

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo da bolota de *Quercus rotundifolia* Lam. como indicador precoce
do stress hídrico ao longo de um gradiente climático no Alentejo
(SE,Portugal)**

Tatiana Evangelista Gomes de Oliveira

Dissertação

Mestrado em Biologia da Conservação

2014

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo da bolota de *Quercus rotundifolia* Lam. como indicador precoce
do stress hídrico ao longo de um gradiente climático no Alentejo
(SE, Portugal)**

Dissertação orientada pela Professora Dra Cristina Máguas

Tatiana Evangelista Gomes de Oliveira

Mestrado em Biologia da Conservação

2014

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à DEUS por me dar força interior para superar as dificuldades , mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades,

À minha ORIENTADORA Professora Dra Cristina Máguas pelos seus ensinamentos, momentos dedicados, por me mostrar como fazer ciência e principalmente por acreditar em mim,

À minha FAMÍLIA Godinho que me deu suporte e me ajudou muito nas minhas saídas de campo, ao meu amor Luís que me acompanhou em todas elas e passou madrugadas acordado comigo trabalhando; à toda minha imensa família que está no Brasil, em especial, à minha MÃE que mesmo de longe, com seus conselhos sempre me amparou e me incentivou nos momentos mais difíceis,

À PROFESSORA Anabela Rosa Bernardes dos Santos Silva ou simplesmente Professora Belucha, pelo tempo disponibilizado, pelos conselhos e ensinamentos partilhados,

Ao PROJETO PTDC/AAC-CLI/104913/2008, nomeadamente a todos os dados de clima (modelados pelo IST, Maria João Pereira, Pedro Pinho e Alzira Ramos), dados da biodiversidade (Alice Nunes, Melanie Batista, Andreia Ferreira, Susana Tápia) e dados das folhas de azinheira (Adriana Silva),

Ao SIAAF, em particular ao Rodrigo Maia pelo apoio técnico, paciência e ensinamentos,

À Cristina Antunes pela disponibilidade e ajuda nos momentos difíceis,

À Dra Carla Rodrigues pela partilha de conhecimentos,

A todos do LABORATÓRIO de fisiologia vegetal por terem me acompanhado e estado sempre dispostos a ajudar. Obrigada Ângela pela disponibilização da centrífuga,

Aos meus COLEGAS Miguel, Pedro Patrício, Catarina, Joana e Elsa que sempre me acompanharam e me motivaram ao longo da elaboração deste trabalho,s

Aos meus AMIGOS Danilo, Avany, Telma, Melina e Virgínia que acompanharam e sempre me apoiaram na minha vida em Portugal, a Daniela e Fernanda, que nas suas vindas e idas Brasil - Portugal foram, são e sempre serão as minhas fontes inspiradoras de força, conquistas e vitórias, de saber sempre seguir em frente.

Dedico esta dissertação a minha FILHA que no meio disto tudo, veio ao mundo para me fazer uma pessoa muito mais feliz. Mamãe te ama Bianca!

Um muito obrigada a todos sem vocês este trabalho não seria possível!

RESUMO

As alterações climáticas tem influenciado diretamente no balanço energético da Terra no espaço e nos seus ecossistemas. Em regiões de clima Mediterrânico, essa influência ainda é mais visível devido às grandes amplitudes térmicas anuais. As respostas das plantas a estas mudanças irá depender basicamente dos regimes de precipitação aos quais elas estão expostas e das estratégias específicas dessas plantas, em particular a tolerância e a resistência à seca. De entre os diversos órgãos da planta, as sementes tem-se tornado uma ferramenta de pesquisa extremamente relevante no que diz respeito ao estudo da fisiologia da planta e das suas interações com o meio ambiente. Isto porque tem como principal característica armazenar as reservas de nutrientes necessários para o desenvolvimento de uma nova planta nos primeiros estágios de vida. Para este estudo, foram utilizadas sementes de *Quercus rotundifolia* Lam., espécie conhecida por azinheira, tipicamente mediterrânica, com uma elevada plasticidade e tolerância à seca, muito frequente na paisagem alentejana. Foram colhidas amostras em 25 locais de estudo em Novembro de 2012 ao longo de um gradiente climático, desde a costa atlântica até à margem esquerda do Guadiana. Foram analisados parâmetros morfológicos, químicos e da composição isotópica das bolotas no intuito de estudar a estratégia adotada pela azinheira e as suas adaptações físico-químicas em situação de stress hídrico. Como resultado, o peso médio foi o parâmetro morfológico que melhor se relacionou com as variáveis climáticas, apresentando uma correlação negativa as temperaturas elevadas de Verão e positivamente correlacionado com a precipitação de Inverno. Embora não se tenha observado nenhuma correlação significativa entre os parâmetros químicos e as variáveis climáticas estudadas, observou-se que o tamanho da bolota estava correlacionado com o conteúdo em açúcares solúveis. Em relação aos parâmetros isotópicos, destacou-se a composição isotópica do azoto ($\delta^{15}\text{N}$), o qual apresentou uma correlação negativa com o índice de aridez associado a cada ponto de amostragem ao longo do gradiente estudado. Já a composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) apresentou uma correlação negativa significativa com a temperatura média de Inverno; enquanto a composição isotópica do oxigénio ($\delta^{18}\text{O}$) mostra uma relação positiva com a mesma. O conteúdo em carbono (%C) também apresentou uma correlação positiva com o índice de aridez, enquanto que a percentagem de azoto (%N) correlacionou-se negativamente com a temperatura sazonal. Para identificar quais as variáveis climáticas que melhor explicaram o desenvolvimento da bolota ao longo do gradiente climático, aplicou-se uma análise de componentes principais (PCA) agrupando todas as variáveis climáticas em fatores, dos quais os dois primeiros explicaram 90,16% (74,84 % + 15,21%) da variância observada. Deste modo, o primeiro eixo agrupou as variáveis de temperatura (valores elevados de temperatura) e precipitação (valores baixos) e, no segundo eixo, variáveis relacionadas com temperaturas baixas e precipitação do mês mais seco. Perantes estes resultados, concluiu-se que as bolotas de *Quercus rotundifolia* Lam. demonstraram ser muito sensíveis às mudanças climáticas, revelando uma relação com a composição química e a morfologia. Deste modo, as bolotas registaram a resposta das plantas à seca e às condições de stress hídrico ao longo do gradiente climático. Como considerações finais, é de salientar que este foi um primeiro estudo e que mais estudos devem ser realizados de modo a poder utilizar as sementes como indicadores nos estudos das relações entre a resposta das plantas às alterações ambientais.

Palavras-chave: *Quercus rotundifolia* Lam.; bolota; sementes; gradiente climático; stress hídrico; parâmetros morfológicos. parâmetros químicos e composição isotópica.

ABSTRACT

Climate change has directly influenced the energetic balance in space on Earth and its ecosystems. In Mediterranean regions, this influence is even more visible due to the large annual temperature range. Plant responses to these changes will depend largely on the precipitation regimes which they are exposed and the specific strategies of these plants, in particular tolerance and drought resistance. Within different organs of the plant, seeds have become an extremely important research tool in regard to the study of plant physiology and its interactions with the environment. The reason is its main characteristic of storing reserves of nutrients needed for the development of a plant in its early stages of life. For this study, it was chosen seeds of *Quercus rotundifolia* Lam., known as Holm oak, typically Mediterranean species, with high plasticity and drought tolerance, very common in the Alentejo landscape. Samples were collected from 25 study sites in November 2012 along a climate gradient from the Atlantic coast to the left bank of the Guadiana. It were analyzed morphological, chemical and isotopic parameters of acorns in order to study the strategy adopted by holm oaks and its physico-chemical adaptations to water stress. As a result, the average weight was the parameter that correlated best with climate variables, which showed negative correlation between the high summer temperatures and positively correlated with winter precipitation. Although it was not observed any significant correlation between chemical parameters and climate variables, it was observed that the size of the acorn correlated with the content of soluble sugars. Concerning the isotopic parameters, the isotopic composition of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) showed a negative correlation with with aridity index, associated with each one of the studies sites within the gradient. Furthermore, the carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) showed a significant negative correlation with the average temperature of winter, while the isotopic composition of oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) shows a positive relationship with it. The carbon content (% C) also showed a positive correlation with the index of aridity, while the percentage of nitrogen (% N) was negatively correlated with seasonal temperature. To identify climate variables that explain the development of acorn along the climate gradient, we applied a principal component analysis (PCA) gathering all climate variables on factors, of which the first two accounted for 90.16 % (74.84% + 15.21%) of the observed variance. Thus, the first axis grouped variables temperature (related with high values) and precipitation (related with lower values) and in the second axis, variables related to low temperatures and precipitation in the driest month. Faced of these results, it was concluded that the acorns of *Quercus rotundifolia* Lam. proved to be very sensitive to climate change, revealing a relationship with the chemical composition and morphology. Thus, acorns recorded the response of plants to drought and water stress conditions along the climate gradient. As conclusion it is noteworthy that this was a preliminary study and further studies should be conducted in order to use the seeds as indicators in studies of relations between the responses of plants to environmental changes

Keywords: *Quercus rotundifolia* Lam.; acorn; seeds; climate gradient; water stress; morphological parameters; chemical parameters; isotopic composition.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1. A Desertificação e o Clima Mediterrânico	9
1.2. As adaptações das plantas à seca.....	10
1.3. <i>Quercus rotundifolia</i> Lam., a azinheira.....	11
1.3.1. Fenologia e formação da bolota	13
1.4. A bolota.....	14
1.4.1. Morfometria da bolota.....	15
1.5. Composição química da bolota	15
1.6. Os isótopos como traçadores no estudo do stress hídrico	16
1.6.1. Carbono	17
1.6.2. Azoto.....	18
1.6.3. Oxigênio	18
1.7. Análise isotópica em sementes	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Geral.....	21
2.2. Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Área geográfica e locais estudo	22
3.2. Gradiente Climático	23
3.3. Colheita de material biológico	25
3.4. Preparação das amostras	25
3.5. Análise morfológica das bolotas.....	25
3.6. Análise elementar e isotópica das bolotas	26
3.7. Análise de componentes químicos das bolotas	26
3.7.1. Determinação das proteínas totais.....	27
3.7.2. Extração e Determinação dos lípidos totais.....	27
3.7.3. Determinação dos açúcares solúveis e amido.....	27
3.7.3.1. Extração da fração solúvel e do amido	27
3.7.3.2. Determinação dos açúcares solúveis.....	28
3.7.3.3. Conversão °Brix para % de açúcares por peso seco de amostra (p/p)	28
3.7.3.4. Adaptação e Otimização do método de determinação da fração solúvel e do amido para a matriz em estudo (bolotas).....	28
3.7.3.5. Resultados.....	31
3.8. Análise elementar e isotópica das folhas	31
3.9. Análise Estatística	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Gradiente climático.....	33

4.2.	Variação de parâmetros morfológicos da bolota de <i>Quercus rotundifolia</i> ao longo do gradiente climático.....	34
4.3.	Avaliação da composição química da bolota de <i>Quercus rotundifolia</i> ao longo do gradiente climático	37
4.4.	Avaliação das variações isotópicas das bolotas e das folhas de <i>Quercus rotundifolia</i> ao longo do gradiente climático.....	41
4.5.	Integração dos dados	45
4.5.1.	Influência da variação climática na composição isotópica da bolota	45
4.5.2.	Seleção de variáveis indicadoras de mudança climática.....	46
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXOS.....	a

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista da azinheira (<i>Quercus rotundifolia</i>) isolada em uma paisagem (A) e como parte de um montado (B), ambas no Conselho de Barrancos, Alentejo SE, Portugal.....	13
Figura 2: Bolota madura de <i>Quercus rotundifolia</i> . A frutificação se dá ao longo do Verão até o início do Outono quando caem.	14
Figura 3: Constituição da bolota de <i>Quercus rotundifolia</i>	15
Figura 4 Mapa dos locais de estudo e da região geográfica estudada ao longo de um gradiente climático no Alentejo, SE Portugal. A: Mapa da distribuição dos locais de estudo (pontos marcados). B: Mapa da área geográfica de estudo (em destaque).....	22
Figura 5: Mapa de um gradiente de precipitação em Portugal (precipitação total anual de 1950-2010). A: Portugal Continental. B: Locais de estudo ao longo do gradiente de precipitação (pontos marcados). Adaptado de Batista, (2013).....	23
Figura 6: Classificação climática de Portugal de acordo com o Índice de Aridez. A: classificação oficial atual, baseada em dados de 1961 a 1990. B: classificação climática provisória, com base em dados de 2000 a 2010. Locais de estudo estão evidenciado pelo círculo azul. (Adaptado de Batista, 2013).....	25
Figura 7: Variação dos parâmetros morfológicos de bolotas de <i>Quercus rotundifolia</i> – valores médios do comprimento (mm), diâmetro (mm) e peso (g) e seus respectivos valores máximos e mínimos (Whiskers)– ao longo do gradiente climático- do ponto mais árido (1) para o ponto mais húmido (25).	35
Figura 8: A componente principal 1 ou fator 1 explica 75% e a componente principal 2 ou fator 2 explica 15% da variância observada total.....	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros usados para a homogeneização dos pontos de amostragem.....	23
Tabela 2: Variáveis climáticas considerados neste trabalho, sua respectiva abreviação e o cálculo que representa.....	24
Tabela 3: Comparação da determinação de açúcares solúveis e de amido obtidos entre as amostras 10 e 21 com diferentes pesos amostrados e volumes de diluição. Leitura por refração de luz (oBrix) dos testes realizados na fracção solúvel extraída directamente (açúcares solúveis, AcS e após adição de HCl ao sedimento para hidrólise-ácida do amido e posterior neutralização (açúcares solúveis, glucose, resultante da hidrólise de amido, Am). Valores de oBrix apresentados são média de leituras realizadas em triplicado.	29
Tabela 4: Determinação do NaCl presente nos brancos de amostra. Valores obtidos por refração de luz (refratómetro digital Pallete PR-32 α , ATAGO) em amostras de 150 μ L (Micropipeta P200, Gilson) doseadas em triplicado.	29
Tabela 5: Variabilidade dos testes de reprodutibilidade às amostras referente aos pontos 2, 8, 10, 16, 21 e 24. Leitura por refração de luz ($^{\circ}$ Brix) da fracção solúvel extraída directamente com H ₂ O (açúcares solúveis, AcS) e após adição de 1mL de HCl ao sedimento para hidrólise-ácida do amido e posterior neutralização (açúcares solúveis, glucose, resultante da hidrólise de amido, Am). Valores de $^{\circ}$ Brix apresentados são média de leituras realizadas em triplicado.	30
Tabela 6: Açúcares solúveis e amido existentes em amostras de polpa da bolota de <i>Quercus rotundifolia</i> . Resultados expressos em % (p/p).....	31
Tabela 7: Variação dos valores médios dos parâmetros climáticos considerados ao longo do gradiente da área geográfica escolhida para estudo. Dados climáticos referentes ao período de 1950 a 2000.	33
Tabela 8: Coeficiente de correlação de Spearman dos parâmetros morfológicos da bolota de <i>Quercus rotundifolia</i> . Correlações significativas ($p < 0.05$) indicadas a negrito.	34
Tabela 9: Composição química da polpa da bolota de <i>Quercus rotundifolia</i> (% , em g) ao longo de um gradiente climático onde o ponto 1 refere-se ao local de estudo mais árido e o ponto 25 o mais húmido.	38
Tabela 10: Coeficiente de correlação Spearman entre os parâmetros químicos – lípidos totais, proteínas totais, açúcares solúveis , amido, açúcares totais – e morfológicos – Comprimento médio , Diâmetro médio e Peso médio.....	39
Tabela 11: Correlação das varáveis climáticas – Temperatura (média anual , amplitude térmica diurna mensal , Isotermalidade, sazonal, máxima no mês mais quente , mínima no mês mais frio, amplitude térmica anual, média do quadrimestre mais húmido, média do quadrimestre mais seco, média do quadrimestre mais quente, média no quadrimestre mais frio), Precipitação (anual, no mês mais húmido, no mês mais seco, isotermalidade, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais quente, quadrimestre	

mais frio), Altitude, Inclinação, Índice de aridez – e os parâmetros químicos – lípidos totais, proteínas totais, açúcares solúveis, amido, açúcares totais – das bolotas de *Quercus rotundifolia*, de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$ 40

Tabela 12: Correlação das variáveis climáticas – Temperatura (média anual, amplitude térmica diurna mensal, Isotermalidade, sazonal, máxima no mês mais quente, mínima no mês mais frio, amplitude térmica anual, média do quadrimestre mais húmido, média do quadrimestre mais seco, média do quadrimestre mais quente, média no quadrimestre mais frio), Precipitação (anual, no mês mais húmido, no mês mais seco, isotermalidade, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais quente, quadrimestre mais frio), Altitude, Inclinação, Índice de aridez – e parâmetros isotópicos – $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, %N, %C, C/N – das bolotas e das folhas de *Quercus rotundifolia*, de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$ 44

Tabela 13: Coeficiente de correlação Spearman entre as variáveis químicas – lípidos totais, proteínas totais, açúcares solúveis, amido, açúcares totais –, morfológicas – Comprimento médio, Diâmetro médio e Peso médio e os parâmetros isotópicos – $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, %N, %C, C/N – das bolotas de *Quercus rotundifolia*. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$ 46

Tabela 14: Valores próprios e vetores próprios dos primeiros dois fatores resultantes da análise de componentes principais (PCA) das variáveis climáticas ($n = 22$) As correlações fator – variável significativas encontram-se destacadas em negrito 47

Tabela 15: Coeficiente de correlação de Spearman (significância $p < 0.05$) para a correlação das variáveis dos parâmetros químicos e morfológicos das bolotas de *Quercus rotundifolia* e os Fatores 1 e 2 (calculados em PCA) 48

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Desertificação e o Clima Mediterrânico

Desertificação corresponde à degradação da terra, nas zonas áridas, semi-áridas e sub-húmidas secas, em resultado da influência de vários fatores naturais ou antropogênicos no balanço energético da terra no espaço, incluindo as variações climáticas e as atividades humanas (UNCCD, 1994)

Segundo a *United Nations Convention to Combat Desertification* – UNCCD (1994), as principais causas da desertificação são:

- As condições climáticas semi-áridas afetando grandes áreas, as secas periódicas, a grande variabilidade pluviométrica e as chuvadas repentinas e de grande intensidade;
- Os solos pobres e altamente erosionáveis, propensos à formação de crostas superficiais;
- O relevo acidentado, com declives acentuados e paisagens muito diversificadas;
- As grandes perdas no coberto vegetal resultantes da severidade regional dos incêndios florestais;
- A crise na agricultura tradicional associada ao abandono da terra e à deterioração das estruturas de proteção do solo e de conservação da água;
- A exploração não sustentável dos recursos hídricos, causadora de prejuízos ambientais graves, neles se incluindo a poluição química, a salinização e o esgotamento dos aquíferos;
- A concentração das atividades económicas no litoral, como resultado do crescimento urbano, da atividade industrial, do turismo e da agricultura de regadio.

Segundo a *United Nations Convention to Combat Desertification* (UNCCD, 1994), uma das principais causas da desertificação são as condições climáticas semi-áridas afetando grandes áreas, as secas periódicas, a grande variabilidade pluviométrica e as chuvadas repentinas e de grande intensidade, o que faz das regiões de clima mediterrânico zonas susceptíveis a desertificação.

Dentro de um panorama mundial de áreas de susceptibilidade à desertificação induzida pela ação antrópica, Portugal é o país mais afetado do anexo IV da Convenção (UNCCD, 1994), seguido por Turquia e Itália. A desertificação tem se espalhado em 1/3 do território nacional e devido às ameaças físicas, ecológicas e sociais, essa situação está rapidamente aumentando para um total de 2/3 do território susceptível a desertificação nas próximas duas décadas (Branco, 2010).

A bacia Mediterrânica é uma das regiões europeias mais propensas a ser afetada pela mudança climática. É esperado que as temperaturas aumentem pelo menos entre 2 a 4 °C ao longo do próximo século. Para a precipitação, é esperado um decréscimo durante o Verão e o Outono e um aumento durante o Inverno, com um

decréscimo global na disponibilidade da água devido ao um aumento na evapotranspiração, especialmente durante o Verão (in Ramírez-Valiente 2009; Giorgi 2008).

O clima mediterrânico corresponde a uma transição entre os climas árido do norte da África e as temperaturas chuvosas da Europa central e é afetada pelas interações entre as latitudes médias e os processos tropicais. Assim, o clima mediterrânico é caracterizado pelos Invernos moderados e chuvosos e verões quente e secos (Giorgi, 2008).

As estações intermédias, a Primavera e o Outono, são os períodos mais importantes para o desenvolvimento da vegetação, alturas onde a água não é demasiadamente escassa ou a temperatura muito baixa. Neste panorama, percebe-se a fragilidade dos ecossistemas presentes em este clima, pois estão sujeitos a temperaturas extremas tanto no Verão como no Inverno.

Em Portugal, a secura do Verão é seguida por um regime de precipitação torrencial no Inverno. Frequentemente, rios e ribeiros secos durante o Verão correm com grande intensidade e quantidade de água durante o Inverno, arrastando grande quantidade de sedimentos. Em virtude deste regime de precipitação torrencial o risco de perda dos solos acentua-se (Rêgo, 2008).

Sobrepondo as zonas do país onde os índices de aridez são mais elevados e as zonas em que os solos apresentam maior risco de erosão, percebe-se que as zonas de Portugal mais ameaçadas pela desertificação coincidem com o sul e interior do país (Rêgo, 2008; Branco, 2010). onde o sobreiro e a azinheira são as duas espécies dominantes desse tipo de paisagem (LPN, 2007)

Foi no interior do Alentejo e no Algarve que, durante a campanha do trigo em 1929, a área sofreu de uma intensa exploração inadequada do solo onde a mecanização da agricultura extensiva e a diminuição dos períodos de pousio destruiu a camada superficial. Assim, um intenso processo erosivo resultou na perda de fertilidade do solo e conseqüentemente na quebra dos pequenos fazendeiros que em massa migraram para as grandes cidades (Branco, 2010).

Para além disto, a pecuária produzida em pastos sob Montado, em anos secos com excessivo número de cabeças, degradou a cobertura do solo levando a um processo de erosão. A valoração do carvão durante a campanha do trigo e durante a 2ª Guerra Mundial também contribuíram para a degradação dos sobreiros e da azinheira, seguidos pela cultura inadequada do cereal. Grandes incêndios combinados as secas também colaboraram com esta destruição do ecossistema natural e para a mal uso da água e do solo (Branco, 2010).

1.2. As adaptações das plantas à seca

De um modo geral, o clima exerce uma forte pressão de seleção nos organismos e nos seus ecossistemas, além de apresentar continuamente novos desafios para a vida (PNUD, 2007). As espécies e as suas populações podem reagir a mudanças climáticas através das evoluções adaptativas ou por migrações até encontrar um clima que mais as favoreça. Se essas alternativas falham e se a população não possui plasticidade na sua filogenia em termos de tolerância e adaptação aos novos formatos do clima, então esta espécie estará

ameaçada de extinção (PNUD,2007). Evolução é uma solução muito perspicaz quando se refere às mais variadas formas de pressão de seleção, mas extinção induzida por mudanças climáticas são inevitáveis. (PNUD,2007).

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos como resposta ao stress, as quais podem constituir a sua estratégia de sobrevivência. Dependendo do mecanismo, a planta pode ser caracterizada como: 1) tolerantes ao stress (são as plantas que entram em contato com o stress e desenvolvem mecanismos para superar o estado de tensão); 2) evitam o stress (aquelas que se adaptam morfológicamente a fim de evitar o contato com o stress); ou ainda, 3) resistentes ao stress (são as plantas que em situação de stress não apresentam sintomas de injúria) (Mandre, 2002).

Além disto, a intensidade da resposta pode variar no tempo e no espaço, sendo diferente em órgãos da mesma planta. São as folhas, que, dependendo da localização na copa – topo ou dentro – tem diversas sensibilidades a luz e as suas mudanças drásticas de intensidade (Mandre, 2002). Um outro exemplo, são os anéis do tronco de uma árvore que através de suas características físicas, podem registrar as mudanças ambientais recentes, mas ocorridas no passado (Loader et al, 2007). A nível das sementes, ainda há pouca informação, tendo esta apenas se tornado objeto de estudo nas últimas décadas (Rodrigues, C., 2011).

Existem diversas maneiras de uma planta se adaptar às variações climáticas. No clima mediterrânico, onde os verões são mais secos e quentes, as plantas possuem uma plasticidade muito grande, sendo características desta zona as Oliveiras, Azinheiras e os Sobreiros. Para este estudo, irar focar-se nas características e estratégias adaptativas da azinheira (*Quercus rotundifolia*)

1.3. *Quercus rotundifolia* Lam., a azinheira

A azinheira, *Quercus rotundifolia* Lam. (fig 1), é uma planta dicotiledónea perenifolia pertencente ao gênero *Quercus*, ordem Fagales e da família das Fagáceas. A azinheira é a espécie mais abundante e representativa do gênero *Quercus* na floresta mediterrânica. Em Portugal, a azinheira corresponde a 13% do coberto florestal nacional, equivalendo a 412.878 ha, dos quais, quase toda a sua totalidade, 99,4% da área de povoamento da azinheira, está localizada na zona de susceptibilidade a desertificação (Dias A, 2013)

Observa-se a incidência da azinheira, em quase todos os grandes tipos de substratos siliciosos (exceto arenosos) e também, em solos de origem calcária, domina áreas com precipitação superior a 300 mm anuais. Em solos com baixa capacidade de retenção de água também se encontram os azinhais, mesmo sob precipitações mais abundantes.(LPN, 2007)

Sendo uma espécie típica do clima Mediterrânico, a azinheira , está claramente adaptada ao stress climático, mais concretamente, às temperaturas mais frias do Inverno, à irregularidade na distribuição de precipitação, e ao período máximo de seca em coincidência com as temperaturas mais elevadas, durante o período de Verão (Costa et al., 1997).

As folhas grossas esclerófilas das azinheiras são relativamente opacas, e têm aproximadamente o dobro da clorofila necessária para a realização da fotossíntese. Outra característica da esclerofilia das azinheiras é que as suas folhas tem cutículas grossas para reduzir as perdas de água durante os períodos secos e calorosos. Os estômatos estão concentrados na parte interior da folha, em algumas ocasiões nas cavidades. Geralmente apresentam uma camada de pêlos ou ceras que refletem a luz solar, reduzindo assim o aquecimento foliar nestes locais de forte exposição solar. Uma outra função destas estruturas é o de ajudarem a manter uma camada de ar saturado de humidade nas proximidades da superfície foliar, o que dificulta as perdas de água, facilitando as trocas gasosas e a condutância estomática (Ruiz de la Torre, 2006).

As folhas da azinheira podem apresentar diferenças devido à diferente posição na copa o que vai condicionar a quantidade de radiação que recebam. As folhas mais exteriores aquecem muito no Verão, fazendo com que os ESTOMAS se mantenham fechados para reduzir a transpiração. Normalmente estas folhas apresentam uma lobulação, que ajuda a refrigerar e facilita a troca de calor. Também podem ter um tamanho menor que as folhas internas, que são mais arredondadas, com bordas inteiras e com menor revestimento isolador. (Costa et al., 1997).

Os processos fisiológicos desta espécie pretendem otimizar a disponibilidade dos recursos hídricos e dos nutrientes. Um destes processos é a estratégia adaptativa da esclerofilia foliar, que permite ajustar o período vegetativo aos momentos mais favoráveis do ciclo climático anual, sendo possível a manutenção de um potencial hídrico sempre muito negativo nos períodos de maior stress hídrico e um conteúdo hídrico da folha muito baixo, o que facilita as trocas gasosas mesmo em períodos de disponibilidade hídrica reduzida (Werner et al., 2001)

Outra adaptação se dá pela taxa fotossintética, que flutua ao longo do dia. Nas primeiras horas, quando o calor ainda não é excessivo, a atividade fotosintética regista níveis máximos na absorção de CO₂. Ao meio dia, a maioria dos estomas fecha para reduzir ao máximo a perda de água durante as horas de mais calor, nas quais a fotossíntese diminui muito. Mais à tarde, mesmo ainda com calor intenso, produz-se uma certa recuperação nos níveis de atividade metabólica. Este mecanismo, o fecho estomático do meio-dia, foi pela primeira vez observado por Lange e colaboradores em *Arbutus unedo*, uma outra planta do Mediterrâneo (Lange et al., 1980)

A rentabilidade fotossintética destes sistemas é aproximadamente metade da apresentada por um bosque caducifólio, pois ainda que capazes de suportar grandes períodos de seca, uma luminosidade extraordinária, temperaturas muito altas no Verão, Invernos muito rigorosos, inclusive geadas tardias, a sua eficiência fotossintética é relativamente baixa. A atividade metabólica das azinheiras reduz significativamente abaixo dos 10°C, sendo especialmente resistente às temperaturas frias, chegando a suportar temperaturas abaixo dos -25°C sem apresentar quaisquer lesões. (Costa et al., 1997).

O Montado de Azinho (fig 1) possui uma área de expansão bastante mais alargada, devido a plasticidade da espécie na sua adaptação a diversos tipos de solo e clima. Outro motivo deve-se a sua fácil dispersão dado que

a bolota (o fruto da azinheira), os quais são normalmente consumidos por animais como corvídeos, sendo assim comum encontrar uma regeneração natural de azinho em zonas onde a agricultura e o pastoreio intensivo foram arredados (LPN, 2007).



Figura 1: Vista da azinheira (*Quercus rotundifolia*) isolada em uma paisagem (A) e como parte de um montado (B), ambas no Conselho de Barrancos, Alentejo SE, Portugal

1.3.1. Fenologia e formação da bolota

Em relação ao género *Quercus* apresentam-se dois tipos de ciclos de amadurecimento do fruto: o anual, que requer unicamente uma temporada para completar o ciclo reprodutivo, e o bianual que requer dois anos completos (Gómez- Casero et al., 2007). Na azinheira o ciclo reprodutivo é anual. (Diaz, 2000).

Nas azinheiras de zonas amenas, o pico do crescimento anual é entre Fevereiro e Abril (Pulido, 2000), podendo atrasar um mês, de Março a Maio (Domingues et al., 1999). O despertar vegetativo e a floração tem lugar entre Abril/ Maio, quando ainda as reservas hídricas dos solos são abundantes. As sucessivas feno fases desenrolam-se de Junho até ao final de Novembro (Macchia et al., 1993).

A maior parte dos esclerófilos perenes mediterrânicos como a azinheira, efetuam no Outono uma segunda atividade vegetativa, quando as temperaturas são favoráveis para o crescimento e as chuvas de final de Verão chegam. Este segundo crescimento poderá não acontecer, se as temperaturas diminuírem abaixo do limite ou se as precipitações seguem até ao final do Outono (Macchia et al., 1993).

A azinheira é uma espécie monóica (a mesma árvore produz folhas masculinas e femininas independentes). O desenvolvimento da flor masculina produz-se a partir do mês de Março e prolonga-se até ao mês de Abril (Dominguez et al., 1999). Já as flores femininas começam a desenvolver-se posteriormente às masculinas, até o mês de Abril (Vázquez, 1997). As inflorescências femininas estão situadas na zona média ou terminais das ramas jovens (Vázquez, 1997) e são fertilizadas entre um a três meses depois da formação do broto anual (Pulido, 2002).

Nas azinheiras, as flores femininas encontram-se receptivas a partir do mês de Abril. O óvulo encontra-se maduro e produz a antese das flores femininas permitindo a polinização anemófila. Posteriormente, se o óvulo

foi fertilizado, produz-se o desenvolvimento do embrião e o início da formação da bolota (fig 2) que irá terminar no mês de Novembro (Vazquez, 1997). Os frutos formados desenvolvem-se ao longo do Verão e princípio do Outono – Setembro e Outubro (Domínguez et al., 1999) – sofrendo consideráveis perdas antes da dispersão, devido a diferentes causas de aborto e a ação de insectos perfuradores de frutos (Pulido, 2002).



Figura 2: Bolota madura de *Quercus rotundifolia*. A frutificação se dá ao longo do Verão até o início do Outono quando caem.

A germinação das bolotas e a emergência de plântulas ocorrem na Primavera seguinte à dispersão, existindo uma ampla variabilidade fenológica em função do clima (Pulido, 2002).

1.4. A bolota

A bolota ou glande, é o fruto da azinheira. Se um corte de fora a dentro for realizado, será possível distinguir duas partes: o pericarpo (ou a casca) que é a capa externa lignificada que protege a parte mais interna que é a semente. A semente por sua vez é composta pela testa (uma espécie de membrana aveludada) e o embrião, que compõe-se de um lado de dois cotilédones de grande tamanho onde se acumulam as grandes reservas e no extremo oposto a base o eixo embrionário, onde se desenvolverá a futura planta (Ramos, 2002)(fig. 3).

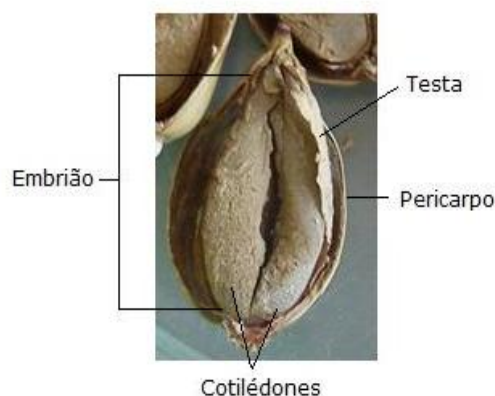


Figura 3: Constituição da bolota de *Quercus rotundifolia*.

1.4.1. Morfometria da bolota

O tamanho da semente é considerado como um dos recursos vegetais de grande relevância ecológica ao estar associado tanto com a capacidade das espécies de dispersar-se e estabelecer-se (Leishman et al., 2000; Garrido et al., 2005). Além do mais, atribui-se à grande parte desta característica à variação das condições ambientais (Gutterman, 1992; Garrido et al., 2005).

A bolota pode apresentar dimensões e formas diferentes de árvore para árvore. Diferentes autores assinalam a duração do período vegetativo como a principal fonte de variação do tamanho da bolota a nível individual. Assim, Diaz-Fernández e outros autores (2000; 2004) indicaram que quando se regista o maior adiantamento na brotação e na floração, produzem-se colheitas de frutos com maior tamanho. O número de sementes que a planta produz também varia e está relacionada com a quantidade de recursos disponíveis. Embora a planta possua uma capacidade relativa de manter o tamanho e o peso da semente modificando o número das mesmas, a variação na quantidade de recursos ambientais causa alterações no tamanho das bolotas.

1.5. Composição química da bolota

As bolotas da azinheira são as mais doces entre todos os carvalhos utilizados na alimentação humana, seja assadas ou para a confecção de farinhas, em épocas de escassez de cereal. Como alimento dos porcos de motanheira ainda tem importância econômica local na produção de carnes e enchidos de qualidade (LPN, 2007).

A polpa das bolotas tem uma cobertura ou consistência membranosa aveludada, dois cotilédones grandes que incluem o endosperma onde se acumulam grandes quantidades de reservas e o embrião (fig 1). A sua composição química englobaria um conjunto de compostos de armazenamento que está presente em grandes quantidades – hidratos de carbono, lípidos ou proteínas, componentes relacionadas com a maquinaria bioquímica encarregada das transformações, das substâncias de reserva e compostos secundários que têm papéis diferentes na biologia das sementes (Besnier, 1989).

Os hidratos de carbono constituem o principal componente nutritivo da bolota, assumindo a principal forma de reserva de energia. Dentro deles o amido é o principal representante assumindo cerca de 62% da matéria seca total (Almeida et al., 1992; Fernández et al., 2005). Outros hidratos de carbono que se podem encontrar nas sementes, são açúcares livres ou solúveis, como glucose ou sacarose que podem variar entre os 4,7% (Fernández et al., 2005) até 11,2% (Almeida et al., 1992). A parede celular, especialmente a das células do pericárpio e do embrião, podem ser considerados como um compartimento extra de armazenamento de hidratos de carbono que, posteriormente são utilizados durante a germinação (Perisse, 2002)..

O armazenamento de lípidos nas sementes não é tão comum como o das substâncias hidrocarbonadas e nitrogenadas, visto que os lípidos simplesmente substituem o amido como fonte de energia. Contudo, a respeito de outros tecidos vegetais sobressairia a grande quantidade de lípidos existentes nas sementes (Perisse, 2002). Os lípidos constituem assim, a forma de reserva de energia mais eficiente, já que o carbono nos ácidos gordurosos é mais reduzido que nos hidratos de carbono e então a oxidação dos lípidos gasta o dobro da energia. No entanto, as gorduras e os hidratos de carbono retêm água e protegem as sementes da dissecação e das baixas temperaturas, o que geralmente são características de espécies que vivem em ambientes xéricos e com sementes difíceis de dissecar (Vazquez, 1998).

Os seus valores aumentam desde o início do período de disseminação até o final, em paralelo ao processo que experimentam os hidratos de carbono de reserva. De modo geral a percentagem de gordura na bolota de azinheira (7,2%-16,5% sobre matéria fresca) é superior ao encontrado em outras espécies como o sobreiro (4,6%-8,6%) (Vázquez, 1998). O ambiente também parece ter uma certa influência sobre os teores de gordura. O estado sanitário também pode influenciar no teor de gordura da bolota, pois as bolotas atacadas por pragas apresentam uma menor quantidade de gordura (Vázquez, 1998; López-Carrasco et al., 2004)

A bolota é considerada um alimento não protéico, pelo seu baixo teor de proteína. Contém cerca de 5% sobre substância seca (Rodríguez-Estévez et al., 2008), com mínimos de 3,6% e máximos de 10,5% (Fernández et al., 2005), dos que uns 39% são solúveis e uns 65% degradáveis no rume. A percentagem de proteína em bolotas de azinheira é inferior ao encontrado em outras espécies, como o sobreiro (6,1-8,5%)(Rodríguez Estévez et al., 2008). O estado sanitário também pode influenciar o teor de proteína da bolota encontrando uma maior quantidade de proteína nas bolotas atacadas por pragas, embora (López-Carrasco et al. (2004)) não encontrem diferenças significativas entre bolotas saudáveis e as atacadas neste aspecto.

1.6. Os isótopos como traçadores no estudo do stress hídrico

Os isótopos estáveis são aplicados a uma ampla gama de estudos, incluindo a evolução, fisiologia e ecologia dos organismos, e as mudanças climáticas globais. Além do mais, os processos vegetais são únicos considerados integradores e indicadores de mudanças ambientais globais (Yakir et al., 1993)

A utilização das razões isotópicas em estudos ambientais baseia-se na existência de diferenças na composição isotópica (R) dos compostos que participam do processo em estudo sensíveis o suficiente para serem detectados e expressa a relação entre o isótopo mais raro e o mais abundante. Tais diferenças ocorrem

na natureza e são frutos de reações físico-químicas e/ou biológicas, possibilitando, deste modo, a discriminação de um dos isótopos. Esta razão geralmente é estabelecida pelo isótopo mais pesado sobre o leve e tendem a ser distintas, pois as velocidades de reação dos isótopos leves e pesados são levemente distintas. Isto leva à atual e ampente aceita notação chamada "delta" (δ) onde a razão do isótopo da amostra analisada ($R_{amostra}$) é expressa em relação a um padrão aceito internacionalmente ($R_{padrão}$). Assim:

$$\delta^{xx} E = \left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} - 1 \right) \times 1000 \quad \text{onde,}$$

Xx = a massa atômica do isótopo mais pesado da razão;

R = expressa relação entre o isótopo raro e o isótopo mais abundante na amostra e na fonte do elemento de interesse (E)

Os isótopos mais usados são carbono, azoto, enxofre, oxigênio e hidrogênio, podem ser analisados juntos ou separadamente, dependendo do objetivo de estudo (Dawson, 2002). Neste estudo, focaremos nos isótopos de carbono, azoto e oxigênio.

O uso dos isótopos estáveis do C, N, O e H para estudar os processos fisiológicos tem aumentado exponencialmente nas últimas tres décadas. Eles estão presentes nos ecossistemas e sua distribuição natural através dos ciclos bioquímicos reflete, de forma integrada, a história dos processos físicos e metabólicos do ambiente. Os ciclos bioquímicos referem-se à transferência de elementos químicos do universo abiótico para o universo biótico e vice-versa. Outro ponto relevante para destacar é que a composição isotópica varia de acordo com o tecido da planta. Algumas dessas diferenças se deve às diferenças entre os componentes químicos do tecido vegetal (Lajtha, 1994).

1.6.1. Carbono

O elemento carbono é observado quando se comparam plantas marinhas e terrestres, bem como entre as plantas terrestres que possuem diferentes vias fotossintéticas [ex C3, C4, e o metabolismo do ácido crassuláceas (CAM)] . As plantas contêm menos ^{13}C que o CO_2 atmosférico em que se baseiam para a fotossíntese. Eles são , portanto, "empobrecido" de ^{13}C em relação à atmosfera . Este esgotamento é causado por processos enzimáticos e físicos que discriminam ^{13}C em favor de ^{12}C . A características básicas dos rácios de isótopos de carbono observadas entre esses grupos sao em grande parte explicadas pelas diferentes formas que eles assimilam carbono e seus fracionamentos associados (Brugnoli et al, 2000; Farquhar et al, 1989), bem como respostas das diferentes espécies em relação às mudanças ecológicas na disponibilidade dos recursos.

Assim, as plantas C3 (como é o caso da azinheira) podem variar em sua $\delta^{13}\text{C}$ de -20 ‰ e -35 ‰ , em resposta à água, luz e disponibilidade de nutrientes (Dawson et al., 2002). A disponibilidade de água, em particular, pode ser especialmente importante na indução de alterações na fisiologia estomática e/ou na discriminação bioquímica expressas na $\delta^{13}\text{C}$ dos produtos da fotossíntese, bem como tecidos e compostos sintetizados a partir desses produtos (Gleixner et al, 1993) .

Devido a diferentes oportunidades de fracionamento isotópico na fixação inicial de CO₂ nas duas vias, C3 e C4, o ¹³C/¹²C também diferem, com plantas C3 empobrecido em ¹³C em relação a plantas C4 (Hobbie et al, 2004).

Particularmente no caso de plantas C3, o CO₂ é assimilado da atmosfera, o que entra e se difunde para fora da folha através dos estômatos. Durante a difusão para o espaço intercelular dentro da folha, o CO₂ é fraccionado contra ¹³C em favor do seu isótopo ¹²C luz em 4,4 ‰.

A vasta gama de valores dentro δ¹³C em materiais biológicos e geológicos sugere que vários e diferentes tipos de processos pode levar à variação observada (Lakatos et al, 2007; Máguas et al, 2003). Como os ambientes mudam no espaço e no tempo, não é nenhuma surpresa δ¹³C de muitos tipos diferentes de materiais também ocorrerem. Como tal, δ¹³C pode servir como um importante indicador de mudança (Dawson et al, 2007).

1.6.2. Azoto

O Azoto é o elemento que com mais frequência limita o crescimento das plantas em muitos ecossistemas terrestres (Evans, 2001). Estudos no campo da fisiologia, ecologia e bioquímica tem cada vez mais utilizado os dados de δ¹⁵N, lançando novos desafios na aplicação do isótopo do azoto como traçador, integrador ou *fingerprint* de um determinado processo (Dawson et al., 2002). O principal desafio está em caracterizar os diversos e variados fatores de fracionamento associados com a transformação, a utilização e a imobilização do substâncias nitrogenadas enquanto se movem através do ciclo N. Outros autores afirmam que o δ¹⁵N da planta não é um marcador de fonte de N, ao invés disso, ele fornece uma síntese do δ¹⁵N da fonte de azoto, fracionando eventos que ocorrem durante a absorção de N e por diferentes associações micorrízicas e durante a assimilação, alocação e perdas de N a partir da planta (Robinson, 2001)

Algumas aplicações – chave usando δ¹⁵N nos tecidos vegetais inclui a avaliação de contribuições de várias fontes de N para a planta, a absorção de N no campo, incluindo a fixação simbiótica do azoto e a deposição atmosférica, o papel da infecção micorrízica, a absorção de N dissolvido e a interpretação de perfis de δ¹⁵N em solos. Como a demanda excede a oferta, freqüentemente N em sistemas naturais sugere que o δ¹⁵N da planta é uma boa aproximação do δ¹⁵N da fonte de N disponível, sob os diferentes cenários. (Marshall et al., 2007).

1.6.3. Oxigênio

De entre os efeitos mais importantes que influenciam δ²H e δ¹⁸O de águas meteóricas estão a sazonalidade - e, por conseguinte, as alterações na temperatura de condensação de precipitação – a latitude e a altitude, (Ehleringer et al., 1992). Outro efeito conhecido que influencia a composição isotópica das águas meteóricas é a continentalidade (Ingraham & Taylor, 1991).

Não há fracionamento de isótopos durante a absorção de água pelas raízes das plantas (Barbour, 2007; Dawson et al, 1998). A composição isotópica da água nas raízes e caules, portanto, reflete a composição isotópica da água disponível para a planta. Embora não haja fracionamento de isótopos durante absorção de

água pelas plantas, o fracionamento faz-se ocorrer durante a transpiração. A composição isotópica da fonte de água (meteórica) é sobreposta pelo sinal evaporativo – transpirativo na folha denominado por *déficit* de pressão de vapor e depende da umidade relativa do ar (Loader et al., 2007).

A análise isotópica do O e H tem sido amplamente utilizada como um biomarcador de mudanças climáticas uma vez que $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ são conhecidos pela capacidade de registrar temperaturas, fontes de água e ainda os níveis de humidade relativa do ar ocorrido no momento da síntese (West et al., 2010).

1.7. Análise isotópica em sementes

No caso das sementes, esta análise tem sido muito utilizada no âmbito da ecogeoquímica com o objetivo de traçar o histórico do material vegetal a nível de adaptações às condições climáticas de desenvolvimento. Um estudo feito com a semente do trigo (*T. Durum*) sugere que medir $\delta^{13}\text{C}$ das sementes pode ser usado como um método para avaliar a captação de água (seja ela derivada de irrigação e/ou precipitação) em agriculturas passadas (Araus et al., 2001).

Um outro estudo sobre a análise isotópica do C ($\delta^{13}\text{C}$) em trigo e cevada foi aplicada para avaliar o peso do grão e a relação da produtividade desta com as práticas agrícolas passadas (Ferrio et al., 2006), mostrando que a análise isotópica do carbono em sementes de trigo e cevada pode ser utilizado como um indicador de estado da água na planta, assim como um método para avaliar a captação de água em agriculturas antigas.

Para o grão do café, a análise isotópica de seus elementos permitiu identificar que esta semente é um indicador fidedigno de parâmetros de dependência geográfica (Rosario, 2004). Anteriormente, a composição isotópica do carbono, nitrogênio e boro em grãos de café (*Coffea sp*) foi determinada em 19 países diferentes, mostrando que esses três elementos são ótimos indicadores de parâmetros de dependência geográfica, e, por isso uma ferramenta muito importante para inferir a região produtora do grão de café (In Rodrigues, C, 2011).

Um outro estudo da determinação do fracionamento isotópico do C, N O e Estrôncio (Sr) do grão verde de café buscou fazer uma relação entre a medida do fracionamento isotópico e as informações disponíveis dos fatores ambientais. Este estudo foi importante para o melhor entendimento de como as sementes integram a ocorrência do fracionamento isotópico durante a sua fase de desenvolvimento, associada às mudanças climáticas e a geologia do local (Rodrigues, C, 2011). Entretanto, o estudo das relações entre os isótopos da semente das plantas e os fatores ambientais ainda é recente (Rodrigues, C, 2011), necessitando de mais investigações.

Diante das atuais e futuras previsões das mudanças climáticas, da sensibilidade das regiões de clima mediterrânico que estão sofrendo alterações severas e de certo modo até abruptas, da vulnerabilidade do seu ecossistema – em particular sua cobertura vegetal que corre o risco de desaparecer em algumas zonas e de até haver extinção de algumas espécies - , viu-se a necessidade de encontrar um indicador precoce a fim de evitar que tornem-se irreversíveis. As características curiosas de *Quercus rotundifolia* Lam. no que diz respeito

às suas adaptações às temperaturas extremas (tanto frias quanto áridas) e à disponibilidade da água, incintaram o estudo desta espécie dentro do contexto de um gradiente climático no Alentejo, SE Portugal.

Sendo as sementes um dos primeiros estágios de uma planta, encontrar indícios marcadores de alterações físico-químicas relacionados com mudanças a nível da temperatura e da precipitação tornou-se o principal motivo desse trabalho, sendo pela primeira vez aplicada a análise isotópica em bolotas com este fim.

Assim, detectar precocemente os efeitos das mudanças climáticas a nível local, embasa futuros projetos de conservação, ganhando-se tempo para o manejo sustentável dessas regiões podendo inclusive expandir o propósito a um modelo global.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar o efeito da variação dos fatores climáticos na morfologia, composição química e isotópica das sementes de *Quercus rotundifolia*, de modo a poder utilizar as bolotas como traçadores da resposta das plantas às alterações climáticas.

2.2. Específicos

- Estudar a variação morfométrica (comprimento, diâmetro e peso) da bolota de *Quercus rotundifolia* ao longo de uma gradiente de temperatura e precipitação
- Estudar a variação dos parâmetros químicos da polpa da bolota de *Quercus rotundifolia* – mais especificamente os açúcares solúveis, amido, lípidos totais e proteínas totais –. ao longo de uma gradiente de temperatura e precipitação
- Estudar a variação da composição isotópica da polpa da bolota de *Quercus rotundifolia* ao longo de uma gradiente de temperatura e precipitação, como traçadores da resposta das plantas ao stress hídrico e variação climática
- Avaliar o potencial das sementes como traçadores da resposta das plantas às variações climáticas e as implicações para o desenvolvimento das novas plântulas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área geográfica e locais estudo

O estudo foi realizado ao longo de um gradiente climático situado na região do Alentejo, SE Portugal. A razão desta escolha prendeu-se com o facto desta região alentejana ser fortemente marcada pela presença de *Quercus rotundifolia* (azinheira), uma árvore com a copa aplanada que aparece de forma dispersa devido às muitas décadas de pastoreio e de cultivo que fizeram com que muito poucas árvores pudessem surgir de forma a ocupar das que iam morrendo (LPN,2007).

O outro aspecto importante e associado a este estudo é o facto desta região geográfica do Alentejo estar caracterizada como uma área de clima Mediterrânico pluvio-sazonal oceânico; verões secos e quentes e Invernos de moderados a frios e chuvosos (Rivas-Martínez, 2004) e de solos pobres variando entre litossolos e luvisolos. De acordo com o índice de aridez calculado pelo Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), esta região é considerada árida em vias de desertificação.

Assim, foram escolhidos um total de 25 locais de estudo (ver Preparação das amostras em 2.2) para a colheita de sementes de *Quercus rotundifolia* (bolota) (fig. 1), ao longo de um gradiente edafo-climático, tal como vai ser descrito no ponto que se segue.

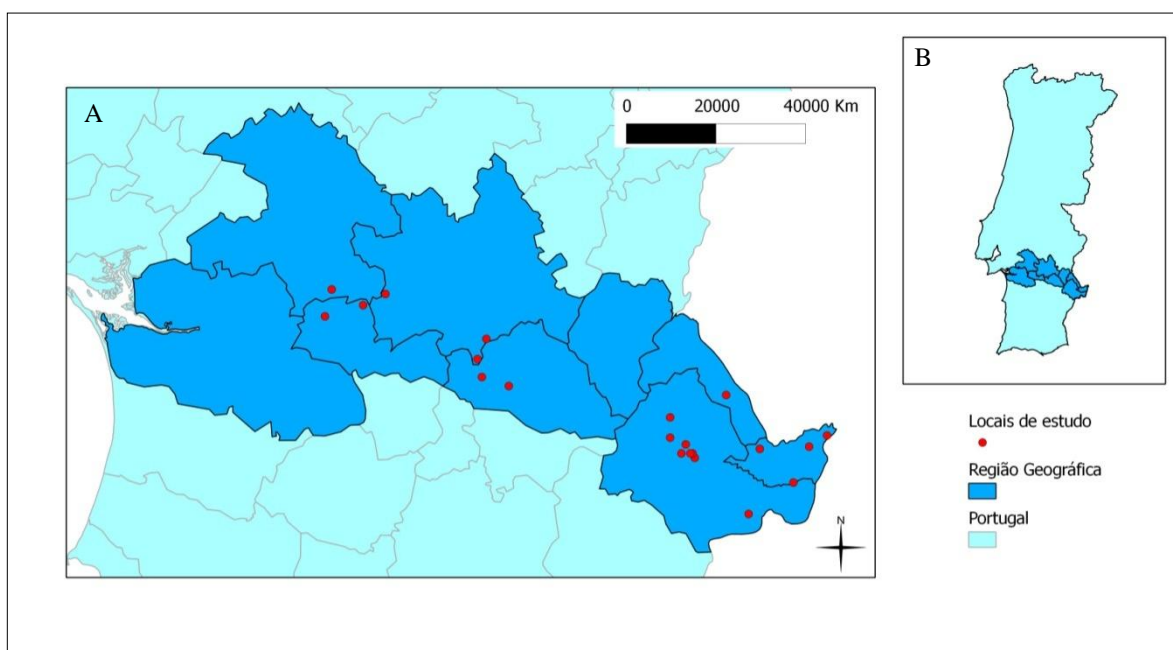


Figura 4 Mapa dos locais de estudo e da região geográfica estudada ao longo de um gradiente climático no Alentejo, SE Portugal. A: Mapa da distribuição dos locais de estudo (pontos marcados). B: Mapa da área geográfica de estudo (em destaque).

3.2. Gradiente Climático

Os locais estudados neste trabalho fazem parte de uma ampla base de dados de sítios que são regularmente monitorizados pelo ICNF em termos da camada de árvores dominante. Para eleger os locais de estudo a partir desta ampla base de dados, usou-se como primeiro pré-requisito aqueles que tinham *Quercus rotundifolia* como a espécie dominante. De seguida, os pontos foram homogeneizados segundo os parâmetros ambientais listados na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros usados para a homogeneização dos pontos de amostragem

Parâmetros	Margem considerada
Altitude	158 – 280m
Incêndios	Zonas não incendiadas entre 1975 -2005
Inclinação	0.8 -4.8
Litologia	Sedimentares e metamórficas
PH do solo	5.6 – 6.5 (excepcionalmente 7.3)
Solo	Litossolos e luvisolos

Adicionalmente, uma amostragem aleatória e estratificada foi aplicada, de acordo com a precipitação anual média do período compreendido entre os anos de 1950 e 2000. Desta forma, este desenho experimental assegura que os pontos tenham similaridade no que se refere aos parâmetros listados acima, mas com diferentes regimes de precipitação (fig 5).

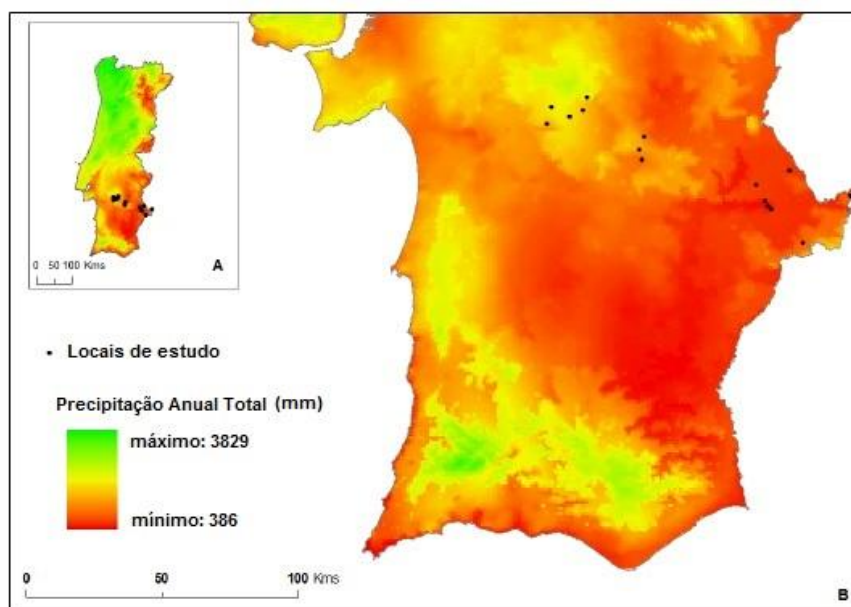


Figura 5: Mapa de um gradiente de precipitação em Portugal (precipitação total anual de 1950-2010). A: Portugal Continental. B: Locais de estudo ao longo do gradiente de precipitação (pontos marcados). Adaptado de Batista, (2013)

Finalmente, um conjunto exaustivo de parâmetros climáticos foram utilizados (Tabela 2), dos quais há a salientar o índice de aridez (fig 6). Desta forma, os locais estudados não só estão em um gradiente climático, mas também estão localizados ao longo de um gradiente de desertificação. Os dados referentes às variáveis climáticas foram cedidos pelo projeto PTDC/AAC-CLI/104913/2008.

Tabela 2: Variáveis climáticas considerados neste trabalho, sua respectiva abreviação e o cálculo que representa.

Abreviação	Descrição	Cálculo
TempMed_An	Temperatura média anual	clima global, 1950-2000, média mensal
AmpTer_diurno	Varição de temperatura diurna	Média Mensal (temp max – temp min)
Temp_Iso	Isotermalidade	$(\text{AmpTer_diurno}/\text{TempAn_var}) * 100$
Temp_Sas	Temperatura Sazonal	$(\text{Desvio Padrão TempMed_An} * 100)$
TempMax_MesQuen	Temperatura máxima do mês mais quente	clima global, 1950-2000, média mensal
TempMin_MesFrio	Temperatura mínima do mês mais frio	clima global, 1950-2000, média mensal
TempAn_var	Varição da temperatura anual	$\text{TempMax_MesQuen} - \text{TempMin_MesFrio}$
TempMed_1/4Chuv	Temperatura média do quarto mais húmido	clima global, 1950-2000, média mensal
TempMed_1/4Seco	Temperatura média do quadrimestre mais seco	clima global, 1950-2000, média mensal
TempMed_1/4Quen	Temperatura média do quadrimestre mais quente	clima global, 1950-2000, média mensal
TempMed_1/4Frio	Temperatura média do quadrimestre mais frio	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_An	Precipitação Anual	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_MesChuv	Precipitação do mês mais húmido	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_MesSeco	Precipitação do mês mais seco	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_Iso	Precipitação sazonal	Coefficiente de Variação
Prec_1/4chuv	Precipitação do quadrimestre mais húmido	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_1/4seco	Precipitação do quadrimestre mais seco	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_1/4Quen	Precipitação do quadrimestre mais quente	clima global, 1950-2000, média mensal
Prec_1/4Frio	Precipitação do quadrimestre mais frio	clima global, 1950-2000, média mensal
Alt	Altitude	MDT FEUP (80m), em metros
Inclinação	Inclinação	MDT Altitude, em graus
I_Aridez	Índice de aridez	$\text{Prec_An}/\text{evaporação potencial}$, dados dos anos de 1960-1990

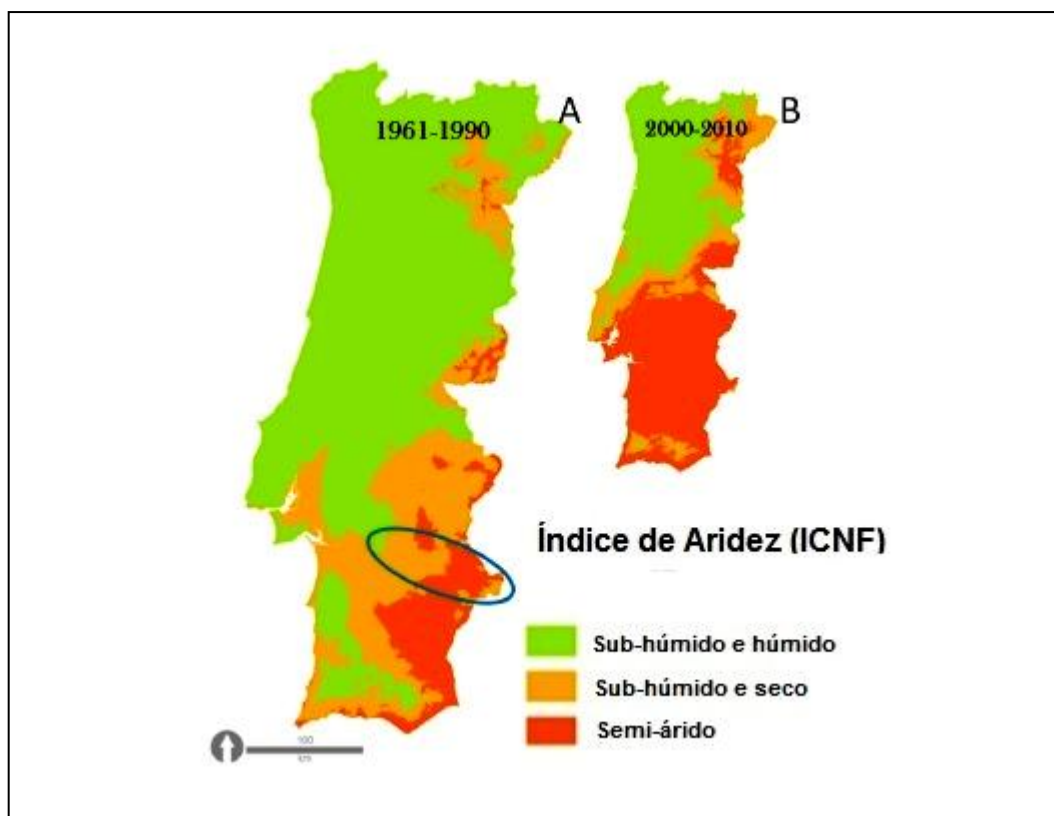


Figura 6: Classificação climática de Portugal de acordo com o Índice de Aridez. A: classificação oficial atual, baseada em dados de 1961 a 1990. B: classificação climática provisória, com base em dados de 2000 a 2010. Locais de estudo estão evidenciado pelo círculo azul. (Adaptado de Batista, 2013)

3.3. Colheita de material biológico

Amostras de bolotas foram colhidas diretamente das azinheiras (*Quercus rotundifolia*). Sempre que possível, foram colhidas em média 10 bolotas verdes e saudáveis por cada árvore num total de 5 árvores por ponto de amostragem.

3.4. Preparação das amostras

Considerou-se as amostras por ponto de amostragem. Isto é, foram escolhidas, aleatoriamente, 2 bolotas por árvore em cada ponto de amostragem, de modo a obtermos uma amostra composta. Estas bolotas foram partidas ao meio e secas em estufa (Memmert) a 60 °C por durante 2 semanas. Foi utilizada apenas a polpa seca da semente homogeneizada em almofariz, moída em moinho (MM2, Retsch) e armazenada em tubos Falcon (50mL).

3.5. Análise morfológica das bolotas

Pesou-se (g) em balança analítica eletrónica (Abs, Kern) e mediu-se o comprimento (mm) e o diâmetro (mm) de 25 bolotas por local de amostragem, escolhendo, sempre que possível, 5 sementes por árvore. de forma

aleatória, num total de 5 árvores por ponto de amostragem. Os dados foram registados para tratamento a posteriori.

3.6. Análise elementar e isotópica das bolotas

Para a análise elementar do C, N e O, 5 µg de amostra foram pesados em balança de precisão (XM 1000 P, Sartorius) e encapsuladas em cápsulas 5x9 de estanho (EuroVector, Milano).

As análises das razões dos isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ foram determinadas por espectrometria de massa de razão de isótopos estáveis em modo de fluxo contínuo (CF- IRMS), num espectrómetro de massas Isoprime (GV, Reino Unido), acoplado a um Analisador Elementar EuroEA (EuroVector, Itália), que efetua a preparação automática das amostras por combustão de Dumas. Para o C, foram utilizados os materiais de referência IAEA-CH6 e IAEA-CH7. Já para o N foram usados os materiais de referência IAEA-CN1 e USGS-35.

A combustão foi feita em excesso de oxigénio ($\text{H}_2\text{O} < 3\text{ppm}$, $\text{C}_n\text{H}_m < 0.5 \text{ ppm}$) (Airliquide, Portugal) e gás cromatográfico carregado com hélio (He) ($\text{H}_2\text{O} < 3\text{ppm}$, $\text{O}_2 < 2\text{ppm}$, $\text{C}_n\text{H}_m < 0.5 \text{ ppm}$) (Airliquide, Portugal).

Para a razão $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, as análises isotópicas foram determinadas por espectrometria de massa de razão de isótopos estáveis em modo de fluxo contínuo (CF- IRMS), num espectrómetro de massas Isoprime (GV, Reino Unido), acoplado a um Analisador Elementar EuroEA (EuroVector, Itália), que efetua a preparação automática das amostras por degradação térmica (pirólise). Foram utilizados os materiais de referência IAEA-601 e IAEA-602.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ apresentam-se na escala determinada pelo PeeDee Belemnite (PDB), enquanto os valores de $\delta^{15}\text{N}$ se reportam ao ar atmosférico. Já os valores de $\delta^{18}\text{O}$, apresentam-se na escala determinada pelo V-SMOW. Todos os valores de δ foram determinados segundo a equação seguinte:

$$\delta^{xx} E = \left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} - 1 \right) \times 1000 \quad \text{onde,}$$

Xx = a massa atómica do isótopo mais pesado da razão;

R = expressa relação entre o isótopo raro e o isótopo mais abundante na amostra e na fonte do elemento de interesse (E)

3.7. Análise de componentes químicos das bolotas

Foram determinadas as percentagens dos conteúdos em proteínas totais, lípidos totais, açúcares solúveis e amido por peso seco. Para tal, foram utilizadas amostras compostas dos 25 locais de estudo. As amostras foram analisadas em triplicado com testes de reprodutibilidade em 6 pontos escolhidos aleatoriamente ao longo do gradiente – pontos 2, 8, 10, 16, 21, 24 – para controlar a variabilidade de amostras idênticas tratadas independentemente.

3.7.1. Determinação das proteínas totais

Determinou-se o Azoto total (% p/p) em análise elementar e multiplicou-se o valor por 6.25 (fator geral para proteínas em cereais), de acordo com AOAC (Método oficial 992.23).

3.7.2. Extração e Determinação dos lípidos totais

Para a extração dos lípidos totais, foi utilizado o método clássico Soxhlet (AOAC, Método oficial 923.05) com a modificação do reagente (Bligh & Dyer, 1959) (ver protocolo em Anexos) Foi utilizado 5g de amostra para 150mL de CHCl₃ (clorofórmio), CH₃OH (metanol) 2:1 (v/v) em extração a quente por 4h. Para determinar a percentagem de lípidos, utilizou-se o método gravimétrico segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{Lípidos} = \frac{(P_o - P_f) \times 100}{5g} \quad \text{Onde:}$$

P_o = peso do cartucho antes da extração, dado em g

P_f = peso final do cartucho (depois da extração, seco por 1 noite em estufa a 60 °C, dado em g)

3.7.3. Determinação dos açúcares solúveis e amido

3.7.3.1. Extração da fração solúvel e do amido

O método utilizado para a extração de fração solúvel e do amido foi adaptado de Duranceau et al (1999) e Almeida (2007) (ver protocolo em anexos), tendo em atenção o tipo de amostra e o método de determinação a utilizar.

Extraíram-se 0.05g da amostra preparada (ver Preparação das amostras em 3.2) com 0,5mL de de H₂O ultra-pura. Após rápida agitação (vórtex 2 Genie G560 E, Scientific industries) e aquecimento por 5 min a 80 °C em banho termoestático (MA6, Lauda), os extractos foram colocados em gelo (5min). A massa (em g) da solução, foi determinada em balança analítica (BP 2215, Sartorius), após prévia determinação do peso do tubo. A posterior centrifugação (Centrifuge 5415C, Eppendorf) por 5 min a 16000g permitiu separar o sobrenadante, contendo a fração solúvel, neste caso maioritariamente açúcares solúveis, do sedimento que continha o amido e alguns resíduos. Dada a cor branca da amostra, que indicava a inexistência de pigmentos, não foi necessário proceder à sua extração com etanol a 80% (v/v).

O amido, um polímero de glucose insolúvel, foi solubilizado por hidrólise ácida. Para tal, o sedimento foi previamente seco (estufa Memmert) a 60 °C por 3 dias e ressuspendido em 1 mL de ácido clorídrico (HCl) 7,5M, agitado em vórtex (2 Genie G560 E, Scientific industries) e mantidos à temperatura ambiente durante toda a noite. Após a adição de 1 mL de NaOH para controlo da acidez (pH ≈ 4), as amostras foram agitadas em vórtex (2 Genie G560 E, Scientific industries) e centrifugadas (Centrifuge 5415C, Eppendorf) por 10 min a 40.000 g para retirar o resíduo de NaCl resultante do processo. A massa (em g) da solução, foi determinada em balança analítica (BP 2215, Sartorius), após prévia determinação do peso do tubo microtubo.

3.7.3.2. Determinação dos açúcares solúveis

Os açúcares solúveis foram determinados por refração da luz (refratómetro digital Pallette PR-32 α , ATAGO) nos sobrenadantes previamente transferidos para novo tubo Eppendorf (1,5 mL), em amostras de 40 μ L (Micropipeta P100, Gilson) doseadas em triplicado.

A glucose resultante da hidrólise do amido foi também determinada por refração da luz (refratómetro digital Pallette PR-32 α , ATAGO) nos sobrenadantes previamente transferidos para novo tubo Eppendorf (1,5 mL), em amostras de 150 μ L (Micropipeta P200, Gilson) doseadas em triplicado. Neste caso, foi reduzido da leitura o valor do “branco” de amostra (tabela 3), resultante da formação de NaCl ocorrida pela hidrólise ácida e subsequente neutralização.

3.7.3.3. Conversão °Brix para % de açúcares por peso seco de amostra (p/p)

Os valores obtidos através do refratómetro digital são expressos em °Brix, isto é, peso de solutos que refractam a luz por 100 g de solução. Assumindo que a refração da luz era devida aos açúcares solúveis (após retirado do valor do “branco”, nas amostras do amido), procedeu-se ao cálculo da % de açúcares solúveis e de amido existentes por peso seco de amostra (p/p). Assim, a conversão foi feita segundo as proporções apropriadas, resultando no algoritmo seguinte:

$$X = \frac{P_a \cdot P_s}{P_b}$$

Onde,

X= % de açúcares solúveis ou de amido por polpa de bolota seca e moída, g em 100g de amostra

P_a = g de açúcares solúveis na solução (valor do °Brix lido pelo refratómetro)

P_s = o peso total da solução

P_b = o peso seco da amostra de bolota utilizada para estas determinações

3.7.3.4. Adaptação e Otimização do método de determinação da fração solúvel e do amido para a matriz em estudo (bolotas)

Após testes realizados como proposto na metodologia original (Almeida, 2007), verificou-se que a utilização de EtOH (80%) era irrelevante uma vez que as amostras não apresentavam muitos pigmentos, como referido acima. Adicionando H₂O ultra-pura desde o início, tornou desnecessária a evaporação do sobrenadante e do resíduo em N₂ sem nenhuma alteração nos resultados.

Para avaliar se a hidrólise do amido tinha sido completa, o resíduo obtido na centrifugação anterior (totalmente ou maioritariamente constituído por NaCl) foi novamente hidrolisado com ácido, neutralizado e doseado por mais 2 vezes. Assim, verificou-se que o amido existente era muito pouco (tabela 3). Desta forma, reduziu-se sem nenhuma alteração no resultado (tabela 3) o peso de amostra inicial pela metade (0.05g) e

duplicou-se o volume de ácido utilizado para a hidrólise (HCl = 1mL), mantendo o tempo de hidrólise durante toda a noite, assegurando condições para que ocorresse a hidrólise completa.

Tabela 3: Comparação da determinação de açúcares solúveis e de amido obtidos entre as amostras 10 e 21 com diferentes pesos amostrados e volumes de diluição. Leitura por refração de luz ($^{\circ}$ Brix) dos testes realizados na fracção solúvel extraída directamente (açúcares solúveis, AcS e após adição de HCl ao sedimento para hidrólise-ácida do amido e posterior neutralização (açúcares solúveis, glucose, resultante da hidrólise de amido, Am). Valores de $^{\circ}$ Brix apresentados são média de leituras realizadas em triplicado.

Amostra	Peso amostrado	AcS	Am	Peso amostrado	AcS	Am	Am
		$^{\circ}$ Brix1 (0.5mL)	$^{\circ}$ Brix2* (1mL)		$^{\circ}$ Brix1 (1mL)	$^{\circ}$ Brix2* (0.5mL)	$^{\circ}$ Brix2* (1mL)
10.1	0.0505	1.5	20.2	0.1008	1.3	25.4	21.6
10.2	0.0555	1.5	20.1	0.1006	1.7	26.9	23.7
10.3	0.0509	1.5	19.9	0.1008	1.5	26.8	22.2
Média	0.0523	1.5	20.1	0.1007	1.5	26.5	22.5
DesPad	0.00	0.0	0.2	0.0	0.2	0.8	1.1
21.1	0.0500	1.5	-	0.1009	1.6	26.9	21.5
21.2	0.0510	1.7	20.2	0.1007	1.9	27.1	24
21.3	0.0555	1.7	20.1	0.1001	1.9	26.7	22.1
Média	0.0522	1.6	20.1	0.1006	1.8	26.9	27.9
DesPad	0.00	0.1	0.12	0.0	0.2	0.2	1.3

Nota: * valores de $^{\circ}$ Brix que incluem a refração da luz pelo NaCl resultante da hidrólise do amido e posterior neutralização das amostras.

Os valores de $^{\circ}$ Brix obtidos nas amostras Am tinham um valor muito elevado porque incluíam a refração da luz pelo NaCl resultante da reacção entre o HCl e o NaOH utilizados na hidrólise do amido e posterior neutralização das soluções. Para acurar os dados, foram feitos branco de amostra onde o sal formado foi igualmente determinado por refração de luz (refratómetro digital Pallette PR-32 α , ATAGO) em amostras de 150 μ L (Micropipeta P200, Gilson) doseadas em triplicado (Tabela 4).

Tabela 4: Determinação do NaCl presente nos brancos de amostra. Valores obtidos por refração de luz (refratómetro digital Pallette PR-32 α , ATAGO) em amostras de 150 μ L (Micropipeta P200, Gilson) doseadas em triplicado.

Branco de amostra	Peso Inicial (g)	$^{\circ}$ Brix
1	2.3606	21.2
2	2.4251	21.0

Os testes de reprodutibilidade realizados em triplicado às amostras referentes aos pontos 2, 8, 10, 16, 21 e 24 (tabela 5) permitiram determinar a variabilidade que se tinha quando feitas independentemente amostras idênticas.

Tabela 5: Variabilidade dos testes de reprodutibilidade às amostras referente aos pontos 2, 8, 10, 16, 21 e 24. Leitura por refração de luz (°Brix) da fracção solúvel extraída directamente com H₂O (açúcares solúveis, AcS) e após adição de 1mL de HCl ao sedimento para hidrólise-ácida do amido e posterior neutralização (açúcares solúveis, glucose, resultante da hidrólise de amido, Am). Valores de °Brix apresentados são média de leituras realizadas em triplicado.

Amostra	AcS			Am	
	Peso Amostrado	P _s 1	°Brix1	P _s 2	°Brix2
2.1	0.0500	0.6184	1.4	2.4236	22
2.2	0.0506	0.5869	1.5	2.4196	22.3
2.3	0.0500	0.5824	1.4	2.4301	22.3
Média	0.502	0.5959	1.4	2.4244	22.2
DesPad	0.0	0.02	0.06	0.01	0.17
8.1	0.0504	0.6559	1.6	2.3547	22.5
8.2	0.0503	0.6453	1.6	2.3149	22.9
8.3	0.0506	0.6214	1.6	2.3229	22.2
Média	0.0504	0.6409	1.6	2.3308	22.5
DesPad	0.0	0.02	0.00	0.02	0.35
10.1	0.0502	0.6008	1.6	2.3766	22.3
10.2	0.0503	0.6264	1.5	2.3424	22.6
10.3	0.0505	0.6114	1.6	2.3630	22.3
Média	0.0503	0.6129	1.6	2.3607	22.4
DesPad	0.00	0.01	0.06	0.02	0.17
16.1	0.0505	0.6175	1.7	2.4085	22.3
16.2	0.0500	0.6213	1.7	2.4099	22.3
16.3	0.0500	0.6423	1.6	2.3727	22.7
Média	0.0502	0.6270	1.7	2.3970	22.4
DesPad	0.00	0.01	0.06	0.02	0.23
21.1	0.0500	0.6294	1.5	2.4105	22.2
21.2	0.0503	0.6448	1.4	2.3892	22.4
21.3	0.0506	0.6316	1.5	2.3954	22.1
Média	0.0503	0.6353	1.5	2.3984	22.2
DesPad	0.00	0.01	0.06	0.01	0.15
24.1	0.0503	0.6124	1.7	2.4118	22.2
24.2	0.0503	0.6182	1.6	2.3906	22.1
24.3	0.0500	0.6270	1.7	2.3671	22.4
Média	0.0502	0.6192	1.7	2.3898	22.2
DesPad	0.00	0.01	0.06	0.02	0.15

3.7.3.5. Resultados

Durante o Outono, os conteúdos de açúcares e amido aumentam em função do grau de maturidade da bolota, passando de 9% e 39% em Setembro para 13% e 57% em Novembro respectivamente (Muñoz, 2011). Assim, foram encontrados valores de acordo com o referido (tabela 6).

Tabela 6: Açúcares solúveis e amido existentes em amostras de polpa da bolota de *Quercus rotundifolia*. Resultados expressos em % (p/p).

		%Brix	% em 100g
Açúcares solúveis	Valor Máximo	2.20	27.81
	Valor Mínimo	1.43	17.01
	Média	1.83	22.49
	Desvio Padrão	0.2	2.7
Amido	Valor Máximo	22.53	68.11
	Valor Mínimo	22.10	40.89
	Média	22.26	58.92
	Desvio Padrão	0.1	5.7

3.8. Análise elementar e isotópica das folhas

Para a análise elementar do C, N das folhas de *Quercus rotundifolia*, 5 µg de amostra foram pesados em balança de precisão (XM 1000 P, Sartorius) e encapsuladas em cápsulas 5x9 de estanho (EuroVector, Milano).

As análises das razões dos isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ foram determinadas por espectrometria de massa de razão de isótopos estáveis em modo de fluxo contínuo (CF- IRMS), num espectrómetro de massas Isoprime (GV, Reino Unido), acoplado a um Analisador Elementar EuroEA (EuroVector, Itália), que efetua a preparação automática das amostras por combustão de Dumas. Para o C, foram utilizados os materiais de referência IAEA-CH6 e IAEA-CH7. Já para o N foram usados os materiais de referência IAEA-CN1 e USGS-35. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ apresentam-se na escala determinada pelo PeeDee Belemnite (PDB), enquanto os valores de $\delta^{15}\text{N}$ se reportam ao ar atmosférico.

Para tal, 10 folhas foram retiradas de vários ramos recolhidos em 3 árvores de cada ponto de amostragem (total de 15 pontos) durante a Primavera (Março a Junho) de 2012. Foram escolhidas folhas totalmente expandidas tiradas das ramificações terminais, que também se designam de cohorts (ou seja, o último cohort). As folhas tratadas foram cedidas pelo projeto PTDC/AAC-CLI/104913/2008.

3.9. Análise Estatística

O principal método de análise estatística escolhido neste trabalho foi a correlação. Segundo Lavorel *et al* (2007a.), pesquisas sobre as respostas dos marcadores das plantas às variações ambientais está muito baseada em correlações.

Foram testadas correlações não-paramétricas entre as variações das medidas dos marcadores (morfometria, composição química e análise elementar) e as variáveis climáticas em 22 dos 25 pontos amostrados nos locais de estudo. Foi escolhido métodos não-parâmetros como alternativa à análise dos dados, uma vez que o número de amostras por locais de estudo, na maioria dos casos não permitiram que os testes de normalidade, homoscedasticidade e linearidade assumissem os pressupostos para as correlações. Desta forma, foram feitas correlações de Spearman entre as variáveis considerando os coeficientes de correlação para níveis de significância p , 0.05. O *software* utilizado foi Statistica 11.

No intuito de agrupar as variáveis de acordo com características de adaptação do *Quercus rotundifolia* à seca e ao funcionamento da sua fisiologia na sua condição ambiental de precipitação foi realizada uma análise de componente principal (PCA) baseada em matriz de correlação.

Assim, foram feitas análises sobre a morfologia da bolota, sua constituição e a fisiologia da árvore baseados nas correlações dos parâmetros morfológicos, da composição química e da análise elementar entre si e com as variáveis climáticas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Gradiente climático

Como já foi referido anteriormente (cap 3), os locais de estudo estão distribuídos ao longo de um gradiente climático na região do Alentejo, SE Portugal, onde o ponto de amostragem 1 é o mais árido e o ponto de amostragem 25 o mais húmido. Na tabela 7, observou-se a variação dos parâmetros climáticos envolvidos (ver cap 3) ao longo desse gradiente.

Tabela 7: Variação dos valores médios dos parâmetros climáticos considerados ao longo do gradiente da área geográfica escolhida para estudo. Dados climáticos referentes ao período de 1950 a 2000.

Parâmetros Climáticos	Variação ao longo do gradiente
Temperatura média anual	16 -17 °C
Variação de temperatura diurna	9,8 a 11,1 °C
Isotermalidade	3,9 – 4,1 °C
Temperatura Sazonal	5 – 6 °C
Temperatura máxima do mês mais quente	30,4 – 32,8 °C
Temperatura mínima do mês mais frio	4,8 – 6,9 °C
Variação da temperatura anual	23,6 – 28 °C
Temperatura média do quarto mais húmido	10,2 – 11,6 °C
Temperatura média do quadrimestre mais seco	22,5 – 24,2 °C
Temperatura média do quadrimestre mais quente	22,7 – 24,4 °C
Temperatura média do quadrimestre mais frio	9,4 – 10,8 °C
Precipitação Anual	520 – 634 mm
Precipitação do mês mais húmido	72 – 89 mm
Precipitação do mês mais seco	3 – 4 mm
Precipitação sazonal	56 – 60 mm
Precipitação do quadrimestre mais húmido	211 – 262 mm
Precipitação do quadrimestre mais seco	26 – 34 mm
Precipitação do quadrimestre mais quente	29 – 34 mm
Precipitação do quadrimestre mais frio	200 – 262 mm
Altitude	156 – 280 m
Inclinação	1 – 5°
Índice de aridez, dados dos anos de 1960-1990	0 – 1

Com base na análise dos parâmetros estudados foi possível observar uma variação entre os pontos mais e menos áridos. Percebe-se assim que, durante os anos em questão, a temperatura da região geográfica estudada, teve uma diferença climática muito grande entre o Inverno e o Verão variando de 5 a 33°C nos meses mais frios e mais quentes, respectivamente. Para o mesmo período, a precipitação variou de 262 a 29 mm.

4.2. Variação de parâmetros morfológicos da bolota de *Quercus rotundifolia* ao longo do gradiente climático

Vários autores têm observado uma variação no tamanho da semente, como resposta adaptativa a variabilidade ambiental, como por exemplo: a latitude, a altitude, a temperatura e a disponibilidade de água (in Ramirez – Valiente, 2009). Desta forma, o tamanho da semente torna-se uma das características morfológicas mais importantes a influenciar nos primeiros estágios do ciclo de vida de uma planta, pois controla a aptidão para a descendência.

Pouco se sabe dos motivos que causam alterações nos parâmetros morfológicos das bolotas, já que a maioria dos estudos focam em estimativas da produção do bolotas, deixando de lado dados sobre o seu tamanho e peso (Gea-Izquierdo, et al, 2006). Encaixando-se nessa lacuna, esse tópico visa analisar a variabilidade dos parâmetros morfológicos das bolotas de *Quercus rotundifolia* ao longo de um gradiente climático.

De modo geral, observou-se que há uma correlação positiva entre todos os parâmetros morfológicos (tabela 8). Assim, as bolotas apresentam uma clara relação entre o comprimento, o diâmetro e o peso,. Nota-se, contudo, que é o peso que possui as correlações mais fortes com os demais parâmetros ($r=0.81$ para o comprimento e $r=0.89$ para o diâmetro).

Tabela 8: Coeficiente de correlação de Spearman dos parâmetros morfológicos da bolota de *Quercus rotundifolia*. Correlações significativas ($p < 0.05$) indicadas a negrito.

	COMPRIMENTO	DIÂMETRO	PESO
COMPRIMENTO	1.000	-	-
DIÂMETRO	0.645	1.000	-
PESO	0.810	0.892	1.000

A variação dos parâmetros morfológicos ao longo do gradiente climático, indicou um padrão descontínuo na oscilação (Figura 7). Ou seja, ao longo do gradiente climático (dado que os pontos 1 a 25 são representados, respectivamente, pelos locais de estudo mais árido e mais húmido) não podemos detetar um padrão claro quanto à variação morfológica da bolota. Muitas das observações indicaram um aumento no comprimento da bolota associado a um aumento de peso e do diâmetro da bolota, indicando uma forte dependência entre eles. No entanto não foi observado uma variação clara da morfologia das bolotas dos locais mais áridos em relação às bolotas de locais menos áridos. O mesmo resultado foi encontrado por Ramirez-Valiente et al (2009), para bolotas de *Quercus suber*.

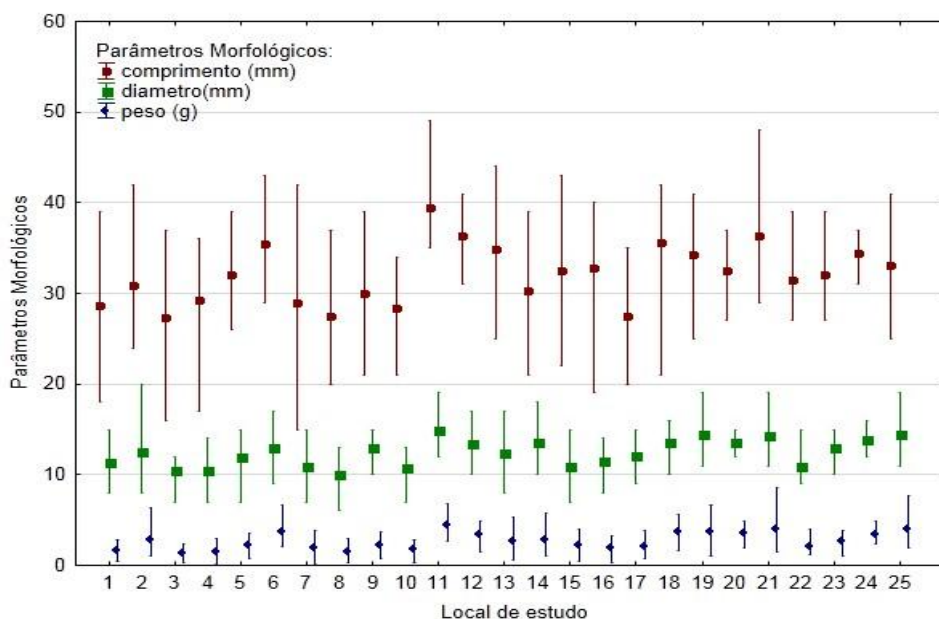


Figura 7: Variação dos parâmetros morfológicos de bolotas de *Quercus rotundifolia* – valores médios do comprimento (mm), diâmetro (mm) e peso (g) e seus respectivos valores máximos e mínimos (*Whiskers*)– ao longo do gradiente climático- do ponto mais árido (1) para o ponto mais húmido (25).

O padrão de variação da morfologia das bolotas não é claro e parece está mais relacionado com gradientes microclimáticos e outros fatores ambientais não considerados associados aos locais de estudo, (como a latitude e/ou a forma de dispersão) do que com o gradiente macroclimático e de aridez existente ao longo da área de estudo. Koenig et al (2009), reportou que o tamanho das bolotas de *Quercus macrocarpa* varia de acordo com a latitude, no entanto, quando acrescentado variáveis ambientais – forma de crescimento, tipo de vegetação, forma de dispersão e produtividade primária absoluta – a variável latitude não explicou nenhuma variação residual dos dados.

De acordo com este estudo, a temperatura média do quadrimestre mais frio é a única variável que se correlaciona significativamente com os três parâmetros morfológicos ($r= 0,46, 0.53$ e $0,48$, respectivamente) (Tabela 9). Especificamente, o parâmetro que melhor se correlaciona com as variáveis climáticas é o peso (Tabela 9), sendo negativamente correlacionado com as elevadas temperaturas (amplitude térmica diurna mensal, sazonalidade da temperatura, temperatura máxima do mês mais quente, amplitude térmica anual e temperatura média no quadrimestre mais seco) e positivamente correlacionado com a precipitação do quadrimestre mais frio, a temperatura mínima no mês mais frio e a isotermalidade da temperatura e da precipitação.

Tanto o diâmetro quanto o peso possuem correlações negativas significativas com a amplitude térmica diurna mensal, temperatura sazonal e variação da temperatura anual e correlações positivas significativas com isotermalidade da precipitação e temperatura mínima do mês mais frio (Tabela 9). Esta última correlação é a mais forte observada para estes parâmetros ($r= 0.56$ para o diâmetro e $r=0.58$ para o peso), sendo indicativo de algum constrangimento no peso e diâmetro em locais cuja temperatura mínima é mais baixa. Muitas vezes as

plantas sofrem um stress maior nos meses mais frios do que nos mais quentes. O menor peso e diâmetro das bolotas em locais mais secos, também poderá estar relacionado com o stress causado pelas temperaturas mínimas. A redução do tamanho da bolota como resposta ao curto período de crescimento em temperaturas mais frias foi reportado para bolotas de *Quercus suber*. (Díaz-Fernández et al., 2004)

De um modo geral, a variação destes parâmetros morfológicos está relacionada com várias variáveis ligadas à temperatura e precipitação (Tabela 9). Um estudo realizado com uma outra espécie de *Quercus* (*Quercus macrocarpa*) ao longo de um gradiente latitudinal nos EUA, concluiu que diferenças na temperatura e na precipitação atuam como fatores limitantes para o crescimento das sementes (Koenig et al, 2009). Um outro estudo (Vásquez et al, 2001), afirmou que as bolotas de *Quercus ilex* podem aumentar ou diminuir o seu peso em até 30% dependendo das condições ambientais e da gestão da área onde se desenvolve o fruto.

De certa forma, tanto o peso como o diâmetro estão mais relacionados com as variações de temperatura, nomeadamente com as temperaturas baixas – situações de frio, do que com as condições de precipitação. Entretanto, o peso médio também apresenta correlações significativas com a maioria das variáveis associadas às temperaturas altas (Tabela 9). Estas correlações demonstram-se negativas, i.e. quanto maior a temperatura máxima durante o Verão menor o peso da bolota.

Alejano et al, (2009), obtiveram diferenças no peso médio das bolotas de *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf) Samp. entre indivíduos, em especial, uma diminuição do peso da bolota no ano de 2005 associada a uma diminuição da colheita, e a um ano muito seco e muito frio com uma precipitação estival nula, sendo que este último pareceu ter uma maior influência nos resultados. Oliveira et al (2000) verificaram que o stress do Inverno pode ser considerado um fator importante de constrangimento em *Quercus ilex*, que mostra um certo grau de adaptação às condições de frio da região Mediterrânica.

Das variáveis climáticas associadas à precipitação, as que demonstraram correlações significativas com parâmetros morfológicos da bolota foram a precipitação do quadrimestre mais frio (Inverno) ($r=0.427$) e a isothermalidade da precipitação ($r=0.446$, para o diâmetro e $r=0.508$, para o peso). Estas correlações positivas indicam a influência que a precipitação em momentos chave pode ter, em alturas do ano em que a temperatura é mais fria e dependentes da isothermalidade. Assim, o desenvolvimento da bolota pode se tornar um reflexo também da precipitação mas apenas em condições que, como já descritas, limitantes como a temperatura mínima.

Embora o índice de aridez seja a forma integradora dos parâmetros climáticos mais importantes (precipitação e temperatura), este não se demonstrou correlacionado com os parâmetros morfológicos da bolota. Isto deve-se ao facto de, morfológicamente, a bolota ser mais influenciada pela temperatura que pela precipitação. Estes parâmetros morfológicos não são, desta forma, uma boa *proxy* para ambas as variáveis climáticas (reflectidas no índice de aridez), mas sim para parâmetros relacionados com a temperatura (em particular com as temperaturas mínimas dos locais onde se desenvolvem).

Tabela 9: Resumo das correlações significativas ($p < 0.05$) entre as variáveis climáticas – temperatura (média anual, amplitude térmica diurna mensal, Isotermalidade, sazonal, máxima no mês mais quente, mínima no mês mais frio, amplitude térmica anual, média do quadrimestre mais húmido, média do quadrimestre mais seco, média do quadrimestre mais quente, média no quadrimestre mais frio) e precipitação (anual, no mês mais húmido, no mês mais seco, isotermalidade, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais quente, quadrimestre mais frio), Altitude, Inclinação, Índice de aridez – e parâmetros morfológicos – Comprimento médio (mm), Diâmetro médio (mm) e Peso médio (g) das bolotas de *Quercus rotundifolia*, de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. (ver tabela completa em anexo)

Variáveis Climáticas		Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Peso (g)
Temperatura	Ampitude Térmica diurna	-0.327	-0.439	-0.512
	Isotermalidade	0.264	0.368	0.449
	Sazonal	-0.316	-0.449	-0.530
	Máxima do mês mais quente	-0.261	-0.396	-0.500
	Mínima do mês mais frio	0.414	0.565	0.583
	Amplitude térmica anual	-0.380	-0.516	-0.594
	Média quadrimestre mais húmido	0.331	0.490	0.382
	Média quadrimestre mais seco	-0.200	-0.375	-0.440
	Média quadrimestre mais frio	0.468	0.532	0.486
Precipitação	isotermalidade	0.258	0.446	0.508
	Quadrimestre mais frio	0.216	0.364	0.427

4.3. Avaliação da composição química da bolota de *Quercus rotundifolia* ao longo do gradiente climático

Para além da variação morfológica, foi estudada a variação da composição química das bolotas de *Quercus rotundifolia* ao longo do mesmo gradiente climático. De acordo com trabalhos anteriores, a composição química da bolota pode variar dependendo de diversos fatores (Galván et al, 2012), como: 1) condições climáticas (precipitação, temperatura, oscilação na temperatura), 2) condições fisiológicas da bolota (maturação, germinação), 3) condições sanitárias (humidade, secura, putrefação e ataques de pestes), 4) posição do fruto na copa respondendo a disponibilidade de luz (Nuzzo et al, 1999), 5) variabilidade genética e variações ambientais locais (Gea – Izquierdo et al, 2008).

O conteúdo de proteínas totais variou de 4% a 7%, de lípidos totais de 11% a 18%, de açúcares solúveis de 17% a 28% e da glicose proveniente do amido de 41% a 68%. De acordo com observações anteriores em Gea – Izquierdo et al (2008), as bolotas apresentaram um elevado teor em lípidos (4 a 12%) e amido (mais que 50%), mais um teor baixo em proteína (4 a 6%), o que mostra que os resultados estão dentro do esperado (tabela 10).

Tabela 9: Composição química da polpa da bolota de *Quercus rotundifolia* (% em g) ao longo de um gradiente climático onde o ponto 1 refere-se ao local de estudo mais árido e o ponto 25 o mais húmido.

Local de estudo	Lípidos totais (%)	Proteína total (%)	Açúcares solúveis (%)	amido (%)	Açúcares totais (%)
1	12	6	24	65	90
2	16	5	17	41	58
3	16	5	28	63	91
4	18	7	25	55	80
5	14	5	24	64	88
6	15	5	21	61	82
7	16	5	21	58	80
8	15	6	20	62	82
9	14	6	19	65	84
10	16	8	19	56	75
11	13	6	21	68	89
12	12	5	23	60	83
13	13	6	27	60	87
14	15	6	25	64	88
15	17	5	23	59	83
16	16	5	21	59	80
17	15	6	26	64	90
18	16	5	22	59	80
19	11	5	23	59	82
20	16	6	25	55	79
21	13	4	19	49	68
22	15	5	22	60	82
23	17	5	20	59	79
24	15	5	21	49	70
25	14	5	26	60	86

Avaliou-se também a relação entre os lípidos totais, proteínas totais, hidratos de carbono e as variáveis climáticas. Pode-se observar, de um modo geral, que os esses parâmetros químicos não foram uma boa ferramenta para indicação de variações climáticas, não sendo observada nenhuma correlação significativa (Tabela 12).

Outros trabalhos mostraram dados contrários aos encontrados. Em Galván (2012) verificou-se uma maior quantidade de proteínas totais e açúcares em regiões secas e maior conteúdo em lípidos em regiões de clima intermediário (Galván, 2012) Outros autores indicam que altas temperaturas durante a fase de crescimento da bolota influencia no aumento do teor de lípidos (Edwards et al., 2010). López-Carrasco et al. (2004), contudo, não encontraram efeitos nas geadas sobre a qualidade da bolota mas sim sobre o seu peso.

No tópico anterior (4.2), observou-se que o peso e o diâmetro médio da bolota demonstraram-se um potencial indicador de variações relacionados tanto com a precipitação como com a temperatura, sendo menor em locais cujas condições são mais xéricas (maior temperaturas e menor disponibilidade hídrica). Assim, tentou-se explorar quais as variações dos lípidos totais, proteínas totais e hidratos de carbono associadas a este decréscimo. Como resultado, o peso e comprimento demonstram-se relacionados significativamente com o conteúdo em açúcares (especificamente os solúveis). correlacionando-se negativamente ($r=-0.657$ e $r = -0.682$, respectivamente) (Tabela 11).

Estes resultados estão de acordo com as observações de outros autores (Morin, 2007), para caules de *Quercus ilex*, onde a concentração de hidratos de carbono totais aumenta continuamente de Outubro a Março, sugerindo que o Inverno favorece as espécies de plantas sempre verdes mediterrânicas a acumularem carbono. Segundo Morin (2007), a concentração de hidratos de carbono totais representa o conjunto de carbono que pode ser usado tanto para melhorar resistência ao frio por meio da hidrólise de carboidratos solúveis, como para apoiar processos metabólicos. No momento do máximo risco (Janeiro) de lesão de congelação, a maior parte da piscina de hidratos de carbono totais é hidrolizada em hidratos de carbono solúveis, enquanto havia uma proporção muito menor de hidratos de carbono totais sendo hidrolizados como hidratos de carbono solúveis na época de menor risco de lesão de congelação (por exemplo, Outubro), sugerindo que os hidratos de carbono solúveis atuam em processos associados ao crescimento.

Tabela 10: Coeficiente de correlação Spearman entre os parâmetros químicos – lípidos totais, proteínas totais, açúcares solúveis, amido, açúcares totais – e morfológicos – Comprimento médio, Diâmetro médio e Peso médio

	Lípidos totais (%)	Proteínas totais (%)	Açúcares solúveis (%)	Amido (%)	Açúcares totais (%)
Comprimento (mm)	-0.1470	-0.2058	-0.6821	-0.1139	-0.3485
Diâmetro (mm)	-0.1581	-0.3132	-0.4590	-0.2055	-0.3178
Peso (g)	-0.0923	-0.2658	-0.6574	-0.2739	-0.4693

Estudo da bolota de *Quercus rotundifolia* Lam. como indicador precoce do stress hídrico ao longo de um gradiente climático na região Alentejana (SE, Portugal)

Tabela 11: Correlação das variáveis climáticas – Temperatura (média anual, amplitude térmica diurna mensal, Isotermalidade, sazonal, máxima no mês mais quente, mínima no mês mais frio, amplitude térmica anual, média do quadrimestre mais húmido, média do quadrimestre mais seco, média do quadrimestre mais quente, média no quadrimestre mais frio), Precipitação (anual, no mês mais húmido, no mês mais seco, isotermalidade, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais quente, quadrimestre mais frio), Altitude, Inclinação, Índice de aridez – e os parâmetros químicos – lípidos totais, proteínas totais, açúcares solúveis, amido, açúcares totais – das bolotas de *Quercus rotundifolia*, de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$.

Variáveis Climáticas		Lípidos totais (%)	Proteínas totais (%)	Açúcares solúveis (%)	Amido (%)	Açúcares totais (%)
Temperatura	Média Anual	0.047	0.398	-0.068	0.288	0.258
	Ampitude Térmica diurna	-0.022	0.356	-0.004	0.272	0.254
	Isotermalidade	-0.051	-0.407	0.037	-0.215	-0.196
	Sazonal	0.094	0.276	0.051	0.243	0.258
	Máxima do mês mais quente	0.055	0.293	0.027	0.264	0.273
	Mínima do mês mais frio	-0.002	-0.277	-0.090	-0.331	-0.329
	Amplitude térmica anual	0.042	0.292	0.111	0.260	0.290
	Média quadrimestre mais húmido	-0.044	-0.014	-0.023	0.042	0.033
	Média quadrimestre mais seco	0.148	0.312	-0.047	0.218	0.204
	Média quadrimestre mais quente	0.120	0.286	-0.042	0.252	0.241
	Média quadrimestre mais frio	-0.035	0.011	-0.113	-0.187	-0.205
Precipitação	Anual	-0.128	-0.323	0.075	-0.300	-0.251
	Mês mais húmido	-0.079	-0.335	0.142	-0.295	-0.219
	Mês mais seco	-0.224	-0.361	-0.327	-0.292	-0.327
	Isotermalidade	0.096	0.058	-0.085	-0.187	-0.236
	Quadrimestre mais húmido	-0.148	-0.333	0.041	-0.251	-0.226
	Quadrimestre mais seco	-0.123	-0.306	0.191	-0.243	-0.172
	Quadrimestre mais quente	0.070	-0.309	0.162	-0.337	-0.253
	Quadrimestre mais frio	-0.175	-0.318	0.051	-0.217	-0.197
Altitude		0.034	-0.159	-0.006	-0.221	-0.217
Inclinação		0.238	0.065	0.053	-0.089	-0.054
Índice Aridez		-0.054	-0.374	0.172	-0.306	-0.201

4.4. Avaliação das variações isotópicas das bolotas e das folhas de *Quercus rotundifolia* ao longo do gradiente climático

O método da análise da composição isotópica tem recentemente surgido como uma das mais poderosas ferramentas no avanço e no entendimento na relação entre as plantas e seu ambiente. Isso porque está a permitir ecologistas a responderem questões até então intratáveis através de outros métodos. Ou seja, a análise isotópica está a ter um importante e significativo impacto na ciência da ecologia da planta muito maior que novas técnicas moleculares para genética, bioquímica e biologia da evolução (Dawson et al, 2002).

Desta forma, através das assinaturas isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ da bolota de *Quercus rotundifolia* ao longo do gradiente climático, pretendeu-se compreender as relações entre as plantas e o ambiente, comparando com dados isotópicos das folhas da mesma espécie, recolhidas no mesmo local no ano anterior.

Ao averiguar os dados isotópicos em relação às variáveis climáticas (Tabela 13), observou-se que a composição isotópica do azoto ($\delta^{15}\text{N}$) relacionou-se significativamente com as variáveis associadas a temperatura e a precipitação, estando também correlacionada significativamente com o índice de aridez ($r=-0,741$) e a altitude ($r=-0,523$). De entre as variáveis relacionadas com a temperatura, observou-se que relativamente às temperaturas máximas, $\delta^{15}\text{N}$ apresenta sempre uma relação positiva significativa: quanto maior a temperatura maior os valores de $\delta^{15}\text{N}$. Vale a pena destacar que a correlação positiva mais significativa verificou-se com a temperatura média anual ($r= 0,809$) (Tabela 13). Referente as temperaturas mínimas, não são observadas correlações (Tabela 13). No que se refere a precipitação, de um modo geral observou-se correlações significativas negativas com a precipitação ao longo do ano destacando o período mais húmido ($r= -0,739, -0,711, -0,744, -0,713, -0,701, -0,715$ para a média da precipitação anual, precipitação do mês mais húmido, precipitação do quadrimestre mais húmido, precipitação do quadrimestre mais seco, precipitação do quadrimestre mais quente e precipitação do quadrimestre mais frio, respectivamente)

De modo geral observou-se um enriquecimento de $\delta^{15}\text{N}$ quando as temperaturas são mais altas e com menor precipitação. Por outro lado, nos locais onde a precipitação é mais frequente sob temperaturas mais amenas, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ são menores, sendo isso comprovado com o índice de aridez. Sendo a correlação com o índice de aridez negativa, quanto mais elevado o índice de aridez (locais mais húmidos) menor os valores de $\delta^{15}\text{N}$.

Estes dados estão de acordo com estudos anteriores, Handley et al, (1999), verificaram que ao longo de um gradiente de precipitação, $\delta^{15}\text{N}$ da folha correlacionou-se negativamente com a precipitação média anual, mesmo existindo uma variabilidade substancial associada com este padrão. Eles atribuíram esta relação às diferenças encontradas ao longo da região mais árida para a mais húmida, propondo que as perdas de azoto relativas às fontes eram maiores nas zonas mais áridas e, devido a perda de azoto (por volatilização, desnitrificação e lixiviação) ser tipicamente escassa em ^{15}N , resultou no enriquecimento de ^{15}N do solo e das

plantas nas regiões mais áridas. Também verificaram-se que este padrão apenas é sustentado para análises em escala regional.

Diferenças no $\delta^{15}\text{N}$ das bolotas dependem do $\delta^{15}\text{N}$ da fonte e o fracionamento associado ao metabolismo do azoto na azinheira. Outros autores reportaram que o valor global de $\delta^{15}\text{N}$ em qualquer parte da planta está diretamente associada à sua fonte de azoto (Werner & Schmidt, 2002). Como as plantas absorvem do solo principalmente as formas inorgânicas NH_4 e NO_3 , sua composição isotópica será em função da composição isotópica dessas formas inorgânicas e também da disponibilidade dessas duas fontes (Martinelli et al, 2009).

De acordo com o que foi verificado nas bolotas, $\delta^{15}\text{N}$ das folhas apresentou correlações significativas positivas com a temperatura e a negativas com a precipitação. Dentre as temperaturas, verificaram-se correlações com aquelas associadas ao Verão (temperatura média anual, amplitude térmica diurna, temperatura máxima do mês mais quente, temperatura média do quadrimestre mais seco e temperatura média do quadrimestre mais quente). Relativamente à precipitação, observou-se correlações negativas com a precipitação durante todo o ano, sendo a mais forte a que se refere ao período mais seco ($r=-0,51$) (tabela 13). Também verificou-se uma correlação negativa com o índice de aridez ($r= -0,464$) (tabela 13).

É notório que os valores da $\delta^{15}\text{N}$ das bolotas apresentam correlações mais consistentes que para as folhas. Uma possível explicação poderá estar relacionada com o facto das bolotas serem formadas durante o período de maior stress hídrico ao contrário das folhas, onde a sua biomassa é formada durante o período da Primavera. Assim, é nas bolotas que, por exemplo, o índice de aridez se reflete de uma forma mais clara e evidente.

Relativamente à composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$), foi verificada uma correlação negativa com a temperatura média do quadrimestre mais frio (tabela 13). Esta observação pode ser atribuído a um fecho dos estomas e uma redução na transpiração sob condições mais áridas e frias (Gao et al, 2006), o qual pode estar diretamente relacionado com a condutância estomática durante a fotossíntese. Nenhuma correlação foi observada para $\delta^{13}\text{C}$ das folhas sendo impossível fazer este tipo de análise.

Relativamente a razão C/N, as folhas apresentaram-se mais correlações significativas que as bolotas (tabela 13). Referente a temperatura, C/N das folhas apresentaram correlações negativas com a temperaturas altas (média anual, amplitude termica diurna, sazonalidade da temperatura, temperatura máxima no mês mais quente, amplitude térmica anual, temperatura média no quadrimestre mais seco e temperatura média no quadrimestre mais quente) e correlações positivas com a isothermalidade da temperatura, temperatura mínima do mês mais frio e com a precipitação ao longo do ano (anual, mês mais seco, mês mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais húmido, quadrimestre maisfrio e quadrimestre mais quente), destacando-se a precipitação no período mais húmido (tabela 13). Já para as bolotas, correlacionou-se com a temperatura média anual, a isothermalidade da temperatura a amplitude térmica diurna e a amplitude térmica anual e precipitação no quadrimestre mais seco ($r=-0,444, -0,457, 0,545, -0,428$ e $0,424$, respectivamente) (tabela 13).

Contudo, em ambos os tecidos, verificou-se que quanto a temperatura aumenta e a precipitação é menor, a razão C/N é menor. Ou seja, nas regiões mais áridas, existe uma maior disponibilidade de N no solo (N está em maior proporção que C), mas devido ao regime restrito de precipitação, a absorção dele por parte dos *Quercus rotundifolia* é limitada causando uma disputa entre os indivíduos daquele ecossistema pela disponibilidade de azoto.

Verificou-se distintos padrões no que se trata dos dados de % C, tanto para as folhas quanto para as bolotas (tabela 13). Para as bolotas, %C correlacionou-se negativas com a temperaturas altas (média anual, amplitude térmica diurna, sazonalidade da temperatura, temperatura máxima no mês mais quente, amplitude térmica anual, temperatura média no quadrimestre mais seco e temperatura média no quadrimestre mais quente) e correlações positivas com a isotermalidade da temperatura, temperatura mínima do mês mais frio e temperatura média no quadrimestre mais frio com destaque para o índice de aridez ($r=0,608$). Para a precipitação, verificou-se uma relação positiva significativa com a precipitação ao longo do ano (anual, mês mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais frio e quadrimestre mais quente), destacando-se a precipitação no período mais seco ($r=0,6$). Para as folhas, %C mostrou-se significativo apenas com a altitude ($r=0,472$).

Esse padrão observado para a %C nas bolotas, indica que uma variação da temperatura no tempo e no espaço influencia diretamente o ciclo do C orgânico na planta, sendo a disponibilidade de água um fator limitante. Nos locais onde o índice de aridez é maior (mais húmido), a %C é maior, por outro lado, locais onde o índice de aridez é menor (mais áridos) a %C é menor, mas se há precipitação observou-se um aumento na %C.

Referente a %N, as folhas apresentaram-se mais correlações que as bolotas. Para a temperatura, verificou-se correlações significativas positivas com as temperaturas associadas ao Verão (média anual, amplitude térmica diurna, sazonalidade, amplitude térmica anual, máxima do mês mais quente, média do quadrimestre mais seco e média do quadrimestre mais quente) e negativas com a isotermalidade e a temperatura mínima no mês mais frio. Para a precipitação, %N das folhas verificou-se relações negativas significativas com a precipitação anual, precipitação no quadrimestre mais húmido, precipitação no quadrimestre mais seco e precipitação no quadrimestre mais frio, além de correlacionar-se negativamente também com o índice de aridez. Já para as bolotas %N correlaciona-se apenas com a isotermalidade da temperatura.

Resumidamente, quanto maior a temperatura e quanto menor a precipitação, maior a %N. Por outro lado, quanto menor a temperatura e quanto maior a precipitação, menor a %N. Segundo Handley (1999) O ciclo do azoto orgânico tende a ser mais limitado nos ecossistemas húmidos e frio do que nos ecossistemas quentes e seco, pois há menos transferência de azoto na interação solo-planta e conseqüentemente menos azoto disponível na biomassa do ecossistema.

Estudo da bolota de *Quercus rotundifolia* Lam. como indicador precoce do stress hídrico ao longo de um gradiente climático na região Alentejana (SE, Portugal)

Tabela 12: Correlação das variáveis climáticas – Temperatura (média anual, amplitude térmica diurna mensal, Isotermalidade, sazonal, máxima no mês mais quente, mínima no mês mais frio, amplitude térmica anual, média do quadrimestre mais húmido, média do quadrimestre mais seco, média do quadrimestre mais quente, média no quadrimestre mais frio), Precipitação (anual, no mês mais húmido, no mês mais seco, isotermalidade, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais quente, quadrimestre mais frio), Altitude, Inclinação, Índice de aridez – e parâmetros isotópicos – $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, %N, %C, C/N – das bolotas e das folhas de *Quercus rotundifolia*, de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$.

Variáveis Climáticas	$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{18}\text{O}$	%N		%C		C/N		
	Folhas	Bolotas	Folhas	Bolotas	Bolotas	Folhas	Bolotas	Folhas	Bolotas	Folhas	Bolotas	
Temperatura	Média anual	0.579	0.809	0.172	-0.028	0.183	0.511	0.388	-0.320	-0.441	-0.591	-0.440
	Amplitude térmica diurna	0.513	0.567	0.192	0.160	-0.281	0.521	0.420	-0.209	-0.628	-0.563	-0.457
	Isotermalidade	-0.454	-0.577	-0.128	-0.235	0.377	-0.609	-0.487	0.049	0.725	0.659	0.545
	Sazonal	0.409	0.469	0.278	0.316	-0.384	0.512	0.347	-0.038	-0.661	-0.540	-0.413
	Máxima do mês mais quente	0.544	0.618	0.312	0.159	-0.173	0.481	0.350	-0.245	-0.583	-0.527	-0.407
	Mínima do mês mais frio	-0.356	-0.382	-0.161	-0.384	0.422	-0.536	-0.337	0.044	0.693	0.546	0.395
	Amplitude térmica anual	0.386	0.461	0.229	0.353	-0.401	0.492	0.366	-0.075	-0.670	-0.524	-0.428
	Média quadrimestre mais húmido	-0.127	0.123	0.034	-0.394	0.419	-0.157	-0.083	-0.150	0.306	0.110	0.120
	Média quadrimestre mais seco	0.557	0.659	0.306	0.148	-0.122	0.496	0.357	-0.262	-0.566	-0.538	-0.419
	Média quadrimestre mais quente	0.529	0.681	0.318	0.089	-0.173	0.560	0.346	-0.331	-0.635	-0.613	-0.421
Média quadrimestre mais frio	0.017	0.073	-0.124	-0.435	0.484	-0.253	-0.055	-0.120	0.487	0.207	0.092	
Precipitação	Anual	-0.464	-0.739	-0.356	-0.024	0.003	-0.470	-0.315	0.329	0.567	0.524	0.391
	Mês mais húmido	-0.451	-0.711	-0.336	0.006	-0.045	-0.412	-0.328	0.246	0.565	0.472	0.401
	Mês mais seco	0.000	-0.327	-0.344	-0.361	-0.120	-0.344	-0.361	-0.086	0.224	0.344	0.361
	Isotermalidade	-0.259	-0.209	-0.200	-0.087	0.134	-0.189	0.074	0.224	0.354	0.200	-0.038
	Quadrimestre mais húmido	-0.458	-0.744	-0.331	-0.071	0.028	-0.471	-0.332	0.334	0.546	0.525	0.398
	Quadrimestre mais seco	-0.510	-0.713	-0.255	-0.070	0.073	-0.567	-0.347	0.295	0.604	0.633	0.424
	Quadrimestre mais quente	-0.469	-0.701	-0.164	0.045	-0.178	-0.453	-0.289	0.373	0.536	0.529	0.356
Quadrimestre mais frio	-0.460	-0.715	-0.360	-0.086	0.116	-0.483	-0.347	0.330	0.549	0.536	0.412	
Altitude	-0.250	-0.523	-0.050	0.238	-0.344	-0.235	-0.090	0.472	0.114	0.320	0.129	
Inclinação	-0.205	0.102	-0.086	0.048	-0.111	0.142	-0.036	0.070	-0.056	-0.142	0.021	
Índice_Aridez	-0.531	-0.741	-0.204	0.088	-0.022	-0.548	-0.355	0.345	0.608	0.598	0.421	
$\delta^{18}\text{O}$ precipitação	0.257	0.325	0.026	0.106	0.561	-0.075	0.079	-0.165	0.154	0.009	-0.085	

4.5. Integração dos dados

4.5.1. Influência da variação climática na composição isotópica da bolota

A abundância natural dos isótopos estáveis tem sido usado tanto como um integrador natural de processos fisiológicos e ecológicos. Como bons integradores, os isótopos estáveis permitem aos ecologistas a avaliar o resultado líquido de muitos processos que variam no tempo e no espaço, ao mesmo tempo que não interfere na atividade natural ou comportamental do elemento no sistema. Como traçadores, permitem ecologistas a seguir os fatos e as transformações do recurso (Dawson et al, 2002). Assim, para além de analisar o padrão isotópico das interações planta-ambiente, procurou-se explorar como essa variação climática influencia no metabolismo da planta

De um modo geral, observaram-se correlações entre $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{18}\text{O}$ e os parâmetros morfológicos e químicos das bolotas como mostra a tabela 14.

Em relação aos parâmetros morfológicos, observou-se uma correlação negativa entre o comprimento, o peso e o diâmetro e $\delta^{13}\text{C}$ indicando que quanto maior o stress hídrico menor o será a bolota (Tabela 14). Estas relações confirmam o que foi dito anteriormente que bolotas menores estão em situação de stress hídrico em locais mais áridos (ver 4.2).

Observou-se também uma relação positiva entre $\delta^{13}\text{C}$ e a percentagem de lípidos totais e açúcares solúveis (Tabela 14). É sabido que quanto maior os valores de $\delta^{13}\text{C}$, maior será o stress hídrico de uma planta. Assim, em locais mais áridos e com menor precipitação *Quercus rotundifolia* tem tendência a armazenar lípidos e açúcares solúveis em suas sementes. Isso poderá indicar mais uma estratégia adaptativa do *Quercus rotundifolia*, que quando em locais onde as condições climáticas são desfavoráveis, poderá estar fazendo reservas e investindo em estruturas de apoio à germinação. Em estudo feito em *Quercus rotundifolia* e *Quercus suber*, verificou-se um aumento nos valores de açúcares solúveis e amido das folhas depois das chuvas do Outono, quando comparado com o Verão. Isto mostrou a relevância da tendência das plantas sempre verdes em assimilar carbono em toda a sua biomassa depois da seca do Verão, no intuito de para a acumular reservas em outras partes da planta (Vaz et al, 2010)

Observou-se ainda uma relação significativa entre %C e os açúcares totais. Estas variáveis relacionam-se negativamente, ou seja, quanto maior a atividade metabólica, menor a quantidade de açúcares totais (Tabela 14). Observou-se também que as bolotas menores localizadas nas zonas mais xéricas, possuem menos açúcares do que aquelas que estão localizadas em zonas mais húmidas. Ou seja, pode ser que as plantas de *Quercus rotundifolia*, quando em situação de stress hídrico, utiliza o açúcar como soluto osmótico ativo para promover o decréscimo do potencial hídrico e auxiliar na manutenção da abertura estomática e no funcionamento do aparelho fotossintético como estratégia de adaptação às condições climáticas extremas (Kramer, 1995).

Tabela 13: Coeficiente de correlação Spearman entre as variáveis químicas – lípidos totais, proteínas totais, açúcares solúveis, amido, açúcares totais –, morfológicas – Comprimento médio, Diâmetro médio e Peso médio e os parâmetros isotópicos – $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, %N, %C, C/N – das bolotas de *Quercus rotundifolia*. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$.

	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$	%N	%C	% C/N
Lípidos totais(%)	0.359	0.450	0.135	0.268	0.044	-0.279
Proteínas totais (%)	0.599	0.239	0.019	0.970	-0.299	-0.951
Açúcares solúveis (%)	0.030	0.433	-0.257	0.085	-0.200	-0.113
Amido (%)	0.214	-0.035	-0.007	0.241	-0.399	-0.277
Açúcares totais (%)	0.226	0.165	-0.075	0.192	-0.422	-0.239
Comprimento(mm)	-0.171	-0.522	0.433	-0.235	0.216	0.235
Diâmetro (mm)	-0.223	-0.589	0.211	-0.296	0.248	0.301
Peso (g)	-0.226	-0.611	0.282	-0.250	0.231	0.262

4.5.2. Seleção de variáveis indicadoras de mudança climática

No sentido de identificar fatores limitantes ao desenvolvimento da bolota e utilizar esses fatores de mudança na bolota como indicadores de mudança climática testou-se agrupar as 19 variáveis climáticas em *factor scores*. De seguida, Os *scores* destes fatores extraídos, foram correlacionados com as variáveis da bolota, consideradas *proxies* ecológicos da sua performance e desenvolvimento. (parâmetros morfológicos, químicos e isotópicos). Foram extraídos 19 fatores ou componentes principais Os dois primeiros fatores explicaram juntos 90,16 % (74,84 % + 15,21%) da variância observada (fig. 8).

Variância observada total dos componentes principais (CP)

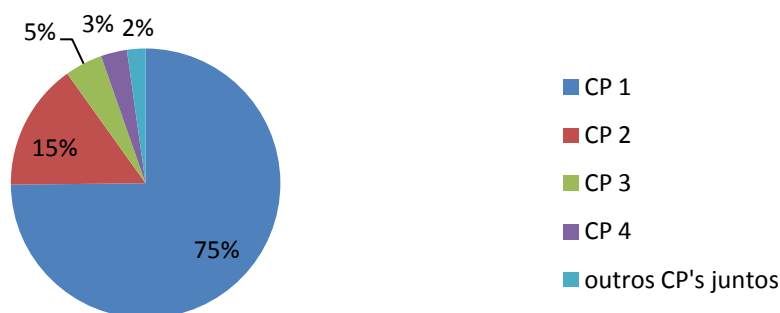


Figura 8: A componente principal 1 ou fator 1 explica 75% e a componente principal 2 ou fator 2 explica 15% da variância observada total.

Analisando mais detalhadamente o fator 1 e o fator 2, buscou-se perceber quais as variáveis foram agrupadas em cada componente de acordo com o coeficiente de correlação (tabela 2). Assim, o fator 1 agrupou variáveis relacionadas tanto com a temperatura como com a precipitação (valores elevados de temperatura e valores baixos de precipitação) no primeiro eixo. Já o fator 2, agrupou as variáveis relacionadas com temperaturas baixas e precipitação no mês mais seco no segundo eixo. (Tabela 15).

Tabela 14: Valores próprios e vetores próprios dos primeiros dois fatores resultantes da análise de componentes principais (PCA) das variáveis climáticas (n= 22) As correlações fator – variável significativas encontram-se destacadas em negro

	Variáveis climáticas	Fator 1	Fator 2
Temperatura	Média Anual	0.714257	0.590508
	Ampitude Térmica diurna	0.950135	-0.126906
	Isotermalidade	-0.852474	0.222149
	Sazonal	0.966281	-0.236445
	Máxima do mês mais quente	0.991387	0.004784
	Mínima do mês mais frio	-0.850550	0.468558
	Amplitude térmica anual	0.975297	-0.197222
	Média quadrimestre mais húmido	-0.252245	0.909336
	Média quadrimestre mais seco	0.984804	0.010536
	Média quadrimestre mais quente	0.980768	0.115603
	Média quadrimestre mais frio	-0.623910	0.712321
Precipitação	Anual	-0.973233	-0.191100
	Mês mais húmido	-0.972954	-0.140222
	Mês mais seco	-0.402201	-0.558971
	isotermalidade	-0.717072	0.408287
	Quadrimestre mais húmido	-0.987354	-0.101432
	Quadrimestre mais seco	-0.916973	-0.278919
	Quadrimestre mais quente	-0.773670	-0.579271
	Quadrimestre mais frio	-0.991171	-0.071529
	Indice Aridez	-0.940890	-0.131152

Como resultado da correlação entre os parâmetros da bolota e o primeiro fator, o peso médio e as variáveis relacionadas com a quantidade de carbono (%C e C/N) demonstraram correlações significativas negativas (Tabela 16). Isto indica um constrangimento no desenvolvimento da semente, traduzido no seu peso e na quantidade de carbono, em condições de reduzida precipitação associada a temperatura elevadas. Como no primeiro fator está incluído o Índice de Aridez (valores baixos, i.e ambientes mais secos/áridos) este padrão também se traduz na diminuição ($r=-0.94$) tanto do peso como de %C e C/N, comprovando o que foi verificado anteriormente (ver 4.2 e 4.4)

Desta forma, o peso médio, %C e C/N podem ser considerados assim bons indicadores de ambientes áridos (xéricos), integrantes de componentes ambientais. Será assim de esperar

encontrar bolotas de menor peso, menor %C e %N (e consequentemente $\delta^{15}\text{N}$) mais elevado em locais mais áridos (com temperaturas mais elevadas e menor precipitação) relativamente a outros com condições menos xéricas. A variação da composição isotópica do azoto só segue esse padrão quando analisado em escala regional, confirmando mais uma vez os resultados anteriores (ver 4.4).

Tabela 15: Coeficiente de correlação de Spearman (significância $p < 0.05$) para a correlação das variáveis dos parâmetros químicos e morfológicos das bolotas de *Quercus rotundifolia* e os Fatores 1 e 2 (calculados em PCA)

	fator 1	fator 2
Lípidos totais(%)	0.114625	-0.001694
Proteínas totais (%)	0.347261	0.221909
Açúcares solúveis (%)	0.005082	-0.017504
Amido (%)	0.267081	0.141728
Açúcares totais (%)	0.260305	0.122530
Comprimento(mm)	-0.233202	0.334839
Diâmetro (mm)	-0.359785	0.368258
Peso (g)	-0.457498	0.267156
$\delta^{15}\text{N}$	0.638803	0.431517
$\delta^{13}\text{C}$	0.166573	-0.268210
$\delta^{18}\text{O}$	-0.193785	0.488136
%N	0.398193	0.151370
%C	-0.596838	0.107849
C/N	-0.455675	-0.142857

Resultante da correlação dos parâmetros morfológicos e químicos e composição isotópica da bolota com o fator 2, observou-se uma correlação positiva e significativa com a variável $\delta^{15}\text{N}$ (tabela 16). Ou seja, quando as temperaturas de Inverno (média do quadrimestre mais húmido e média do quadrimestre mais frio) são mais elevadas e a precipitação no mês mais seco mais reduzida espera-se encontrar um maior $\delta^{15}\text{N}$.

A composição isotópica do oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) também correlacionou-se positivamente com o fator 2. Sabe-se que valores de $\delta^{18}\text{O}$ pode-se referir a variações de humidade relativa, latitude e continentalidade (Rodrigues et al, 2011), no entanto, os dados obtidos neste estudo não foram suficientes para interpretar este resultado.

De um modo geral, a PCA parece agrupar as variáveis de acordo com as maiores situações de stress da azinheira sendo o fator 1 correspondente ao stress das temperaturas mais áridas e o fator 2 o stress relacionado às temperaturas mínimas e ao frio durante o Inverno

Assim como já observado anteriormente (tabela 12), a composição química não possui relação direta com as variáveis climáticas. Entre as variáveis morfológicas analisadas (tabela 9), nota-se mais uma vez que, das características morfológicas, é o peso médio que melhor se correlaciona com as variáveis climáticas (mostrando valores mais baixos em situações mais áridas). Confirma-se ainda

o elevado potencial do $\delta^{15}\text{N}$ como indicador de aridez (integrando tanto a temperatura como a precipitação, exibindo valores mais positivos em condições mais áridas ao longo do gradiente climático).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseado nesse estudo, foi possível chegar a várias conclusões gerais:

- A morfometria das bolotas dos locais mais áridos não é diferente da morfometria de bolotas de locais mais húmidos.
- De entre os parâmetros morfológicos estudados, foi o peso médio que melhor refletiu a influência das variações climáticas, em particular as que estão relacionadas com as temperaturas mais elevadas
- Os parâmetros químicos isoladamente não foram bons indicadores para a análise das variações climáticas ao longo do gradiente estudado. No entanto, quando analisados em conjunto com os parâmetros isotópicos e morfológicos, verificou-se que o conteúdo dos açúcares solúveis expressaram uma resposta ao stress hídrico.
- De um modo geral, é notório que as variações isotópicas das bolotas quando comparadas com as folhas apresentaram melhores correlações com as variáveis climáticas. Isto pode estar relacionado com o desenvolvimento fenológico e o período de maior stress hídrico, revelando uma resposta mais clara às variações de temperatura e precipitação, bem como do índice de aridez.
- Este estudo, embora preliminar, indicou que o investimento das plantas nas sementes está de acordo com as suas adaptações ao stress hídrico e às variáveis ambientais, resultando numa estratégia de sobrevivência adequada às condições ambientais.
- As características estudadas no que toca às bolotas explicaram cerca de 90% da variabilidade encontrada, o que demonstra o interesse em continuar este tipo de estudos, com vista à utilização das sementes como traçadores de alterações climáticas e de adaptação ao stress hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzal-Rafii Z, Dodd RS, Pelleau Y (1992) Mediterranean evergreen oak diversity: morphological and chemical variation of acorns. *Can J Bot* 70:1459–1466. doi: 10.1139/b92-184
- Alejano R, Vázquez J, Carevic F, Fernández M (2009) Peso individual de la bellota de *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf) Samp. Influencia de factores ecológicos y selvícolas. In: V Congr. For. Español, Ávila. pp 1–14
- Almeida J.A.A., Marinho, A.A.N.; Baptista M.E.S., (1992) Valor nutritivo da balota e da lande. In : II Coloquio sobre el cerdo ibérico, 9-10. Junta de Extremadura. Badajoz (España).
- Almeida AM, Silva AB, Araújo SS, et al. (2007) Responses to water withdrawal of tobacco plants genetically engineered with the AtTPS1 gene: a special reference to photosynthetic parameters. *Euphytica* 154:113–126. doi: 10.1007/s10681-006-9277-2
- Barbosa JN (2012) Isótopos estáveis para a discriminação da origem geográfica de cafés especiais da Serra da Mantiqueira de Minas Gerais. Tese Doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras –MG
- Batista M K. (2013) Searching for an ecological indicator based on plant functional diversity along a climatic gradient. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Barbour, M. M. (2007a). Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Functional Plant Biology*, 34, 83-94.
- Besnier Romero, F., (1989) Semillas. *Biología y tecnología*. Ed. Mundiprensa, 637 pp. Madrid (España).
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Bioc.Physiol.*, 37: 911-917. PMID: 13671378
- Branco J, Oliveira M, Ferreira R, Póvoa O (2010) Desertificação em Portugal: causas, consequências e possíveis soluções. <http://comum.rcaap.pt/handle/123456789/2049> Acesso em 15 Fev 2014
- Bruognoli, E., and G. D. Farquhar. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. Pages 399–434 in R. C. Leegood, T. D. Sharkey, and S. von Caemmerer (Eds.) *Advances in photosynthesis and Respiration: Photosynthesis, Physiology and Meta- bolism*. Springer, The Netherlands. Capo,
- Cabrera AG, Sanz P (2008) The sustainability of the “dehesas”. *Options Mediterr* 107:103–107.
- Cabrera-Bosquet L, Albrizio R, Nogue S, Luis Araus J (2011) Dual Delta ¹³C/delta ¹⁸O response to water and nitrogen availability and its relationship with yield in field-grown durum wheat. *Plant Cell Environ* 34:418–433. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02252.x
- Cardillo E, Bernal CJ (2006) Morphological response and growth of cork oak (*Quercus suber* L) seedlings at different shade levels. *For Ecol Manage* 222:296–301. doi: 10.1016/j.foreco.2005.10.026
- Cerasoli S, Maillard P, Scartazza A, et al. (2004) Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-year-old cork oak (*Quercus suber* L) saplings. *Ann For Sci* 61:721–729. doi: 10.1051/forest:2004058
- Costa, M.; Morla, C.; Sainz, H (Eds). (1997) Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica. Editorial Planeta. Madrid. 597 pp.
- Cunniff PA (1998) Official Methods of Analysis of AOAC International. Assoc Off Anal Chem Int
- Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, et al. (2002) Stable Isotopes in Plant Ecology. *Annu Rev Ecol Syst* 33:507–559. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.33.020602.095451
- Dawson TE, Siegwolf RTW (2007) Stable Isotopes as Indicators of Ecological Change. *Terr Ecol* 1:1–18. doi: 10.1016/S1936-7961(07)01001-9

- Dias A, Franco A, Araújo A, Ferreira C (2013) Adaptação das florestas às alterações climáticas. <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ppf/resource/ficheiros/alt-clima/rel-florest-enaac>. Acessado em 19 Fev 2014
- Díaz Fernández, P.M. (2000). Variabilidad de la fenología y del ciclo reproductor de *Quercus suber* L. en la península Ibérica. Tesis doctoral Departamento de Silvopascicultura, UPM. [<http://oa.upm.es/814>]
- Díaz-Fernández P. M.; Climent J.; Gil L., (2004). Biennial acorn maturation and its relationship with flowering phenology in Iberian populations of *Quercus suber*. *Trees* , 18, 615-621.
- Ducatti C, Martins C, Arrigoni MDB (2011) Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. *Rev Bras Zootec* 40:68–75.
- Duranceau M, Ghashghaie J, Badeck F, et al. (1999) Delta ¹³C of CO₂ respired in the dark in relation to delta C-13 of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L.-under progressive drought. *Plant Cell Environ* 22:515–523. doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00420.x
- Echevarría-Zomeño S, Ariza D, Jorge I, et al. (2009) Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *J Plant Physiol* 166:233–45. doi: 10.1016/j.jplph.2008.05.008
- Edwards, J. P.; Rotundo, J.L.; Westgate, M.E., (2010). Tasa y duración de la acumulación de los componentes de semilla de soja bajo stress hídrico. En: Ciclo de Seminarios 2010, II Programa de Posgrado en Ciencias Agrarias, Area Produccion Vegetal. Inta. Balcarce (Argentina)
- Ehleringer J (2000) Carbon isotope ratios in belowground carbon cycle processes. *Ecol Appl* 10:412–422.
- Ehleringer JR, Cerling TE (1995) Atmospheric CO₂ and the ratio of intercellular to ambient CO₂ concentrations in plants. *Tree Physiol* 15:105–111.
- Ehleringer, J.R., & Dawson, T.E. (1992). Water uptake by plants. Perspectives from stable isotope composition. *Plant, Cell and Environment*, 15, 1073-1082.
- Evans RD (2001) Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends Plant Sci* 6:121–6.
- Farquhar G, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 40:503–537. doi: 10.1146/annurev.pp.40.060189.002443
- Farquhar G, O'Leary M, Berry J (1982) On the Relationship Between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. *Aust J Plant Physiol* 9:121. doi: 10.1071/PP9820121
- Fernández I, Gómez A, Moreno P (2005) Características de las bellotas de encina (*Quercus ilex*) en diferentes zonas del Valle de los Pedroches (Córdoba). Inventario bromatológico. In *Pastos y Ganadería Extensiva*, García, B., García, A., Vázquez, B. and Zabalgoeazcoa, I. (eds). Gráficas Cervantes, SA. Salamanca. Spain, pp. 317-322.
- Fernández I, Gómez A, Moreno P, Pedro E De (2004) Variabilidad de las características de las bellotas en el Valle de los Pedroches (Córdoba). In *Proceedings of the XLV Meeting of the SEEP*, Gijón (Spain), 30 May-3 June 2005, Osoro, K., Argamentería, A. y Larraceleta, A. (eds). Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Asturias, Spain, pp. 383-389.
- Ferreira-Dias S, Valente DG, Abreu JMF (2007) Pattern recognition of acorns from different *Quercus* species based on oil content and fatty acid profile. *Grasas y Aceites* 54:384–391. doi: 10.3989/gya.2003.v54.i4.224
- Ferrio J, Arab G, Bort J, et al. (2007) Land use changes and crop productivity in early agriculture: comparison with current conditions in the mid-Euphrates valley. *CIHEAM* 167–174.
- Ferrio J, Resco V (2005) Stable isotopes in arid and semi-arid forest systems. *Options Mediterr* 14:371–382.
- Ferrio JP, Bort J, Voltas J, Araus J (2004) Past climate and agricultural water management in the Mediterranean inferred from carbon isotope discrimination in archaeological plant remains. *Options Mediterr* 287–296.

- Garrido, J. L.; Rey, P. J.; Herrera, C. M., (2005) Fuentes de variación en el tamaño de la semilla de la herbácea perenne *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 62(1), 115-125
- Galván J, Jorrín Novo JJ, Cabrera AG, et al. (2012) Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.). *Eur J For Res* 131:893–904. doi: 10.1007/s10342-011-0563-8
- Gea-Izquierdo G, Cañellas I, Montero G (2008) Acorn production in Spanish holm oak woodlands. *For Syst* 15:339–354.
- Gao TP, Chen T, Feng HY, et al. (2006) Seasonal and annual variation of osmotic solute and stable carbon isotope composition in leaves of endangered desert evergreen shrub *Ammopiptanthus mongolicus*. *South African J Bot* 72:570–578.
- Giorgi F, Lionello P (2008) Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob Planet Change* 63:90–104. doi: 10.1016/j.gloplacha.2007.09.005
- Gleixner, G., H.-J. Danier, R. A. Werner, and H.-L. Schmidt. (1993). Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing Basidiomycetes. *Plant Physiology* 102:1287–1290
- Gómez- Casero, M. T., Gálan, C.; Domínguez-Vilches, E (2007) Flowering phenology of Mediterranean *Quercus* species in different locations (Córdoba, SW Iberian Peninsula). *Acta Botanica Malacitana* 32: 127-146.
- Halford NG, Curtis TY, Muttucumaru N, et al. (2011) Sugars in crop plants. *Ann Appl Biol* 158:1–25. doi: 10.1111/j.1744-7348.2010.00443.x
- Handley LL, Austin AT, Stewart GR, et al. (1999) The ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) of ecosystem samples reflects measures of water availability. *Aust J Plant Physiol* 26:185. doi: 10.1071/PP98146
- Hobbie E A, Werner R A (2004). Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C-3 and C-4 plants: a review and synthesis. *New Phytologist*: 161 (2): 371-385.
- Hultine KR, Marshall JD (2000) Altitude trends in conifer leaf morphology and stable carbon isotope composition. *Oecologia* 123:32–40. doi: 10.1007/s004420050986
- Ingraham, N., & Taylor, B. (1991). Light stable isotope systematics of large-scale hydrologic regimes in California and Nevada. *Water resources research*, 27, 77-90.
- Isabel L, Gaspar M, Moreira P, et al. (2007) Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34:425–431.
- Koenig WD, Knops JMH, Dickinson JL, Zuckerberg B (2009) Latitudinal decrease in acorn size in bur oak (*Quercus macrocarpa*) is due to environmental constraints, not avian dispersal. *Botany* 87:349–356. doi: 10.1139/B09-008
- Kolb KJ, Evans RD (2002) Implications of leaf nitrogen recycling on the nitrogen isotope composition of deciduous plant tissues. *New Phytol* 156:57–64. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00490.x
- Kramer, P. J., and Boyer, J. S. (1995) *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego.
- Lakatos, M., Hartard, B., Máguas, C. (2007). The stable isotopes $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of lichens can be used as tracers of microenvironmental carbon and water sources. In: T.E. Dawson, R.T.W. Siegwolf, *Stable isotopes as indicators of ecological change*. Amsterdam: Academic Press, Elsevier. Lajtha,
- Lange OL, Tenhunen JD, Braun M, et al. (1980) Midday stomatal closure in *Arbutus unedo* leaves in a natural macchia and under simulated habitat conditions in an environmental chamber. *Oecologia* 47:365–367. doi: 10.1007/BF00398530

Leishman, M.R., I.J. Wright, A.T. Moles Y M. Westoby., (2000) The evolutionary ecology of seed size. In: *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 31-57. FENNER *et al.* (Eds.). CAB International, Wallingford, (U.K).

Loader NJ, McCarroll D (2004) Stable isotopes in tree rings. *Quat Sci Rev* 23:771–801. doi: 10.1016/j.quascirev.2003.06.017

Lajtha, K., and R. H. Michener (Eds.). 1994. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 316 p

Loader NJ, McCarroll D, Gagen M, et al. (2007) Extracting Climatic Information from Stable Isotopes in Tree Rings. *Terr. Ecol.* 1:

Lockheart MJ, Van Bergen PF, Evershed RP (1997) Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter. *Org Geochem* 26:137–153. doi: 10.1016/S0146-6380(96)00135-0

Long TJ, Jones RH (1996) Seedling growth strategies and seed size effects in fourteen oak species native to different soil moisture habitats. *Trees* 11:1. doi: 10.1007/s004680050051

López-Carrasco, C.; Daza, A.; Rey, A.; López-Bote, C., 2004. Efectos de las heladas y los carpófagos (*Curculio* sp.) sobre la calidad de bellotas en una dehesa de Castilla-La Mancha. *En: Pastos y ganadería Extensiva. Actas de la XLIV Reunión Científica de la S.E.E.P.*, 427-432. GARCÍA CRIADO *et al.* (Eds.). IRNACSIC. Salamanca (España).

LPN (2007) Os Montados: muito para além das árvores., Público. Fundação luso-americanada, Lisboa

Macchia, F.; Cavallaro, V.; Forte, L. 1993. La relación entre el clima, el ciclo ontogenético y la distribución de *Quercus ilex* L. Congreso Forestal Español. Lourizán. Tomo I: 271- 276.

Máguas, C., & Griffiths, H. (2003). Applications of stable isotopes in plant ecology. In: K. Esser, U. Lüttge, W. Beyschlag, *Progress in Botany*. Berlin: Springer.

Mandre M (2002) Stress concepts and plants. *For Stud Uurim* 9–16.

Martinelli L, Ometto J, Ferraz E (2009) *Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis*, 1ª ed. São Paulo: Oficina de textos.

Marshall, J. D., Renée Brooks, J., & Lajtha, K. (2007). Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. In: R. Michener, & K. Lajtha, *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Oxford: Blackwell Publishing.

Michener R, Lajtha K (2008) *Stable isotopes in ecology and environmental science*.

Morin X, Améglio T, Ahas R, et al. (2007) Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiol* 27:817–825. doi: 10.1093/treephys/27.6.817

Newton J (2010) *Stable isotope ecology*. doi: 10.1002/9780470015902.a0021231

Nunes JT (2007) Produção pecuária no montado: suínos. *Rev Ciências Agrárias* 30:251–259.

Oliveira G, Peñuelas J (2000) Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica* 21:97–107.

Oliveira G, Penuelas J (1999) Comparing evergreen and semi-deciduous Mediterranean woody species during winter: photochemical and phenological responses. *Rev Biol* 17:249–259.

- PNUD (2007) Relatório do Desenvolvimento Humano 2007/2008. Combater as alterações climáticas: Solidariedade humana num mundo dividido. 396 p.
- PERISSÉ P.,(2002) Semillas un punto de vista agronómico. Em: www.semilla.cyta.com.ar Acessado em 15 Jan 2014
- Perakis SS, Sinkhorn ER, Compton JE (2011) $\delta^{15}\text{N}$ constraints on long-term nitrogen balances in temperate forests. *Oecologia* 167:793–807. doi: 10.1007/s00442-011-2016-y
- Pereira A (2007) Isótopos estáveis em estudos ecológicos :métodos ,aplicações e perspectivas. *Rev Biociências* 13:16–27.
- Pinto CA., Henriques MO, Figueiredo JP, et al. (2011) Phenology and growth dynamics in Mediterranean evergreen oaks: Effects of environmental conditions and water relations. *For Ecol Manage* 262:500–508. doi: 10.1016/j.foreco.2011.04.018
- Poulos Hm, Goodale Um, Berlyn GP (2007) Drought response of two Mexican oak species, *Quercus laceyi* and *Q. sideroxylla* (Fagaceae), in relation to elevational position. *Am J Bot* 94:809–818. doi: 10.3732/ajb.94.5.809
- Pulido, F. J. (2002) Biología reproductiva y conservación: el caso de la regeneración de los bosques templados y subtropicales de robles (*Quercus* spp.). *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 5-15.
- Rababah TM, Ereifej KI, Al-Mahasneh MA, et al. (2010) The Physicochemical Composition of Acorns for Two Mediterranean *Quercus* Species. *Jordan J Agric Sci* 4:131–137.
- Rambal S (1993) The differential role of mechanisms for drought resistance in a Mediterranean evergreen shrub: a simulation approach. *Plant Cell Environ* 16:35–44. doi: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00842.x
- Ramos, S. (2002) Biología reproductiva de una masa de alcornoque (*Q. Suber* L.) en el sur de Badajoz . Tesis doctoral. Universidad De Extremadura. Badajoz (España).
- Ramírez-Valiente J., Valladares F, Gil L, Aranda I (2009) Population differences in juvenile survival under increasing drought are mediated by seed size in cork oak (*Quercus suber* L.). *For Ecol Manage* 257:1676–1683. doi: 10.1016/j.foreco.2009.01.024
- Rêgo FC, Vasco I, Carvalho J, et al. (2008) Sobreiro, uma barreira contra a desertificação. Relatório WWF/CEABN
- Rivas-Martínez, S., A. Penas, and T. E. Díaz. (2004) Bioclimatic map of Europe- Thermoclimatic belts. University of León, Spain
- Robinson D (2001) Delta¹⁵N as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends Ecol Evol* 16:153–162. doi: 10.1016/S0169-5347(00)02098-X
- Rodrigues C, Brunner M, Steiman S, et al. (2011) Isotopes as tracers of the Hawaiian coffee-producing regions. *J Agric Food Chem* 59:10239–46. doi: 10.1021/jf200788p
- Rodrigues C, Máguas C, Prohaska T (2010) Strontium and oxygen isotope fingerprinting of green coffee beans and its potential to proof authenticity of coffee. *Eur Food Res Technol* 232:361–373. doi: 10.1007/s00217-010-1362-z
- Rodríguez C, Muñoz B (2009) Fenología de *Quercus ilex* L. y *Quercus suber* L. en una dehesa del centro peninsular.
- Rodríguez-Estévez V, García A., Peña F, Gómez AG, (2009a) Foraging of Iberian fattening pigs grazing natural pasture in the dehesa. *Livest Sci* 120:135–143. doi: 10.1016/j.livsci.2008.05.006
- Rodríguez-Estévez V, García A, Gómez AG (2009b) Characteristics of the acorns selected by free range Iberian pigs during the montanera season. *Livest Sci* 122:169–176. doi: 10.1016/j.livsci.2008.08.010

- Rodriguez-Estévez V, Martínez AG, Moreno CM, et al. (2008) Dimensiones y características nutritivas de las bellotas de los *Quercus* de la dehesa. *Arch Zootec* 57:1–12.
- Rosário L do (2004) Indicadores de desertificação para Portugal Continental.
- Rossmann A (1997) Determination of the carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method). A European interlaboratory comparison. *Anal Chim Acta* 340:21–29. doi: 10.1016/S0003-2670(96)00538-7
- Royo C, Moral LG Del (2000) Tools for improving the efficiency of durum wheat selection under Mediterranean conditions. *Option Mediterr* 40:63–70.
- Ruiz de la Torre, J. (2006) Flora Mayor. Ministerio de Medio Ambiente. Parques Nacionales. Madrid.
- Schmidt HL, Werner R a, Rossmann a (2001) ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry* 58:9–32.
- Tejerina D, García-Torres S, Cabeza de Vaca M, et al. (2011) Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chem* 124:997–1004. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.058
- United Nations (1994) United Nations Convention of Combat Desertification. <http://www.unccd.int/en/about-the-convention/Pages/Text-overview.aspx>. Acessado em 15 Jan 2013
- Vaz M, Pereira JS, Gazarini LC, et al. (2010) Drought-induced photosynthetic inhibition and autumn recovery in two Mediterranean oak species (*Quercus ilex* and *Quercus suber*). *Tree Physiol* 30:946–956. doi: 10.1093/treephys/tpq044
- Vázquez, F. (1997). Fenofases florales en *Quercus rotundifolia* Lam. II Congreso Forestal Español. Pamplona, 23-27 de junio. Tomo 1: 139-144
- Vázquez, F.M., (1998^a). Producción de bellota en *Quercus* II. Aportación al conocimiento de sus plagas en el sur de la península ibérica. *Solo cerdo ibérico*, 1, 67-75.
- Vázquez, F. M., Doncel, E., & Ramos, S. (2001). Variaciones de calidad en la bellota. *Solo Cerdo Ibérico*, 6, 75–80.
- Vergeat A (2013) Modeling vegetation structure as early-warning indicator of desertification and land degradation: a case study on holm oak woodlands in southern Portugal. Tese de especialização. Faculdade de Engenharia Civil, Ambiental e Territorial. Politécnico de Milão, Milão
- Villegas D, Aparicio N, Araus J (2000) Carbon isotope discrimination, canopy temperature depression and nitrogen content as tools for grain yield assessment in Mediterranean conditions. *Option Mediterr* 40:181–184.
- Werner R a, Schmidt HL, Rossmann a (2001) ^{18}O pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry* 58:9–32.
- West JB (2010) Isocapes - Understanding Movement, Pattern, and Process on earth through Isotope Mapping. *Chem & amp*; doi: 101007/9789048133543
- Yakir D, Sternberg L da S (1993) The use of stable isotopes to study ecosystem gas exchange. *Oecologia* 123:297–311.

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolos

Protocolo de extração e determinação dos níveis de Lípidos em bolotas de *Quercus rotundifolia* [Adaptado do Método clássico Soxhlet (AOAC, Método oficial 923.05) Bligh, E.G. & W.J. Dyer (1959)]

Procedimento de extração:

- Em cartucho de filtro de celulose com o peso tarado, pesar 5g da amostra ($P_{amostra}$) preparada anteriormente de acordo com o método original
- pesar massa (em g) do cartucho com a amostra em balança analítica. Registrar P_o
- Colocar cartucho no extrator Soxhlet e acoplar balão com o solvente - 150ml de clorofórmio-metanol na proporção 2:1 (v/v)
- Extrair por 4h
- Retirar cartucho e por em estufa a 60°C por uma noite
- Descartar solvente residual do balão
- Retirar cartucho da estufa e colocar no dessecador por aproximadamente 30 minutos
- Pesar massa (em g) do conjunto cartucho e amostra em balança analítica. Registrar P_f

Fórmula para determinação (método gravimétrico):

$$\% \text{ lípidos} = \frac{(P_o - P_f) \times 100}{5g} \quad \text{onde:}$$

$P_{amostra}$ refere-se à 5g de amostra da polpa da bolota seca e moída.

P_o refere-se ao peso inicial do conjunto cartucho + $P_{amostra}$

P_f refere-se ao peso final do conjunto Cartucho + $P_{amostra}$

Os resultados se informam em % de lípidos em base seca

Protocolo de extração e determinação do conteúdo de açúcares solúveis e amido em bolotas de *Quercus rotundifolia* (adaptado de Duranceau et al, 1999 e Almeida, 2007)

Procedimento de extração:

- Pesar 0.05g da amostra preparada anteriormente, de acordo com AOAC (método oficial 996.11)
- Adicionar 0,5mL de H₂O ultra-pura e agitar em vórtex
- Aquecer por 5 min a 80 °C em banho termoestabilizado
- Arrefecer por 5 min a 0 °C em gelo.
- Pesar a solução (massa em g) após prévia determinação do peso do tubo.
- Centrifugar por 5 min a 16.000g separando o sobrenadante, contendo a fração solúvel
- Separar cuidadosamente o sobrenadante (contendo a fração solúvel de açúcares) do sedimento (contendo o amido).

Sobrenadante

- Ler em triplicado 0,150 mL da solução em refratómetro (resultado em °Brix)

Sedimento (hidrólise ácida)

- Secar o sedimento em estufa a 60 °C por 3 dias
- Ressuspender em 1 mL de ácido clorídrico (HCl) 7,5M
- Agitar em vórtex e manter à temperatura ambiente durante toda a noite
- Adicionar 1 mL de NaOH para controlo da acidez (pH > 4) e agitar em vórtex
- Centrifugar por 10 min a 40.000 g
- Pesar solução (massa em g) após prévia determinação do peso do microtubo.
- Ler em triplicado 0,150 mL da solução em refratómetro (resultado em °Brix).

Fórmula para conversão do °Brix em g

$$X = \frac{P_a \cdot P_s}{P_b} \quad \text{onde,}$$

X= % de açúcares solúveis ou de amido por polpa de bolota seca e moída, g em 100g de amostra

P_a = g de açúcares solúveis na solução (valor do °Brix lido pelo refratómetro)

P_s = o peso total da solução

P_b = o peso seco da amostra de bolota utilizada para estas determinações

NOTA: Para acurar os dados referente ao amido, fazer branco de amostra onde o sal formado (NaCl, resultante da reacção entre o HCl e o NaOH) deverá ser igualmente determinado por refração de luz

Anexo 2 – Tabela completa de correlação das variáveis climáticas – Temperatura (média anual , amplitude térmica diurna mensal , Isotermalidade, sazonal, máxima no mês mais quente , mínima no mês mais frio, amplitude térmica anual , média do quadrimestre mais húmido, média do quadrimestre mais seco, média do quadrimestre mais quente, média no quadrimestre mais frio,), Precipitação (anual, no mês mais húmido, no mês mais seco, isotermalidade, quadrimestre mais húmido, quadrimestre mais seco, quadrimestre mais quente, quadrimestre mais frio), Altitude, Inclinação, Índice de aridez – e parâmetros morfológicos – Comprimento médio (mm), Diâmetro médio (mm) e Peso médio (g) das bolotas de *Quercus rotundifolia* . de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. Correlações significativas indicadas a negrito, para nível de significância $p < 0.05$.

	Variáveis Climáticas	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Peso (g)
Temperatura	Média Anual	0.088	-0.073	-0.191
	Ampitude Térmica diurna	-0.327	-0.439	-0.512
	Isotermalidade	0.264	0.368	0.449
	Sazonal	-0.316	-0.449	-0.530
	Máxima do mês mais quente	-0.261	-0.396	-0.500
	Mínima do mês mais frio	0.414	0.565	0.583
	Amplitude térmica anual	-0.380	-0.516	-0.594
	Média quadrimestre mais húmido	0.331	0.490	0.382
	Média quadrimestre mais seco	-0.200	-0.375	-0.440
	Média quadrimestre mais quente	-0.180	-0.288	-0.378
	Média quadrimestre mais frio	0.468	0.532	0.486
Precipitação	Anual	0.096	0.301	0.351
	Mês mais húmido	0.013	0.251	0.301
	Mês mais seco	0.292	0.224	0.292
	Isotermalidade	0.258	0.446	0.508
	Quadrimestre mais húmido	0.157	0.351	0.403
	Quadrimestre mais seco	-0.004	0.099	0.175
	Quadrimestre mais quente	-0.096	0.124	0.158
	Quadrimestre mais frio	0.216	0.364	0.427
	Altitude	-0.299	-0.212	-0.101
	Inclinação	0.081	-0.006	-0.056
	Indice_Aridez	0.003	0.193	0.208