31	0,39	0,35	0,31	0,21	0,00	0,08	0,21	0,21	0
	5	0,24	0,24	0,32	0,24	0,28	0,28	0,07	0,13	0,13	0
Médias	0,41	0,39	0,35	0,28	0,27	0,12	0,12	0,07	0,17	0	
Conteúdo Hídrico	100%	95%	84%	69%	65%	28%	28%	17%	42%	0%	

Tabela 17 - Valores do potencial hídrico em *Usnea rubicunda* nos diferentes momentos de amostragem. As médias a partir dos 210 minutos pois os valores de potencial hídrico deixam de fazer sentido por estarem demasiado próximos de zero quando deveriam ser mais negativos

t (min)	1 (Mpa)	2 (MPa)	3 (Mpa)	4 (MPa)	5 (Mpa)	Médias
0	-1,01	0,03	-1,05	-3,73	0,05	0,03
60	-3,34	0,01	-5,14	-3,72	-1,71	-1,71
100	-3,04	0,01	-0,03	-3,28	-3,85	-3,39
140	-3,74	0,00	-3,29	0,00	0,00	-3,52
180	0,00	0,00	-0,09	-0,04	-3,13	-3,13
210	0,02	0,00	0,01	0,00	-0,06	
310	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	
370	0,01	-0,05	0,03	0,00	0,01	
2150	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	

Tabela 18 - Pesos de 5 amostras de líquenes da espécie *Evernia prunastri* ao longo de um intervalo de tempo de 2120 minutos (cerca de 35 horas). O primeiro momento de pesagem (t_0) foi realizado após os hidratação, pelo que se assume que estão no máximo do seu conteúdo hídrico. O último momento de pesagem foi após desidratação na estufa a 60°C, pelo que este peso corresponde ao peso apenas da matéria orgânica.

Pesos											
t (min)	0	40	80	120	160	210	260	360	2120	Estufa 48h	
Réplicas	1	0,009	0,008	0,006	0,004	0,005	0,003	0,002	0,002	0,004	0,003
	2	0,01	0,008	0,008	0,008	0,007	0,006	0,007	0,007	0,006	0,004
	3	0,012	0,010	0,008	0,009	0,008	0,007	0,007	0,007	0,006	0,006
	4	0,01	0,009	0,008	0,007	0,007	0,008	0,007	0,006	0,005	0,004
	5	0,013	0,012	0,011	0,010	0,008	0,005	0,006	0,005	0,006	0,006

Tabela 19 - Variação do conteúdo hídrico de *Evernia prunastri* ao longo de um intervalo de tempo de 2120 minutos. Este é determinado pela diferença entre o peso num determinado momento e o peso seco. Determinou-se a média das diferenças de todas as réplicas e assumiu-se que o conteúdo hídrico máximo seria em t_0 , correspondendo aos 100%. O conteúdo hídrico nos momentos seguintes é determinado em relação ao primeiro.

Conteúdo Hídrico											
t (min)	0	40	80	120	160	210	260	360	2120	Estufa 48h	
Réplicas	1	0,67	0,63	0,50	0,25	0,40	0,00	-0,50	-0,50	0,25	0
	2	0,60	0,50	0,50	0,50	0,43	0,33	0,43	0,43	0,33	0
	3	0,50	0,40	0,25	0,33	0,25	0,14	0,14	0,14	0,00	0
	4	0,60	0,56	0,50	0,43	0,43	0,50	0,43	0,33	0,20	0
	5	0,54	0,50	0,45	0,40	0,25	-0,20	0,00	-0,20	0,00	0
Médias	0,58	0,52	0,44	0,38	0,35	0,16	0,10	0,04	0,16	0	
Conteúdo Hídrico	100%	89%	76%	66%	60%	27%	17%	7%	27%	0%	

Tabela 20 - Valores do potencial hídrico em *Evernia prunastri* diferentes momentos de amostragem. A média aos 2120 minutos não foi determinada pois os valores de potencial hídrico deixam de fazer sentido por estarem demasiado próximos de zero quando deveriam ser mais negativos.

t (min)	1 (Mpa)	2 (Mpa)	3 (Mpa)	4 (Mpa)	85(Mpa)	Médias
0	0	-3,97	-1,95	-3,20	-5,31	0
40	-1,99	-3,15	-1,94	-1,36	-2,93	-2,06
80	-3,93	-4,37	-3,68	-2,92	-4,34	-3,72
120	0,00	-3,57	-3,19	-3,79	-5,32	-4,10
160	0,00	0	-4,49	-3,9	0,00	-4,20
210	-0,02	-4,34	-5,08	-4,11	0,04	-4,51
260	0,00	-3,91	-3,36	-4,2	-0,01	-3,82
360	0,00	0,00	-3,51	-3,29	0,02	-3,40
2120	0,03	0,01	-0,01	0,01	-0,01	

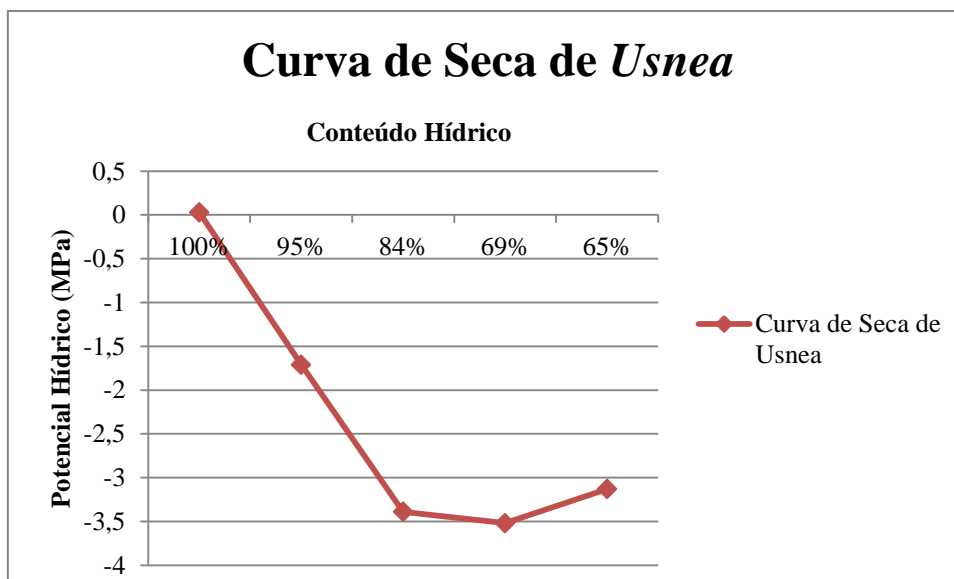


Figura 7 - Representação da gráfica da curva de seca para *Usnea rubicunda*. Apenas se utilizaram, para fazer o gráfico, as médias do potencial hídrico que faziam se aproximavam do esperado, sendo este meramente ilustrativo do que, mais ou menos, se esperava obter.

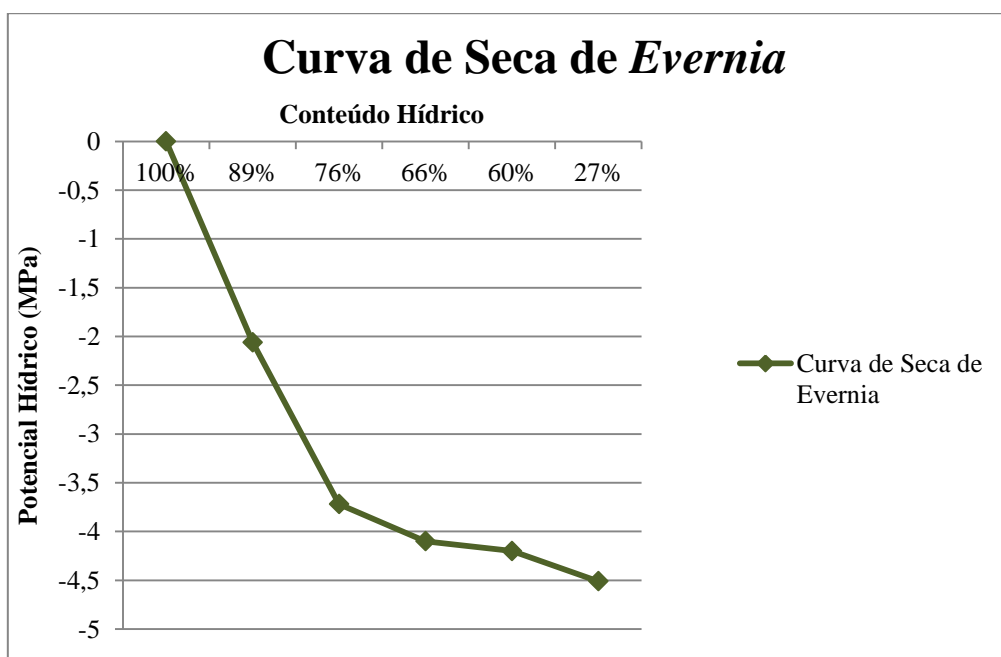


Figura 8 - Representação da gráfica da curva de seca para *Evernia prunastri*. Apenas se utilizaram, para fazer o gráfico, as médias do potencial hídrico que faziam se aproximavam do esperado, sendo este meramente ilustrativo do que, mais ou menos, se esperava obter.



Figura 9 - PSYPRO™, Wescor. Psicrómetro utilizado na determinação do potencial hídrico. (Imagem retirada de <http://www.wissmess.de/uploads/produktbilder/1233739965psypro.jpg>)



Figura 10 - Câmara C-52™ e respectivo poço a cinzento. (Imagem retirada de <http://www.wissmess.de/uploads/produktbilder/1247518784c-52.jpg>)

Protocolo do Psicrómetro

1. Ligar o PsyPro e verificar a Voltagem da Bateria (não fazer medições com o aparelho a carregar).
2. Se for necessário carregar o aparelho, usar o carregador que veio associado, quando a luz no transformador ficar verde é sinal de que o carregamento foi completo e só após esse momento é que se deve iniciar a amostragem.
3. Com o *software* aberto e com o Psicrómetro ligado fazer “Contact PsyPro” no menu “Tools”. Se tudo correr bem, a janela deverá desaparecer, caso contrário mostrará uma imagem de erro. Se tal se ocorrer, verificar se as portas COM nos “PC Settings” está correcta e se há de facto ligação do Psicrómetro ao computador.
4. Imediatamente após isso, no mesmo menu, fazer “Set PsyPro Time” pra ajustar a data e a hora do aparelho – ele recomeça a contagem do tempo após a última utilização, pelo que é necessário fazer essa sincronização.
5. Caso se verifique a necessidade (após várias utilizações), verificar a memória do PsyPro.

Calibração

1. Utilizar os discos de papel de filtro e as três soluções *standard* fornecidas. Colocar numa caixa de petri uma gota da solução – de notar que quer a pipeta quer a caixa devem estar limpas.
2. Com um pinça, embeber um disco de papel de filtro na solução de forma a que o disco não fique saturado. Remover o excesso com uma tira de papel de filtro para evitar excessos.
3. Colocar o disco no poço e fechar a câmara. Repetir o procedimento para as restantes câmaras operacionais e aguardar cerca de 10 minutos para estabilizar na atmosfera da câmara.
4. Com os respectivos *Settings* definidos ou pelo operador ou que estejam guardados no PsyPro – é possível inclusive guardar diferentes *settings* para a amostragem em vários ficheiros, defini-los com *default* ou guardá-los na memória do próprio aparelho – iniciar a amostragem clicando em “Logging On”. Conforme seja necessário, pedir inclusivamente os 50 pontos amostrados no decorrer da medição (“Log results plus entire psychrometric curve”).
5. No fim do período de amostragem fazer “Logging Off” e obter os dados da amostragem clicando na opção “Get PsyPro Data” no menu “Tools”. Escolher, mediante a situação, “Since Previous Download” ou “Acquire all Data”. Os dados são obtidos em ficheiros .csv que podem ser lidos quer pelo Excel quer através de um bloco de notas. Os dados obtidos poderão ser o valor do Potencial Hídrico em MPa e, caso tenha feito essa opção, os 50 pontos da curva psicrométrica em μV por s.
6. Obtidos os valores fazer a recta de calibração para cada câmara utilizando as 3 soluções. Cada câmara terá uma curva de calibração diferente e o factor de correcção de cada uma delas corresponderá ao inverso do declive dessa mesma recta.
7. Ter em conta que certas variações ao nível do potencial da amostra ou das condições ambientais da sala podem afectar a amostragem.

Amostragem

1. Repetir os mesmos paços utilizados para a calibração com o material a ser utilizado.
2. Usar o poço adequado ao volume da amostra – para que esta nunca toque no Termopar da câmara.
3. No final de cada amostragem, limpar sempre bem os poços de forma a não restarem impurezas.



Protocolo para a Extração de Água

Requisitos da Extração:

1. Bomba de vácuo tem que estar a trabalhar com as torneiras de cada unidade de extração fechadas – posição horizontal
2. Manter a linha de extração com os tubos montados
3. Verificar o Filtro do óleo
 - a. Se o nível do óleo se encontrar acima da válvula, despejar
4. Na bomba de vácuo, o óleo tem que estar numa posição mediana, se estiver escuro é sinal de que há muito vapor de água (contactar Rodrigo Maia)
5. Ver o nível do vácuo no mostrador que tem que estar entre 4-8
6. Ao fim de cada extração, retirar a água quente para evitar logo a destilação
7. No banho de água quente, a água tem que estar a um nível alto suficiente para manter o termopar (entre os dois tubos) mergulhado

Protocolo da Extração

1. Encher os *dures* com Azoto Líquido
2. Montar o tubo em “U” na extensão (suporte para o tubo em “U” e o tubo com a amostra)
3. Colocar o tubo com a amostra no ponto de entrada do outro lado da extensão; recuar um milímetro o tubo e apertar (o mais depressa possível mas calmamente)
4. Adicionar o suporte já com o tubo em “U” e a amostra na linha e repetir o processo até ocupar uma linha de extração inteira
5. Abrir a válvula de isolamento (as torneiras)
 - a. Verificar que o ponteiro regressa à posição original, demorando cerca de 30 segundos
6. Fechar de novo a válvula de isolamento e manter a válvula de arejamento fechada
7. Repetir o mesmo para as outras unidades de extração
8. Quando todas as unidades tiverem ocupadas, iniciar o aquecimento da água ajustando o termóstato para os 90°C – a água mantém-se nos 80°C. Para acelerar o aquecimento usar a resistência e, quando o termómetro atingir os 80°C, desligar a resistência da corrente
9. Aguardar 90 minutos
10. Ao fim desse tempo, abrir a válvula de arejamento para escoar o ar e fechar imediatamente
11. Usar o Secador na extensão dos tubos em “U” e dos tubos com a amostra para retirar alguma água que possa aí estar contida
12. Desmontar a extensão com a amostra
13. Retirar o tubo em “U” e colocar parafilm, o mais depressa possível
14. Recolher a água do tubo em “U” para um Eppendorf devidamente rotulado
15. Colocar todo material usado na estufa para secagem