



GIORDANE AUGUSTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE
ESTÔMATOS EM JATOBÁ (*Hymenaea courbaril*
L.) COM USO DA GEOESTATÍSTICA**

**LAVRAS-MG
2010**

GIORDANE AUGUSTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE ESTÔMATOS EM JATOBÁ
(*Hymenaea courbaril* L.) COM USO DA GEOESTATÍSTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Ângela Maria Soares

Coorientadores

Dr. José Marcio de Mello

Dr. Evaristo Mauro de Castro

**LAVRAS-MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Martins, Giordane Augusto.

Avaliação de características de estômatos em jatobá (*Hymenaea
courbaril* L.) com uso da geoestatística / Giordane Augusto Martins.
– Lavras : UFLA, 2009.

73 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Ângela Maria Soares.

Bibliografia.

1. Estômatos. 2. Densidade estomática. 3. Expansão foliar. 4.
Folhas. 5. Distribuição espacial. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 581.42

GIORDANE AUGUSTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DE ESTÔMATOS EM JATOBÁ
(*Hymenaea courbaril* L.) COM USO DA GEOESTATÍSTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de julho de 2009

Dr. João Paulo Delfino Barbosa UFLA

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira UFLA

Dra. Angela Maria Soares

Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Dr. José Marcio de Mello

Coorientadores

**LAVRAS-MG
2010**

Aos meus pais José Orlando e Ana Maria

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, instituição que me acolheu durante a graduação e o mestrado. Agradeço ao programa de Pós-Graduação de Fisiologia Vegetal, por investir sua confiança em minha pessoa. Agradeço à CAPES, pela concessão de bolsa.

Agradeço aos grandes amigos que me acompanharam durante esse período, à família Itaipava, Emilio (Zé), Antonio (Bob), Adalberto (Betão), Alan e Satoshi e seus agregados, Andressa, Alexandre (Migue), Elisandra (Chiquita) e Adriano (Mini). Agradeço aos colegas de laboratório, os quais colaboraram para conclusão deste trabalho, João Paulo, Raquel, Marcos e Anderson. Aos Professores Evaristo de Castro e José Marcio de Mello pela coorientação.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Angela Maria Soares, pela dedicação e liberdade dada para que este trabalho tenha tomado a forma que tomou.

RESUMO GERAL

Os estômatos são estruturas vitais para sobrevivência das plantas terrestres, sendo fundamentais no controle das trocas gasosas. Assim, a densidade estomática é um atributo frequentemente utilizado em avaliações de respostas de plantas a pressões ambientais. Este atributo fornece informações que remetem à plasticidade das plantas quanto às variações na disponibilidade de água e nutrientes, intensidade da radiação, dentre outros fatores. No entanto, não há um método bem definido ou padronizado para o levantamento da densidade estomática, o que inviabiliza comparações entre trabalhos que focam tal atributo. Nesse sentido, foi realizada uma investigação da estrutura da distribuição espacial dos estômatos em folhas de Jatobá (*H. courbaril* L.), coletadas em três ambientes distintos, utilizando-se de ferramentas de geoestatística. Foram ainda realizadas análises da expansão foliar, com objetivo de identificar possíveis relações entre a estrutura espacial dos estômatos nas folhas e a taxa de expansão foliar. Com base no estudo da distribuição espacial da densidade estomática, foi proposto um método de amostragem e análise para avaliar a densidade estomática em folhas de Dicotiledôneas, que foi comparado com outros dois métodos. Em geral, os resultados obtidos indicaram uma estrutura espacial da densidade estomática nas folhas de jatobá, sendo que essa estrutura é fortemente influenciada pela taxa de expansão foliar. Ao comparar diferentes métodos para avaliação da densidade estomática, verificou-se que a ferramenta geoestatística elimina parte da variação entre amostras, uma vez que considera a variabilidade associada ao fator espacial. A redução na variabilidade dos dados estimados permitiu detectar diferenças entre tratamentos, o que não ocorreu com os demais métodos.

Palavras-chave: Estômatos. Densidade estomática. Expansão foliar. Folhas.

GENERAL ABSTRACT

Stomata are structures critical to the survival of terrestrial plants, and are fundamental in the control of gas exchange. Thus, stomatal density is a trait often used to measure plant responses to environmental stresses. This trait provides information regarding the plants plasticity with respect to water and nutrient availability, the intensity of radiation, as well as other stresses. However, there is not a well-defined or standardized method for the measurement of stomatal density, thus precluding comparisons between studies that focus on this trait. Therefore, a study was conducted to determine the structure of the spatial distribution of stomata in the leaves of Jatobá (*H. courbaril* L.) using a geo-statistical analysis. An analysis of leaf expansion to investigate any possible relationships between the spatial structure of the stomata in the leaves and leaf expansion rates was performed. In this study, a protocol is determined to estimate the stomatal density in the leaves of Dicotyledons, and is compared with two other methods used in a case study where plants were collected from three different environments. There was a clear pattern of the spatial distribution of stomata within the Jatobá leaf, and it became clear that this structure is strongly influenced by the rate of leaf expansion. Comparing the different methods to estimate the stomatal density, it was found that by using geo-statistical software, some of the variation between samples is removed by considering the variability caused by the spatial factor. This reduction in the variability of the estimated data allowed the mean test to detect differences between treatments, which were not detectable with the other methods.

Key words: Estomatal. Stomatal density. Leaf expansion. Leaves.

LISTA FIGURAS

- Figura 1 Processo de referenciamento dos pontos amostrados: grade amostral utilizada (a); folíolo com os pontos a serem amostrados demarcados (b); imagem da superfície foliar considerada a unidade amostral básica (c); folíolo com pontos referenciados no plano cartesiano (d) 35
- Figura 2 Semivariograma típico para dados sem tendência e com ruído com os parâmetros que caracterizam a estrutura e correlação : efeito pepita ou “*nugget*” (τ^2), contribuição ou “*sill partial*” (σ^2), e alcance ou “*range*” (Θ) (MELLO et al., 2005) 37
- Figura 3 Cinco primeiros folíolos direitos do ápice do ramo de Jatobá e locais das medidas A, L1e, L2e, L3e, L1d, L2d e L3d 38
- Figura 4 Distribuição dos pontos amostrados em um folíolo de Jatobá com indicação dos quartis da DE por tamanho e cores dos pontos amostrados, onde os menores valores são representados em azul e os maiores em vermelho 41
- Figura 5 Semivariogramas teóricos ajustados para DE dos folíolos de Jatobá (curvas) e semivariogramas experimentais (pontos). 42
- Figura 6 Avaliação da estrutura de dependência espacial em quatro direções (0°, 45°, 90° e 135°) nos folíolos de Jatobá..... 45
- Figura 7 Mapas de Krigagem da densidade estomática obtidos para diferentes folíolos (a, b, c, d, e, f, g, h) 47
- Figura 8 Fotografia digital de um ponto amostral da folha representando a unidade amostral básica 63
- Figura 9 Grade amostral de 5x5mm com conglomerados de 2,5x2,5mm (no interior do quadrado) demarcada no folíolo de Jatobá 68

LISTA TABELAS

Tabela 1	Parâmetros do teste de normalidade Shapiro-Wilk para a DE de cada folíolo	40
Tabela 2	Estimativa dos parâmetros efeito pepita (τ^2), variação estruturada (σ^2), patamar ($\tau^2 + \sigma^2$), alcance (Θ) e da relação variação estruturada/patamar (Dep. Esp. %) para a densidade estomática (DE) de oito folíolos de Jatobá.....	44
Tabela 3	Médias dos valores referentes à taxa de expansão foliar de três diferentes regiões do folíolo obtidas de 10 ramos em crescimento de Jatobá.....	49
Tabela 4	Teste de médias comparando as médias das densidades estomáticas (estômatos mm^{-2}) das folhas entre os sítios M, P e S, com as médias obtidas por diferentes métodos (método descrito por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961), média aritmética da amostragem sistemática e média estimada através do tratamento geoestatístico).....	65
Tabela 5	Coefficiente de variação (CV) e médias da densidade estomática (estômatos mm^{-2}) estimadas pelo método geoestatístico (Geo), método descrito por Labouriau (1961) (Lab) e média aritmética dos dados amostrados sistematicamente (Med. Ar.) das folhas coletadas nos sítios M, P e S	66

SUMÁRIO

	CAPITULO 1 Introdução geral.....	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Estômatos	15
2.2	Geoestatística e distribuição espacial dos estômatos	17
2.3	Expansão foliar	20
2.4	Avaliação da densidade estomática	21
	REFERÊNCIAS	23
	CAPÍTULO 2: Análise da distribuição espacial de estômatos na superfície de folhas de jatobá (<i>Hymenaea courbaril</i> L.)	27
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1	Material vegetal	33
2.2	Base de dados e análises	34
2.3	Expansão foliar	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
	CAPÍTULO 3: Comparação de diferentes métodos de estimativa da densidade estomática em folhas de jatobá (<i>Hymenaea courbaril</i> L.)	56
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1	Sítios	62
2.2	Material vegetal	62
2.3	Tratamento dos dados	63

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

CAPITULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Os estômatos são estruturas encontradas nas partes aéreas das plantas terrestres, principalmente nas folhas, e são responsáveis por grande parte das trocas gasosas que ocorrem nos vegetais. Assim, os estômatos podem ser entendidos como válvulas da epiderme que controlam, principalmente, a entrada de dióxido de carbono e a saída de água da planta e, conseqüentemente, afetam a taxa fotossintética, o estado hídrico da planta e a eficiência do uso da água e são, portanto, componentes chave para sobrevivência das plantas terrestres (BERGER; ALTMANN, 2000; NADEAU; SACK, 2002).

A análise de atributos dessas estruturas embasa inferências sobre o comportamento das plantas perante variações ambientais. Rotineiramente, os atributos analisados acerca de respostas estruturais dos estômatos são densidade estomática e índice estomático. É interessante ressaltar que a análise da distribuição espacial dessas variáveis, no limbo foliar pode fornecer também informações associadas aos processos de formação da folha (POOLE, 1996).

Para obtenção de informações da distribuição espacial em folhas é necessário utilizar métodos de amostragem e tratamento de dados que considerem o caráter espacial dessa informação. Dentre diversas ferramentas que permitem a análise de dados que apresentam variação no espaço, destaca-se a geoestatística.

Ao realizar o levantamento de dados com caráter espacial é necessária a elaboração de um plano amostral que vise a otimizar o esforço amostral e qualidade dos dados. Nesse contexto, novamente a geoestatística apresenta-se como ferramenta adequada, fornecendo parâmetros com informações relacionadas ao padrão da distribuição espacial da variável analisada que permitem a elaboração de um plano amostral. Esses mesmos parâmetros também

podem ser utilizados na compreensão de processos que ocorrem nas folhas durante a sua formação.

Diante da escassez de estudos que considerem a distribuição espacial dos estômatos no limbo foliar, e baseando-se na hipótese que atributos estomáticos, como densidade estomática e índice estomático, são variáveis que apresentam estrutura espacial e respondem de maneira diferencial às condições ambientais, desenvolveu-se o presente trabalho, tendo como material vegetal: folhas de Jatobá oriundas de diferentes ambientes. Os objetivos do trabalho foram: (i) elaborar um método de amostragem da densidade estomática que contemplasse o caráter espacial dessa variável; (ii) analisar o padrão da distribuição da densidade estomática no limbo foliar; (iii) correlacionar parâmetros da distribuição espacial com a taxa de expansão foliar; (iv) descrever possíveis relações que influenciam os processos de expansão foliar e a gênese de estômatos; (v) comparar resultados obtidos por diferentes métodos de amostragem e análise; (vi) propor uma rotina para estudos de densidade estomática visando otimizar o esforço amostral e a qualidade da informação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estômatos

Os estômatos são estruturas de fundamental importância para a sobrevivência das plantas terrestres. Em termos evolutivos, essa estrutura contribuiu para a ocupação do ambiente terrestre pelos vegetais. A maior parte da água transpirada pelas plantas terrestres, bem como o dióxido de carbono absorvido na fotossíntese, passa através dos poros estomáticos, também denominados ostíolos ou fendas estomáticas (JONES, 1992).

A natureza sésstil das plantas exige que elas adaptem constantemente as variações em seu ambiente, e estômatos são vitais para essa função (CASSON; GRAY, 2008). Ao regular as trocas gasosas com o ambiente, principalmente vapor de água e dióxido de carbono, essas estruturas permitem à planta otimizar e balancear a performance fotossintética com a disponibilidade e uso de água (CHAERLE et al., 2005).

O aparato estomático é composto por duas células-guarda ou labiais pareadas as quais circundam um poro microscópico, o ostíolo. Abaixo do poro encontra-se a câmara subestomática. As células-guarda podem ainda ser acompanhadas de células subsidiárias ou companheiras. De acordo com o número de células subsidiárias ou ausência das mesmas, os estômatos são classificados como anomocíticos, paracíticos, anisocíticos ou tetracíticos quando há ausência, duas, três ou quatro células subsidiárias, respectivamente. Essa estrutura apresenta um comportamento dinâmico, sendo capaz de aumentar ou diminuir a resistência à passagem dos gases através do controle do potencial hídrico (Ψ_w) das células-guarda (ROELFSEMA; HEDRICH, 2005).

A segunda estratégia empregada pelas plantas para adaptar as constantes mudanças ambientais é modular a frequência na qual os estômatos se desenvolvem em novos órgãos (CASSON; GRAY, 2008). Mudanças na

frequência podem ser expressas na forma de densidade estomática (DE) (número de estômatos por unidade de área) ou como índice estomático (razão, expressa em porcentagem, entre número de estômatos e número de estômatos mais número de células epidérmicas).

A mudança na densidade estomática ou índice estomático pode ser considerado um evento de longo termo, pois é um processo no nível estrutural e irreversível. Alterações na frequência do desenvolvimento de estômatos em novos órgãos são reguladas por um mecanismo que envolve órgãos maduros, funcionando como sensores das condições ambientais e enviando sinais para os órgãos em desenvolvimento (COUPE et al., 2006; LAKE et al., 2001; MIYAZAWA; LIVINGSTONE; TURPIN, 2006; SCHOCH; ZINSOU; SIBI, 1980).

As trocas gasosas representam um importante ponto de controle do funcionamento da planta como um todo, alterando diversas respostas no espaço e no tempo. A modulação da frequência, na qual os estômatos se desenvolvem em um novo órgão é um processo que registra o comportamento da planta perante variações ambientais, no intervalo de tempo no qual o órgão se desenvolve. Esse registro, o qual pode ser medido e expresso como densidade estomática é de grande valia em investigações fisiológicas e ecológicas, por ser inerente aos processos pertinentes a essas duas grandes áreas da botânica.

Embora a densidade estomática venha sendo amplamente utilizada em estudos de comportamento de plantas em diferentes condições ambientais, raramente o caráter espacial desse atributo é considerado na coleta e processamento dos dados (POOLE et al. 1996). Segundo Tichá (1982), todas as folhas completamente expandidas de uma mesma planta exibem um gradiente ontogênico e espacial da densidade estomática. Esse atributo também é fortemente afetado pelas condições de crescimento: importantes influências incluem intensidade e qualidade da radiação (GAY; HURD, 1975),

disponibilidade de água (GINDEL, 1969), disponibilidade de nutrientes no solo (HSAIO; GISCHER, 1975) e níveis de dióxido de carbono (WOODWARD; BAZZAZ, 1998). Mesmo quando folhas com equivalentes estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie são estudadas, deve ser estabelecido se há diferença na densidade estomática ao longo da superfície foliar, em qualquer desses níveis, ontogênico e fenotípico (WEYERS; MEIDNER, 1990).

A necessidade de se estabelecer a existência de diferenças na densidade estomática ao longo da superfície foliar deve-se à heterogeneidade da distribuição dos estômatos, provocada principalmente por variações das condições ambientais no intervalo de tempo em que o órgão (folha) se desenvolve (POOLE et al., 1996).

O crescimento das folhas em Monocotiledôneas ocorre unidirecionalmente, com células sendo constantemente produzidas na região meristemática, próximo à base da folha, e são afastadas do meristema pela subsequente divisão e alongação das células (FRASER et al., 1990; SKINNER; NELSON, 1994), resultando em um nítido padrão de distribuição dos estômatos longitudinalmente na folha. Devido a essa característica é possível deduzir processos temporais, através de características espaciais em folhas de Monocotiledôneas (POOLE et al., 1996). No entanto, o mesmo não é possível em Dicotiledôneas, pois essas apresentam um crescimento bidirecional das folhas, ocorrendo divisões celulares em todo o limbo foliar (GRANIER; TARDIEU, 1998). Esse fato provoca uma aparente aleatoriedade da distribuição espacial dos estômatos.

2.2 Geoestatística e distribuição espacial dos estômatos

A geoestatística é um método estatístico relativamente recente capaz de analisar a distribuição dos valores de variáveis no espaço. Essa ferramenta vem

sendo amplamente utilizada na geologia, ciências dos solos e mais recentemente nas ciências ambientais em geral. Porém, esse método apresenta grande potencial de aplicação em qualquer estudo que envolva variáveis distribuídas no espaço, e que de alguma forma apresentem um padrão na sua distribuição espacial. Matheron (1963) denominou esse tipo de variável como “Variáveis Regionalizadas”, nome dado também à teoria precursora da geoestatística. A Teoria das Variáveis Regionalizadas foi definida por Matheron (1963) a partir de uma função espacial numérica, variando de um local para outro, com continuidade aparente e tal variação não pode ser representada por uma função matemática simplesmente. No entanto, atualmente a fundamentação geoestatística encontra-se inserida na teoria convencional da estatística (MELLO et al., 2005).

A geoestatística é baseada na variância ao longo do espaço, assim considerando dois pontos com um intervalo de distância h entre eles, a variação entre esses dois pontos é dada por uma função variograma 2γ , que depende da localização (x) e do deslocamento (h) (MCBRATNEY; WEBSTER, 1996).

No entanto, para que a função variograma seja função apenas de h , é preciso adotar a hipótese de que a variância das diferenças entre dois pontos amostrais dependa apenas do deslocamento (h) (Hipótese Intrínseca) e que isso ocorra em toda área a qual a população ocupa (Estacionaridade).

Na teoria das Variáveis Regionalizadas, o valor de $\gamma(h)$ é conhecido como semivariância, e é definido como a metade da esperança da variância entre pares de pontos separados por uma distância (h). A função γ é o semivariograma (MELLO et al., 2005).

Dentro das condições impostas pela Hipótese Intrínseca, a semivariância pode ser estimada mediante uma única realização do processo estocástico através da equação:

$$\gamma^*(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} [Z(x_i) - Z(x_i+h)]^2$$

Em que $N(h)$ é o número de pares de valores medidos $Z(x_i)$, $Z(x_i+h)$, separados por um vetor h (JOURNEL; HUIJBREGTS, 1978). O gráfico de $\gamma^*(h)$ em função dos valores correspondentes de h , chamado semivariograma, é uma função do vetor h e, portanto, ele depende de ambos, magnitude e direção de h .

Assim, a construção de semivariogramas permite a detecção de padrões de distribuição espacial, além de permitir afirmar se a variável se enquadra na definição de “Variável Regionalizada”.

A geoestatística apresenta-se como uma potencial ferramenta para investigar a distribuição espacial dos estômatos. Poole et al. (1996), investigando sobre densidade estomática de folhas de *Alnus glutinosa* L., discutem a importância de se considerar a heterogeneidade da distribuição espacial dos estômatos na superfície da folha, e utiliza um interpolador bi-linear para estimar o número de estômatos na folha e construir mapas da densidade e índice estomático. Nesse ponto, a geoestatística apresenta grande potencial em estudos dessa natureza, pois através da modelagem do semivariograma obtém-se um interpolador que considera o padrão de distribuição de cada base de dados em particular.

Há de se ressaltar que o uso da Geoestatística, assim como de outras técnicas de tratamento de dados com caráter mais refinado só é possível graças ao advento de computadores mais eficientes e ao fácil acesso dos mesmos aos pesquisadores. Souza e Buckeridge (2004) destacam que, por volta da década de 1960, com a maior disponibilidade de recursos computacionais, surgem novas possibilidades de abordagem de processos biológicos, assim como em diversas outras áreas da ciência.

2.3 Expansão foliar

A área foliar determina grandemente a intercepção de luz e a transpiração da planta (MONTEITH, 1977). O crescimento da folha com o tempo depende das condições ambientais, como déficit hídrico (LECOEUR et al., 1995; RANDALL; SINCLAIR, 1988), densidade de fluxo de fótons (DENGLER, 1980; MILTHORPE; NEWTON, 1963), temperatura (BEM HAJ SALAH; TARDIEU, 1995; GRANIER; TARDIEU, 1998) e demanda evaporativa (BEM HAJ SALH; TARDIEU, 1996). A expansão foliar pode ser abordada, também como um processo ligado à deformação das paredes das células epidérmicas, que formam o tecido menos plástico das folhas durante a expansão (KUTSCHERA, 1992). No entanto, de uma forma simplificada a expansão foliar pode ser considerada como resultado da divisão e expansão das células epidérmicas como descrito por Tardieu, Granier e Muller (1999) pela equação a seguir:

$$RER = dN/Ndt + dA_c/A_c dt.$$

onde RER é a taxa de expansão foliar relativa, N é o número de células epidérmicas, A_c é a área média das células epidérmicas e t é o tempo.

Um importante componente dos modelos de expansão foliar é a taxa de divisão celular, que mesmo sendo expressa separadamente da taxa de expansão celular, não são independentes, pois são modulados pelos mesmos fenômenos; turgor das células epidérmicas e propriedades das paredes celulares (LOCKHART, 1965).

Ambos os processos de expansão e divisão celular influenciam diretamente na distribuição espacial dos estômatos nas folhas, pois o processo de

diferenciação celular que dá origem aos estômatos só ocorre em células jovens, as quais acabaram de passar pelo processo de divisão e a expansão celular continua, ocorrendo depois de cessada a divisão (BEERING; CHALONER, 1993).

Poole (1996), ao encontrar variações na densidade estomática em diferentes regiões de uma mesma folha, sugere três possíveis explicações para o fenômeno.

- a) A diferenciação dos estômatos não é uniforme nas diferentes regiões da superfície foliar, resultando em diferentes densidades estomáticas ou diferentes densidades de células epidérmicas ou ambos (hipótese da “diferenciação”).
- b) Na fase final da expansão foliar não há divisão e a expansão celular é diferente em diferentes partes da folha, resultando no espaçamento desigual entre os estômatos (hipótese da “expansão”).
- c) Variações espaciais na expansão e diferenciação contribuem para o espaçamento desuniforme (hipótese “mista”).

No entanto, detectar variações na taxa de expansão e na densidade estomática em pequenas regiões da folha pode gerar dados com altos níveis de ruído. Uma alternativa viável para tal investigação surge com a possibilidade do uso das ferramentas geoestatísticas, como os parâmetros de ajuste do semivariograma.

2.4 Avaliação da densidade estomática

Ao estimar a densidade estomática de uma planta, como qualquer outra variável, é necessário seguir um protocolo de procedimentos. Esse protocolo

deve ser satisfatório em dois sentidos; “viabilidade do procedimento” e “acurácia da estimativa”. A viabilidade do procedimento é inerente ao processo amostral. A amostra deve representar a população como um todo e para isso quanto maior a amostra, mais representativa será a mesma. Por outro lado, amostras grandes podem significar o emprego de muito tempo e recursos. A acurácia está relacionada à precisão da estimativa, sendo assim, depende da qualidade dos dados obtidos na amostragem. Dessa forma, um procedimento amostral satisfatório otimiza a menor amostra com a maior acurácia possível.

Sendo a densidade estomática um atributo que varia no espaço, alguns fatores do procedimento amostral podem influenciar na representatividade da amostra. Alguns desses fatores são: forma de amostragem (sistemática ou aleatória) e a forma e dimensão da grade e da unidade amostral.

Tendo em vista que o processo de formação dos estômatos induz a uma organização espacial dessas estruturas ao longo do limbo foliar, uma análise que considere o caráter espacial dos dados pode auxiliar na elaboração de um plano amostral. Assim, pode-se definir o tamanho ótimo da unidade amostral, a forma mais satisfatória da unidade amostral, a dimensão e estrutura da grade amostral e o esforço amostral ótimo (OLIVEIRA, 1991).

REFERÊNCIAS

BEERIING, D. J.; CHALONER, W. G. Stomatal density responses of Egyptian *Olea eutopaea* L. leaves to CO₂ changes since 1327. **Annals of Botany**, London, v. 71, n. 4, p. 431-435, Apr. 1993.

BEM HAJ SALAH, H.; TARDIEU, F. Quantitative analysis of the combined effects of temperature, evaporative demand and light on leaf elongation rate in well watered field and laboratory grown maize plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 1689-1698, Nov. 1996.

BEM HAJ SALAH, H.; TARDIEU, F. Temperature affects expansion rate of maize leaves without change in spatial distribution of cell length: analysis of the coordination between cell division and cell expansion. **Plant Physiology**, Osney Mead, v. 109, p. 861-870, June 1995.

BERGER, D.; ALTMANN, T. A. Subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Development**, New York, v. 14, n. 9, p. 1119-1131, May 2000.

CASSON, S.; GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 9-23, Feb. 2008.

CHAERLE, L.; SAIBO, N.; VAN DER STRAETEN, D. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 23, n. 6, p. 308-315, June 2005.

COUPE, S. A. et al. Systemic signaling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, 329-341, Jan. 2006.

DENGLER, N. G. Comparative histological basis of sun and shade leaf dimorphism in *Helianthus annuus*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 58, n. 6, p. 717-730, Mar. 1980.

FRASER, T. E.; SILK, W. K.; ROST, T. L. Effects of low water potential on cortical cell length in growing regions of maize roots. **Plant Physiology**, Cambridge, v. 93, n. 2, p. 648-651, June 1990.

GAY, A. P.; HURD, R. G. The influence of light on stomatal density in the tomato. **New Phytologist**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 37-46, July 1975.

GINDEL, L. Stomata constellation in the leaves of cotton, maize and wheat plants as a function of soil moisture and environment. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 1143-1151, June 1969.

GRANIER, C.; TARDIEU, F. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves: a common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. **Plant Physiology**, Cambridge, v. 116, n. 3, p. 991-1001, Mar. 1998.

HSAIO, T. C.; FISCHER, R. A. Microscopic measurements. In: KANESMASU, E. T. **Measurements of stomatal aperture and diffusion resistance**. Pullman: Washington State University, 1975. p. 2-5.

JONES, H. G. **Plants and microclimate, a quantitative approach to environmental plant physiology**. 2nd ed. Cambridge: University of Cambridge, 1992.

KUTSCHERA, U. The role of the epidermis in the control of elongation growth in stem and coleoptiles. **Acta Botanica**, Cambridge, v. 105, n. 1, p. 246-252, Jan. 1992.

LAKE, J. A. et al. Plant development: signals from mature to new leaves. **Nature**, London, v. 411, n. 6834, p. 154, May 2001.

LECOEUR, J. et al. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1093-1101, Sept. 1995.

LOCKHART, J. A. An analysis of irreversible plant cell elongation. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 453-470, Mar. 1965.

MATHERON, G. Principles of geostatistics. **Economic Geology**, Littleton, v. 58, n. 8, p. 1246-1266, Dec. 1963.

MELLO, J. M. et al. Estudo da dependência espacial de características dendrométricas para *Eucalyptus grandis*. **CERNE**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 113-126, 2005.

MILTHORPE, F. L.; NEWTON, P. Studies on the expansion of the leaf surface. The influence of radiation on cell division and leaf expansion. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 14, p. 483-495, 1963.

MIYAZAWA, S. I.; LIVINGSTONE, N. J.; TURPIN, D. H. Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 373-380, Jan. 2006.

POOLE, I. et al. Variations in stomatal density and index: implications for paleoclimatic reconstructions. **Plant, Cell and Environment**, Amsterdam, v. 19, n. 6, p. 705-712, June 1996.

RANDALL, H. C.; SINCLAIR, T. R. Sensitivity of soybean leaf development to water deficits. **Plant, Cell and Environment**, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 835-839, Apr. 1988.

ROELFSEMA, M. R.; HEDRICH, R. In the light of stomatal opening: new insights into "ghe Watergate". **New Phytologist**, Cambridge, v. 167, n. 3, p. 665-691, Sept. 2005.

SCHOCH, P. G.; ZINSOU, C.; SIBI, M. Dependence of stomatal index on environmental factors during stomata differentiation in leaves of *Vigna signensis* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 1211-1216, Oct. 1980.

SKINNER, R. H.; NELSON, C. J. Epidermal cell division and the coordination of leaf and tiller development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 9-16, July 1994.

SOUZA, G. M.; BUCKRIGE, M. S. Sistemas complexos: novas formas de ver a botânica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 1-19, ago. 2004.

TARDIEU, F.; GRANIER, C.; MULLER, B. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate? **New Phytologist**, Cambridge, v. 143, n. 1, p. 33-43, July 1999.

TICHÁ, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves: stomatal density and size. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 16, p. 375-471, 1982.

WEYERS, J. D. B.; MEIDNER, H. **Methods in stomatal research**. Harlow: Longman, 1990. 233 p.

WOODWARD, F. I.; BAZZAZ, F. A. The responses of stomatal density to CO₂ partial pressure. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 771-1778, Dec. 1988.

CAPÍTULO 2: Análise da distribuição espacial de estômatos na superfície de folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.)

RESUMO

Os estômatos são estruturas funcionalmente essenciais para as plantas terrestres. Atributos relacionados a essa estrutura são de grande importância na descrição do comportamento de plantas submetidas a diferentes condições ambientais. Entretanto, um processo de amostragem e análise de atributos de estômatos, eficiente e padronizado, é fundamental para que essas informações possam contribuir para compreensão das respostas de plantas em diferentes escalas de tempo e espaço. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar o padrão de distribuição dos estômatos no limbo foliar e também os possíveis mecanismos que interferem nesse padrão, em particular a expansão foliar. Para isso, utilizou-se de ferramentas da geoestatística e relações biométricas de folíolos de *H. courbaril* L.. Verificou-se uma estrutura espacial na distribuição dos estômatos no limbo foliar. As relações biométricas dos folíolos indicaram uma diferença na taxa de expansão foliar do lado direito em relação ao lado esquerdo do folíolo, portanto há uma taxa de expansão diferencial ao longo do limbo foliar. Além disso, os resultados obtidos mostram uma estreita relação entre mecanismos de formação de estômatos e a taxa de expansão foliar.

Palavras-chave: Estômatos. Geoestatística. Anatomia foliar. Expansão foliar. Jatobá.

ABSTRACT

Stomata are leaf structures that essential for the proper functioning of terrestrial plants. The traits related to these structures are of importance when describing the behavior of plants under different environmental conditions. However, an efficient and standardized method for the sampling and analysis of stomatal traits is essential to understanding the plants responses under different scales of time and space. In this context, the objective of this study was to investigate the distribution pattern of stomata on the leaf surface, and the possible mechanisms that interfere with this pattern, particularly leaf expansion. For this, we used geo-statistical tools and an analysis of biometric relationships of leaves from *H. courbaril* L.. There was a clear spatial structure in the distribution of stomata in the leaves. The biometric relationship of the leaflets showed a difference in the rate of leaf expansion on the right side over the left side of the leaves indicating a differential rate of expansion along the leaf blade. Furthermore, the results show a close relationship between mechanisms of stomata formation and leaf expansion rate.

Key-words: Estomata. Geoestatistic. Stomatal density. Leaf expansion. Jatobá.

1 INTRODUÇÃO

Os estômatos são estruturas encontradas nas partes aéreas das plantas terrestres, principalmente nas folhas, e são responsáveis por grande parte das trocas gasosas que ocorrem nos vegetais. Assim, os estômatos podem ser entendidos como válvulas da epiderme que controlam, principalmente, a entrada de dióxido de carbono e a saída de água da planta e, conseqüentemente, afetam a taxa fotossintética, o estado hídrico da planta e a eficiência do uso da água e são, portanto, componentes chave para sobrevivência das plantas terrestres (BERGER; ALTMANN, 2000; NADEAU; SACK, 2002).

Ao abordar o aparato estomático como válvulas da interface planta-atmosfera, a área dessa interface passa a ser um atributo crucial nos estudos de respostas a nível estrutural/anatômico e conseqüentemente funcional das plantas submetidas a pressões ambientais. A área potencial dessa interface é constituída pelo número de estômatos por unidade de área, expressa pela densidade estomática (DE) e pela dimensão de cada estômato.

Os estômatos são formados depois de uma seqüência de divisões assimétricas que ocorrem durante o desenvolvimento da folha (NADEAU; SACK, 2002) e dessa forma, a DE e a distribuição dos estômatos são regulados geneticamente durante esse período (NADEAU; SACK, 2002). No entanto, o padrão da distribuição dos estômatos também é afetado por fatores ambientais, como intensidade de radiação, umidade, temperatura, níveis de dióxido de carbono na atmosfera, disponibilidade hídrica e nutricional do solo, pela arquitetura interna e posição da folha (ASSMANNAND, 2001; CHEN et al., 2001; CROXDALE, 2000). Variações nos fatores ambientais ao longo do desenvolvimento da folha podem causar uma distribuição irregular dos estômatos na superfície foliar.

A heterogeneidade da distribuição espacial dos estômatos na lâmina foliar provocada por fatores ontogênicos e fenotípicos é um fenômeno há muito conhecido (SALISBURY, 1928; SLAVIK, 1963). Contudo, trabalhos contendo informações como DE, índice estomático e biometria de estômatos, raramente mencionam o número, tamanho e localização das áreas analisadas (unidades amostrais) para o levantamento de tais informações (POOLE et al., 1996). Além disso, a forma como são obtidos os dados (amostragem) não permite um tratamento estatístico que considere o caráter espacial da informação. Assim, as análises habituais são baseadas na variância da média, o que pode levar a perda na qualidade da interpretação dos fenômenos biológicos, pois, segundo Amzallag (2001), uma análise baseada apenas na variância da média pode não incluir fatores importantes para o significado biológico da variável analisada.

Tendo em vista a existência de uma heterogeneidade na distribuição espacial dos estômatos, surge a necessidade da investigação de um possível padrão ou da aleatoriedade dessa heterogeneidade espacial, produzindo resultados que auxiliam na elaboração de um plano amostral adequado (OLIVEIRA; CORREA; CAMPOS, 1995).

Com o advento de técnicas matemáticas mais refinadas e o fácil acesso a computadores com grande capacidade de processamento, trabalhos com um tratamento mais refinado de dados vêm se tornando mais frequentes (SOUZA; BUCKERIDGE, 2004). Dentro dessa perspectiva, a geoestatística apresenta-se como uma ferramenta relativamente recente capaz de analisar a distribuição dos valores de variáveis no espaço. A formalização dessa teoria foi realizada por G. Matheron, no início da década de 60, na França (CRESSIE, 1990), e a partir de então vem sendo aplicada por cientistas de diferentes áreas do conhecimento, por exemplo: (i) a distribuição espacial do teor de estanho em jazidas (CLARK, 1979); (ii) a distribuição espacial da precipitação em certa região (SWITZER,

1979) e (iii) o estudo da distribuição espaço-temporal da poluição atmosférica (CRESSIE, 1989).

Admitindo-se a existência da heterogeneidade na distribuição espacial dos estômatos e com novas técnicas que permitem detectar e dimensionar tal fenômeno, o presente trabalho objetivou um estudo da espacialização dos estômatos na lâmina foliar por meio de uma superamostragem em folhas de *H. courbaril* L., utilizando-se de ferramentas geoestatísticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material botânico foi coletado no município de Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil (21°44'38'' Sul, 46°28'16'' Oeste), em um fragmento florestal caracterizado fitofisionomicamente como Floresta Estacional Semidecidual Montana (ZONEAMENTO ECOLÓGICO ECONÔMICO DO ESTADO DE MINAS GERAIS - ZEE, MG, 2007).

As folhas foram coletadas entre os meses de setembro e novembro de 2008, sendo que tais folhas foram lançadas e expandiram entre 15/08/2008 e 15/10/2008. Neste período, a temperatura média da região foi de 16,9°C, as temperaturas médias, máxima e mínima foram de 17,8°C e 16,1°C, respectivamente. O total de precipitação para o período foi de 154,2mm (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2009).

A amostragem das folhas foi realizada em 4 indivíduos adultos de *H. courbaril* L., sendo coletadas 2 folhas por indivíduo. Foi padronizada a coleta da primeira folha completamente expandida a partir do ápice do ramo. Folhas com sinais de ataque de herbívoros e/ou patógenos foram excluídas. O material foi fixado em álcool 70%.

Sendo a *H. courbaril* L. uma espécie que possui folhas compostas por dois folíolos, foi utilizado sempre o folíolo direito para prática das análises.

No Laboratório de Anatomia Vegetal do Setor de Botânica Estrutural, Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela técnica de impressão da epiderme foram feitas lâminas descartáveis da impressão da face abaxial dos folíolos de *H. courbaril* L.

Foram capturadas imagens digitais das impressões utilizando-se de uma câmera digital Canon A-630, acoplada ao microscópio de luz (Olympus CBB).

As imagens obtidas, consideradas unidades amostrais básicas, possuem as dimensões de 0,768 x 0,576mm, proporcionando uma área de 0,442mm² amostrada por unidade (Figura 1c).

2.2 Base de dados e análises

Para obtenção de dados referentes à densidade estomática (DE), com informações de caráter espacial, o folíolo foi referenciado em um plano cartesiano, assim como os pontos a serem amostrados. Neste processo, utilizou-se papel vegetal milimetrado, o qual foi perfurado de modo a formar uma grade amostral de 5 x 5mm. Com a grade amostral assim definida, foram demarcados pontos no folíolo com caneta de ponta porosa, transferindo-se assim a grade amostral para superfície do folíolo (Figura 1 a e b).

Posteriormente, o folíolo com pontos demarcados foi digitalizado, com uso de *scanner*, sobre papel milimetrado, obtendo-se assim uma imagem *.jpg (Figura 1b). Através do *software* ImageTool[®], a imagem *.jpg foi transformada em um plano cartesiano com dimensões reais (Figura 1d). Ainda com o auxílio do mesmo *software* foi extraído um banco de dados com coordenadas X e Y referentes a cada ponto a ser amostrado e um banco de dados com coordenadas X e Y referentes ao perímetro do folíolo.

A contagem dos estômatos na unidade amostral foi realizada com auxílio do *software* *Image Tool* e expressa como densidade estomática (DE). Os dados referentes à DE foram associados as suas respectivas coordenadas, formando-se, assim, a base de dados

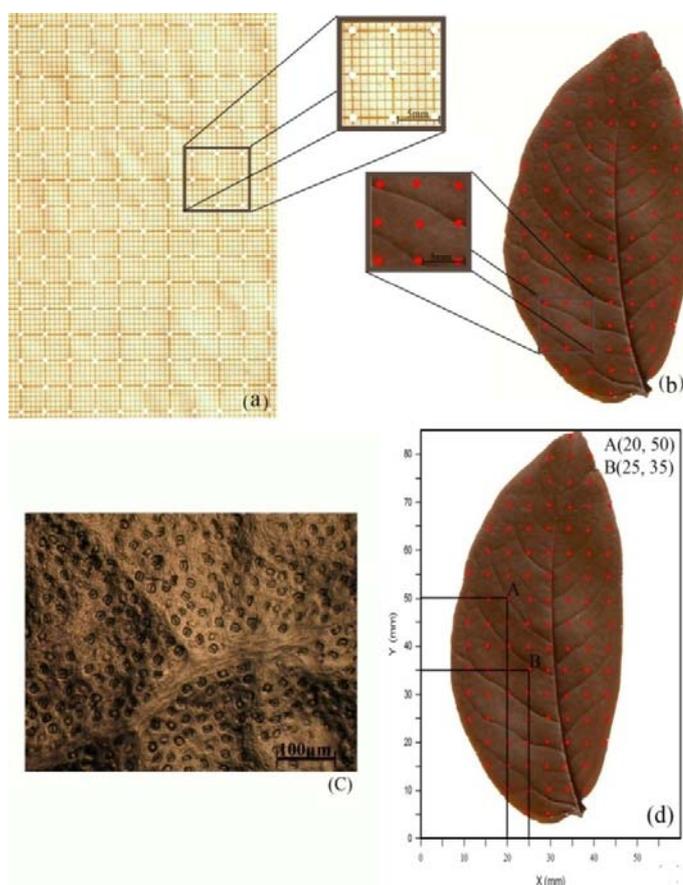


Figura 1 Processo de referenciamento dos pontos amostrados: grade amostral utilizada (a); folíolo com os pontos a serem amostrados demarcados (b); imagem da superfície foliar considerada a unidade amostral básica (c); folíolo com pontos referenciados no plano cartesiano (d)

Essa operação foi repetida com uma grade amostral mais fina 2,5 x 2,5mm, a fim de refinar a amostragem. No entanto, com a grade amostral reduzida, foram analisadas secções da lâmina foliar com 1,8 x 1,8cm, a qual foi definida com base em testes preliminares.

Foi testada a normalidade dos dados referentes à DE para cada folha analisada, através do teste de Shapiro-Wilk. Tal teste foi aplicado, pois a

modelagem estocástica é fundamentada pela distribuição normal dos dados (CRESSIE, 1993), considerando-se também que toda inferência geoestatística linear tem-se desenvolvido sob tais fundamentos. No entanto, deve-se ressaltar que a aplicação da geoestatística não exige normalidade dos dados, porém, quando tal condição é observada as inferências ganharão propriedades estatísticas ótimas (MELLO et al., 2005).

Para estudar os padrões espaciais da DE, os dados foram analisados de acordo com a teoria geoestatística. Nesse contexto, a DE é interpretada como um atributo Z , o qual pode variar em função das coordenadas em um plano cartesiano. Cada valor de $Z(x_i)$ corresponde a um valor observado da DE nas coordenadas de um plano cartesiano x_i , $i=1,2,3,\dots,n$, sendo considerada uma realização da variável aleatória $Z(x)$. Havendo a *priori* uma variação contínua de Z em função de x , a estrutura de correlação da variável Z no espaço é representada no semivariograma (CRESSIE, 1993). Na Figura 2 é representado um semivariograma típico para dados sem tendência e com ruído. A linha tracejada representa um semivariograma sem ruído. Neste semivariograma estão apresentados os parâmetros que caracterizam a estrutura de correlação: efeito pepita ou “*nugget*” (τ^2), contribuição ou “*sill partial*” (σ^2), e alcance ou “*range*” (Θ).

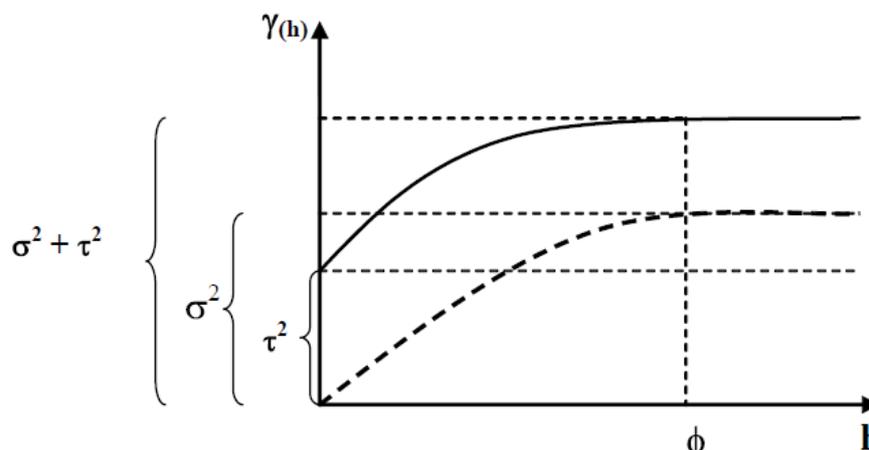


Figura 2 Semivariograma típico para dados sem tendência e com ruído com os parâmetros que caracterizam a estrutura e correlação : efeito pepita ou “*nugget*” (τ^2), contribuição ou “*sill partial*” (σ^2), e alcance ou “*range*” (ϕ) (MELLO et al., 2005)

Foram ajustadas para cada base de dados as funções autorizadas (modelos) apresentadas por Journel e Huijbregts (1978), McBratney e Webster (1986), com o objetivo de obter o conjunto de parâmetros para as respectivas funções. Os ajustes foram feitos pelo Método dos Quadrados Mínimos Ponderados, usando o programa R, através do pacote geoR (RIBEIRO JÚNIOR; DIGLLE, 2001).

Para melhor visualização da estrutura espacial da densidade estomática foi realizada a Krigagem dos dados, a partir do modelo ajustado. Para tal foi utilizado o programa R, através do pacote *splancs* (ROWLINGSON; DIGLLE, 1993).

2.3 Expansão foliar

Uma análise biométrica da expansão foliar foi realizada a fim de detectar taxas de expansão foliar diferentes, em regiões distintas de uma mesma folha. Para tal, foram realizadas medições do comprimento da nervura central (A), da largura do folíolo em três pontos de A ($L1$, $L2$ e $L3$), definidos pela razão $A/4$. As medidas de $L1$, $L2$ e $L3$ foram ainda divididas entre o lado esquerdo ($L1e$, $L2e$ e $L3e$) e direito ($L1d$, $L2d$ e $L3d$) da nervura central (Figura 3).

Tais medições foram realizadas no folíolo direito das 5 primeiras folhas, do ápice de 10 ramos em crescimento, sendo considerado folha 1 ($f1$) a primeira do ápice e folha 5 ($f5$) a última. Assim foram medidos folíolos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3).

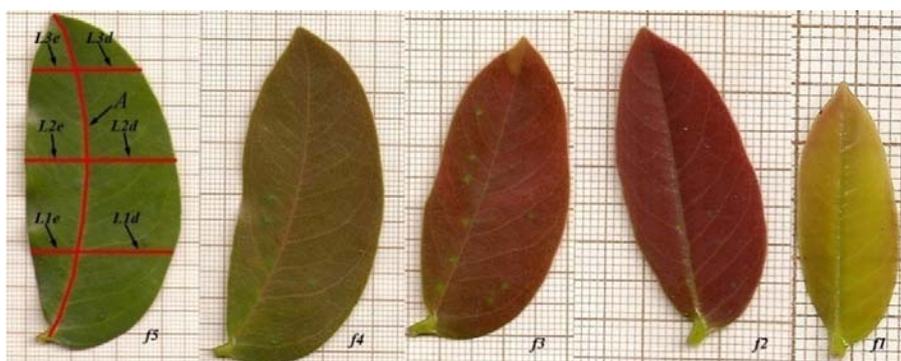


Figura 3 Cinco primeiros folíolos direitos do ápice do ramo de Jatobá e locais das medidas A , $L1e$, $L2e$, $L3e$, $L1d$, $L2d$ e $L3d$

Para detectar uma possível diferença de taxa de expansão em pontos diferentes do folíolo de Jatobá, foram calculadas as seguintes razões (r): $L1/A$, $L2/A$ e $L3/A$ para uma análise longitudinal e $(L1e+L2e+L3e)/A$ e $(L1d+L2d+L3d)/A$ para uma análise transversal.

Os valores das razões (r) correspondentes a cada folha permitiu o cálculo da seguinte diferença, $[r(f5)-r(f4)-r(f3)-r(f2)-r(f1)]$, cujo valor foi associado à taxa de expansão foliar em diferentes regiões da folha.

Foi realizado um teste de média (Tukey a 0,05) entre as relações L1/A, L2/A e L3/A e um teste de t entre $(L1e+L2e+L3e)/A$ e $(L1d+L2d+L3d)/A$.

Posteriormente, foram calculados semivariogramas para o lado direito e esquerdo dos folíolos completamente expandidos de cada ramo.

Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os valores referentes à taxa de expansão de cada folíolo e o alcance (Θ) do semivariograma.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando analisados os dados de DE, para cada folha através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, foram encontrados valores que indicam uma distribuição normal da frequência dos dados (Tabela 1).

Tabela 1 Parâmetros do teste de normalidade Shapiro-Wilk para a DE de cada folíolo

FOLÍOLO	W	p-value
1	0,9782	0,5013
2	0,9865	0,7387
3	0,987	0,0544
4	0,9782	0,5033
5	0,9775	0,0935
6	0,9653	0,0625
7	0,9755	0,5412
8	0,9814	0,6257

Na Figura 4, pode-se observar a distribuição dos pontos amostrados no folíolo com a grade amostral de 5 x 5mm e as secções com grade amostral de 2,5 x 2,5mm. Os pontos aparecem com tamanhos e cores diferentes, indicando os quartis referentes à DE, onde os pontos menores indicam o primeiro quartil e os pontos maiores indicam o quarto quartil.

Através do semivariograma experimental, foi possível detectar uma estrutura de dependência espacial dos dados. Na Figura 5, podem ser observados os semivariogramas experimentais da DE dos folíolos de Jatobá pontos e as curvas dos modelos ajustados pelo método dos Quadrados Mínimos Ponderados (semivariogramas teóricos).

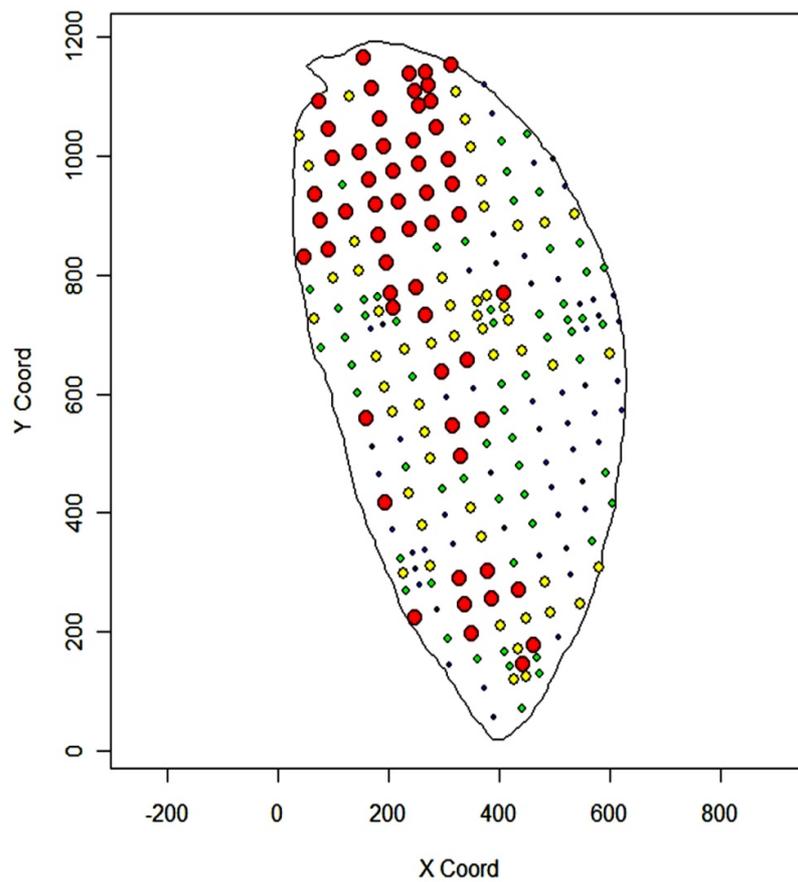


Figura 4 Distribuição dos pontos amostrados em um folíolo de Jatobá com indicação dos quartis da DE por tamanho e cores dos pontos amostrados, onde os menores valores são representados em azul e os maiores em vermelho

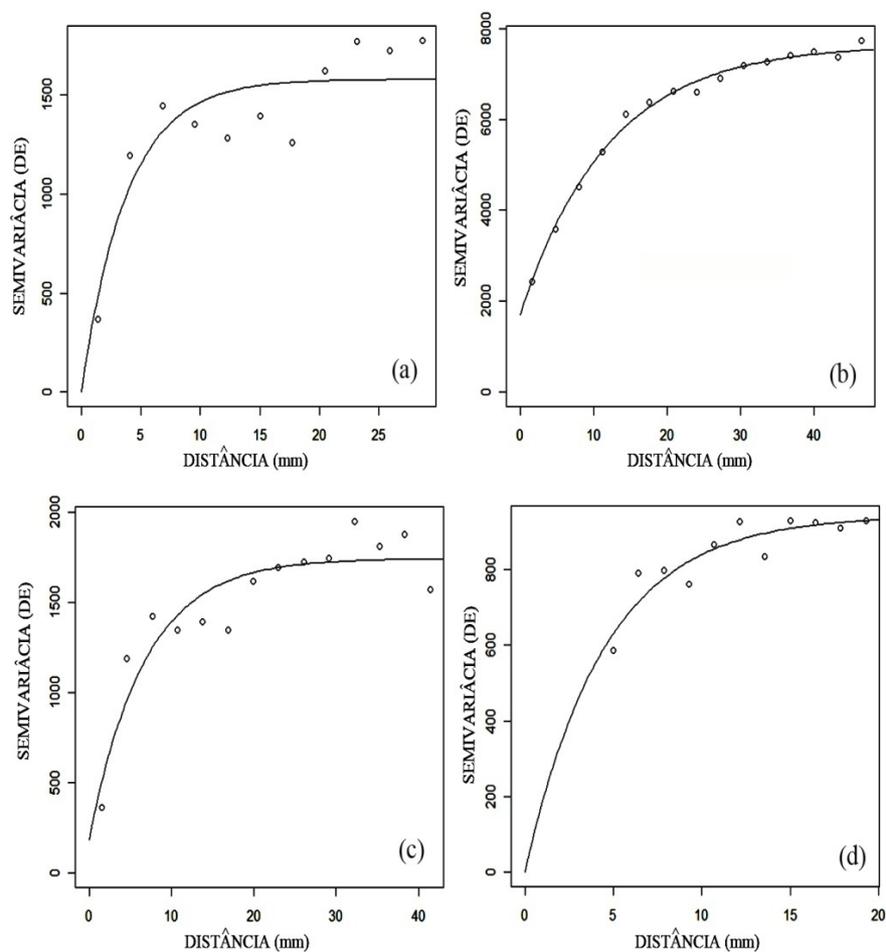
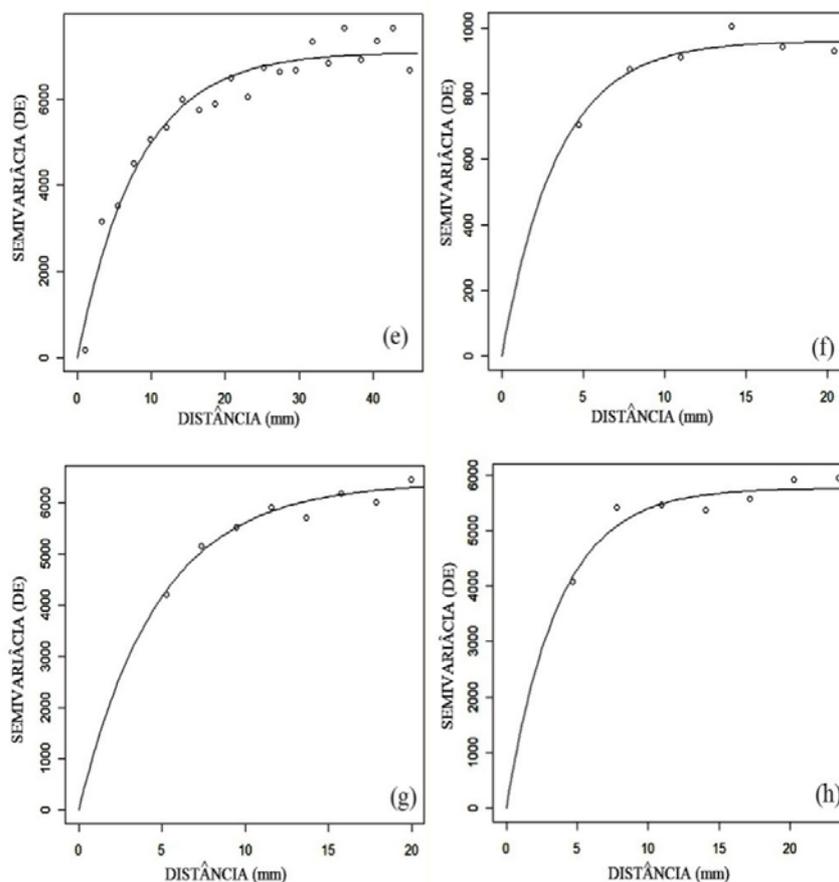


Figura 5 Semivariogramas teóricos ajustados para DE dos folíolos de Jatobá (curvas) e semivariogramas experimentais (pontos).
“Continua...”

Figura 5 “Cont.”



Na Tabela 2 são representados os ajustes dos parâmetros, onde é possível verificar o grau de dependência espacial, o qual foi estimado utilizando-se da relação entre a variação estruturada e o patamar (Dep. Esp.%). Segundo Cambardella et al. (1994), quando tal relação for maior ou igual a 75%, há uma forte dependência espacial. Seguindo tal classificação, a densidade estomática apresentou forte dependência espacial para todos os folíolos.

Exceto o folíolo b, que apresentou efeito pepita 1710, os demais folíolos apresentaram um baixo efeito pepita, entre 6,70 e 186,35. Estes resultados indicam a continuidade espacial dos dados na microescala.

A combinação de baixos valores para o efeito pepita e altos valores da variação estruturada (954,54 a 7641,03) é responsável pelos altos valores do índice de dependência espacial (89,31 a 99,87%).

Tabela 2 Estimativa dos parâmetros efeito pepita (τ^2), variação estruturada (σ^2), patamar ($\tau^2 + \sigma^2$), alcance (Θ) e da relação variação estruturada/patamar (Dep. Esp. %) para a densidade estomática (DE) de oito folíolos de Jatobá

FOLÍOLO	$\tau^2_{(DE)}$	$\sigma^2_{(DE)}$	$\tau^2 + \sigma^2$	$\Theta_{(mm)}$	Dep. Esp.(%)
A	6,70	1580,71	1587,41	6,00	99,57
B	1710,74	5930,29	7641,03	3,81	77,61
C	186,35	1556,89	1743,24	8,94	89,31
D	12,21	942,32	954,54	4,52	98,72
E	13,11	7087,83	7100,94	8,19	99,81
F	19,22	960,80	980,02	3,40	98,03
G	78,98	6393,16	6472,14	6,12	98,77
H	7,21	5786,33	5772,54	9,34	99,87

O alcance representado na Tabela 2 é chamado de alcance teórico, pois esse parâmetro real em modelos exponenciais é infinito (JOURNEL; HUIJBEREGTS, 1978). Desta forma, define-se como alcance prático três vezes o alcance teórico (JOURNEL; HUIJBEREGTS, 1978; MCBRATNEY; WEBSTER, 1986). Esse parâmetro de ajuste indica a distância máxima da estrutura de dependência espacial, o qual variou de 10,20 a 27,02mm.

Foram plotados semivariogramas direcionais (0°, 45°, 90° e 135°), onde pode-se observar um comportamento semelhante dos semivariogramas nas quatro direções (Figura 6). Esse tipo de comportamento do semivariograma direcional indica isotropia na distribuição da DE no limbo foliar, tendo a mesma estrutura de dependência espacial nas quatro direções (CRESSIE, 1993). Esse resultado reflete o crescimento bidirecional das folhas das Dicotiledôneas.

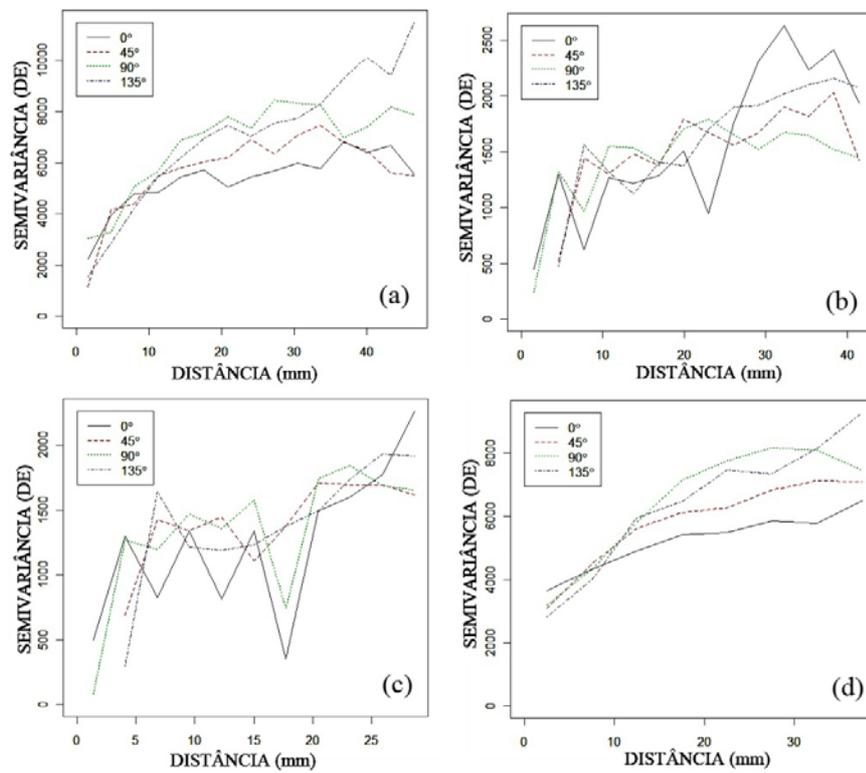
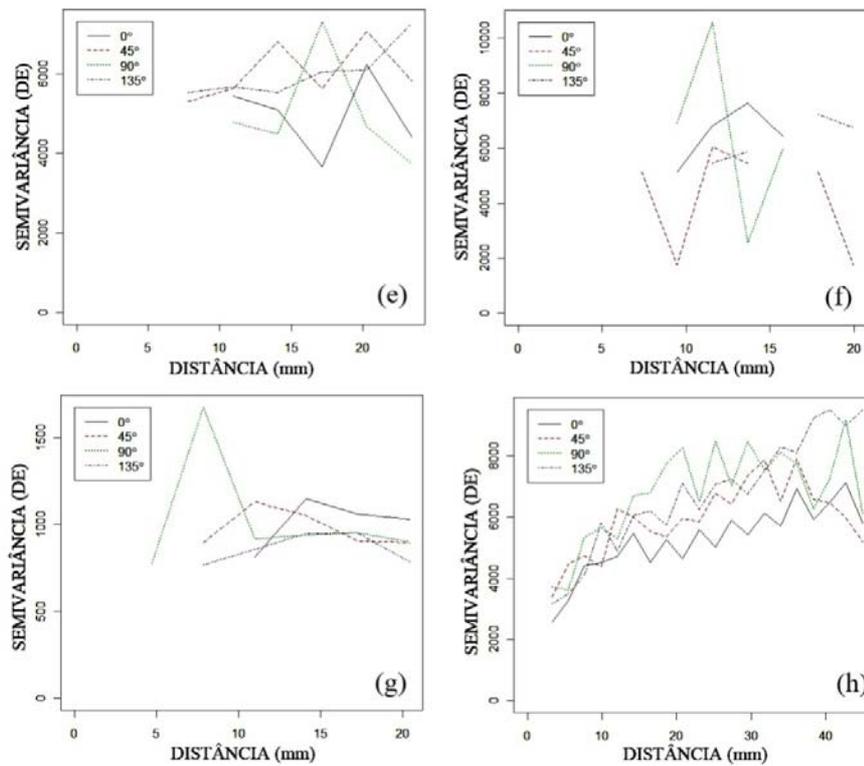


Figura 6 Avaliação da estrutura de dependência espacial em quatro direções (0° , 45° , 90° e 135°) nos folíolos de Jatobá
“Continua

Figura 6 “Cont.”



Utilizando os interpoladores gerados pelos modelos ajustados para cada base de dados, foram plotados mapas de Krigagem para melhor visualização da estrutura espacial da densidade estomática (Figura 7).

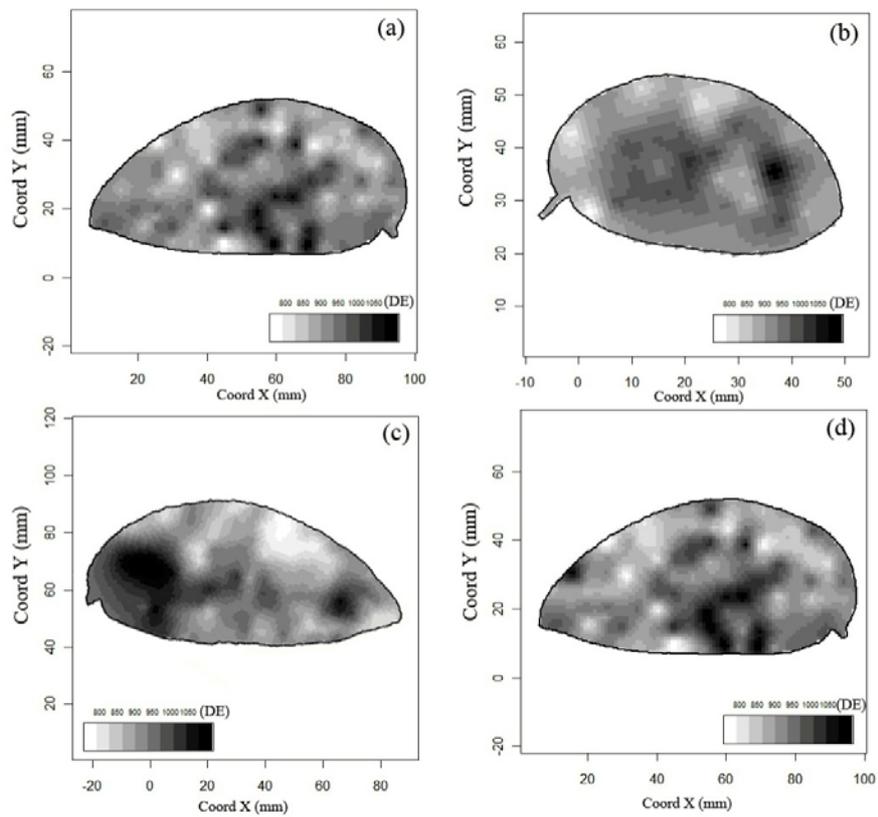
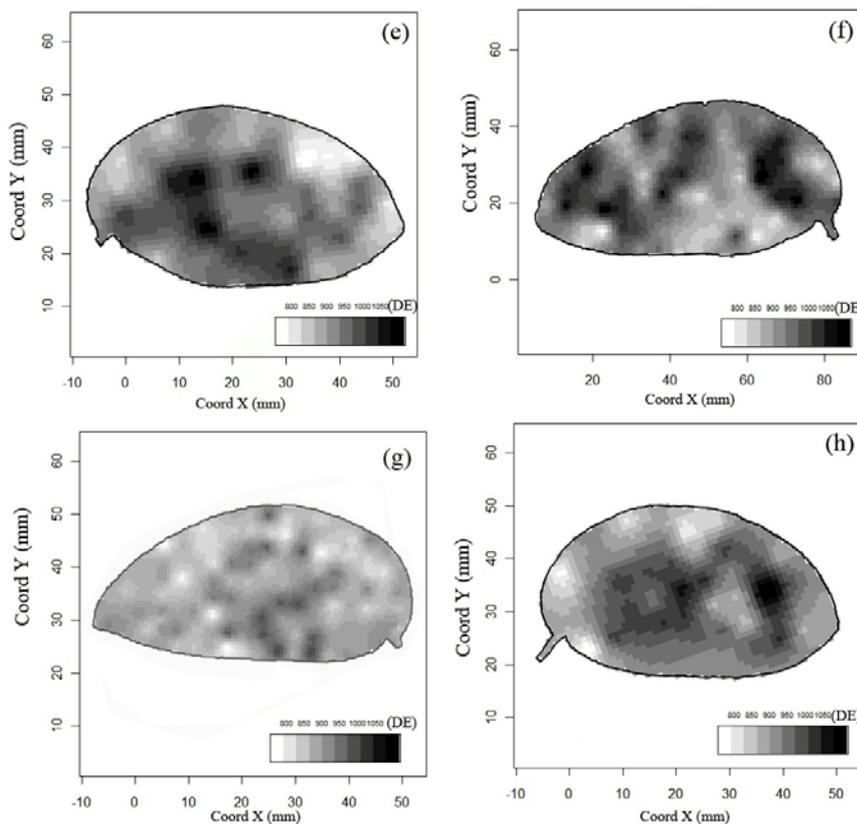


Figura 7 Mapas de Krigagem da densidade estomática obtidos para diferentes folíolos (a, b, c, d, e, f, g, h)
“Continua...”

Figura 7 “Cont.”



Ao comparar por teste de média os valores referentes à taxa de expansão das relações L1/A, L2/A e L3/A, não foram encontradas diferenças significativas. Esse resultado permite afirmar que os folíolos de *H. courbaril* possuem taxas de expansão semelhantes nos terços longitudinais (Tabela 3).

Tabela 3 Médias dos valores referentes à taxa de expansão foliar de três diferentes regiões do folíolo obtidas de 10 ramos em crescimento de Jatobá

RELAÇÕES	MÉDIAS
L1/A	0,0732 a
L2/A	0,0852 a
L3/A	0,0845 a

As médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

No entanto, ao comparar as médias dos valores referentes à taxa de expansão das relações $(L1e+L2e+L3e)/A$ (média 0,0631) e $(L1d+L2d+L3d)/A$ (média 0,1737) utilizando-se do teste de t , foi observada uma diferença significativa ($t=4,89085$ e $P<0,01$). Esse resultado indica que o lado direito do folíolo apresenta uma taxa de expansão significativamente maior que o lado esquerdo.

Ao aplicar a análise de correlação linear de Pearson, entre os valores referentes à taxa de expansão de cada lado do folíolo com o alcance teórico (Θ) do semivariograma, construído para cada lado dos folíolos, encontrou-se uma alta correlação positiva (0,84). Esse resultado indica uma forte relação entre a taxa de expansão e a estrutura da distribuição espacial dos estômatos.

Ao observar os resultados das análises geoestatísticas, é notável a falta de padrão da distribuição da densidade estomática em grande escala (Figura 7), contrariando os resultados encontrados por Poole et al. (1996) ao utilizar a interpolação bi-linear para plotagem de mapas da DE em folhas de *Alnus glutinosa* (L.).

No entanto, em pequenas escalas, foi detectado um claro padrão da estrutura espacial da densidade estomática (Figura 5). Tal resultado descarta a visão de uma total aleatoriedade na distribuição dos estômatos no limbo foliar descrita por Mott e Buckley (1998) como “heterogeneidade sistemática” em grandes escalas e “heterogeneidade aleatória” em pequenas escalas.

O padrão da distribuição da DE no limbo foliar em pequenas escalas indica a existência de fatores que colaboram para um padrão bem definido dessa característica, como fatores ontogênicos descritos por Nadeau e Sack (2002) em *Arabidopsis*. Porém, a falta de continuidade de tal padrão em grandes escalas pode ser um reflexo de fatores ambientais altamente instáveis e que possuem influência direta na DE, como radiação, umidade, temperatura, níveis de dióxido de carbono na atmosfera, disponibilidade hídrica e nutricional do solo, pela arquitetura interna e posição da folha (ASSMANN; WANG, 2001; CHEN et al., 2001; CROXDALE, 2000).

Tais fatores ambientais expressam suas variações ao longo do tempo e afetam uma característica fundamentalmente espacial. Essa relação tem sido utilizada para inferir processos temporais através de padrões espaciais. Porém, sendo o tempo uma variável unidimensional, tais inferências apenas podem ser feitas em órgãos que apresentem crescimento unidimensional, como raízes e folhas de Monocotiledôneas (GANDAR; HALL, 1988; PETERS; BERNSTEIN, 1997; SILK, 1992).

Granier e Tardieu (1998) afirmam que tais processos temporais não podem ser deduzidos de padrões espaciais em folhas de Dicotiledôneas, por essas apresentarem um crescimento bidimensional. No entanto, o procedimento de análise geoestatística mostrou-se capaz de identificar um padrão espacial bidirecional de um atributo resultante de processos temporais.

Considerando-se os resultados obtidos por Poole et al. (1996), ao avaliarem a densidade estomática e área foliar de *Alnus glutinosa* (L.), os resultados encontrados quando avaliado o padrão espacial da DE, em partes da folha, que apresentam diferentes taxas de expansão permitem afirmar a existência de uma relação entre a taxa de expansão e o arranjo espacial dos estômatos na superfície do limbo foliar. Tais resultados também são subsidiados pelo trabalho de Tardieu, Granier e Muller (1999), o qual modelou a expansão

foliar, sendo função da taxa de alongamento celular e taxa de divisão celular. Assim, sendo o processo de formação dos estômatos uma série de divisões assimétricas (NADEAU; SACK, 2002) espera-se que a taxa de expansão foliar interfira nesse processo.

Entretanto, no presente trabalho as avaliações da relação entre expansão foliar e estruturas espaciais dos estômatos foram feitas dentro da mesma folha. Assim, os resultados encontrados sugerem uma relação mais estreita no controle das duas características.

4 CONCLUSÕES

A densidade estomática em folhas de Jatobá mostrou ser uma variável com estrutura espacial bem definida em pequenas escalas, sendo o espaço uma significativa fonte de variação em dados amostrados de tal característica.

A geoestatística mostrou-se capaz de detectar e quantificar a fração da variância atribuída ao espaço em levantamentos de densidade estomática.

A homogeneidade da distribuição dos estômatos no limbo foliar é maior quando as folhas apresentam altas taxas de expansão, sendo que as duas características estão estreitamente relacionadas. Esse resultado sugere pontos de controle em comum entre padrão de distribuição e taxa de expansão.

REFERÊNCIAS

- AMZALLAG, G. N. Data analysis in plant physiology: are we missing the reality? **Plant, Cell and Environment**, Amsterdam, v. 24, n. 9, p. 881-890, Sept. 2001.
- ASSMANN, S. M.; WANG, X. Q. From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 4, n. 5, p. 421-428, Oct. 2001.
- BERGER, D.; ALTMANN, T. A. Subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. **Genes & Development**, New York, v. 14, n. 9, p. 1119-1131, May 2000.
- CAMBARDELLA, C. A. et al. Field scale variability of soil properties in central Iowa soils. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 58, n. 5, p. 1501-1511, Sept. 1994.
- CHEN, L. Q. et al. The stomatal frequency of extant and fossil Ginkgo leaves as biosensors of atmospheric CO₂ levels. **American Journal of Botany**, Stanford, v. 88, n. 7, p. 1309-1315, July 2001.
- CLARK, I. **Practical geostatistics**. London: Applied Science, 1979. 130 p.
- CRESSIE, N. **Statistics for spatial data**. New York: J. Wiley, 1993. 900 p.
- CRESSIE, N. The origins of kriging. **Mathematical Geology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 239-252, July 1989.
- CROXDALE, J. Stomatal pattern in angiosperms. **American Journal of Botany**, Stanford, v. 87, n. 8, p. 1069-1080, Aug. 2000.
- GANDAR, P. W.; HALL, A. J. Estimating position-time relationships in steady state one-dimensional growth zones. **Planta**, Heidelberg, v. 175, n. 1, p. 121-129, July 1988.
- GRANIER, C.; TARDIEU, F. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves: a common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. **Plant Physiology**, Cambridge, v. 116, n. 3, p. 991-1001, Mar. 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 28 mar. 2009.

JOURNEL, A. G.; HUIJBREGTS, C. J. **Mining geostatistics**. London: Academic, 1978. 600 p.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G. B.; ZAUGA, G. V. Transpiração de algumas plantas da caatinga aclimatadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro: comportamento de *Capparis Yco Mart*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 375-385, 1961.

MATHERON, G. Principles of geostatistics. **Economic Geology**, Littleton, v. 58, n.1, p.1246-1266, 1963.

MCBRATNEY, A. B.; WEBSTER, R. Choosing functions for semivariograms of soil properties and fitting them to sampling estimates. **Journal Soil Science**, Madison, v. 37, n. 4, p. 617-639, Dec. 1986.

MELLO, J. M. et al. Estudo da dependência espacial de características dendrométricas para *Eucalyptus grandis*. **CERNE**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 113-126, 2005.

NADEAU, J. A.; SACK, F. D. Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. **Science**, Columbus, v. 296, n. 5573, p. 1697-1700, June 2002.

OLIVEIRA, M. S.; CORREA, J. B.; CAMPOS, P. M. Programa interlaboratorial de controle de qualidade de análise de solo do estado de Minas Gerais (PROFERT-MG). **Boletim Informativo SBCS**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 18-23, 1995.

PETERS, W. S.; BERNSTEIN, N. The determination of relative elemental growth rate profiles from segmental growth rates. **Plant Physiology**, Cambridge, v. 113, n. 4, p. 1395-1404, Apr. 1997.

POOLE, I. et al. Variations in stomatal density and index: implications for paleoclimatic reconstructions. **Plant, Cell and Environment**, Amsterdam, v. 19, n. 6, p. 705-712, June 1996.

RIBEIRO JÚNIOR, P. J.; DIGGLE, P. J. The geor package functions for geostatistical data analysis: **R News**, Vienna, v. 1, n. 2, p. 15-18, 2001.

ROWLINGSON, B.; DIGGLE, P. Splancs: spatial point pattern analysis code in S-Plus. **Computers and geosciences**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 627-655, 1993.

SALISBURY, E. J. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. **Philosophical transactions of the royal society**, London, v. 216, p. 1-65, 1928.

SLAVIK, B. The distribution pattern of transpiration rate, water saturation deficit, stomata number and size, photosynthetic respiration rate in the area of the tobacco leaf blade. **Biologia Plantarum**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 143-153, June 1963.

SOUZA, G. M.; BUCKRIGE M. S. Sistemas complexos: novas formas de ver a botânica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 1-19, ago. 2004.

TARDIEU, F.; GRANIER, C.; MULLER, B. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate? **New Phytologist**, Cambridge, v. 143, n. 1, p. 33-43. July 1999.

ZONEAMENTO ECOLÓGICO ECONÔMICO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Disponível em: <<http://www.zee.mg.gov.br>>. Acesso em: 28 mar. 2009.

CAPÍTULO 3: Comparação de diferentes métodos de estimativa da densidade estomática em folhas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.)

RESUMO

Um método de amostragem e análise de atributos de estômatos, eficiente e padronizado, é fundamental para que essas informações possam contribuir para compreensão das respostas de plantas em diferentes escalas de tempo e espaço. Este trabalho visou comparar diferentes métodos de avaliação da densidade estomática e estabelecer um plano amostral para tal característica. Foram analisados três métodos de análise da densidade estomática, (i) média aritmética de uma amostra sistemática com grade regular de 5 x 5mm, (ii) média geoestatística dessa mesma amostra e (iii) método proposto por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961). Para isso, foi feito um estudo de caso utilizando folhas de Jatobá coletadas em três diferentes biomas brasileiros, Pantanal, Savana Brasileira e Mata Atlântica. Os resultados obtidos com o uso das médias geoestatísticas mostraram-se mais precisas por apresentar menor coeficiente de variação, 3,1, 3,2 e 3,8% para os biomas Mata Atlântica, Pantanal e Savana Brasileira respectivamente, seguido do método que utilizou as médias aritméticas (8,4, 10,5 e 11,2%) e o método descrito por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961) (16,5, 18,0 e 17,4%).

Palavras-chave: Estômatos. Geoestatística. Jatobá. Amostragem.

ABSTRACT

Stomata are structures that are functionally essential to terrestrial plants, and traits linked to this structure are very important for describing the behavior of plants under different environmental conditions. Thus, a process of sampling and analysing standardized data can be of great value both for research aimed at investigating a particular species, and for studies of meta-analysis. This study is aimed at comparing different methods for surveying stomatal density and establishing a sampling plan for this trait. We analyzed three stomatal survey techniques: (i) the arithmetic mean of a systematic sample with a regular grid of 5x5mm (ii) the geostatistic mean of the same data and (iii) a method proposed by Labouriau, Oliveira e Zauga (1961). A case study was conducted using Jatobá leaves collected in three different Brazilian biomes: the Pantanal, the Brazilian savannah and the Atlantic Forest. The results obtained through the geo-statistical mean method were more accurate and resulted in a lower coefficient of variation, 3.1, 3.2 and 3.8% for the Atlantic Forest, Pantanal and Brazilian savannah respectively, followed by the arithmetic mean method (8.4, 10.5 and 11.2%) and Labouriau, Oliveira e Zauga (1961) (16.5, 18.0 and 17.4%).

Key-words: Estomata. Geoestatistic. Stomatal density. Jatobá.

1 INTRODUÇÃO

A anatomia foliar é conhecida por ser altamente plástica às alterações dos fatores ambientais como irradiância (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 1998), nutrientes (JOKELA; SARJALA; HUTTUNEN, 1998), seca (BOSABALIDIS; KOFIDIS, 2002), ozônio (OKSANEN et al., 2004), concentrações de dióxido de carbono (BEERLING; WILLIAM; CHALONER, 1993), umidade, temperatura, arquitetura interna e posição da folha (ASSMANN; WANG, 2001; CHEN et al., 2001; CROXDALE, 2000). Devido a essa plasticidade às mudanças ambientais, atributos anatômicos de folhas são frequentemente utilizados como indicadores do funcionamento de plantas expostas a diversas pressões ambientais.

Em estudos referentes à fotossíntese, a densidade estomática (estômatos por unidade de área) é de especial interesse, pois esse atributo oferece informações acerca da condutância estomática (g_s) máxima, a qual afeta o ganho de carbono e a eficiência no uso da água pelas plantas (BEERLING; WILLIAM; CHALONER, 1997). Desta forma, é de se esperar que modificações na densidade estomática sejam acompanhadas de alterações, em diferentes níveis e escalas anatômicas e fisiológicas nas plantas, refletindo a clara relação “forma/função” observada em todos os seres vivos.

Os estômatos estão envolvidos em dois dos mais importantes processos que ocorrem em todas as plantas terrestres, fotossíntese e transpiração. Em pequeno intervalo de tempo, abrindo e fechando os estômatos, as plantas terrestres são capazes de ajustar suas trocas gasosas para satisfazer as condições ambientais e fisiológicas (SCHLUTER et al., 2003). A segunda estratégia empregada pelas plantas para adaptar as constantes mudanças ambientais é modular a frequência, na qual os estômatos se formam em novos órgãos, sendo esse um evento de longo termo. Mudanças na frequência em que os estômatos são formados podem ser expressas na forma de densidade estomática ou como

índice estomático, a relação do número de estômatos por número de células epidérmicas (CASSON; GRAY, 2008).

A densidade estomática de uma dada folha é determinada por dois fatores: (i) a proporção de células epidérmicas em desenvolvimento que se diferenciam em estômatos; (ii) o nível de expansão das células epidérmicas (BEERLING; WILLIAM; CHALONER, 1993). O primeiro fator pode ser medido, isoladamente, através do índice estomático, ou seja, isolado da influência da expansão das células da epiderme (TICHÁ, 1982). O segundo fator influencia fundamentalmente no espaço entre estômatos, ocupado pelas células epidérmicas (BEERLING; WILLIAM; CHALONER, 1993). Dessa forma, todas as folhas completamente expandidas de uma mesma planta exibem um gradiente ontogênico e espacial da densidade estomática (TICHÁ, 1982).

Mesmo sendo esse fato conhecido há algum tempo (SALISBURY, 1928; SLAVIK, 1963), raramente publicações descrevem o número, a localização e a área dos sítios amostrados na superfície das folhas (POOLE, 1996). Essas publicações em geral não consideram a existência de variações da densidade e índice estomáticos dentro de uma mesma folha e quando essas informações são fornecidas não são claros os critérios utilizados para tal.

Habitualmente, o número e a área das unidades amostrais são definidos pela conveniência operacional da amostragem; tamanho da folha, resolução do microscópio e quantidade de material botânico disponível. Assim, o esforço amostral é geralmente maior em folhas pequenas que em folhas grandes. Sendo esses fatores definidos por cada pesquisador, não há um método estabelecido que permita a comparação de resultados em diferentes trabalhos. Labouriau, Oliveira e Zauga (1961) definem um método de amostragem em epidermes de folhas, o qual vem sendo amplamente utilizado. No entanto, esse método não considera o caráter espacial dessas características.

Para se padronizar o esforço amostral em folhas de diferentes espécies, com forma, tamanho e níveis de organização diferentes é necessário um estudo prévio do comportamento da estrutura espacial da característica a ser avaliada e um tratamento dos dados que seja adequado à forma de amostragem.

Através de uma análise geoestatística das características que possuem variações ao longo da superfície foliar (espaço), é possível detectar padrões de distribuição das mesmas. Em posse dessa informação, é possível elaborar um plano amostral adequado para cada espécie. Nesse contexto, o presente trabalho visou estabelecer um procedimento que permita elaborar um plano amostral da densidade estomática, por meio de um estudo de caso em folhas de Jatobá (*H. courbaril* L.).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sítios

Foram avaliados indivíduos de Jatobá (*H. courbaril* L.) em três diferentes sítios localizados em diferentes biomas brasileiros. O sítio (M) que representa o bioma Mata Atlântica está localizado no município de Poços de Caldas - MG (21°44'38'' Sul, 46°28'16'' Oeste). O sítio (P) representa o bioma Pantanal e está localizado no município de Aquidauana - MS (20°27'53'' Sul, 55°42'27'' Oeste). O sítio (S) representa o bioma Savana Brasileira e está localizado no município de Candeias - MG (20°44'31'' Sul, 45°10'44'' Oeste).

2.2 Material vegetal

Foram coletadas duas folhas livres de ataques de herbívoros e patógenos de cada indivíduo de *H. courbaril*, sendo quatro indivíduos por sítio. Para padronização da coleta foram selecionadas as primeiras folhas completamente expandidas a partir do ápice de ramos do topo do dossel das árvores.

As folhas coletadas foram fixadas em álcool 70%. Posteriormente, no laboratório de anatomia vegetal do Setor de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), foram feitas impressões epidérmicas da superfície abaxial das folhas, utilizando adesivo instantâneo universal éster de cianoacrilato (Super-Bonder®). Esse material deu origem a lâminas descartáveis das impressões.

Os pontos da folha a serem amostrados foram definidos sistematicamente através de uma grade amostral de 5 x 5mm com conglomerados de 2,5 x 2,5mm e cada ponto amostrado foi referenciado em um plano cartesiano de acordo com estudos preliminares (Figura 2). As lâminas

obtidas foram fotografadas no microscópio de luz (Olympus CBB) com câmera fotográfica digital (Canon A-630). Cada campo amostrado (unidade amostral básica) possui uma forma retangular de 0,768 x 0,576mm, sendo 0,442mm² a área de cada campo (Figura 8). Com auxílio do *software* ImageTool®, foi realizada a contagem dos estômatos em cada campo amostrado.

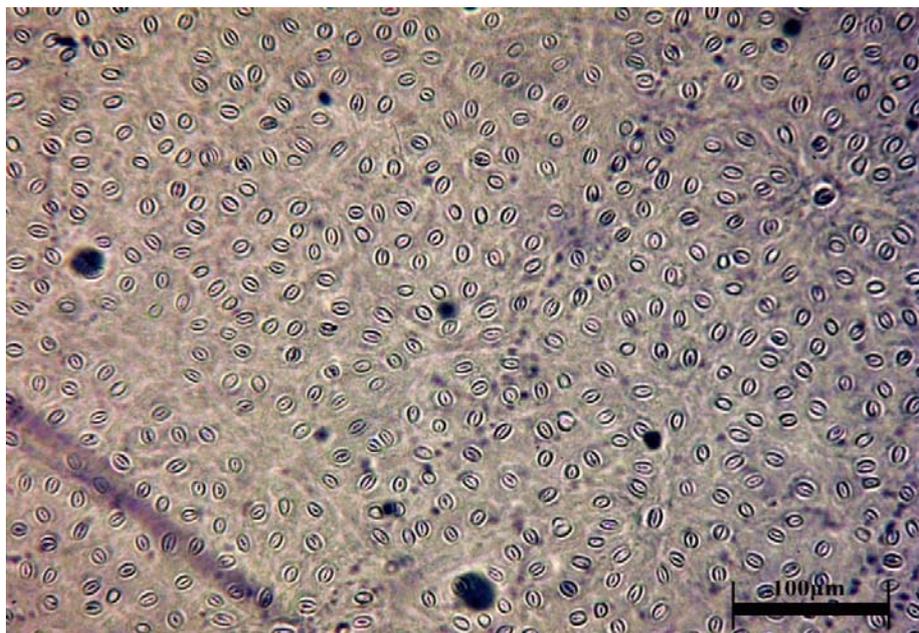


Figura 8 Fotografia digital de um ponto amostral da folha representando a unidade amostral básica

Sendo o método de impressão epidérmica não destrutivo, foi possível coletar amostras das mesmas folhas utilizando o método descrito por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961).

2.3 Tratamento dos dados

Foi realizada uma análise geoestatística dos dados coletados, onde foi estimada a densidade estomática média de cada folha. Posteriormente, as médias

estimadas da densidade estomática das folhas dos indivíduos foram submetidas a um teste de médias (Scott Knott a 0,05), comparando os sítios M, P e S.

Foi calculada média aritmética da densidade estomática de cada folha, a partir de todos os dados coletados para a análise geoestatística. Através de um teste de médias (Scott-Knott a 0,05), os sítios foram comparados utilizando as médias aritméticas. A mesma operação foi repetida utilizando os dados levantados de acordo com o método proposto por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961).

Foi calculado o coeficiente de variação (CV) das médias obtidas pelos três métodos dentro de cada sítio, a fim de detectar qual método foi capaz de isolar mais fontes de variação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando comparados através do teste de médias os valores das densidades estomáticas das folhas, obtidas pelo tratamento geoestatístico, pode-se observar diferenças significativas, entre os sítios amostrados, sendo que o sítio representante do bioma Mata Atlântica (M) apresentou maior média da densidade estomática (308,2), seguidos dos sítios P (284,1) e S (273,0) (Tabela 4).

No entanto, ao realizar o mesmo teste com as médias aritméticas das mesmas amostras utilizadas nas análises geoestatísticas não houve diferença significativa das médias da densidade estomática das folhas dos sítios S e P, havendo diferença significativa apenas do sítio M para os sítios S e P (Tabela 4).

Os resultados para o teste de médias dos valores obtidos pelo método de Labouriau, Oliveira e Zauga (1961) não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 4 Teste de médias comparando as médias das densidades estomáticas (estômatos mm^{-2}) das folhas entre os sítios M, P e S, com as médias obtidas por diferentes métodos (método descrito por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961), média aritmética da amostragem sistemática e média estimada através do tratamento geoestatístico)

	Labouriau (estômatos mm^{-2})	Média aritmética (estômatos mm^{-2})	Média geoestatística (estômatos mm^{-2})
Sítio M	294,7 a	307,5 a	308,2 a
Sítio P	290,5 a	276,7 b	284,1 b
Sítio S	254,1 a	261,0 b	273,0 c

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Ao calcular o coeficiente de variação (CV) da densidade estomática dos valores obtidos para cada método em cada sítio, observou-se que os dados levantados e estimados pelo método geoestatístico apresentou menor coeficiente

de variação nos três sítios, sendo 3,1%, 3,2% e 3,8% para os sítios M, P e S, respectivamente. O coeficiente de variação dos dados obtidos pelo método proposto por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961) apresentou o maior coeficiente de variação em todos os sítios, sendo 16,5%, 18,0% e 17,4% para os sítios M, P e S, respectivamente. Os valores do coeficiente de variação para as médias aritméticas dos dados levantados para a análise geoestatística foram 8,4%, 10,5% e 11,2% para os sítios M, P e S, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 Coeficiente de variação (CV) e médias da densidade estomática (estômatos mm^{-2}) estimadas pelo método geoestatístico (Geo), método descrito por Labouriau (1961) (Lab) e média aritmética dos dados amostrados sistematicamente (Med. Ar.) das folhas coletadas nos sítios M, P e S

Método	sítio M			sítio P			sítio S		
	Geo	Lab	Med. Ar.	Geo	Lab	Med. Ar.	Geo	Lab	Med. Ar.
Média(DE)	308.3	294.8	307.5	284.0	290.5	282.7	273.0	254.1	261.0
CV (%)	3,1	16,5	8,4	3,2	18,0	10,5	3,8	17,4	11,2

Ao observar os resultados obtidos nos testes de média (Tabela 4), nota-se que há diferença na precisão do teste, quando são usados dados amostrados através de diferentes métodos. Quando se utilizou o método proposto por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961), a amostragem foi aleatória com apenas 4 amostras por folha. O baixo esforço amostral (número de amostras por folha) provocou maior variância na densidade estomática de folhas coletadas no mesmo local. Este fato não permitiu que o teste de médias diferenciasse a densidade estomática de plantas que cresceram em ambientes onde vários fatores que interferem na densidade estomática são distintos.

Quando observados os resultados do teste de médias, para as médias aritméticas da densidade estomática de cada folha obtida da amostragem realizada sistematicamente (Tabela 4), há menor variância em relação aos dados obtidos pelo método descrito por Labouriau, Oliveira e Zauga (1961), pois com

esses dados o teste de médias foi capaz de diferenciar o Sítio M dos demais. Considerando-se que o tratamento dos dados obtidos por esses dois métodos foi o mesmo, pode-se inferir que o método de coleta dos dados influencia fortemente nos resultados. Considerando ainda que o esforço amostral e a disposição das unidades amostras (aleatória e sistemática) é o que diferencia os dois métodos, fica claro que um dos dois fatores ou os dois, operando em conjunto levaram a amostragem sistemática a ser mais eficiente.

A heterogeneidade da distribuição dos estômatos na superfície da folha é um fator que deve ser considerado, quando se realiza o levantamento por amostragem dessa característica, a fim de aumentar a precisão da estimativa (POOLE et al., 1996). Dessa maneira, quando a amostragem foi realizada em toda a folha utilizando uma grade de amostras de 5 x 5mm e aglomerados de 2,5 x 2,5mm (Figura 9), foi possível eliminar parte dessa fonte de variação, o que foi demonstrado pela precisão do teste de médias e pelo coeficiente de variação da densidade estomática das folhas de mesmo sítio, expressivamente menor para os dados obtidos através da amostragem sistemática (Tabela 5).

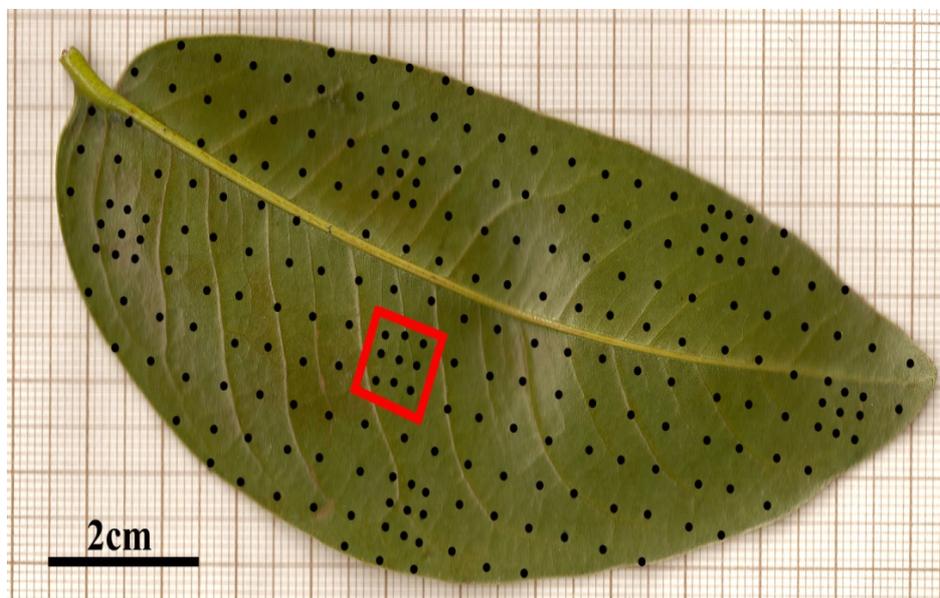


Figura 9 Grade amostral de 5x5mm com conglomerados de 2,5x2,5mm (no interior do quadrado) demarcada no folíolo de Jatobá

Considerando que a expansão foliar e a densidade estomática são funções da expansão das células epidérmicas (BEERLING; WILLIAM; CHALONER, 1993; GRANIER, 1998) e que a expansão foliar apresenta diferenças ao longo da folha (GRANIER; TARDIEU, 1998), fica clara a existência de mecanismos que geram um padrão na distribuição espacial dos estômatos na folha. Dessa forma, a análise geoestatística foi capaz de detectar tais padrões, eliminando, assim, a variância gerada pelo espaço, o que foi comprovado quando se realizou o teste de médias com os dados gerados pela análise geoestatística, a qual diferenciou a densidade estomática de todos os sítios (Tabela 4). O mesmo pode ser observado quanto ao coeficiente de variação dos dados geoestatísticos, os quais foram menores que os demais métodos (Tabela 5).

É importante ressaltar que mesmo com diferentes coeficientes de variação e diferentes médias dentro dos sítios dos diferentes métodos, a ordem crescente da densidade estomática nos sítios foi mantida ($S < P < M$) em todos os métodos. Essa informação demonstra que as três formas de levantamento de dados, de alguma forma descreveram a realidade, havendo diferença apenas na variância inclusa nos dados. No entanto, ao aplicar um teste de médias, essa variância passa a ter um papel decisivo nos resultados, pois ela permite ou não o teste diferenciar as médias.

Ao utilizar análise de variância para o tratamento de dados é necessário seguir a premissa de que os dados são independentes, (um evento deve ser independente dos outros) (TRIOLA, 1999). Dessa forma, para seguir a formalidade estatística na análise da densidade estomática, é necessário que as amostras sejam realizadas a uma distância que garanta sua independência. No caso da espécie *H. courbaril* L., a geoestatística determina que essa distância seja de no mínimo 18 mm, de acordo com estudos preliminares, pois, análises que não consideram a dependência dos dados em parcelas com espaçamento menor que 18 mm perdem qualidade da estimativa (MELLO et al., 2005).

Tendo em vista o exposto, a necessidade de um planejamento amostral de índice estomático, densidade estomática e células epidérmicas devem considerar o caráter espacial dos dados. Para tal, uma análise da dependência espacial mostra-se bastante eficiente, pois fornece um parâmetro que determina a distância máxima da dependência espacial.

O levantamento dessas variáveis através de análises geoestatísticas fornece uma informação com grande nível de precisão, no entanto exige um grande esforço amostral. Dessa forma, existem duas alternativas viáveis no levantamento de características da superfície foliar: (i) analisar previamente uma pequena quantidade de folhas geoestatisticamente, de acordo com o método descrito no capítulo anterior, obtendo-se assim informações acerca da distância

máxima que um ponto possui influência sobre outro (alcance) e estabelecendo uma grade amostral com tal distância, para uma posterior análise convencional dos dados (ANAVA e teste de médias); (ii) realizar toda a análise de acordo com o método descrito no capítulo anterior, sendo esse indicado para casos onde a variação entre tratamentos da característica analisada não é tão pronunciada.

4 CONCLUSÕES

A realização de um plano amostral para características da superfície foliar é necessária pra que heterogeneidades espaciais sejam consideradas na análise no caso da geoestatística ou para contemplar as formalidades exigidas pela estatística probabilística.

O método de levantamento de estômatos mais eficiente foi o que utilizou a geoestatística, no entanto é possível melhorar a qualidade do levantamento utilizando esse método apenas para definir um plano amostral.

Mesmo sendo o mecanismo de formação de estômatos semelhante em Dicotiledôneas, é necessário que o estudo seja repetido em diferentes espécies, para tal comportamento ser confirmado. Além disso, tal repetibilidade pode auxiliar na sistematização de grupos funcionais de plantas quanto a respostas anatômicas às modificações no ambiente.

REFERÊNCIAS

ASSMANN, S. M.; WANG, X. Q. From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 4, n. 5, p. 421-428, Oct. 2001.

BEERLING, D. J. Carbon isotope discrimination and stomatal responses of mature *Pinus sylvestris* L. trees exposed in situ for three years to elevated CO₂ and temperature. **Acta Oecologica**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 697-712, Nov. 1997.

BEERLING, D. J.; WILLIAM, G.; CHALONER, F. R. S. Evolutionary responses of stomatal density to global CO₂ change. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 48, n. 4, p. 343-353, May 1993.

BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, Ireland, v. 163, n. 2, p. 375-379, 2002.

CASSON, S.; GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 9-23, Feb. 2008.

CHEN, L. Q. et al. The stomatal frequency of extant and fossil ginkgo leaves as biosensors of atmospheric CO₂ levels. **American Journal of Botany**, Springfield, v. 88, n. 7, p. 1309-1315, July 2001.

CROXDALE, J. Stomatal pattern in angiosperms. **American Journal of Botany**, Springfield, v. 87, n. 8, p. 1069-1080, Aug. 2000.

JOKELA, A.; SARJALA, T.; HUTTUNEN, S. The structure and hardening status of Scots pine needles at different potassium availability levels. **Trees**, Berlin, v. 12, n. 8, p. 490-498, Aug. 1998.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G. B.; ZAUGA, G. V. Transpiração de algumas plantas da caatinga aclimatadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Comportamento de *Capparis Yco* Mart. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 375-385, 1961.

LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. New York: Springer, 1998. 540 p.

MELLO, J. M. et al. Estudo da dependência espacial de características dendrométricas para *Eucalyptus grandis*. **CERNE**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 113-126, 2005.

OKSANEN, E. et al. Ozoneinduced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 3, p. 791-799, Mar. 2004.

POOLE, I. et al. Variations in stomatal density and index: implications for paleoclimatic reconstructions. **Plant, Cell and Environment**, Amsterdam, v. 19, n. 6, p. 705-712, June 1996.

SALISBURY, E. J. On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 216, n. 1, p. 1-65, Jan. 1928.

SLAVIK, B. The distribution pattern of transpiration rate, water saturation deficit, stomata number and size, photosynthetic respiration rate in the area of the tobacco leaf blade. **Biologia Plantarum**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 143-153, June 1963.

TICHÁ, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves: stomatal density and size. **Photosynthetica**, Amsterdam, v. 16, p. 375-471, 1982.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 410 p.