

Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Fernanda Moreira Gianasi
Rubens Manoel dos Santos
(Organizadores)

Manual para padronização de coleta, triagem e tratamento dos dados de características funcionais de plantas

Manual para padronização de coleta, triagem e tratamento dos dados de características funcionais de plantas

**Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Fernanda Moreira Gianasi
Rubens Manoel dos Santos**
(Organizadores)

Manual para padronização de coleta, triagem e tratamento dos dados de características funcionais de plantas



Lavras
2022

© Editora UFLA 2022 by Nathalle Cristine Alencar Fagundes, Fernanda Moreira Gianasi, Rubens Manoel dos Santos (Organizadores).

Este livro é de uso livre e gratuito e pode ser copiado na íntegra ou em partes, desde que se cite a fonte. Qualquer dúvida ou informações, entre em contato conosco pelo e-mail: editora@editora.ufla.br

O conteúdo desta obra, além de autorizações relacionadas à permissão de uso de imagens e/ou textos de outro(s) autor(es), é de inteira responsabilidade do(s) autor(es) e/ou organizador(es). Direitos de publicação reservados à Editora UFLA.

Impresso no Brasil - ISBN: 978-65-86561-20-3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

Reitor: João Chrysóstomo de Resende Júnior

Vice-Reitor: Valter Carvalho de Andrade Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Luciano José Pereira

UNIDADE RESPONSÁVEL PELA EDIÇÃO DO LIVRO

Conselho editorial responsável pela aprovação da obra:

Marco Aurélio Carbone Carneiro (Presidente), Nilton Curi (Vice-Presidente),

Francisval de Melo Carvalho, Alberto Colombo, João Domingos Scalon, Wilson Magela Gonçalves

Referências Bibliográficas: Mídia Revisões

Revisão de Texto: Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade

EXPEDIENTE EDITORA UFLA

Flávio Monteiro de Oliveira (Diretor)

Alice de Fátima Vilela

Damiana Joana Geraldo Souza

Késia Portela de Assis

Marco Aurélio Costa Santiago

Patrícia Carvalho de Morais (Vice-Diretora)

Renata de Lima Rezende

Vítor Lúcio da Silva Naves

Walquíria Pinheiro Lima Bello

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Universitária da UFLA

Manual para padronização de coleta, triagem e tratamento dos dados de características funcionais de plantas / Nathalle Cristine Alencar Fagundes, Fernanda Moreira Gianasi, Rubens Manoel dos Santos, organizadores. – Lavras : UFLA, 2022.

105 p. : il. ; 21 cm.

Bibliografia.

1. Ecologia funcional. 2. Anatomia ecológica. 3. Trade-offs em plantas. 4. Functional traits. 5. Diversidade funcional. I. Fagundes, Nathalle Cristine Alencar. II. Gianasi, Fernanda Moreira. IV. Santos, Rubens Manoel dos. V. Universidade Federal de Lavras.

CDD – 580.74

Ficha elaborada por Eduardo César Borges (CRB 6/2832)



EDITORA UFLA

Campus Universitário da UFLA, Andar Térreo do Centro de Eventos, Cx. Postal 3037,

CEP 37200-900 - Lavras/MG, Tel: (35) 3829-1532 - (35) 3829-1551

E-mail: editora@ufla.br, Homepage: www.editora.ufla.br

Às árvores, nosso objeto de estudo,
inspiração e admiração.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por tornarem nossas pesquisas possíveis através do apoio e financiamento à Ciência e Tecnologia no país, mais precisamente no Estado de Minas Gerais, bem como pela concessão de bolsas, financiamentos e insumos que sustentam financeira e tecnologicamente a pós-graduação e os pós-graduandos. À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo apoio logístico, humano e tecnológico, à Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), e ao Programa de Bolsas de Produtividade em Pesquisa (PQ/UEMG) pelo apoio.

A todos os membros do Laboratório de Fitogeografia e Ecologia Evolutiva da UFLA, pelos longos e divertidos trabalhos de campo e de laboratório, que inspiraram a escrita deste livro. Aos nossos familiares, companheiros (as) e amigos (as), que compreenderam nossa paixão pela ciência, nossos anseios pelas descobertas nesse âmbito, e, por essa compreensão, suportaram nossas inúmeras ausências.

A todos aqueles que apoiam a universidade pública, gratuita e de qualidade, que valorizam o ensino e a pesquisa, que pautam suas decisões na ciência e entendem que estes são caminhos para uma sociedade argumentativa, consciente e justa.

Sumário

Apresentação	9
Introdução	11
1. Contextualizando as características funcionais	12
1.1. Referências	15
2. Características funcionais: de indivíduos a ecossistemas	17
2.1. Implicações adaptativas, na história de vida e nos <i>trade-offs</i> a nível de indivíduo	18
2.2. O papel do ambiente na seleção das características funcionais e <i>trade-offs</i>	21
2.3. Características funcionais: implicações na ecologia das comunidades vegetais	22
2.3.1. Filtragem ambiental e estruturação de comunidades	22
2.3.2. Similaridade limitante e estruturação de comunidades vegetais	23
2.3.3. Similaridade limitante <i>versus</i> filtro ambiental: o papel da escala de paisagem	24
2.4. Referências	25
3. Coleta de campo, triagem e mensuração das principais características funcionais	29
3.1. A escolha dos indivíduos	30
3.2. Padronização das coletas e quantidade coletadas	30
3.3. Procedimentos pós-coleta e triagem - mensuração do material	32
3.4. Principais características funcionais	35
3.4.1. Características funcionais foliares	35
3.4.2. Características funcionais mensuradas nos galhos	38
3.5. Referências	43
4. Confeção de lâminas anatômicas	44
4.1. Preparação das amostras	46
4.2. Seccionamento com micrótomo	46
4.3. Formulação e preparo de Gelatina Glicerínada	48
4.4. Clarificação e técnicas de coloração	49
4.5. Montagem das lâminas anatômicas	52
4.6. Armazenamento das lâminas anatômicas	54
4.7. Referências	54
5. Obtenção e tratamento de imagens	55
5.1. Obtenção de imagens para área foliar	56
5.1.1. Uso do scanner	57

5.2. Obtenção de imagens de lâminas anatômicas	60
5.3. Referências	62
6. Programas de análises de imagens e mensuração dos dados anatômicos	63
6.1. Utilizando o ImageJ para mensuração de área foliar	64
6.1.1. Casos especiais	70
6.2. Mensurando as características funcionais relativas aos vasos xilemáticos	74
6.2.1. Criação da escala	74
6.2.2. Preparando as imagens no GIMP	78
6.2.3. Utilizando o ImageJ	82
6.3. Referências	87
7. Métodos de análise de características funcionais para estudos ecológicos em comunidades	88
7.1. Tabulação de dados de características funcionais	89
7.2. Lidando com problemas posteriores à coleta de dados	93
7.2.1. Dados faltantes	93
7.2.2. Valores inválidos	96
7.3. Obtenção de métricas de diversidade funcional em comunidades	96
7.3.1. Construção de planilhas para obtenção das métricas	97
7.4. Métricas de diversidade funcional do pacote “FD” do programa R	100
7.4.1. Recomendações adicionais	102
7.5. Referências	102
Dados dos autores	104

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista de características funcionais hidráulicas mensuradas nas folhas	39
Tabela 2. Lista de características funcionais mensuradas nos galhos	42

Apresentação

O estudo das características funcionais tem se tornado um tópico cada vez mais constante nas pesquisas ecológicas. Esta crescente está relacionada às mudanças de paradigma do olhar ecológico: a percepção do papel funcional das espécies como um importante componente da biodiversidade. O desenvolvimento das métricas de diversidade funcional tem gerado boas respostas às mais diferentes questões, melhorando a capacidade preditiva sobre os eventos ecológicos.

O primeiro passo a ser pensado em qualquer estudo de diversidade funcional é a escolha das características funcionais relevantes para responder aos objetivos do estudo. Mas afinal, o que são as características funcionais? Para iniciar esta discussão, que será melhor abordada durante os capítulos seguintes, precisamos enfatizar a escolha do termo “características funcionais” em detrimento de “traços funcionais”. Embora seja recorrente a utilização da expressão “traço funcional” em textos escritos na língua portuguesa, como uma tradução literal do termo em inglês “*functional trait*”, neste material foi adotada a expressão “característica funcional” por se julgar que esta traduz de forma mais consistente e objetiva o significado de “*functional trait*”. Em português, o termo “traço” tem mais de um significado, designando tanto um caráter ou qualidade, quanto vestígio, rastro ou sinal, entre outros termos, o que poderia levar a uma confusão semântica. Portanto, o uso de “característica funcional” é preferível, já que faz uma referência clara a algo que caracteriza, que é inerente e peculiar à natureza do que é estudado.

Após decidida a pergunta ecológica a ser respondida e quais as características funcionais mais relevantes para esse propósito, o próximo passo é definir como obter essas características de forma padronizada e evitando-se o mínimo de erros possíveis. Nesse sentido, práticas metodológicas estão sendo desenvolvidas para padronização de coleta, triagem e tratamento dos dados na ecologia vegetal. As publicações de Cornelissen *et al.* (2003), Pérez-Harguindenguy *et al.* (2013), e mais recentemente, Wigley *et al.* (2021), são consideradas marcos metodológicos importantes de protocolos de coleta aplicáveis a uma gama de situações e contextos geográficos. Entretanto, muitas vezes a literatura disponível não supre as demandas de processos metodológicos nos passos pós-coleta do material botânico. Por exemplo, quais os procedimentos de anatomia vegetal básicos para produção de lâminas anatômicas? Como gerar e tratar as imagens obtidas a partir de lâminas anatômicas? Quais alternativas são possíveis quando não se têm equipamentos e programas sofisticados em mãos?

Essas questões, embora simples para pessoas familiarizadas com os procedimentos básicos na obtenção das características funcionais, podem se apresentar como um empecilho para iniciantes no assunto, devido à inexistência de literatura que contemple esta parte metodológica pós-coleta de maneira específica e didática.

Outra questão-chave para a iniciativa de elaboração deste livro está justamente na ausência de um material em língua portuguesa que aborde de forma simplificada diferentes práticas utilizadas para obtenção de diferentes características funcionais. Portanto, neste livro, os autores se dedicaram a reunir e padronizar os mais diferentes procedimentos metodológicos de coleta, triagem e tratamento de dados para obtenção das características funcionais mais comumente utilizadas nas pesquisas ecológicas, oferecendo alternativas relativamente fáceis e baratas de mensuração para um grande número de espécies vegetais, que apresentam um forte poder preditivo de respostas importantes do ecossistema. Além disso, também é oferecida uma breve introdução às metodologias de análises estatísticas de diversidade funcional, explicitando algumas métricas e como estas são aplicáveis a diferentes contextos.

Introdução

“A revolução da biodiversidade – *The biodiversity revolution*”. O título deste artigo da Rachel Cernasky, publicado na revista científica *Nature*, em 2017, remete à importância que os estudos com características funcionais têm adquirido, não só para os ecologistas vegetais, mas para todos aqueles que estudam a biodiversidade e as mudanças ecossistêmicas como um todo. A revolução da biodiversidade é uma alusão à utilização cada vez maior de métricas de diversidade por meio das características funcionais, em detrimento de métricas tradicionais. Essas e outras discussões controversas a respeito do tema são abordadas neste livro, além da questão central que estimulou sua escrita e publicação: a grande necessidade de orientação e padronização não só para as coletas destas características, mas para a gama de procedimentos que envolvem o tratamento posterior dos dados.

A escrita de um manual que padronizasse e orientasse os procedimentos de coleta e tratamento dos dados surgiu de um anseio dos autores, mediante a escrita de uma tese de doutorado, uma dissertação de mestrado e diversos artigos sobre o tema. Após uma vasta pesquisa bibliográfica, comunicação científica com pesquisadores do tema fora do Brasil, e após se depararem com diversos resultados incomparáveis devido à divergência na metodologia das coletas e tratamento dos dados, os autores chegaram a uma listagem de padronização para as coletas internas, em seus respectivos grupos de pesquisa. No entanto, a publicação destes procedimentos foi solicitada por programas de pós-graduação em Minas Gerais, e por diversos pesquisadores no Brasil, buscando orientações na coleta e tratamento dos dados em ecologia funcional. Desta demanda, surgiu a ideia da escrita e publicação deste livro.

Descritos os anseios e a observação de gargalos que motivaram essa publicação, segue o manual. Este está estruturado em uma seção inicial, que trata do histórico e das implicações das características funcionais para o estudo de populações, comunidades e ecossistemas, seguido da seção que trata das coletas e tratamento dos dados, e por último, informações sobre formas de analisar esses dados e como realizar as análises.

1. Contextualizando as características funcionais

Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Fernanda Moreira Gianasi
Rubens Manoel dos Santos

A diversidade de espécies e os padrões que regem a distribuição destas espécies nas comunidades vegetais são objeto de estudo de naturalistas desde a época das grandes navegações, no século XVI. Com a expansão territorial advinda das grandes navegações, muitas espécies foram descobertas e houve a necessidade de catalogá-las e sistematizá-las, como uma maneira de acumular registros sobre o novo mundo. Assim, inventariar a diversidade de espécies foi o objetivo de diversos naturalistas durante esse período. Porém, os relatos produzidos permeiam não só a percepção da distribuição das espécies e da grande diversidade nas florestas tropicais, mas como espécies diferem em forma e função dentro da mesma comunidade, sob influência do ambiente. Von Humboldt (1808), naturalista alemão, escreveu que “Quanto mais perto chegamos dos trópicos, maior o aumento na variedade das estruturas, na beleza das formas e na mistura das cores”. August de Saint-Hilaire, naturalista francês, em expedição pelo Brasil, escreveu que aqui “cada árvore tem, por assim dizer, um porte que lhe é próprio; cada uma tem sua folhagem e oferece frequentemente uma tonalidade de verde diferente das árvores vizinhas” (SAINT-HILAIRE, 1938). Em “*The origin of species*”, Darwin (1859) já postulava sobre as características dos organismos influenciando sua performance e função no ecossistema, acrescentando que áreas com maior produtividade (como os trópicos) apresentavam maior diversidade de plantas distantemente relacionadas.

Desde a época das grandes navegações até a década de 90, diversas inferências foram feitas a respeito dos fatores que influenciam a biodiversidade e de como a biodiversidade influencia as comunidades. Em especial, a relação observada por Darwin entre biodiversidade e produtividade, bem como outros processos ecossistêmicos (produção de oxigênio, ciclagem de nutrientes e da água, estoque de carbono, etc.) permaneceram sendo objeto de investigação. No entanto, em meados da década de 80 a início dos anos 90, mediante os dados de desmatamento, as projeções para as mudanças climáticas e os debates sobre perda da biodiversidade, esta passou a ser uma preocupação global. Estudos sobre as consequências da perda de biodiversidade para o funcionamento dos ecossistemas começaram a ser publicados, e as relações entre diversidade e processos ecossistêmicos passaram a ser melhor investigadas¹. Uma maior atenção é dada ao papel da diversidade de espécies na qualidade e manutenção da prestação dos serviços ecossistêmicos, visto que estes são indispensáveis à sobrevivência humana. Porém, muita variação residual permanece inexplicável quando se quantificam tendências estatísticas entre diversidade de espécies por meio da riqueza e os processos ecossistêmicos (SCHMITZ *et al.*, 2015). Uma vez que a riqueza é um dado pouco preditivo de como a diversidade afeta o

¹Alguns estudos importantes que trazem essa relação entre biodiversidade (ou a perda desta) e processos ecossistêmicos são os de Giller e Donovan (2002), Isbell *et al.* (2015), Jax (2005), Lawton (1994), Naeem *et al.* (1994) e Tilman e Downing (1994),

funcionamento do ecossistema, outras maneiras de quantificar a diversidade foram sendo testadas, entre elas, a quantificação por meio das características funcionais.

Características ou atributos funcionais são qualquer caractere morfológico, fisiológico, bioquímico, estrutural, fenológico ou comportamental expresso fenotipicamente, relacionado ao *fitness* (capacidade de crescimento, reprodução e sobrevivência) e mensurável a nível de indivíduo. Essa foi uma das primeiras definições a serem utilizadas, e a discussão foi grande na comunidade científica acerca de um conceito que melhor definisse a relação destas características com o ambiente, e a maneira como estas características afetam funções neste ambiente. Toda característica presente em um indivíduo afeta o seu *fitness*, mas nem toda característica do indivíduo é funcional, sendo as características funcionais as que interessam para a ecologia (MLAMBO, 2014). As características funcionais devem não só afetar o *fitness* da espécie e refletir sua resposta ao ambiente, mas devem também ter um efeito sobre o funcionamento da comunidade e, portanto, sobre os processos ecossistêmicos como um todo. São responsáveis pela tolerância de cada indivíduo ao ambiente, a estressores ambientais e distúrbios; e contribuem para propriedades e serviços do ecossistema. Dessa forma, o conceito de diversidade deixou de ser a observação das espécies presentes em uma comunidade, para representar o valor adaptativo e a contribuição daquela espécie na comunidade e no ecossistema como um todo².

A visão de que “o ecossistema pode depender não apenas do número de espécies presente, mas também da diversidade de suas características” (CERNANSKY, 2017) tem sido bastante discutida. Dependendo do objetivo da pesquisa, os índices tradicionais utilizados para medir a diversidade de espécies nas comunidades podem mascarar fatores importantes. Por exemplo, se uma mudança ambiental qualquer repõe uma comunidade em que as espécies pertencem a gêneros distintos por outra em que a maioria das espécies pertence ao mesmo gênero, mantendo o mesmo número de espécies e a mesma distribuição de abundâncias, análises tradicionais da diversidade não revelarão efeito da mudança sobre a comunidade. Assim, medidas de diversidade que incorporem informações sobre as características funcionais devem ser consideradas quando o objetivo envolve inferências sobre o funcionamento daquela comunidade.

O advento das pesquisas e o sucesso de muitos artigos em explicar a distribuição das espécies e os fatores que condicionam esta distribuição por meio das características funcionais mostram que estas podem ser excelentes preditores do funcionamento das comunidades vegetais. No entanto, as abordagens clássicas para acessar a diversidade vegetal não devem ser ignoradas, pelo contrário. Ambas as abordagens são complementares e trazem informações de suma importância quando

²Para um aprofundamento sobre as definições e o debate em torno das definições de características funcionais, consulte Díaz *et al.* (2013), Donovan *et al.* (2011), Lavorel e Garnier (2002), Mlambo (2014), Tilman (2004) e Violle *et al.* (2007).

utilizadas em conjunto, e o tipo de abordagem depende inteiramente do objetivo do estudo. A importância das características funcionais, que podem ser comuns ou não às espécies que coexistem em uma comunidade, auxilia no entendimento de como ocorre o agrupamento e a distribuição destas espécies, mas a nomenclatura e a classificação delas são de vital importância. Uma vez que as características vêm sendo compartilhadas por grupos com restrições ambientais semelhantes ao longo do processo evolutivo, a abordagem clássica aliada à funcional pode ser de grande valia no entendimento de como a funcionalidade molda a comunidade e de como as relações de parentesco podem ou não ser relevantes nesse processo. Para tal, é necessário compreender quais as implicações das características funcionais, tanto para a história de vida dos indivíduos, quanto para as comunidades e ecossistemas como um todo. Assim, nas próximas seções, serão tratadas as implicações ecológicas das características funcionais, desde o seu papel em modular a história de vida dos indivíduos até o seu papel em moldar as comunidades vegetais.

1.1. Referências

- CERNANSKY, R. The biodiversity revolution. **Nature**, London, v. 546, n. 14, p. 22-24, 2017.
- DARWIN, C. **On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life**. London: H. Milford; Oxford University, 1859.
- DÍAZ, S. *et al.* Functional traits, the phylogeny of function, and ecosystem service vulnerability. **Ecology and Evolution**, Córdoba, v. 3, n. 9, p. 2958-2975, 2013.
- DONOVAN, L. A. *et al.* The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 88-95, 2011.
- GILLER, P. S.; O' DONOVAN, G. Biodiversity and ecosystem function: do species matter? **Biology and environment: proceedings of the Royal Irish Academy**, New York, v. 102, n. 3, p. 129, 139, 2002.
- ISBELL, F. *et al.* Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. **Nature**, London, v. 526, n. 7574, p. 574-577, 2015.
- JAX, K. Function and “functioning” in ecology: what does it mean? **Oikos**, Buenos Aires, v. 111, n. 3, p. 641-648, 2005.
- LAVOREL, S.; GARNIER, E. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. **Functional Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 545-556, 2002.
- LAWTON, J. H. What do species do in ecosystems? **Oikos**, Buenos Aires, p. 367-374, 1994.

- MLAMBO, M. C. Not all traits are 'functional': insights from taxonomy and biodiversity-ecosystem functioning research. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 23, n. 3, p. 781-790, 2014.
- NAEEM, S. *et al.* Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. **Nature**, London, v. 368, n. 6473, p. 734-737, 1994.
- SAINT-HILAIRE, A. **Viagem pelas províncias do Rio de Janeiro e Minas Gerais**. São Paulo: Nacional, 1938.
- SCHMITZ, O. J. *et al.* Functional traits and trait-mediated interactions: connecting community-level interactions with ecosystem functioning. **Advances in Ecological Research**, London, v. 52, p. 319-343, 2015.
- TILMAN, D.; DOWNING, J. A. Biodiversity and stability in grasslands. **Nature**, London, v. 367, n. 6461, p. 363-365, 1994.
- TILMAN, D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 30, p. 10854-10861, 2004.
- VIOLLE, C. *et al.* Let the concept of trait be functional! **Oikos**, Buenos Aires, v. 116, n. 5, p. 882-892, 2007.
- VON HUMBOLDT, A. **Ansichten der Natur**. Tübingen: Cotta'schen, 1808.
Disponível em: http://gutenberg.spiegel.de/?id=5&xid=3736&kapitel=1#gb_found. Acesso em: 30 mar. 2020.

2. Características funcionais: de indivíduos a ecossistemas

Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Rubens Manoel dos Santos

A história de vida, bem como o *fitness*, são condicionados principalmente pelas taxas vitais de crescimento e reprodução de um indivíduo. Por sua vez, essas taxas são determinadas pela performance fisiológica do indivíduo no ambiente onde o mesmo se encontra, influenciando diretamente a capacidade adaptativa. O que molda a capacidade fisiológica e, portanto, adaptativa do indivíduo e define assim os limiares de tolerância às condições ambientais são as características anatômicas, entre elas, as características funcionais.

As características funcionais dos órgãos da planta suportam os processos fisiológicos, e determinam a capacidade das espécies de evitar ou tolerar o estresse ambiental. Mudanças no ambiente podem induzir (ou não, depende da capacidade adaptativa de cada espécie) a modificações nos tecidos da planta, redefinindo anatomicamente e funcionalmente aquele órgão. Assim, a existência de uma espécie em determinado habitat depende da capacidade adaptativa de seus indivíduos e da forma como esses indivíduos utilizam o recurso disponível e interagem com o ambiente, o que é mediado pelas características funcionais.

Por determinar a história de vida, e conseqüentemente, a história adaptativa dos indivíduos, a abordagem funcional tem sido bastante utilizada para prever a estrutura e dinâmica das comunidades vegetais, e conseqüentemente, os processos ecossistêmicos. Os mecanismos que estruturam as comunidades e governam a substituição de espécies podem ser investigados por meio das respostas das características funcionais às mudanças, fazendo com que estas sejam amplamente utilizadas na busca do entendimento dos padrões e processos em ecologia de comunidades³. Neste capítulo, tratamos das implicações das características funcionais desde a história de vida dos indivíduos até o funcionamento dos ecossistemas.

2.1. Implicações adaptativas, na história de vida e nos *trade-offs* a nível de indivíduo

A nível de indivíduo, as características funcionais estão relacionadas ao investimento na construção dos tecidos, na manutenção das relações ecológicas e ao retorno que aquele investimento proporciona em termos de *fitness* ao indivíduo, uma relação denominada de espectro econômico (“*economics spectrum*” em inglês)⁴. A partir dessa relação econômica, as plantas estabelecem *trade-offs* para investimento em sobrevivência ou crescimento, de acordo com as restrições do ambiente onde se

³Os artigos de Adler *et al.* (2014), Auffret *et al.* (2017), Austin (1985), Bergholz *et al.* (2017), Boukili e Chazdon (2017), Brown (1995), Cadotte *et al.* (2015), Cavender-Bares *et al.* (2009), Chao *et al.* (2008), Cianciaruso *et al.* (2009a), Costa *et al.* (2017), Diaz *et al.* (2004, 2013), Gianasi *et al.* (2020), Lavorel e Garnier (2002), Li *et al.* (2017), Macarthur e Levins (1967), Sobral e Cianciaruso (2012) e Tilman (2004) abordam o papel das características funcionais na estruturação das comunidades.

⁴As relações que envolvem o espectro econômico são bem explicitadas e discutidas nos trabalhos de Adler *et al.* (2014), Chave *et al.* (2009), Donovan *et al.* (2011), Markesteijn *et al.* (2011), Reich *et al.* (2003), Westoby *et al.* (2002) e Wright *et al.* (2004).

encontram. Por exemplo, o investimento da folha em massa seca (tecidos estruturais), é um indicativo de que a planta vai permanecer com aquela folha durante mais tempo, uma vez que essa estrutura custa muito para a planta em termos de energia e biomassa, sendo um investimento a longo prazo (Figura 2.1). Assim, folhas com alta massa seca por área foliar terão uma lâmina foliar espessa, com grande concentração de lignina, células pequenas e de parede celular espessa, e com maior vida útil (vão permanecer funcionais na planta por mais tempo). Uma vez que a planta investiu maior quantidade de recursos (biomassa e energia) na construção de uma folha mais resistente, é de se esperar que aquela folha tenha uma vida útil maior. Assim, a quantidade de massa seca e a vida útil da folha possuem correlação positiva, e determinam se a planta vai investir na capacidade fotossintética e no rápido crescimento (baixa quantidade de massa seca e vida útil breve), ou se vai investir na longevidade foliar por meio do acúmulo de massa seca, que vai conferir maior resistência à folha.

A área foliar também está diretamente relacionada à longevidade da folha, porém de maneira inversamente proporcional. Quanto maior a massa da folha, maior o investimento em tecidos estruturais, de defesa e de proteção. Quanto maior a área foliar, maior o investimento em captação de luz em detrimento dos tecidos estruturais. Com uma maior captação de luz, a planta consegue realizar a fotossíntese de maneira mais efetiva. Dessa forma, este *trade-off* entre maior massa ou maior captação de luz afeta diretamente a capacidade fotossintética líquida da folha e, portanto, o crescimento relativo do indivíduo. Folhas de maior longevidade apresentam menor capacidade fotossintética e menor área foliar, porém mais massa seca e maior resistência mecânica, favorecendo a sobrevivência do indivíduo em detrimento do crescimento.

A Figura 2.1 traz um esboço do retorno cumulativo de massa seca por área da folha, mostrando, em y, o retorno líquido dos custos da respiração foliar, e em x, o tempo de construção da folha. A curva é inicialmente negativa, visto que os custos de produção em LMA começam sem que a folha dê retorno, em termos de fotossíntese, geração de ATP e energia. Quanto mais alta a LMA, maior o investimento energético da planta na construção da folha, portanto, mais negativo fica o gráfico. O tempo de retorno para o investimento está em (A), (B) representa o ótimo, em que o investimento supera os custos iniciais de produção, e em (C), há uma estabilização da curva, quando a folha senesce e não há mais retorno.

O *trade-off* de investimento em crescimento ou sobrevivência relaciona ainda a eficiência na condutividade hidráulica dos tecidos responsáveis por conferir resistência à embolia e resistência mecânica da madeira⁵. Quanto maior e mais largo

⁵Mais informações relacionadas aos *trade-offs* da madeira em Apgaua *et al.* (2015), Chave *et al.* (2009), Cornelissen *et al.* (2003), Lebrija-trejos *et al.* (2010), Markesteijn *et al.* (2011), Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013), Tng *et al.* (2018) e Vico *et al.* (2017).

o vaso condutor, menor é sua resistência ao fluxo de água, e menor tende a ser a frequência de vasos por mm^2 , bem como a densidade da madeira. Assim, espécies com madeira menos densa e menor densidade de vasos por mm^2 tendem a ter vasos condutores maiores. Por sua vez, vasos maiores implicam em maior condutividade, investindo na eficiência da condutividade, no crescimento e, com isso, promovendo maior capacidade competitiva.

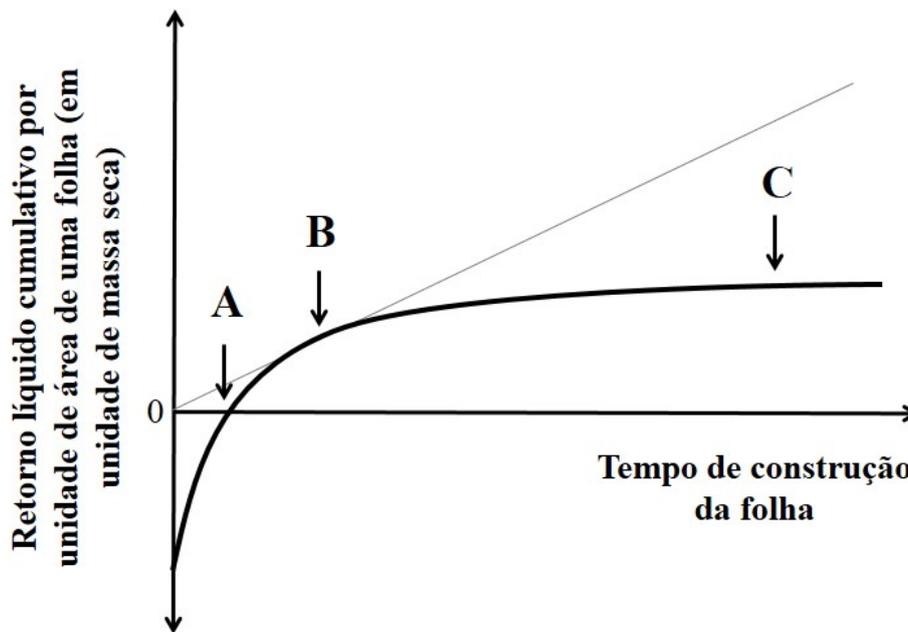


Figura 2.1. Curva do retorno cumulativo de massa seca (LMA – *Leaf mass per area*, em inglês) por unidade de área foliar, considerando o tempo de construção (longevidade) da folha.

Fonte: Adaptado de Westoby *et al.* (2002).

No entanto, transporte eficiente não significa transporte seguro, e as características supracitadas tornam a planta mais susceptível à embolia e cavitação. Um vaso maior precisa de mais água para preenchê-lo; quando isso não ocorre, há a entrada de ar no vaso (embolia), a coluna d'água se rompe (cavitação) e o vaso se torna não-funcional. Resistência à embolia e a possíveis danos mecânicos são conferidos por vasos menores, com maior densidade por mm^2 , alta lignificação e madeira densa (MUSCARELLA *et al.*, 2016b). No geral, as espécies que investem em longevidade possuem crescimento lento, expresso pela alta lignificação dos órgãos, alta massa seca em folhas pequenas e investimento em órgãos mais resistentes, e tendem a maximizar esse investimento retendo e/ou preservando esses órgãos por períodos longos de tempo, de modo que o tempo de uso do órgão compense o investimento. Essas espécies possuem maior capacidade de sobrevivência frente aos estressores ambientais. Por outro lado, espécies que investem em crescimento possuem órgãos menos resistentes e de menor custo, mas possuem grande capacidade competitiva, uma vez que conseguem acessar os recursos no dossel ou em camadas mais profundas

do solo mais rapidamente. Mas o que leva uma espécie a investir em crescimento ou sobrevivência? A pressão seletiva do ambiente. O investimento em crescimento ou sobrevivência é uma característica evolutiva, delineada principalmente por meio da restritividade do habitat onde aquela espécie evoluiu. A restritividade do habitat molda as características das espécies ao longo do tempo evolutivo e atua como um filtro à colonização por novas espécies.

2.2. O papel do ambiente na seleção das características funcionais e *trade-offs*

As características funcionais são selecionadas evolutivamente de acordo com a restritividade ambiental (ou filtro ambiental, que será melhor discutido no próximo capítulo), e apesar das respostas plásticas / elásticas das espécies, as mesmas estão condicionadas a colonizar e persistir apenas em locais que não superam seu limiar de tolerância fisiológica (REICH *et al.*, 2003). Espécies de ambientes ricos em nutrientes e/ou maior disponibilidade hídrica tendem a ter rápido crescimento, com rápida captação e pouca conservação interna de recursos e, portanto, rápida substituição de órgãos⁶.

Em um ambiente com abundância de recursos, as espécies investem em um rápido crescimento para obter vantagem competitiva, em detrimento de investir em órgãos mais resistentes e duráveis. O rápido crescimento pode conferir vantagem competitiva, principalmente na captura de luz, e é um forte determinante da composição da comunidade (MUSCARELLA *et al.*, 2016a). Nesses ambientes com recurso mais abundante, a ciclagem de nutrientes tende a ser mais rápida, devido ao grande aporte de biomassa no solo, advindo dos órgãos substituídos. Assim, espécies de ambientes com maior disponibilidade de recursos tendem a histórias de vida rápidas, com maior elasticidade para o crescimento individual e recrutamento. São espécies com estratégia ecológica aquisitiva, que investem em tecidos de baixo custo (folhas de vida curta e madeira leve), mas com altas taxas fotossintéticas e rápido crescimento, portanto, rápido retorno do investimento.

Por outro lado, espécies de ambientes restritivos, com menor aporte nutricional e/ou água disponíveis, tendem a ter história de vida lenta, com maior elasticidade para a sobrevivência. Essas espécies possuem estratégia ecológica conservativa, com maximização do tempo médio de permanência dos nutrientes, por meio da maior longevidade dos órgãos e da alta reabsorção de nutrientes de órgãos senescentes, além do investimento em defesas químicas e mecânicas.

⁶Os artigos de Adler *et al.* (2014), Boukili e Chazdon (2017), Chave *et al.* (2009), Lavorel e Garnier (2002), Markesteijn *et al.* (2011), Muscarella *et al.* (2016a, 2016b), Tng *et al.* (2018), Westoby *et al.* (2002) e Wright *et al.* (2004), abordam o papel do ambiente e da filtragem ambiental nos *trade-offs* observados nas espécies estudadas, e na comunidade vegetal como um todo.

Embora diversos estudos tenham se debruçado sobre o papel das características funcionais no *trade-off* crescimento / sobrevivência⁵ e evidenciado o papel do ambiente na seleção das espécies, a questão não está tão bem resolvida quanto parece. Fagundes (2019) encontrou espécies de crescimento rápido e características funcionais conservativas em habitats consideravelmente restritivos de florestas tropicais sazonalmente secas, mostrando que mais estudos são necessários antes que o *trade-off* apresentado possa ser considerado um padrão.

2.3. Características funcionais: implicações na ecologia das comunidades vegetais

2.3.1. Filtragem ambiental e estruturação de comunidades

A desigualdade na distribuição da vegetação é amplamente reconhecida e evidências dessa desigualdade são encontradas desde a época do final do Cretáceo, a cerca de 145 milhões de anos antes do presente (SCHULZE; BECK; MULLER-HOHENSTEIN, 2005). A heterogeneidade climática e ambiental são fatores preponderantes para a distribuição e coexistência das espécies nas comunidades vegetais, e as espécies se distribuem conforme suas capacidades adaptativas e tolerâncias fisiológicas. A distribuição desigual da água, nutrientes e da luz propiciam nichos para espécies com diferentes estratégias ecológicas (BERGHOLZ *et al.*, 2017), afetando a riqueza e influenciando diretamente a maneira como as espécies se organizam em comunidades. Essas estratégias ecológicas variam desde as tolerâncias fisiológicas até a capacidade de dispersão e colonização de habitats e, portanto, respondem de maneiras diferentes à forma como a heterogeneidade se distribui no gradiente ambiental.

Habitats mais heterogêneos apresentam mais nichos que habitats homogêneos, o que permite a coexistência de um maior número de espécies, como já observado por MacArthur e MacArthur (1961), principalmente em grandes escalas espaciais, segundo assinalado por Bergholz *et al.* (2017). Assim, as condições de um habitat podem apresentar um entrave à colonização e estabelecimento de espécies, funcionando como um filtro ambiental, como mencionado no capítulo anterior. A filtragem ambiental ocorre como uma força seletiva, uma vez que nem todos os organismos estão aptos a se estabelecer com sucesso e persistir em todas as condições abióticas (KRAFT; GODOY; LEVINE, 2015; LEBRIJA-TREJOS *et al.*, 2010).

O ambiente seleciona (filtra) espécies com características funcionais semelhantes, que conferem tolerância às resistividades impostas por determinado habitat, levando a uma convergência dessas características dentro daquele habitat (LI *et al.*, 2018). Assim, as espécies serão “filtradas” de acordo com a capacidade de tolerar determinadas condições presentes no habitat, apresentando características

funcionais semelhantes (convergência funcional). Essa convergência funcional pode ocorrer tanto por meio da seleção de características funcionais necessárias à colonização e persistência naquele habitat, quanto da exclusão de competidores menos hábeis, menos adaptados àquelas condições⁷.

Assim, se tais espécies em uma determinada localidade ocorrem sobre as mesmas condições ambientais, é esperado que haja uma tendência de que essas espécies apresentem estratégias ecológicas e características funcionais similares. Espécies dissimilares ou com características funcionais não adaptadas podem ser excluídas por não conseguirem sobreviver àquelas condições ambientais (filtragem ambiental). No entanto, a ausência de espécies em uma comunidade pode refletir não apenas a filtragem ambiental, mas características ecológicas ou barreiras, como limitações reprodutivas ou na dispersão, e interações ecológicas, como simbioses, predação e, principalmente, competição.

2.3.2. Similaridade limitante e estruturação de comunidades vegetais

Baseado na competição pelo habitat, o conceito de similaridade limitante, proposto inicialmente por MacArthur e Levins (1967), prediz que espécies com estratégias ecológicas similares não podem coexistir, uma vez que experimentam forte sobreposição de nicho, e a competição por recursos culminaria na exclusão competitiva de espécies semelhantes. Uma vez que as características ecológicas das espécies tendem a ser conservadas evolutivamente ao longo das linhagens, espécies aparentadas tendem a ter maior semelhança ecológico-funcional que espécies não aparentadas. Essa premissa abre a interpretação de que tanto pode haver limitação na coexistência de espécies similares, como pode haver convergência funcional em espécies não similares dentro de uma comunidade⁸.

Diversos estudos em ecologia têm analisado os padrões de agrupamento das comunidades considerando a filtragem ambiental e similaridade limitante sob a ótica da semelhança ecológica entre espécies aparentadas. Partindo da premissa de compartilhamento de características funcionais semelhantes entre espécies aparentadas (o que é chamado de sinal filogenético), se parentes próximos ocorrem em conjunto em uma comunidade mais que o esperado, gerando um conservadorismo de nicho, a causa pode ser uma filtragem ambiental sobre tolerâncias fisiológicas compartilhadas. Nesse caso, as espécies aparentadas exibiriam pequenas diferenças na ocupação dos nichos, que as permitiriam coexistir, e taxas de crescimento maiores que as demais espécies, que seriam por sua vez, excluídas do habitat (CADOTTE; TUCKER, 2017).

⁷A teoria de exclusão competitiva, ou “Weaker competitor exclusion” é discutida nos artigos de Bello *et al.* (2013), Bergholz *et al.* (2017) e Kraft, Godoy e Levine (2015).

⁸Os autores Bergholz *et al.* (2017), Cavender-Bares *et al.* (2009), Cianciaruso *et al.* (2009), Cianciaruso, Silva e Batalha (2009), Kraft, Godoy e Levine (2015), Sobral e Cianciaruso (2012), Webb *et al.* (2002), discutem e/ou testam a importância da convergência funcional e da similaridade limitante na estruturação das comunidades vegetais.

Em situações em que a filtragem ambiental é preponderante na formação e manutenção da comunidade, grande número de espécies filogeneticamente e funcionalmente próximas tende a coocorrer (agrupamento filogenético/funcional). Também pode ocorrer de espécies não aparentadas apresentarem convergência de características funcionais devido à filtragem ambiental. Porém, a similaridade limitante pode ser preponderante em comunidades onde a competição por recursos é mais forte que a filtragem ambiental, levando à exclusão de espécies aparentadas e à sobredispersão das características funcionais.

Muscarella *et al.* (2016b) pontuam que a similaridade limitante tende a ser preponderante em habitats com maior quantidade de recursos disponíveis, onde a competição tende a se acirrar. Quando ambas as condições – filtragem de habitat e exclusão competitiva – atuam em uma comunidade, esta tende a apresentar uma distribuição aleatória, condizente com a neutralidade descrita por Hubbell (2001)⁹.

2.3.3. Similaridade limitante *versus* filtro ambiental: o papel da escala de paisagem

Uma vez que as espécies apresentam sucesso diferencial dentro das comunidades, levando a modificações na abundância e na identidade funcional de acordo com os filtros ambientais, com a similaridade limitante ou com ambos, a escala deve ser considerada. Escalas locais tendem a aumentar a importância da similaridade limitante na montagem das comunidades, e escalas maiores tendem a aumentar a importância dos filtros ambientais.

Fatores biogeográficos, como especiação e extinção, ocorrem ainda em escalas espaciais e temporais, pois podem alterar os padrões de distribuição de espécies ecologicamente estabelecidas, por meio, tanto da mobilidade da espécie na dispersão, quanto da persistência da espécie mediante modificações no habitat. Assim, sobrevivência, persistência e as interações competitivas tendem a variar de acordo com a heterogeneidade e a escala espacial considerada.

Li *et al.* (2018) estudaram comunidades vegetais ao longo de todo o globo, e concluíram que modelos nulos (como os previstos pela teoria neutra de Hubbell) e similaridade limitante não são processos fundamentais na regulação da ocupação das comunidades pelas espécies, sendo a filtragem ambiental o fator preponderante. Por meio da filtragem no gradiente ambiental, as espécies menos adaptadas são excluídas

⁹A “Teoria neutra unificada da biodiversidade e Biogeografia - The unified neutral theory of biodiversity and biogeography”, proposta por Hubbell em 2001 se baseia na teoria de biogeografia de ilhas, e presume que as comunidades vegetais são estruturadas através estocasticidade demográfica, pela capacidade de dispersão das espécies apenas, e não através de um fator que auxilia ou dificulta a colonização pelas espécies no habitat. Assim, prevê que todas as espécies tem igual possibilidade de migração, reprodução e morte. Hubbell propôs ainda, em 2005, um adendo à teoria neutra: a hipótese de equivalência funcional. Pela ótica desta hipótese, para gerar os padrões observados em uma comunidade, a estocasticidade demográfica e as limitações na dispersão são mais importantes do que diferenças funcionais entre as espécies.

da comunidade, e a coexistência das espécies restantes é resultado da semelhança, ou convergência funcional. De fato, estudos evidenciam a importância da filtragem de habitat na substituição de espécies em gradientes ambientais, mesmo em pequenas escalas (FAGUNDES *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2017).

Embora a abordagem funcional esteja sendo amplamente utilizada, e a perspectiva de utilização de dados de ecologia funcional somada aos dados de filogenia das espécies gere informações aprofundadas, existe grande dificuldade na replicação dos estudos. Não existem trabalhos que esmiúcem o passo a passo para as coletas. Embora artigos se debrucem em explicar as características funcionais em si, como os manuais publicados por Cornelissen *et al.* (2003) e Pérez-Harguindenguy *et al.* (2013), as informações não compreendem todas as etapas de coleta e tratamento dos dados. A falta de padronização na coleta de dados é um fator preponderante, que deve ser observado. Resultados diferenciados podem ser encontrados entre estudos, devido à não padronização na coleta, triagem e mensuração dos dados. Dessa forma, o próximo capítulo inicia a seção que trata da coleta e demais procedimentos realizados com as características funcionais, a fim de obter seus atributos.

2.4. Referências

- ADLER, P. B. *et al.* Functional traits explain variation in plant life history strategies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, n. 2, p. 740-745, 2014.
- APGAUA, D. M. G. *et al.* Functional traits and water transport strategies in lowland tropical rainforest trees. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0130799, 2015.
- AUFFRET, A. G. *et al.* Spatial scale and specialization affect how biogeography and functional traits predict long-term patterns of community turnover. **Functional Ecology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 436-443, 2017.
- AUSTIN, M. P. Continuum concept, ordination methods, and niche theory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, n. 1, p. 39-61, 1985.
- BELLO, F. *et al.* Which trait dissimilarity for functional diversity: trait means or trait overlap? **Journal of Vegetation Science**, Uppsala, v. 24, n. 5, p. 807-819, 2013.
- BERGHOLZ, K. *et al.* Environmental heterogeneity drives fine-scale species assembly and functional diversity of annual plants in a semi-arid environment. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 24, p. 138-146, 2017.
- BOUKILI, V. K.; CHAZDON, R. L. Environmental filtering, local site factors and landscape context drive changes in functional trait composition during tropical forest succession. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 24, p. 37-47, 2017.

- CADOTTE, M. W. *et al.* Predicting communities from functional traits. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 30, n. 9, p. 510-511, 2015.
- CADOTTE, M. W.; TUCKER, C. M. Should environmental filtering be abandoned? **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 429-437, 2017.
- CAVENDER-BARES, J. *et al.* The merging of community ecology and phylogenetic biology. **Ecology Letters**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 693-715, 2009.
- CHAO, K. J. *et al.* Growth and wood density predict tree mortality in Amazon forests. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 281-292, 2008.
- CHAVE, J. *et al.* Towards a worldwide wood economics spectrum. **Ecology letters**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 351-366, 2009.
- CIANCIARUSO, M. V. *et al.* Including intraspecific variability in functional diversity. **Ecology**, Bethesda, v. 90, n. 1, p. 81-89, 2009.
- CIANCIARUSO, M. V.; SILVA, I. A.; BATALHA, M. A. Diversidades filogenética e funcional: novas abordagens para a ecologia de comunidades. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 93-103, 2009.
- CORNELISSEN, J. H. C. *et al.* A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 51, n. 4, p. 335-380, 2003.
- COSTA, D. S. *et al.* Community-weighted means and functional dispersion of plant functional traits along environmental gradients on Mount Kilimanjaro. **Journal of Vegetation Science**, Uppsala, v. 28, n. 4, p. 684-695, 2017.
- DONOVAN, L. A. *et al.* The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 88-95, 2011.
- FAGUNDES, N. C. A. *et al.* Riparian vegetation structure and soil variables in Pandeiros river, Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 70, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/gSXNcxV8GFJqmXFpgqzMPgr/?lang=en>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- FAGUNDES, N. C. A. **Morphoanatomical, functional and evolutionary traits conditioning the adaptability of Leguminosae in an edaphoclimatic gradient.** 2019. 155 f. Tese (Doutorado em Botânica Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- GIANASI, F. M. *et al.* Environmental filtering both indirectly and directly drives the Dry Tropical Forest species composition and functional composition. **Ecological Research**, Tokyo, v. 36, p. 107-118, 2020.
- HUBBELL, S. P. Neutral theory in community ecology and the hypothesis of functional equivalence. **Functional Ecology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 166-172, 2005.
- HUBBELL, S. P. **The unified neutral theory of biodiversity and biogeography (MPB-32).** Princeton: Princeton University, 2001. 392 p.

- KRAFT, N. J. B.; GODOY, O.; LEVINE, J. M. Plant functional traits and the multidimensional nature of species coexistence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 3, p. 797-802, 2015.
- LAVOREL, S.; GARNIER, E. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. **Functional Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 545-556, 2002.
- LEBRIJA-TREJOS, E. *et al.* Functional traits and environmental filtering drive community assembly in a species-rich tropical system. **Ecology**, Bethesda, v. 91, n. 2, p. 386-398, 2010.
- LI, Y. *et al.* Habitat filtering determines the functional niche occupancy of plant communities worldwide. **Journal of Ecology**, London, v. 106, p. 1001-1009, 2018.
- MARKESTEIJN, L. *et al.* Hydraulics and life history of tropical dry forest tree species: coordination of species' drought and shade tolerance. **New Phytologist**, Cambridge, v. 191, n. 2, p. 480-495, 2011.
- MUSCARELLA, R. *et al.* Functional convergence and phylogenetic divergence during secondary succession of subtropical wet forests in Puerto Rico. **Journal of Vegetation Science**, Uppsala, v. 27, n. 2, p. 283-294, 2016a.
- MUSCARELLA, R. *et al.* Variation of tropical forest assembly processes across regional environmental gradients. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 23, p. 52-62, 2016b.
- PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. *et al.* New handbook for stand-ardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 61, p. 167-234. 2013.
- REICH, P. B. *et al.* The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 164, n. S3, p. S143-S164, 2003.
- REIS, G. H. *et al.* Temporal vegetation changes in a seasonally dry tropical forest enclave in an ecotonal region between savanna and semiarid zones of Brazil. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 65, n. 1, p. 85-93, 2017.
- SCHULZE, E-D.; BECK, E.; MULLER-HOHENSTEIN, K. **Plant Ecology**. New York: Springer Verlag, 2005. 702 p.
- SOBRAL, F. L.; CIANCIARUSO, M. V. Estrutura filogenética e funcional de assembléias:(re) montando a ecologia de comunidades em diferentes escalas espaciais. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 28, n. 4, p. 617-631, 2012.
- TILMAN, D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 30, p. 10854-10861, 2004.

- TNG, D. Y. P. *et al.* Rainforest trees respond to drought by modifying their hydraulic architecture. **Ecology and Evolution**, Córdoba, v. 8, n. 24, p. 12479-12491, 2018.
- VICO, G. *et al.* How competitive is drought deciduousness in tropical forests? A combined eco-hydrological and eco-evolutionary approach. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 12, n. 6, p. 065006, 2017.
- WEBB, C. O. *et al.* Phylogenies and community ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 475-505, 2002.
- WESTOBY, M. *et al.* Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 33, n. 1, p. 125-159, 2002.
- WRIGHT, I. J. *et al.* The worldwide leaf economics spectrum. **Nature**, London, v. 428, n. 6985, p. 821-827, 2004.

3. Coleta de campo, triagem e mensuração das principais características funcionais

Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Fernanda Moreira Gianasi
Camila Laís Farrapo

Existem manuais práticos com essa finalidade (CORNELISSEN *et al.*, 2003; PÉREZ-HARGUINDENGUY *et al.*, 2013), porém, o nível de detalhamento não permite facilitar o entendimento e mesmo a padronização dos procedimentos mais básicos de coleta e triagem dos dados. Aqui, são apresentados os procedimentos para coleta e triagem de material necessário para se obterem as características funcionais mais utilizadas na literatura, e facilmente coletadas (sem a necessidade de aparelhos específicos para tal), como uma forma de democratizar o acesso a tais informações. Iniciando com a coleta em campo, é imprescindível que os seguintes passos sejam observados:

3.1. A escolha dos indivíduos

Deverá ser selecionado um número de indivíduos e de repetições que atendam aos objetivos e hipóteses do trabalho, bem como aos pressupostos das análises que serão utilizadas. Tais indivíduos devem estar em um bom estado fitossanitário (plantas saudias), e quando coletadas folhas, estas devem estar saudias, totalmente expandidas (o que pode variar de acordo com os objetivos do trabalho), sem sinais de herbivoria, quando possível. Para os galhos, devem ser coletados galhos saudios, sem sinais de brocas ou outras avarias, e as amostras devem ser coletadas onde não haja nós ou más formações, para que estes fatores não influenciem nas medições e nos caracteres anatômicos dos tecidos e órgãos analisados.

3.2. Padronização das coletas e quantidade coletadas

A padronização pode variar de acordo com o objetivo do estudo, e quanto menor a escala (comparações entre a mesma espécie em dois ambientes, por exemplo) maior deve ser a padronização das coletas, para evitar a interferência da heterogeneidade nos resultados obtidos. Dessa maneira, aumenta-se a confiabilidade dos dados coletados, e obviamente, dos resultados obtidos.

Após a escolha do indivíduo, devem ser coletados ramos terminais expostos ao sol com o tamanho de um metro (Figura 3.1), de onde serão retiradas as amostras de folhas, podendo também ser retiradas amostras de madeira (no galho). Vale ressaltar que, em espécies cujo limbo foliar é repartido (folhas compostas ou recompostas), o folíolo ou foliólulo é mensurado, e, nesse caso, utiliza-se o termo “unidade foliar”, uma vez que estes serão mensurados e considerados da mesma forma que em folhas simples. Para as coletas, o ideal é que a direção (norte, sul, leste ou oeste) seja padronizada, para a retirada dos galhos e das unidades foliares. Pela facilidade de coleta, as amostras relativas à madeira têm sido obtidas, em sua maioria, através dos galhos, sendo pouco utilizada a tradagem ou a cunha. O material coletado pode ser acondicionado em sacos plásticos identificados em campo para triagem em

laboratório, tomando-se os devidos cuidados para que as folhas frescas não sofram dessecação. Em locais onde o clima vai de ameno a quente, a coleta não deve demorar para ser triada, e deve-se borrifar água nas folhas para manter a umidade dentro dos sacos plásticos em que as mesmas estão acondicionadas. No caso das folhas, o material deve ser escaneado e pesado no mesmo dia (como esmiuçado abaixo), ou borrifada água e acondicionado em geladeira até o dia seguinte, por ser esse o material mais sujeito à perda hídrica. Essa perda, por sua vez, pode alterar os valores de peso fresco, e até mesmo a área foliar.

Amostra coletada / Collected sample

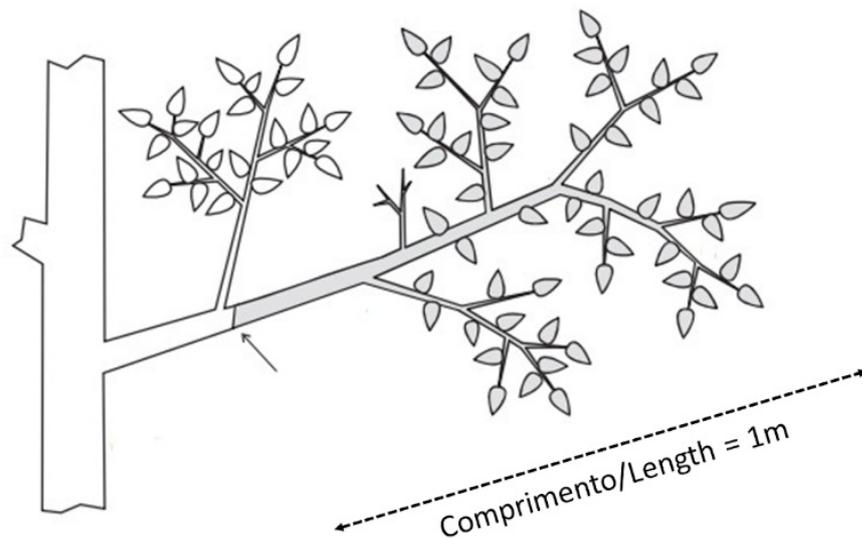


Figura 3.1. Como proceder à coleta dos ramos terminais para mensuração das características funcionais em espécies arbóreas.

Fonte: Adaptado de Pérez-Harguindeguy et al. (2013)

O número de folhas selecionadas no ramo coletado depende da metodologia a ser utilizada. Para a área foliar, é necessário escanear um mínimo de cinco folhas simples por indivíduo (por repetição), enquanto que para folíolos e foliólulos, depende do tamanho. As unidades foliares escaneadas são pesadas para obtenção do peso fresco e secas em estufa para obtenção do peso seco. Folíolos e foliólulos são utilizados como unidades foliares, porém, recomenda-se que uma quantidade maior que cinco unidades foliares seja utilizada, uma vez que algumas são muito pequenas, e a utilização de apenas cinco pode implicar um peso extremamente baixo, dificultando a posterior obtenção dos atributos funcionais¹⁰. Um mínimo de três folhas deve ser reservado para medição (esmiuçada no próximo tópico), além das folhas utilizadas para escaneamento e pesagem.

¹⁰Atributos funcionais são os valores atribuídos às características funcionais. Exemplo: espessura da folha e comprimento do pecíolo são características funcionais. Numa folha de 5 cm de espessura e 1 cm de pecíolo, esses valores são considerados os atributos funcionais.

Quanto às amostras de madeira, no corte feito a 1 m do ponto distal do galho (base), retiram-se duas amostras: uma pequena (entre 3 a 5 cm), que será colocada em recipiente identificado, contendo álcool 70% para posterior confecção de lâminas anatômicas; outra maior (entre 5 a 10 cm), que será mensurada e pesada posteriormente, e deve ser acondicionada em sacos identificados. Outra maneira de avaliar o investimento na capacidade de transporte de água por unidade foliar é o *Huber Value*, ou valor de Huber (HUBER, 1928), que mostra as diferenças na alocação de recursos por área foliar. O valor de Huber é dado pela razão entre o alburno e a área foliar, e para tal, a coleta é feita em ramos expostos ao sol, de um metro (como para as demais características funcionais), porém, todas as folhas presentes naquele ramo são contadas, escaneadas e passam pelo procedimento para obtenção da área foliar. A espessura do ramo a um metro deve ser obtida com auxílio de um paquímetro, sendo contabilizada a espessura total, com casca e medula. Assim, é obtido quanto em área do alburno é investido por área foliar (em m²).

3.3. Procedimentos pós-coleta e triagem – mensuração do material

As unidades foliares frescas devem ser escaneadas com a face adaxial voltada para baixo, preferencialmente em 300 dpi e em escalas de cinza, a fim de padronizar o processo. A quantidade de unidades foliares escaneadas deve ser incluída na planilha de dados. Após escaneadas, as unidades foliares devem ser pesadas em balança de precisão, para obtenção da massa fresca, acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa a 70 °C durante três dias para obtenção da massa seca. As unidades reservadas para medição são mensuradas em comprimento, largura e comprimento do pecíolo com auxílio de uma régua (medida em cm), e a espessura da unidade foliar com auxílio de um paquímetro digital (medida em mm), evitando posicionar o paquímetro sobre as nervuras durante a medição para não superestimar a espessura foliar (Figura 3.2). Caso seja necessário aos objetivos do estudo, como por exemplo, comparação entre indivíduos de uma mesma espécie, aconselha-se individualizar cada folha em saquinhos de papel identificados, para mensurações posteriores.

Para obtenção dos atributos funcionais da madeira, o galho coletado deve ser mensurado em espessura do cerne, da casca e da medula com auxílio de um paquímetro digital (Figuras 3.2 e 3.3). Após as medições, a casca e a medula dos galhos medidos devem ser retiradas, pois para a mensuração do alburno não são consideradas a casca e a medula. A mensuração em comprimento é feita com auxílio de uma régua, e em espessura, com auxílio de um paquímetro digital (Figura 3.2 e 3.3). Para espessura, são obtidas duas medidas, uma perpendicular à outra, e posteriormente é utilizada a média entre as duas medidas. Por meio do comprimento e da espessura (esta última se refere ao diâmetro) obtém-se o volume da madeira, utilizando-se da fórmula:

$$\text{Volume} = (0.5 * \text{espessura})^2 * \pi * \text{comprimento}$$

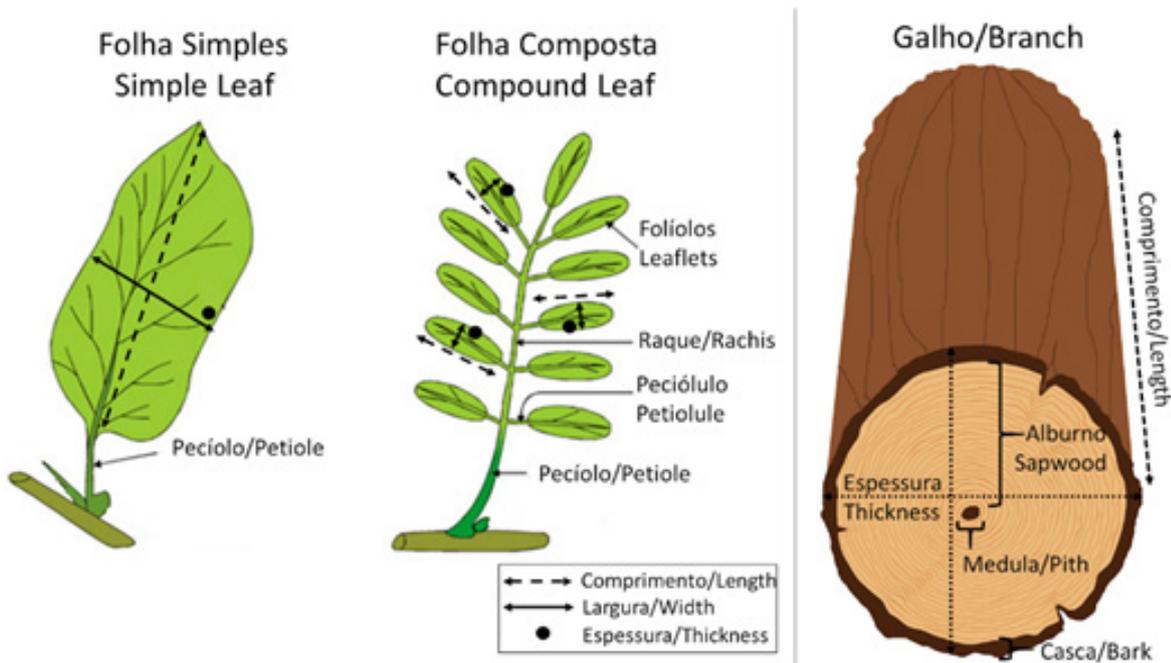


Figura 3.2. Locais para mensuração de unidades foliares (folhas, folíolos e foliólulos), pecíolo e parâmetros relativos à madeira (comprimento, espessura, espessura do alburno e da medula) para obtenção dos atributos funcionais relativos a cada característica.

Fonte: Dos autores (2021).

Entretanto, o volume é mais comumente obtido por meio do princípio de Arquimedes, após a embebição. A embebição é o procedimento realizado com os galhos após a medição e limpeza (retirada da casca e da medula), quando os mesmos são colocados imersos em água durante três dias. A embebição serve para padronizar a quantidade de água contida no material, preenchendo todas as porosidades e garantindo que a variação seja realmente do volume das amostras (Figura 3.3). Durante o tempo de embebição, é necessário realizar a troca da água diariamente para evitar a proliferação de fungos que possam comprometer a integridade do material imerso.

Para obtenção do volume por meio do Princípio de Arquimedes, uma quantidade de água suficiente para cobrir a amostra é colocada em um recipiente na balança de precisão, que deve ser tarada para zerar o peso, e o galho é imerso na água de maneira gradativa (Figura 3.4). A mudança de massa da água (mg) registrada durante a completa submersão corresponde à massa de água deslocada, convertida em um volume usando a fórmula: massa deslocada de água (mg) / 1,0 (mg.mm⁻³), em que 1,0 mg.mm⁻³ é a densidade da água. Portanto, assume-se que a massa de água deslocada é o volume da amostra. É importante observar que o galho seja completamente submerso pela água e não toque em nenhuma das bordas do recipiente: o volume é dado pelo peso da água deslocada no recipiente. O período de imersão em água para padronização das amostras também deve ser observado.

Antes do próximo tópico, cabe ressaltar a importância de estar atento às unidades de medida usadas em cada mensuração. É possível que, dependendo da ferramenta utilizada, seja necessária a transformação dos dados coletados, para garantir que eles estejam nas unidades padrão, que serão apresentadas ao longo dos próximos capítulos. Por exemplo, a unidade padrão da massa seca da folha é dada em miligramas (mg). Caso a unidade de medidas da balança utilizada seja gramas (g), o valor deve ser convertido multiplicando-se o valor em gramas por 1000. Esta conversão é importante, pois os valores de massa seca serão utilizados no cálculo de outras características funcionais. No caso, se a unidade estiver incorreta, o erro ocorrerá em efeito cascata. Antes de transformar qualquer dado, recomenda-se consultar tabelas de conversão apropriadas, evitando erros futuros.

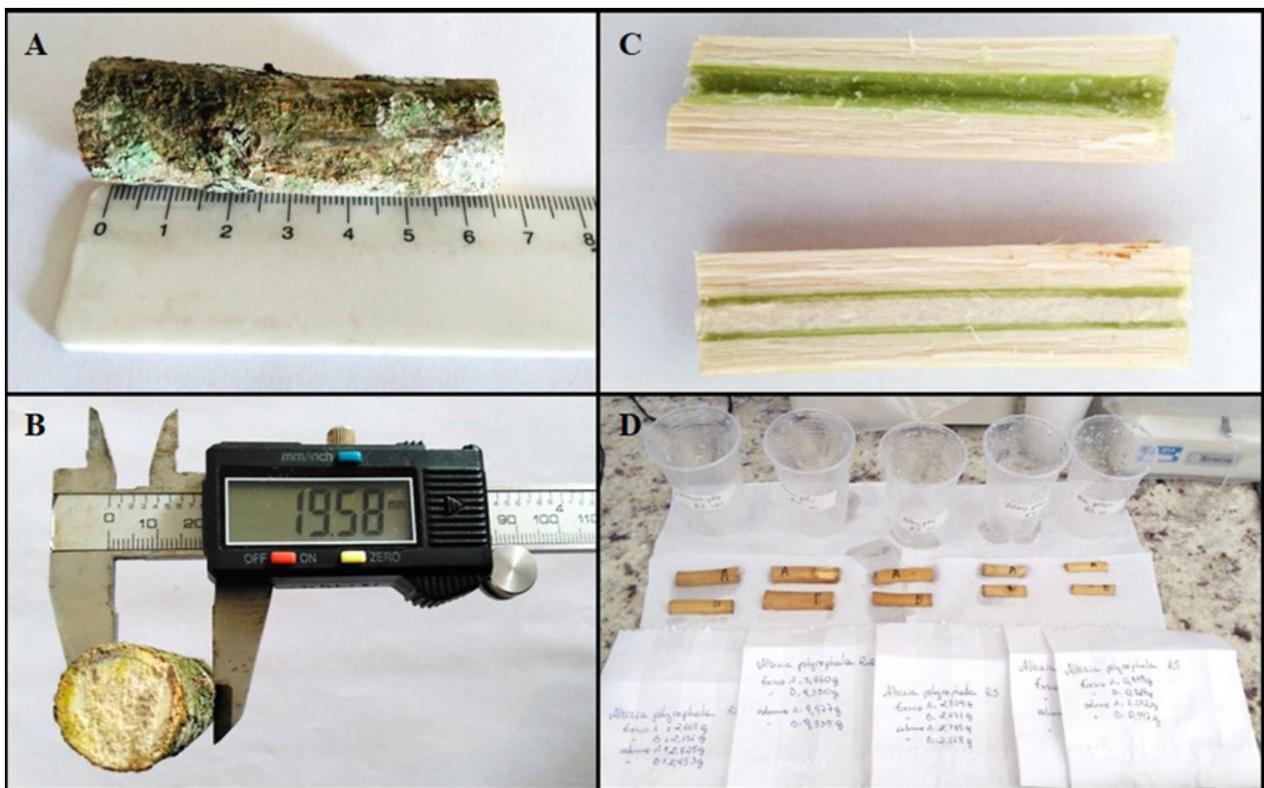


Figura 3.3. Mensuração do comprimento (A) e da espessura (B) do ramo com auxílio de régua e paquímetro digital, respectivamente. Ramos após retirada a casca e a medula (C): é importante notar que, para tal, os ramos são seccionados, identificados (ramo a e ramo b). O ramo da porção superior da figura C teve sua medula retirada, o ramo da porção inferior encontra-se com a medula. Em D, os ramos encontravam-se em processo de embebição nos copos contendo água, foram retirados, secos com auxílio de toalhas de pano pesados (peso fresco), foi feito o volume segundo o Princípio de Arquimedes ambos serão acondicionados em sacos plásticos identificados para serem levados à estufa. Após transcritas para a planilha, os pesos (fresco e seco) e o volume dos ramos a e b serão somados, para obtenção da mensuração do ramo como um todo.

Fonte: Dos autores (2021).



Figura 3.4. Medição do volume segundo o Princípio de Arquimedes, com auxílio de um tripé para câmera fotográfica e uma pinça de ponta fina, podendo também ser utilizada uma agulha (quanto mais fino o material, menor a interferência no volume final). A balança é tarada com o recipiente com água, e com auxílio da pinça amarrada ao tripé, a amostra de galho é submersa na água, de maneira que ela fique totalmente submersa, sem tocar em nenhuma das bordas do recipiente.

Fonte: Dos autores (2021).

3.4. Principais características funcionais

Nesta seção, serão apresentadas algumas características funcionais obtidas a partir da análise das folhas e dos galhos, evidenciando suas relações com as respostas das plantas às condições ambientais, além de demonstrar seus principais efeitos nos processos e serviços ecossistêmicos.

3.4.1. Características funcionais foliares

Várias das características funcionais listadas podem ser diretamente relacionadas à captação luminosa, ao balanço hídrico e às trocas gasosas. Entre elas, a área foliar total, o comprimento da folha, a largura da folha e o número de unidades foliares. Todas estas características estão diretamente relacionadas às proporções da área de captação luminosa e às trocas gasosas das unidades foliares. A área foliar

total é obtida por meio do escaneamento de unidades foliares frescas que foram contabilizadas para obtenção do número de unidades foliares, em um processo que será descrito nos capítulos de obtenção e tratamento de imagens (Capítulo 5), com valores expressos em milímetros quadrados (mm^2). A partir dos valores de área foliar total e número total de unidades foliares, é possível calcular a área foliar média por indivíduos. A área foliar total também será importante nos cálculos de outras características funcionais, que serão listadas nos parágrafos abaixo. Em todos estes casos, as características funcionais expressam o tamanho da folha, representado pela projeção da superfície unilateral da lâmina das unidades foliares. O tamanho das folhas tem consequências importantes para o balanço hídrico e energético destas. Segundo Cornelissen *et al.* (2003), as variações nessas características funcionais têm sido associadas à variação climática, geologia, altitude ou latitude, em que restrições impostas por extremos de temperatura, restrições hídricas e alta radiação tendem a selecionar folhas relativamente pequenas. As variações destas características também podem estar relacionadas a fatores alométricos (tamanho da planta, tamanho dos galhos, anatomia e arquitetura), disponibilidade de nutrientes e propriedades do solo, além de estarem sob influência dos fatores filogenéticos.

No que diz respeito às funções dos pecíolos, raques e peciólulos nos indivíduos vegetais, em parte, é possível compará-las às funções exercidas pelos caules, remetendo ao suporte hidráulico e ao posicionamento espacial das folhas no dossel. Neste caso, valores mais robustos no comprimento de pecíolo, comprimento de raque e comprimento do peciólulo indicam uma ampliação da capacidade de captação luminosa, que podem representar efeitos nas taxas fotossintéticas. Assim como na área foliar total, a variação no comprimento do pecíolo, raque e peciólulos pode estar relacionada aos fatores ambientais (especialmente à radiação, disponibilidade de nutrientes e propriedades do solo) e a fatores alométricos (tamanho da planta, tamanho dos galhos, anatomia, posição na copa).

Os tricomas são anexos da epiderme foliar que podem ser caracterizados de diversas maneiras, de acordo com a quantidade de células, morfologia, presença de glândulas, posição e função nas folhas. A presença de tricomas está relacionada à redução da temperatura foliar e do estresse hídrico, devido à sua capacidade de criar condições microclimáticas mais adequadas na camada limítrofe da superfície foliar, uma característica importante, especialmente em ambientes com alta incidência luminosa. Sua presença, em muitos casos, é facilmente observada a olho nu, devido à alta densidade de tricomas presente em algumas espécies, mas aconselha-se o uso de lupa ou microscópio estereoscópio para auxiliar na sua visualização, que pode ser realizada tanto em material fresco, quanto no material levado à estufa. Neste manual, os tricomas foram considerados uma variável categórica, indicada pela sua presença ou ausência nas unidades foliares.

A espessura de folha, segundo Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013), desempenha um papel fundamental na determinação da resistência e longevidade foliar. Os *trade-offs*, entre os benefícios fotossintéticos e os custos de respiração e transpiração para a construção das folhas, preveem que a espessura da unidade foliar deve ser maior em ambientes com maior incidência luminosa, com restrições hídricas e menos férteis, assim como em unidades foliares mais longevas. As folhas mais espessas geralmente apresentam uma baixa porcentagem de nitrogênio e maior vida útil, e geralmente estão associadas à menor taxa fotossintética por unidade de massa foliar. Outras questões levantadas pelos autores é que, em espécies com folhas mais espessas, a difusão mais lenta do CO₂ (menor condutância do mesofilo), o maior autossombreamento interno dos cloroplastos ou maior refletividade óptica em combinação com menor transmitância interna também está relacionada a menores taxas fotossintéticas das folhas mais espessas.

A massa fresca de folha e a massa seca de folha são preponderantes para obtenção de outras características funcionais. A massa fresca de folha, expressa em gramas (g), trata-se da pesagem das unidades foliares frescas em balança de precisão, que posteriormente serão secas em estufa e pesadas novamente para obtenção da massa seca de folha, expressa em miligramas (mg). A razão entre a massa seca e a massa fresca é o conteúdo de matéria seca, expresso em miligramas/gramas (mg.g⁻¹). Esta última característica funcional está relacionada à densidade média dos tecidos foliares. Foi demonstrado que o conteúdo de matéria seca se relaciona negativamente com as taxas relativas de crescimento, e positivamente com a vida útil foliar. Folhas com valores mais altos de conteúdo de matéria seca geralmente são mais rígidas e mais resistentes a danos físicos. A serapilheira derivada de folhas com alto conteúdo de matéria seca tende a se decompor mais lentamente do que aquelas compostas por folhas com baixos valores (CORNELISSEN *et al.*, 2003; PÉREZ-HARGUINDEGUY *et al.*, 2013).

A área foliar específica pode ser facilmente calculada pela razão entre a área foliar total e a massa seca (descritas previamente), com valores expressos em milímetros quadrados/miligramas (mm².mg⁻¹). Esta característica funcional é uma das mais expressivas e preponderantes nos mais diversos estudos ecológicos. Ela frequentemente é relacionada positivamente às taxas relativas de crescimento entre espécies, e tende a se relacionar positivamente às taxas fotossintéticas e com teor de nitrogênio foliar, e negativamente com a longevidade foliar e investimentos de carbono em compostos secundários, como taninos ou lignina. Outra tendência observada é que, em ambientes ou períodos mais favoráveis, sejam eles hídricos ou nutricionais, a área foliar específica apresenta valores mais altos que aquelas observadas em ambientes ou períodos restritivos (PÉREZ-HARGUINDEGUY *et al.*, 2013).

Por fim, a massa foliar por área, calculada a partir da razão entre a massa seca de folha e a área foliar total, mede o investimento de massa seca foliar por unidade de área foliar capaz de interceptação de luz. No geral, as espécies com altos valores de massa foliar por área têm lâminas foliares mais espessas, tecidos mais densos, ou ambos. Há uma tendência de que espécies em solos secos e pouco férteis convirjam para maiores valores de massa foliar por área, o que permitiria que espécies em ambientes com poucos recursos obtivessem maior tempo médio de vida foliar, segundo Wright *et al.* (2004).

Apartir dos estudos de diversas características funcionais foliares, incluindo a maioria dos descritos neste manual, diversos trabalhos foram capazes de identificar o espectro “econômico” mundial (*The leaf economics spectrum*) de características correlacionadas das folhas, que afetam os padrões globais de ciclagem de nutrientes e produtividade primária (DONOVAN *et al.*, 2011; OSNAS *et al.*, 2013; SHIPLEY *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2004), como citado no capítulo 2. Em uma extremidade do espectro, estão representadas espécies de rápido crescimento que produzem folhas estruturalmente baratas e de vida curta, com alto teor de nitrogênio e alta taxa fotossintética. Na outra extremidade do espectro, estão representadas as espécies de crescimento lento que produzem folhas estruturalmente dispendiosas e de vida longa, com baixo teor de nitrogênio e baixa taxa fotossintética (WRIGHT *et al.*, 2004). Essas diferentes possíveis combinações de características funcionais foliares representam estratégias ecológicas que tentam otimizar o custo de construir uma folha, versus o benefício que uma folha oferece na forma de fixação de carbono por fotossíntese (estratégia aquisitiva x estratégia conservativa). Esse padrão de correlação entre as características foliares foi constatado entre espécies com diferentes formas de crescimento, filogenia e nos biomas. Mas também foi constatado entre os biomas, levantando a hipótese de que o espectro econômico foliar é capaz de refletir a adaptação a gradientes ambientais de pequena e grande escala, tornando-se uma das explicações mais citadas para as variações nas características funcionais foliares (DONOVAN *et al.*, 2011). A Tabela 3.1 resume as principais características funcionais hidráulicas obtidas por meio da análise foliar, evidenciando a relação destas com as respostas das plantas ao ambiente.

3.4.2. Características funcionais mensuradas nos galhos

Diversas funções essenciais das espécies vegetais são desempenhadas pela madeira, o que inclui suporte mecânico de toda a parte aérea, armazenamento de água e nutrientes, e transporte hídrico, o que caracteriza *trade-offs* fisiológicos, estruturais e defensivos. Ecologicamente, as características funcionais da madeira são altamente relevantes para a compreensão dos ciclos biogeoquímicos e da ecologia do ecossistema: as plantas representam 90% do estoque de biomassa viva, sendo cruciais para os ciclos do carbono (CHAVE *et al.*, 2009).

Tabela 3.1. Lista das principais características funcionais hidráulicas mensuradas nas unidades foliares.

Característica funcional	Functional traits	Unidade	Descrição
Número de unidades foliares	Number of leaf unit	N	Quantidade de unidades foliares (folhas simples, folíolos ou foliólulos nas folhas compostas).
Comprimento de pecíolo	Petiole length	cm	Medida do comprimento da bainha até o limbo nas folhas simples e da bainha até a raque nas folhas compostas.
Comprimento de raque	Rachis length	cm	Medida do comprimento do pecíolo até o peciólulo do último folíolo. Presente apenas nas folhas compostas.
Tricomas	Leaf trichomes	Binária	Presença ou ausência de tricomas. Representado por 1 se presente e 0 se ausente. Relacionada com defesa estrutural e retenção de gases e vapor de água próximo ao estômato.
Comprimento do peciólulo	Petiollule length	cm	Medida do comprimento do peciólulo, da raque até o limbo do folíolo. Presente apenas nas folhas compostas. Relacionado com a exposição da folha.
Comprimento de folha	Leaf length	cm	Média do comprimento total do limbo de três unidades foliares (folhas simples, folíolos ou foliólulos nas folhas compostas).
Largura de folha	Leaf width	cm	Média da largura total do limbo de três unidades foliares (folhas simples, folíolos ou foliólulos nas folhas compostas).
Espessura de folha	Leaf thickness	mm	Espessura média total do ápice, da região mediana e da base da folha em folhas simples. Espessura na região mediana de três folíolos ou foliólulos nas folhas compostas. Mensuração feita sempre evitando as nervuras. Relacionada com o investimento em tecidos estruturais.
Massa fresca de folha	Leaf fresh mass	g	Peso total de todas as unidades foliares escaneadas, obtida no dia da coleta.
Massa seca de folha	Leaf dry mass	mg	Massa seca de todas as unidades foliares utilizadas para escaneamento e massa fresca obtida após secagem em estufa a 70 °C por 72 horas.
Área foliar total	Leaf area (LA)	mm ²	Soma de áreas das unidades foliares (folhas simples, folíolos ou foliólulos nas folhas compostas). Relacionada com a capacidade fotossintética.
Área foliar específica	Specific leaf area (SLA)	mm ² .mg ⁻¹	Razão entre a área foliar total e a massa seca. Está relacionada com o crescimento relativo, a taxa fotossintética, defesa estrutural e longevidade (suporte estrutural).
Massa foliar por área	Leaf mass per area (LMA)	mg.mm ⁻²	Razão entre a massa seca e a área foliar total. Está relacionada com a longevidade e o crescimento do indivíduo.

Continua...

Tabela 3.1. Continuação.

Característica funcional	Functional traits	Unidade	Descrição
Conteúdo de matéria seca	Leaf dry matter content (LDMC)	mg.g ⁻¹	Razão entre a massa seca e a massa fresca. Está relacionada com a densidade média dos tecidos, estoque hídrico, a longevidade e o custo de produção dos tecidos foliares.

Fonte: Dos autores (2021).

Obter um segmento adequado do caule principal de espécies arbóreas utilizando métodos destrutivos (abate de árvores) ou não (por meio de tradagem), é um trabalho dispendioso, que demanda pessoal e equipamentos específicos. A alternativa mais viável, amplamente difundida e que tem gerado resultados satisfatórios consiste na coleta de ramos terminais com 1 metro de comprimento (como descrito previamente), a partir dos quais é possível mensurar não apenas as características funcionais relacionadas à madeira, mas também aquelas relacionadas à casca.

A espessura de casca, medida com auxílio de um paquímetro e expressa em milímetros (mm), e o súber, caracterizado visualmente por sua presença ou ausência, são as principais características funcionais relacionadas às cascas das espécies lenhosas. A casca é definida como o conjunto de camadas de tecidos externas ao xilema, incluindo o câmbio vascular. Segundo Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013), cascas mais espessas são capazes de isolar meristemas e primórdios foliares latentes de temperaturas extremas, bem como também podem fornecer proteção aos tecidos vitais contra o ataque de patógenos, herbívoros, geada ou seca. Em geral, essas características têm especial relevância em árvores ou arbustos sujeitos a regimes de fogo.

Dentre as principais relevâncias ecológicas atribuídas às características funcionais derivadas de mensurações nos galhos, o crescimento potencial, estabilidade, resistência mecânica e arquitetura hidráulica estão entre as mais estudadas. As características funcionais atribuídas a estas funções podem ser atribuídas ao alburno, diâmetro da medula, densidade específica e densidade. A densidade específica, calculada a partir da razão entre a massa seca e o volume do ramo, e a densidade, calculada a partir da razão entre a massa fresca e o volume do ramo, são especialmente relatadas, devido à importância que estas têm para a estabilidade, defesa, arquitetura, hidráulica, ganho de carbono e potencial de crescimento das plantas, como descrito por Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013). Estas características por vezes são associadas ao *trade-off* entre sobrevivência e crescimento: espécies com baixa densidade do caule, (que geralmente apresentam vasos com grandes diâmetros), apresentam um crescimento rápido, com baixos custos de

construção por área e uma grande capacidade hidráulica, enquanto espécies com alta densidade do caule, (que geralmente apresentam vasos com pequenos diâmetros), apresentam uma alta sobrevivência, devido a fatores biomecânicos e segurança hidráulica, resistência a patógenos, herbívoros ou dano físico. Em combinação com características relacionadas ao tamanho da planta, também desempenha um papel global importante no armazenamento de carbono.

Neste sentido, as características funcionais diretamente relacionadas aos aspectos hidráulicos das plantas podem ser observadas a partir de mensurações da densidade de vasos, área total de vasos, diâmetro de vaso, fração de vasos múltiplos, índice de vulnerabilidade de Carlquist e valor de Huber. Estas características influenciam diretamente a eficiência e a segurança da condutância da água por meio de caules de plantas: plantas com vasos mais largos são condutores hídricos mais eficientes que plantas com os vasos mais estreitos. Isso ocorre porque a condutividade da água aumenta com a quarta potência do diâmetro do vaso, entretanto, vasos maiores também tendem a ser mais propensos à cavitação induzida pela seca (APGAUA *et al.*, 2017).

Evidências apontam para diferentes *trade-offs* relacionados às características funcionais da madeira: *trade-off* negativo entre a resistência à embolia e a eficiência na condutividade hídrica; *trade-off* negativo entre a eficiência na condutividade hídrica e a resistência mecânica; *trade-off* positivo entre resistência à embolia e resistência mecânica. Além disso, são apontadas correlações entre a área foliar e a densidade: há uma tendência de que a área foliar diminua com o aumento da densidade da madeira. Esta relação pode ser impulsionada pela exigência de um sistema hidráulico mais eficiente diante de folhas com maior área foliar, e maiores taxas de evapotranspiração. Além disso, o padrão entre a área foliar e a densidade da madeira pode corresponder a uma estratégia ecológica do indivíduo como um todo, em que aqueles com folhas maiores impulsionam um crescimento mais rápido e menor densidade de madeira. Portanto, pode-se esperar que as características econômicas das folhas relacionadas a estratégias conservativas estejam associadas à madeira mais densa. No entanto, estas relações ainda são controversas, e carecem de estudos mais aprofundados (CHAVE *et al.*, 2009). A Tabela 3.2 lista as principais características funcionais obtidas pelos galhos, com uma breve descrição, e ressaltando suas relações com as respostas dos indivíduos frente ao ambiente.

Tabela 3.2. Lista de características funcionais mensuradas nos galhos.

Características Funcionais	Functional traits	Unidade	Descrição
Comprimento de ramo	Branch length	cm	Medida do comprimento da amostra de galho.
Espessura de ramo	Branch thickness	mm	Medida de duas espessuras perpendiculares do galho.
Espessura de casca	Bark thickness	mm	Medida de espessura da casca em dois lados opostos da amostra de galho.
Alburno	Sapwood radius	mm	Medida de dois raios opostos mensurados a partir da casca até a medula (quando possuir medula visível) ou da casca até o centro da amostra (quando a medula não for visível a olho nu).
Diâmetro da medula	Pith diameter	mm	Diâmetro da medula. Duas mensurações feitas em forma perpendicular apenas nas amostras que possuem medula visível a olho nu.
Súber	Suber in bark	binário	Presença ou ausência de súber na casca. Representado por 1 se presente e 0 se ausente.
Massa fresca do ramo	Branch fresh mass	g	Massa total obtida após três dias do material embebido em água.
Volume do ramo	Branch volume	cm ³	Volume obtido pelo Princípio de Arquimedes
Densidade Específica	Sapwood Specific Density (SSD)	mg.mm ⁻³	Razão entre a massa seca e o volume do ramo. Relacionado com a condutância hídrica e a resistência física e mecânica da madeira.
Densidade	Sapwood Density (SD)	g.cm ³	Razão entre a massa fresca e o volume. Relacionado com a condutância hídrica e a resistência física e mecânica da madeira.
Massa seca do ramo	Branch dry mass	mg	Massa seca do ramo obtida após secagem em estufa a 70 °C por 72 horas.
Densidade de vasos	Vessel Density (VD)	número de vasos. mm ⁻²	Número de vasos por área obtido a partir da média da quantidade de vasos de três regiões de 1 mm ² distintas (proximal, intermediária e distal à casca e / ou à medula) de uma mesma lâmina anatômica. Relacionado com a condutância hídrica, a resistência física e mecânica da madeira e a vulnerabilidade à cavitação.
Área total de vasos	Total vessel area	µm ²	Média da área total de vasos de três regiões distintas (proximal, intermediária e distal à casca e / ou à medula) de uma mesma lâmina anatômica na escala de 1mm ² . Relacionado com a condutância hídrica, a resistência física e mecânica da madeira e a vulnerabilidade à cavitação.
Diâmetro de vaso	Vessel diameter	µm	Valor obtido a partir de $2 \cdot (\sqrt{\text{área total de vaso} / \pi})$. Relacionado com a condutância hídrica, a resistência física e mecânica da madeira e a vulnerabilidade à cavitação.

Continua...

Tabela 3.2. Continuação.

Características Funcionais	Functional traits	Unidade	Descrição
Fração de vasos múltiplos	Vessel multiple fraction	sem unidade	Valor obtido pela razão entre o número de vasos múltiplos (ou seja, vasos agrupados em contato direto entre si) e o número total de vasos. Quanto mais alto o valor, maior a segurança no transporte hídrico. Relacionado com a condutância hídrica e a vulnerabilidade à cavitação.
Índice de vulnerabilidade de Carlquist	Carlquist vulnerability index	sem unidade	Razão entre o diâmetro e a densidade de vasos. Quanto mais alto o valor do índice, maiores são os vasos e maior chance de cavitação/ embolia.
Valor de Huber	Huber value	sem unidade	Razão entre a espessura do galho e a área foliar. Mede o investimento no transporte de água e fotoassimilados por unidade foliar.

Fonte: Dos autores (2021).

3.5. Referências

- APGAUA, D. M. G. *et al.* Plant functional groups within a tropical forest exhibit different wood functional anatomy. **Functional Ecology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 582-591, 2017.
- CHAVE, J. *et al.* Towards a worldwide wood economics spectrum. **Ecology Letters**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 351-366, 2009.
- CORNELISSEN, J. H. C. *et al.* A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 51, n. 4, p. 335-380, 2003.
- DONOVAN, L. A. *et al.* The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 88-95, 2011.
- HUBER, B. Weitere quantitative Untersuchungen über das Wasserleitungssystem der Pflanzen. **Jahrb Wiss. Botanik**, Berlin, v. 67, p. 877-959, 1928.
- OSNAS, J. L. D. *et al.* Global leaf trait relationships: mass, area, and the leaf economics spectrum. **Science**, Washington, v. 340, n. 6133, p. 741-744, 2013.
- PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. *et al.* New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 61, p. 167-234, 2013.
- SHIPLEY, B. *et al.* Fundamental trade-offs generating the worldwide leaf economics spectrum. **Ecology**, Bethesda, v. 87, n. 3, p. 535-541, 2006.
- WRIGHT, I. J. *et al.* The worldwide leaf economics spectrum. **Nature**, London, v. 428, n. 6985, p. 821-827, 2004.

4. Confecção de lâminas anatômicas

Fernanda Moreira Gianasi
Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Rubens Manoel dos Santos

Muitas características funcionais importantes: densidade de vasos do xilema, área de vasos, índice de vulnerabilidade de Carlquist, são obtidas a partir de metodologias que incluem a produção de lâminas anatômicas, um procedimento recorrente nas práticas de Anatomia Vegetal, muitas vezes não dominados por pesquisadores de áreas afins. Neste capítulo, vamos sintetizar alguns procedimentos básicos de maneira simplificada, para atender a esta demanda.

Durante os procedimentos de coleta, caso for adequada a mensuração das características funcionais ligadas aos vasos xilemáticos, é importante a coleta de material específico para esta finalidade. Portanto, se necessário, deverá se obter duas coletas nos ramos de 1 m, uma com aproximadamente 5 cm de comprimento, que será acondicionada em frascos contendo álcool 70%, como descrito no capítulo anterior, para procedimentos de anatomia. Aquela destinada à produção de lâminas anatômicas deve ser coletada, fracionada em amostras menores de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, que serão mantidas em frascos, completamente imersas em álcool 70%, devidamente etiquetados, para preservação do material. Outras substâncias podem ser usadas para conservação das coletas botânicas, como o F.A.A., entretanto o álcool 70%, devido ao seu baixo custo, fácil acesso e por não apresentar toxicidade, é o mais indicado. Dê preferência a frascos de polietileno, e evite aqueles produzidos em acrílico, cuja resistência é menor, especialmente se as amostras precisarem ficar condicionadas por um longo período de tempo. Além disso, é importante cuidado ao etiquetar frascos contendo álcool ou outros solventes que podem apagar ou borrar as informações. Como medida de segurança, é conveniente escrever a lápis (evitando que a tinta seja apagada), em pequenos pedaços de papel-manteiga (que são resistentes ao solvente), a informação desejada e guardá-los dentro dos frascos junto à amostra coletada. Ademais, é recomendado o uso de um caderno, com a descrição detalhada das informações relevantes sobre as coletas, especialmente nos casos em que uma grande quantidade de amostras for processada. São informações relevantes o número da coleta, local, data, breve descrição do ambiente, do indivíduo e da coleta.

A seguir, serão descritas com precisão todas as etapas para a confecção de lâminas anatômicas, buscando-se otimizar o processo com relação a tempo e custos. Para a montagem de lâminas anatômicas para esta finalidade, são necessários materiais de fácil acesso:

- Lâminas de vidro para microscopia;
- Lamínulas de vidro para microscopia (preferência para as de tamanho 24x50 mm);
- Corante azul de toluidina em solução;
- Vidro de relógio com água (de preferência deionizada ou destilada);
- Pinça de ponta fina;
- Pincel escolar chato ou arredondado (de preferência n.º 2, 4 ou 6);

- Material para coletar as secções (palito de dente ou agulha para desentupir fogão a gás);
- Pipeta plástica de Pasteur;
- Preparado de gelatina glicerinada;
- Fonte de calor para derreter a gelatina (Chapa aquecedora);
- Etiquetas;
- Lápis;
- Esmalte transparente para unhas.

4.1. Preparação das amostras

Espécies que apresentem densidade da madeira mais baixas no geral não necessitam de pré-tratamento para serem seccionadas no micrótomo. Entretanto, quando a densidade da madeira é alta, o que ocorre em particular em muitas espécies lenhosas de ambientes sazonais, as secções em micrótomo podem ser um desafio, influenciando na qualidade final das lâminas. Nestes casos, pode ser necessária a utilização de técnicas simples, que ajudarão o material a ficar mais tenro, facilitando a microtomia.

O amolecimento das amostras pode ser realizado a partir de técnicas distintas: embebição em séries de solução de glicerina ou a partir da fervura do material em água ou outras soluções. A primeira técnica consiste em lavar previamente as amostras em água destilada, e posteriormente embebê-las em séries sucessivas de solução de glicerina à temperatura ambiente (30%; 50% e 100%). O tempo entre uma sessão e outra dependerá da dureza e do tamanho da amostra, quanto maior a dureza ou a amostra, maior o tempo entre as sessões. O amolecimento também pode ser feito pelo cozimento das amostras em água fervente, ou em solução de água e glicerina 2:1, ou ainda em uma solução de água, álcool 70° e glicerina 1:1:1, cujo tempo de cozimento dependerá da dureza da amostra (BURGER; RICHTER, 1991).

4.2. Seccionamento com micrótomo

Na microscopia de luz, técnica microscópica mais usualmente utilizada, a imagem é formada a partir da iluminação do espécime com fótons. Para ser visível ao olho humano, a luz emitida pelo microscópio óptico deve atravessar primeiro o objeto de estudo. Por esse motivo, o espécime vegetal a ser observado não pode ser opaco, ao contrário, deve se apresentar fino o suficiente para permitir que a luz o atravessasse, permitindo sua adequada visualização.

Como já descrito, as amostras de ramos coletadas com a finalidade de confecção de lâminas anatômicas apresentam certa rigidez e espessura, o que

dificulta a confecção de micro secções realizadas à mão livre. Portanto, para esse tipo de amostra, é necessário o uso do micrótomo, um equipamento adequado para a retirada de micro secções uniformes, suficientemente finas e transparentes de material para serem visualizadas em microscópio óptico. Os micrótomos de deslize são tradicionalmente os mais utilizados para a secção de material não embocado. O correto manuseio destes equipamentos é essencial para a produção das lâminas anatômicas e para a segurança do usuário. Utilizando-se de navalhas bem afiadas, os micrótomos de deslize permitem a obtenção de secções finas, de espessuras prefixadas, que variam de 15 a 25 μm . Por permitirem que a navalha passe com igual pressão sobre toda a superfície da amostra, o uso dos micrótomos favorece secções delgadas e homogêneas.

Distintos modelos de micrótomos de deslize podem ser utilizados, dentre eles o modelo Leica[®]SM2010, ou modelos próximos, são mais comumente encontrados em laboratórios de anatomia vegetal. Eles têm como vantagem a maior precisão dos cortes e uma navalha pode ser afiada em afiadores específicos para tal finalidade. Entretanto, seu custo, incluindo a compra e manutenção de sua navalha, é mais elevado. Outro modelo, o GSL1 (GÄRTNER; LUCCHINETTI; SCHWEINGRUBER, 2014), foi desenvolvido em 2014 e ainda é pouco utilizado, entretanto pode ser uma alternativa de baixo custo. Este modelo apresenta um design com suporte adaptável às lâminas de estilete escolar comum. A vantagem é que essas lâminas são acessíveis, baratas e as secções das amostras apresentam uma boa qualidade quando estas são preparadas adequadamente (FUJI, 2003). Devido ao seu baixo custo, o uso dessas lâminas substitui o processo de afiação demorado e dispendioso das navalhas de micrótomo comuns. Assim, quando a lâmina se desgasta, perdendo o corte, pode ser facilmente substituída por outra.

Antes de iniciar a secção dos cortes, também é necessário deixar a superfície de contato da amostra com a navalha o mais regular possível. Ademais, é preciso sempre obter um número considerável de secções, para que se possam selecionar as mais delgadas e aquelas que apresentam melhores características para montagem das lâminas anatômicas. Após as secções serem obtidas com auxílio do micrótomo, elas são removidas da superfície da navalha com o auxílio de um pincel molhado, e mantidas em placas de Petri ou vidros de relógio contendo água destilada até a montagem das lâminas.

As micro secções para visualização dos vasos xilemáticos devem ser realizadas em plano transversal, ou seja, perpendicular ao eixo principal do ramo (Figura 4.1.A). Quando possível, devem-se obter cortes que contemplem toda a circunferência do ramo. Caso contrário, seccionar longitudinalmente a amostra na região mediana (Figura 4.1.B) em duas ou quatro partes (no caso de amostras mais espessas), antes de levá-las ao micrótomo.

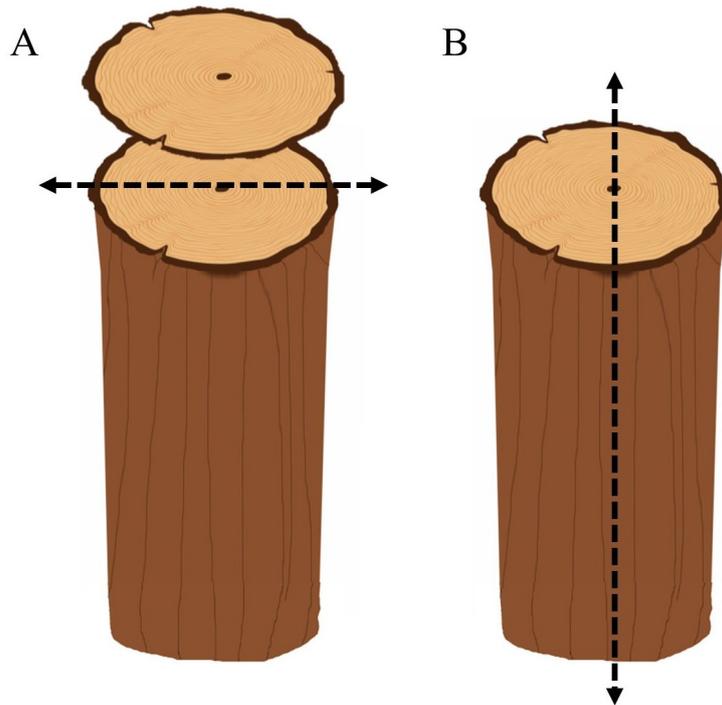


Figura 4.1. Corte transversal (A) e longitudinal (B). Em amostras de ramos mais espessos, seccionar longitudinalmente na região mediana antes de levá-las ao micrótomo, para facilitar a secção. No micrótomo, realizar micro secções transversais dos ramos.

Fonte: Dos autores (2021).

4.3. Formulação e preparo de Gelatina Glicerizada

Para este tipo de amostras, é sugerido o preparo de lâminas semipermanentes, utilizando gelatina glicerizada, o que permite que estas sejam guardadas por um período de tempo maior (de meses a poucos anos, dependendo do material) que as lâminas temporárias. A gelatina glicerizada (HAUPT, 1930 *apud* KRAUS; ARDUIM, 1997) é de preparo simples, obtida a partir de:

Gelatina incolor	10,0 g
Fenol (opcional)	1,0 mL
Glicerina	70,0 mL
Água destilada	60,0 mL

Para o preparo, dissolva a gelatina na água destilada aquecida a até no máximo 30° C. Após, acrescente o fenol e a glicerina, agitando até obter uma mistura homogênea. A gelatina glicerizada deve ser guardada em potes de vidro ou plástico, e mantida na geladeira, para aumentar seu tempo útil. O fenol utilizado no preparo da gelatina é tóxico, cancerígeno e, portanto, deve-se evitar que a geladeira utilizada para conservação seja a mesma utilizada para alimentos. O fenol é responsável por evitar a contaminação da gelatina e das lâminas por microrganismos, garantindo

maior durabilidade. Contudo, ele não é um material essencial para a preparação da gelatina, que pode ser produzida sem esta substância, com a ressalva de que o tempo de duração tanto do preparado, quanto das lâminas semipermanentes será menor, embora a glicerina também auxilie a conservar a substância. O fenol é uma substância altamente tóxica, corrosiva e carcinogênica, sendo importante ressaltar que o uso de luvas e máscara de proteção respiratória é indispensável quando esta substância for usada, tanto no procedimento de preparação da gelatina, quanto na montagem das lâminas anatômicas, para evitar o contato direto com a substância. Além da proteção citada, também é indispensável que todo o procedimento seja realizado em uma capela de fluxo laminar. No caso da não utilização do fenol, a gelatina glicerinada é segura para ser manuseada, e existem relatos de duração de até 10 anos das lâminas produzidas a partir dela, mesmo sem o uso do fenol.

4.4. Clarificação e técnicas de coloração

Após as amostras serem seccionadas no micrótomo e levadas a um vidro de relógio com água, as secções microtomadas devem ser coradas. Entretanto, para este tipo de órgão vegetal, em raras ocasiões, antes de serem coradas, as micro secções devem ser clarificadas. A clarificação do material, nestes casos, só é necessária para amostras cuja madeira seja naturalmente muito escura. Neste caso, devem-se dispor os cortes anatômicos em um vidro de relógio com solução de hipoclorito de sódio comercial e água 1:1. O tempo de clarificação depende do material, mas deve-se tomar cuidado para evitar que um maior tempo de exposição torne as secções das amostras quebradiças, dificultando a montagem das lâminas. Após clarificação, é preciso lavar os cortes anatômicos 3 vezes em água, com auxílio da pipeta plástica de Pasteur. A lavagem correta dos cortes, removendo completamente o hipoclorito de sódio, é importante para corrigir o pH, que pode interferir na eficácia do corante. Entretanto, na maioria das vezes, é possível corar esse tipo de material sem a necessidade do processo de clarificação.

A coloração é um processo importante na observação de espécimes usando microscopia óptica, facilitando a visualização. O uso de corantes é necessário para evidenciar as estruturas celulares, permitindo uma melhor observação e a geração de imagens. Há diversos métodos especiais de coloração, que funcionam quando os componentes do corante apresentam uma afinidade com determinadas substâncias químicas que formam as estruturas celulares. Diversos fatores podem influenciar na distribuição do corante sobre a superfície das secções, o que requer cuidados especiais.

O pH é um dos fatores que mais interferem, especialmente quando as secções foram clarificadas. Quando a remoção do hipoclorito de sódio não é

feita corretamente, pode ocorrer a precipitação do corante, impedindo sua ação. Além disso, a presença de metabólitos secundários vestigiais inerentes à espécie estudada pode alterar o potencial de coloração. No caso em que a coloração é comprometida por essas substâncias, o uso de solução diluída de ácido acético pode garantir melhores resultados. Neste caso, é preciso enxaguar as secções em água antes e após o uso da solução de ácido acético. Também se deve ficar atento à concentração do corante, que pode interferir no seu tempo de ação, na sua distribuição, na intensidade da coloração na secção, e no grau de pureza do corante, que varia de acordo com o fabricante e deve ser levado em conta no momento de preparação das soluções.

Para a coloração topográfica de amostras de madeira coletadas ainda verdes, ou seja, que busca apenas uma visão global das estruturas, é indicado o uso do corante azul de toluidina. Este corante reage com as paredes lignificadas das células, corando-as de verde ou azul-esverdeado, e com paredes celulósicas, corando-as de roxo (Figura 4.2). O azul de toluidina é um tipo de corante metacromático, que produz uma combinação diferencial do corante com os componentes celulares, produzindo uma cor divergente da cor original do corante.

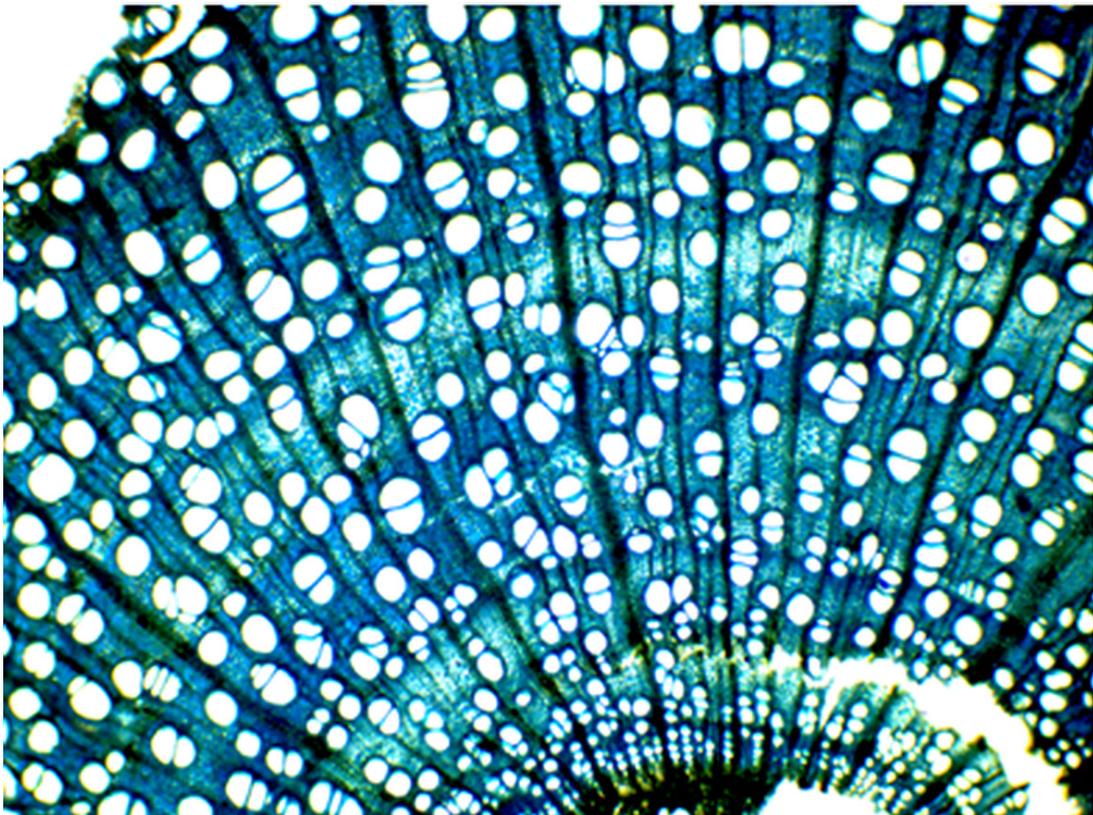


Figura 4.2. Imagem de micro secção transversal de ramos de *Ceiba rubriflora* Carv.-Sobr. & L.P. Queiroz obtida em câmera digital acoplada a microscópio óptico. Aumento de 40x e uso de lente objetiva de 4x. Note que a coloração predominantemente azul-esverdeado é característica do corante azul de toluidina.

Fonte: Dos autores (2021).

O azul de toluidina é uma substância relativamente barata, quando comparada a outros corantes, encontrada facilmente, estável, de fácil manipulação e sem riscos diretos à saúde, quando manipulada de forma adequada. Ele pode ser encontrado à venda como solução ou em pó com coloração verde escura. Neste último caso, é necessária a preparação prévia da solução, obtida a partir de:

Azul de Toluidina	0,5 g
Água destilada	100 mL

O preparo consiste em diluir o corante em pó na água e, posteriormente, filtrar a solução com papel filtro, obtendo-se uma solução homogênea azul escuro. Recomenda-se armazenar em frascos de vidro na cor âmbar, de preferência sob refrigeração. Para retirar a solução dos frascos, usar sempre uma pipeta plástica de Pasteur unicamente para esta finalidade. Também é possível armazená-la em frascos de vidros com gotejador, evitando assim a contaminação da solução por outros compostos químicos que podem alterar as características do corante.

Para a coloração, basta remover o excesso de água do vidro de relógio em que as micro secções estão repousando, deixando água suficiente para as amostras ficarem imersas, gotejar, com auxílio de pipeta plástica de Pasteur ou gotejador, algumas gotas da solução de azul de toluidina, aguardar tempo suficiente para que ocorra a ação do corante (aproximadamente 1 a 2 minutos), remover o excesso de solução, lavar as micro secções em água abundante para remover o excesso de corante e manter as amostras hidratadas em água até a montagem das lâminas.

Outro corante metacromático bastante utilizado para corar madeira é a safranina. A safranina pode ser comprada já diluída, mas a forma mais fácil de encontrá-la no mercado é um pó de coloração vermelho-escuro, que pode ser diluído em água destilada, álcool ou em ambos. É um corante de preço também bastante acessível, que possui afinidade pela lignina e cora os tecidos, em que esta substância está presente, de vermelho (Figura 4.3). Para obter a safranina em solução hidroalcoólica, mais utilizada para este fim, utilize 1,5 gramas de safranina em pó, que deve ser dissolvida em 150 ml de álcool etílico 95%. Desta deriva a solução alcoólica, de onde devem ser retirados 10 ml, diluídos em 90 ml de água destilada, misturando até completa dissolução, e ambos devem ser acondicionados em vidros âmbar e guardados na geladeira para maior durabilidade. Para confecção da safranina aquosa, basta dissolver 1 g de safranina em 80 ml de água destilada.

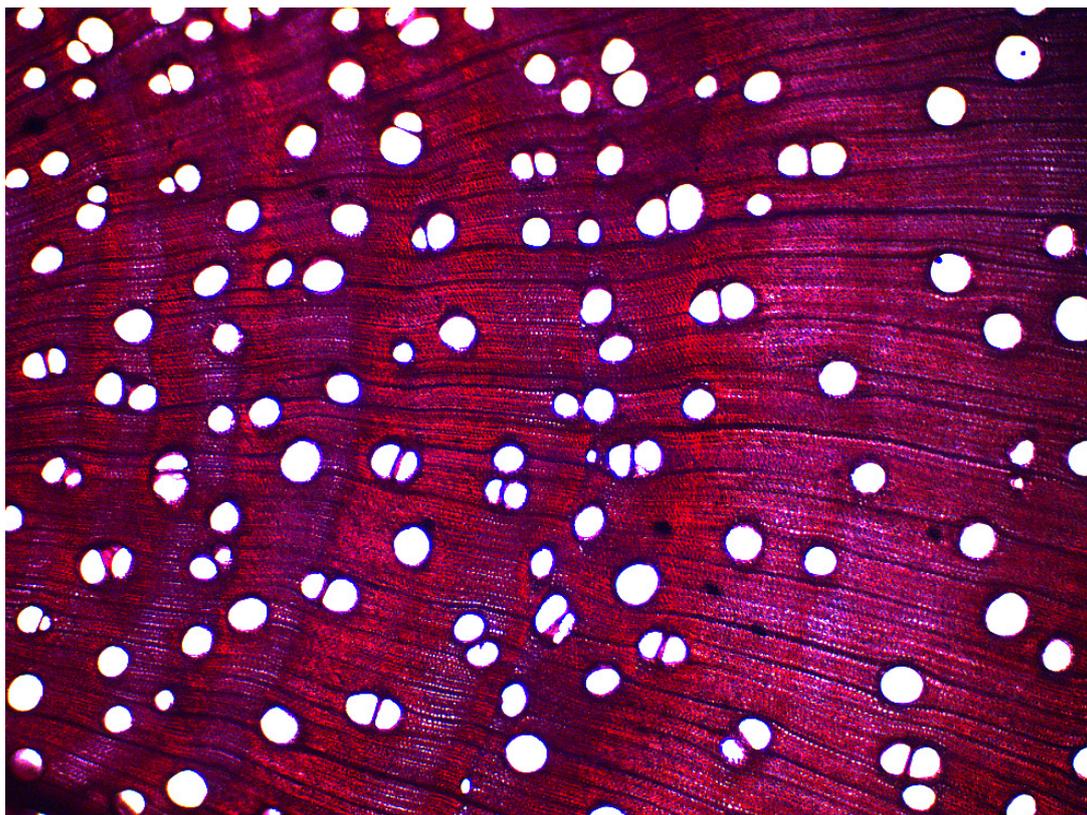


Figura 4.3. Imagem de micro secção transversal de ramos de *Albizia polycephala* (Benth.) Killip ex Record obtida a partir de câmera digital acoplada a microscópio óptico. Aumento de 40x e uso de lente objetiva de 4x e corada com o corante safranina, em solução hidroalcoólica, como demonstra a coloração avermelhada obtida na imagem.

Fonte: Dos autores (2021).

4.5. Montagem das lâminas anatômicas

Após a aplicação do corante, deve-se suceder ao preparo das lâminas de vidro para receberem os cortes. Primeiro, deve-se dispor uma pequena quantidade de gelatina glicerinada na lâmina de vidro. A quantidade deve ser suficiente para cobrir os cortes, mas devem-se evitar excessos que extravasem pela lamínula. A gelatina deve então ser derretida por meio de uma fonte de calor, como uma chapa aquecedora. Neste passo, é necessário cuidado com a temperatura, que não deve ser muito alta, evitando que o material ferva e forme bolhas. Cabe ainda a ressalva de uso de luvas e máscaras de proteção respiratória caso o preparado de gelatina glicerinada tenha sido feito com fenol. Utilizando uma pinça, palito de dente ou pincel, deve-se pegar as secções das amostras no vidro de relógio e dispor sobre a gelatina derretida na lâmina de vidro. Dependendo do tamanho das micro secções, é possível dispor dois ou três cortes do mesmo material na lâmina de vidro. Se necessário, ajustar cuidadosamente os cortes, para evitar que fiquem dobrados ou sobrepostos. Essa etapa exige prática e paciência, testando

quais utensílios a serem utilizados são mais adequados de acordo com a própria habilidade. Por fim, encoste uma das arestas de uma lamínula de vidro no limite da gota de gelatina glicerinada e, delicadamente, deixe-a cair sobre a lâmina de vidro para evitar a formação de bolhas de ar, que dificultarão a observação ao microscópio (Figura 4.4).

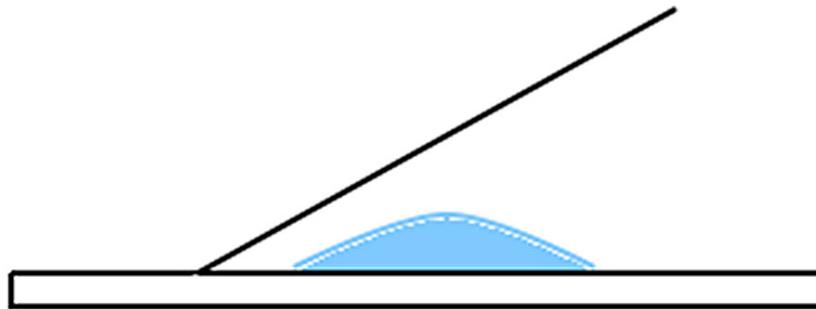


Figura 4.4. Posição correta para disposição da lâmina de vidro sobre as micro seções. A aresta da lamínula de vidro é apoiada na lâmina de vidro primeiro por uma das extremidades e posteriormente ela é solta suavemente, cobrindo a região com a gelatina glicerinada.

Fonte: Dos autores (2021).

Se necessário, com papel toalha, remova qualquer excesso de gelatina. Não se esqueça de etiquetar as lâminas de vidro com as informações de coleta, escritas preferencialmente a lápis (Figura 4.5). Assim que a gelatina glicerinada se solidificar, é possível selar as lâminas anatômicas aplicando uma camada de esmalte transparente (base de esmalte para unhas) por toda a borda da lamínula de vidro. Este processo permitirá que a qualidade da lâmina seja mantida por um maior período de tempo.

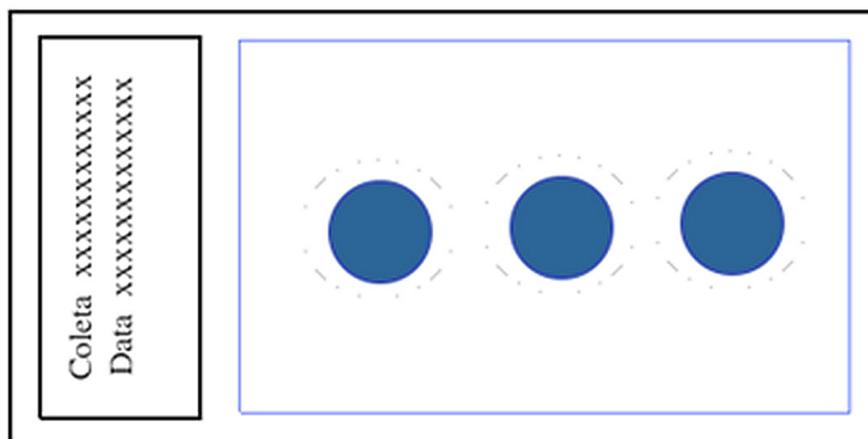


Figura 4.5. Esquema de uma lâmina anatômica finalizada. No canto esquerdo, etiqueta com a data e dados de coleta. Os círculos representam as micro seções dispostas sobre a lâmina de vidro imersas em gelatina glicerinada e cobertas pelas lamínulas de vidro.

Fonte: Dos autores (2021).

4.6. Armazenamento das lâminas anatômicas

Especialmente quando a quantidade de lâminas é expressiva, é importante o seu correto armazenamento até que sejam fotografadas, evitando que se quebrem ou danifiquem as micro secções. Elas podem ser armazenadas em caixas porta lâminas, compradas facilmente a baixo custo em lojas especializadas em materiais para laboratório. Uma alternativa ainda mais barata é a confecção de caixas porta lâminas de papelão, com formato proposto pelos integrantes de Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina. Para montar as caixas porta lâminas de papelão, são necessários os seguintes materiais:

- Caixa de papelão
- Lápis
- Régua
- Tesoura
- Cola branca
- Fita adesiva larga

Recortar 8 tiras de papelão com as seguintes dimensões: 1 tira 25cm x 20cm; 2 tiras 25cm x 10cm; 2 tiras 25cm x 1cm; 1 tira 23cm x 1cm; 2 tiras 18cm x 1cm. Em cada caixa, podem ser armazenadas até 16 lâminas semipermanentes. O tutorial completo da montagem das caixas pode ser encontrado acessando a página do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG/UFSC), no endereço:

<https://laveg.paginas.ufsc.br/roteiro-ilustrado/caixadelaminas/>.

4.7. Referências

BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991.

FUJII, T. Application of the " NT-cutter" knife blade to microtome sectioning of wood. *IAWA Journal*, Utrecht v. 24, n. 3, p. 241-245, 2003.

GÄRTNER, H.; LUCCHINETTI, S.; SCHWEINGRUBER, F. H. New perspectives for wood anatomical analysis in dendrosciences: the GSL1-microtome. *Dendrochronologia*, Jena, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2014.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 1997.

5. Obtenção e tratamento de imagens

Fernanda Moreira Gianasi
Rubens Manoel dos Santos

A obtenção e tratamento de imagens é uma etapa extremamente relevante no processamento de diversas características funcionais, como por exemplo, área foliar, área foliar específica, massa por área, densidade, diâmetro, área de vasos xilemáticos e índice de vulnerabilidade de Carlquist. Esta etapa, quando realizada de forma correta, agiliza o processamento dos dados e dá maior confiabilidade aos valores obtidos, sendo uma etapa que merece atenção especial.

A obtenção das imagens pode ser realizada a partir de dois processos: via escaneamento ou via fotografia, por meio de aplicativos próprios para escaneamento de imagens, pelos quais são obtidas imagens de órgãos macroscópicos, geralmente da morfologia externa da planta, como a folha, que dá suporte para o cálculo de área foliar. As imagens microscópicas dos tecidos contidos nas lâminas anatômicas são obtidas por meio de câmera fotográfica acoplada ao microscópio. Embora sejam processos relativamente simples, é necessário que alguns cuidados específicos sejam tomados, para minimizar possíveis erros no tratamento das imagens. A seguir, ambos os processos serão abordados de forma detalhada, dando ênfase às alternativas que podem ser utilizadas e às possíveis dificuldades e diferentes situações que podem surgir de acordo com as variações morfológicas das espécies.

5.1. Obtenção de imagens para área foliar

Imagens do limbo foliar para o cálculo de área foliar podem ser obtidas por inúmeros processos de escaneamento. Muitos equipamentos foram criados especificamente para esta finalidade e já fornecem os valores de área foliar imediatamente após o uso, como por exemplo, LI-COR®3100, CI-203® Handheld Laser Leaf Area Meter, LI-3000®C Portable Leaf Area Meter etc. Contudo, existem alternativas acessíveis que podem ser usadas quando não houver a disponibilidade destes equipamentos. Uma delas é o uso do aplicativo gratuito Easy Leaf Area Free (EASLON; BLOOM, 2014), compatível com celulares que usam os sistemas operacionais mais populares.

O uso desse aplicativo é simples, requer apenas um celular com uma câmera e uma escala vermelha de 4 cm², que pode ser pintada em um papel milimetrado, usado como fundo para capturar as imagens. O cuidado deve estar apenas em garantir que tanto a escala, quanto o limbo foliar se encontrem no mesmo plano. As imagens são capturadas pela câmera do celular por meio do aplicativo e a área foliar é calculada automaticamente a partir das áreas verdes dos limbos foliares contrastadas com a área vermelha conhecida da escala, gerando resultados imediatos, que devem ser anotados em uma planilha. Pelo aplicativo, realizam-se ajustes de controle de cor para identificar corretamente a área verde das folhas e a área da escala.

Entretanto, existem algumas limitações para o uso do aplicativo. Por exemplo, no caso de folhas lobadas, com reentrâncias ou onduladas, que habitualmente não se mantêm planas, ocasionando a sobreposição de áreas das folhas e dificuldades em manter as folhas no mesmo plano da escala. Isso pode ser resolvido com o uso de um vidro transparente usado acima das folhas, tomando os devidos cuidados para que, ao serem fotografadas pela câmera do celular, o reflexo do vidro não interfira na imagem. Também são limitações, folhas que apresentem áreas de coloração não-verde, como regiões com injúrias ou com herbivoria, o que pode resultar em medições imprecisas da área foliar, já que o aplicativo não reconhece essas áreas de coloração diferentes da verde como pertencentes à folha.

Nestas situações, a alternativa é o uso de scanners de mesa simples, um equipamento barato, que pode ser instalado e usado em qualquer computador. A única diferença deste método para os anteriores é que as imagens precisarão ser processadas em um programa específico para tratamento da imagem e obtenção da área foliar.

5.1.1. Uso do scanner

Para captura das imagens com scanner, o primeiro passo é colorir um quadrado de papel de 1 cm² de preferência com uma coloração mais escura (preto), que funcionará como escala, recortá-lo e colocá-lo (pode ser colado com fita adesiva transparente para facilitar) em uma das extremidades da área de captura do scanner. Também é possível utilizar um pequeno pedaço de papel milimetrado com a face voltada para a bandeja de vidro, ou qualquer régua de medidas que não ocupe muita área de captura.

As folhas devem ser dispostas com a face adaxial voltada para baixo, em contato com a bandeja de vidro do scanner, de forma que não se sobreponham, não se toquem e nem cubram a escala. Esse método é adequado para folhas onduladas e com reentrâncias, já que, quando a tampa do scanner é fechada, há o nivelamento do limbo foliar, minimizando erros. Quando possível, sempre evitar que, na hora da captura da imagem, a tampa permaneça com frestas e, se necessário, pressioná-la levemente.

Dependendo dos objetivos do estudo, especialmente aqueles que incluem as variações dentro do mesmo indivíduo, é necessária a obtenção de valores individuais da área foliar de cada unidade. Portanto, é necessário identificar todas as unidades foliares durante a obtenção das imagens. Essa identificação pode ser realizada, por exemplo, por meio de etiquetas próximas às folhas na bandeja de vidro do scanner. Posteriormente, as unidades foliares devem ser armazenadas em sacos de papel identificados, também de forma individualizada, para o processamento das etapas seguintes.

Ademais, é preciso sempre fazer a verificação prévia da imagem antes de salvá-la para garantir que as fotos estejam adequadas. As imagens podem ser salvas coloridas, entretanto, se salvas em escala de cinza, no processo de análise, o trabalho de cálculo da área foliar no programa específico contará com uma etapa a menos. As imagens devem ser salvas em extensão .tif ou .tiff, que suporta compactações sem a perda da qualidade (o que significa que a imagem será compactada sem a fusão de pixels, preservando a informação por pixels); salvar a imagem com 300 dpi de resolução (Figura 5.1).



Figura 5.1. Imagem de folhas de *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze obtidas em scanner de mesa com escala localizada no canto superior direito. Note que, mesmo com todos os referidos cuidados, a imagem ainda apresenta zonas sombreadas que o programa de análise de imagens pode interpretar como parte da área foliar. No capítulo seguinte, será abordado como corrigir este problema.

Fonte: Dos autores (2021).

A quantidade de pixels da imagem é um importante fator de análise das imagens (vide próximo capítulo). Por esse motivo, resoluções mais baixas que 300 dpi não são indicadas. Por outro lado, resoluções mais altas podem representar um maior

gasto de tempo no processamento da imagem pelo scanner e computador, além de se tornarem um empecilho quanto ao armazenamento, especialmente quando se está trabalhando com um alto volume de imagens.

As folhas apresentam uma enorme diversidade morfológica, com relação ao formato, divisão do limbo, tamanho, pecíolos, margem do limbo, entre outros aspectos. As especificidades inerentes a cada espécie devem ser levadas em consideração no momento de escaneá-las. A seguir, destacamos alguns desses casos e como proceder.

- **Folhas com limbo foliar maior que a área de captura de imagem do scanner:** com o auxílio de uma tesoura, dividir o limbo quantas vezes for necessário até atingir um tamanho compatível com a área de captura de imagem. Não se esquecer de, ao nomear os arquivos, indicar cada imagem como parte de apenas um limbo foliar.
- **Folhas compostas pinadas ou bipinadas:** ao se deparar com folhas compostas, recomenda-se trabalhar com a unidade foliar, ou seja, com a menor unidade de divisão do limbo foliar. No caso das folhas compostas pinadas, a unidade foliar será representada pelo folíolo; em compostas bipinadas, a unidade foliar será o foliólulo. Para escaneá-las, destacar as unidades foliares das folhas e dispô-las sobre a área de captura, evitando sobreposições (Figura 5.2). A quantidade de folíolos ou foliólulos a serem escaneados depende da massa relativa de cada unidade foliar. Uma vez que a massa será utilizada para obtenção de diferentes características funcionais foliares, como área foliar específica, é interessante que a quantidade de unidades foliares selecionadas represente uma massa significativa de pelo menos 1g. Portanto, em casos em que a massa da unidade foliar é muito pequena (na ordem de miligramas), recomenda-se que sejam utilizadas algumas centenas de folíolos ou foliólulos.
- **Inclusão ou não de pecíolos e peciólulos:** a inclusão ou não dos pecíolos (folhas simples) ou peciólulos (folhas compostas pinadas) na digitalização das unidades foliares pode ou não ocorrer, dependendo do objetivo da coleta. Segundo Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013), a fração de massa seca das unidades foliares por pecíolo e peciólulos pode variar de aproximadamente zero, quando as folhas são sésseis, a até 50%. Quanto maior a massa representada por esta estrutura, maior a redução da área foliar específica quando o pecíolo é incluído no cálculo da área foliar. Pecíolos e peciólulos podem ser considerados parte integrante da unidade foliar, tendo diversas funções, como suporte e um sistema vascular que são essenciais às funções fotossintéticas da folha. Sob outra perspectiva, eles têm como função principal o posicionamento espacial e suporte hidráulico, assemelhando-se à função do caule, enquanto a principal função da lâmina foliar é interceptação de luz e fixação de carbono, o que levaria à sua exclusão. A decisão de incluí-los pode ser definitiva em

alguns estudos, e em outros, pode ser uma fonte de erro considerável e sistemático, especialmente se for necessária a comparação entre espécies. Portanto, a mensuração individual entre pecíolos ou pecíolulos e limbo foliar pode ser considerada como uma opção segura no processamento dos dados.

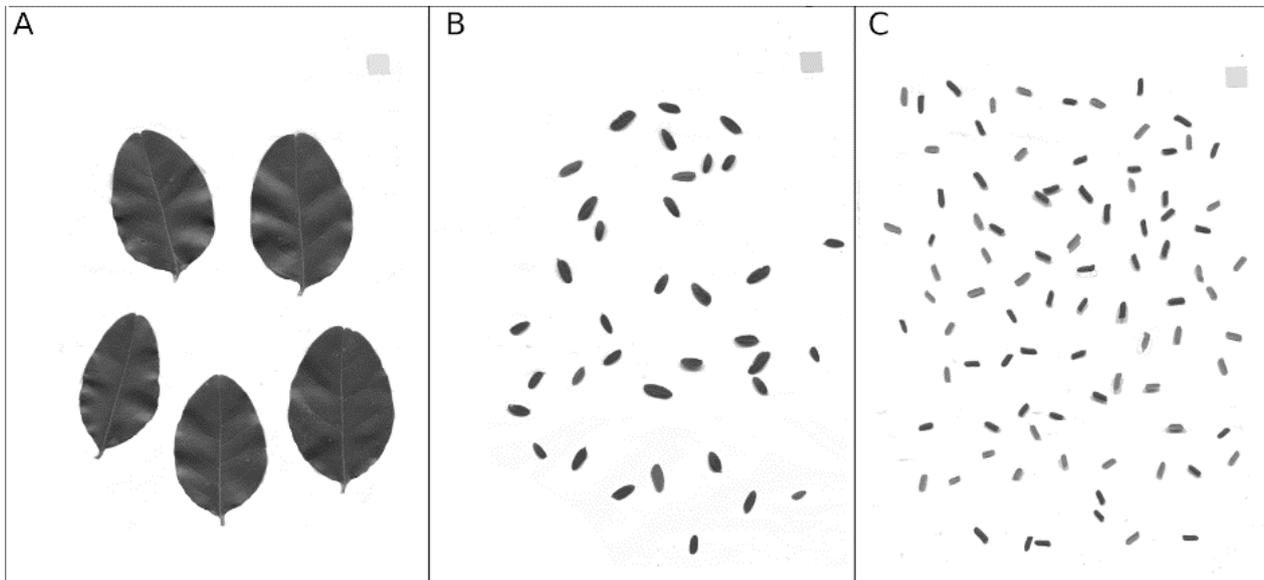


Figura 5.2. Digitalização de diferentes unidades foliares. A) folhas simples de *Bougainvillea* sp.; B) folíolos de folha composta pinada de *Acosmium cardenasii* H. S. Irwin & Arroyo; C) folíolulos de folhas compostas bipinadas de *Senegalia langsdorffii* (Benth.) Seigler & Ebinger.

Fonte: Dos autores (2021).

5.2. Obtenção de imagens de lâminas anatômicas

A captura das imagens de lâminas anatômicas é realizada a partir de uma câmera fotográfica digital acoplada a um microscópio óptico e ligada a um computador. No geral, cada câmera vem com um programa específico para instalação no computador, e as capturas são realizadas a partir desse programa. Devido às especificidades de cada programa, serão abordados apenas os aspectos gerais e cuidados na hora de fotografar as lâminas anatômicas.

O primeiro passo a ser pensado na obtenção de imagens anatômicas para as análises de características funcionais é a escala. Sua relevância se deve ao fato de ser impossível realizar as análises quantitativas de dados anatômicos se não houver uma escala adequada para calibração das medidas. A escala é obtida por meio de imagens de lâminas micrométricas com diferentes lentes objetivas. Estas lâminas costumam estar disponíveis nos laboratórios, ou imagens destas lâminas já fotografadas podem ser acessadas no computador utilizado junto à câmera. No caso de não estarem disponíveis, é possível fotografar uma pequena seção de papel milimetrado com as diferentes objetivas e, assim, obter uma escala (Figura 5.3).

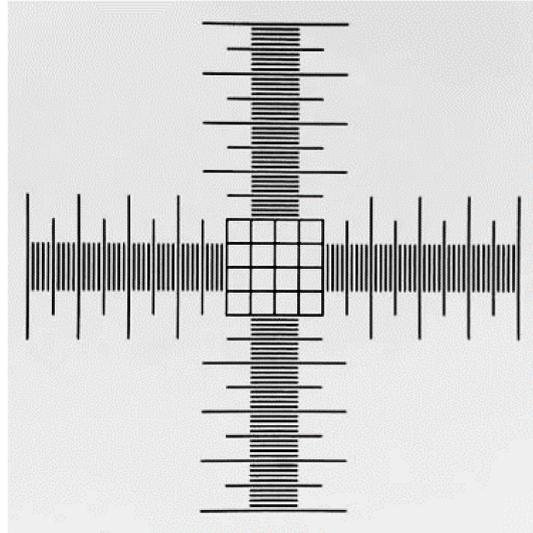


Figura 5.3. Exemplo de escala micrométrica capturada com o microscópio, com a lente objetiva de 10x.
Fonte: Dos autores (2021).

Para obtenção das imagens das micro secções, a lâmina anatômica deve ser levada ao microscópico e a área de interesse deve ser focalizada como feito rotineiramente em qualquer microscópio óptico. Com o programa aberto, ajustar o plano de visão e capturar a imagem. Recomenda-se capturar uma imagem com a lente objetiva de 4x, cujo aumento total é de 40x (aumento da objetiva de 4x multiplicado pelo aumento de 10x da ocular) para ser ter uma observação geral da secção microtomada (Figura 5.4).

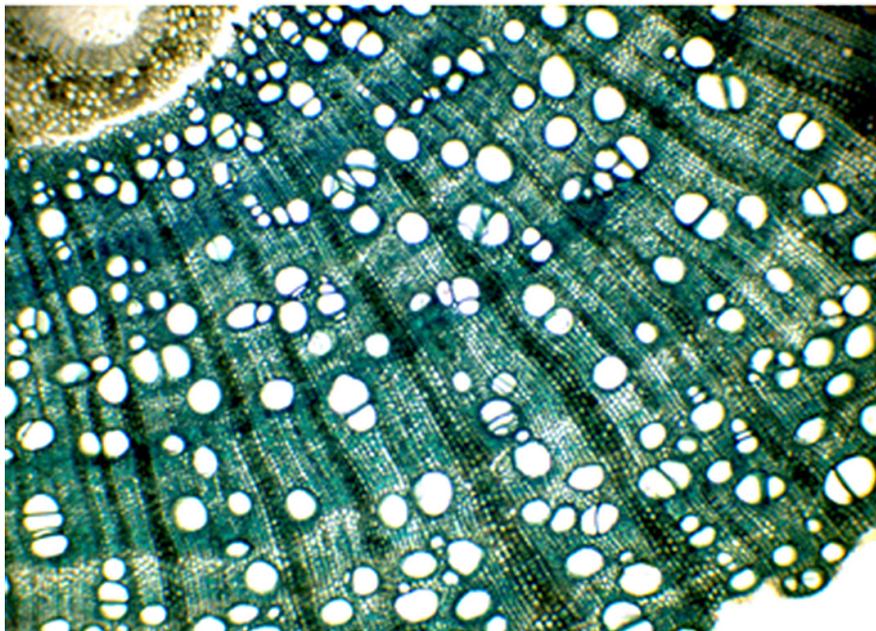


Figura 5.4. Imagem de micro secção transversal de ramos de *Cavanillesia umbellata* Ruiz & Pav. obtida a partir de câmera digital acoplada a microscópio óptico. Aumento de 40x e uso de lente objetiva de 4x. Note que é possível observar todas as regiões da micro secção, incluindo a região da medula no canto superior esquerdo.
Fonte: Dos autores (2021).

Posteriormente, deve-se realizar a captura de imagens com a lente objetiva de 10x, cujo aumento total é de 100x (aumento da objetiva de 10x multiplicado pelo aumento de 10x da ocular). Devem ser realizadas as capturas de imagens em 3 regiões diferentes da secção (uma imagem da região proximal à medula, outra da região intermediária e, por fim, uma da região mais distal), buscando não sobrepor as áreas de captura. A captura em regiões diferentes da secção visa contemplar toda a variação no tamanho dos vasos que pode ocorrer em algumas espécies (Figura 5.5).

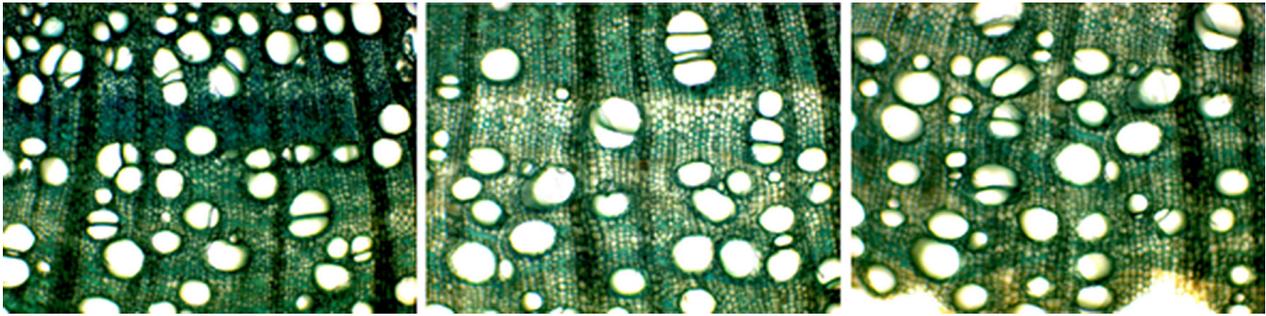


Figura 5.5. Importância de se realizar mais de uma imagem por secção. Imagens de micro secção transversal de ramos de *Cavanillesia umbellata* Ruiz & Pav. obtidas a partir de câmera digital acoplada a microscópio óptico. Aumento de 100x e uso de lente objetiva de 10x. A) Imagem da região proximal da medula; B) Imagem da região intermediária; C) Imagem da região distal. Note que há diferenças visíveis no tamanho e número de vasos entre as imagens.

Fonte: Dos autores (2021).

Assim como demonstrado nas imagens obtidas por escaneamento, é importante salvar as imagens em extensão .tif ou .tiff, que suportam compactações sem a perda da qualidade da imagem, e com 300 dpi de resolução. Devem-se salvar as imagens com o nome da espécie trabalhada, o código da área de coleta, o número da repetição, o aumento utilizado e o número da foto. Por exemplo, a espécie *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze, coletada na área com código de coleta A, e repetição 3 pode ter o arquivo nomeado como: *Cordia_sessilis_A_r3_100_fl*, indicando todas as informações necessárias para a correta identificação da imagem.

5.3. Referências

- EASLON, H. M.; BLOOM, A. J. Easy leaf area: automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. **Applications in Plant Sciences**, Washington, v. 2, n. 7, p. 1400033, 2014.
- PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. *et al.* New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 61, p. 167-234, 2013.

6. Programas de análises de imagens e mensuração dos dados anatômicos

Fernanda Moreira Gianasi
Nathalle Cristine Alencar Fagundes
Rubens Manoel dos Santos

Programas de manipulação e análise de imagens são ferramentas importantes nos estudos de características funcionais. Em uma busca rápida, é possível encontrar uma infinidade deles, que vão de avançados softwares pagos e de difícil manipulação, até softwares gratuitos, com interfaces intuitivas e acessíveis. Recentemente desenvolvido, o Package ‘pliman’ (OLIVOTO, 2021) pode ser uma alternativa interessante para obtenção da área foliar de imagens digitalizadas para pesquisadores familiarizados com o software R (R CORE TEAM). Entretanto, cabe ressaltar que, neste caso, as imagens devem ser digitalizadas com cores e com bom contraste entre as unidades foliares, fundo e escala.

Aqui, é aconselhado o uso de dois distintos programas confiáveis, de acesso gratuito, disponíveis para diferentes sistemas operacionais, com interface amigável e que atendem completamente as demandas de análise das imagens: GIMP (GNU Image Manipulation Program) e ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

O GIMP pode ser baixado acessando-se o endereço eletrônico: <https://www.gimp.org/> e o ImageJ no endereço eletrônico: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Na página do GIMP, existem tutoriais explicativos para instalação e atualizações. Para o ImageJ, não é necessária a instalação, apenas baixar a pasta em download e extrair seus arquivos. Para executar o programa, basta clicar no ícone com nome ImageJ e uma pequena janela com uma barra de ferramentas será aberta. Na página para download do ImageJ, também está disponível uma aba com uma série de plugins que podem ser instalados para diversas finalidades. Nesta aba, recomenda-se buscar pelo plugin “Cell Counter” e fazer o download do arquivo para dentro da pasta “Plugins”, previamente baixada junto com outros arquivos do ImageJ. Esse plugin abrirá uma nova guia de contagem no programa, e esta poderá ser útil em diversas situações.

6.1. Utilizando o ImageJ para mensuração de área foliar

Para mensurar a área foliar, não é necessário o tratamento prévio das imagens das unidades foliares escaneadas, que podem ser trabalhadas diretamente no ImageJ. Assim que o programa for executado, uma pequena janela com uma barra de comandos e uma barra de ferramentas será aberta, conforme a Figura 6.1. A seguir, será demonstrado o passo a passo detalhado de todos os comandos para mensuração da área foliar.

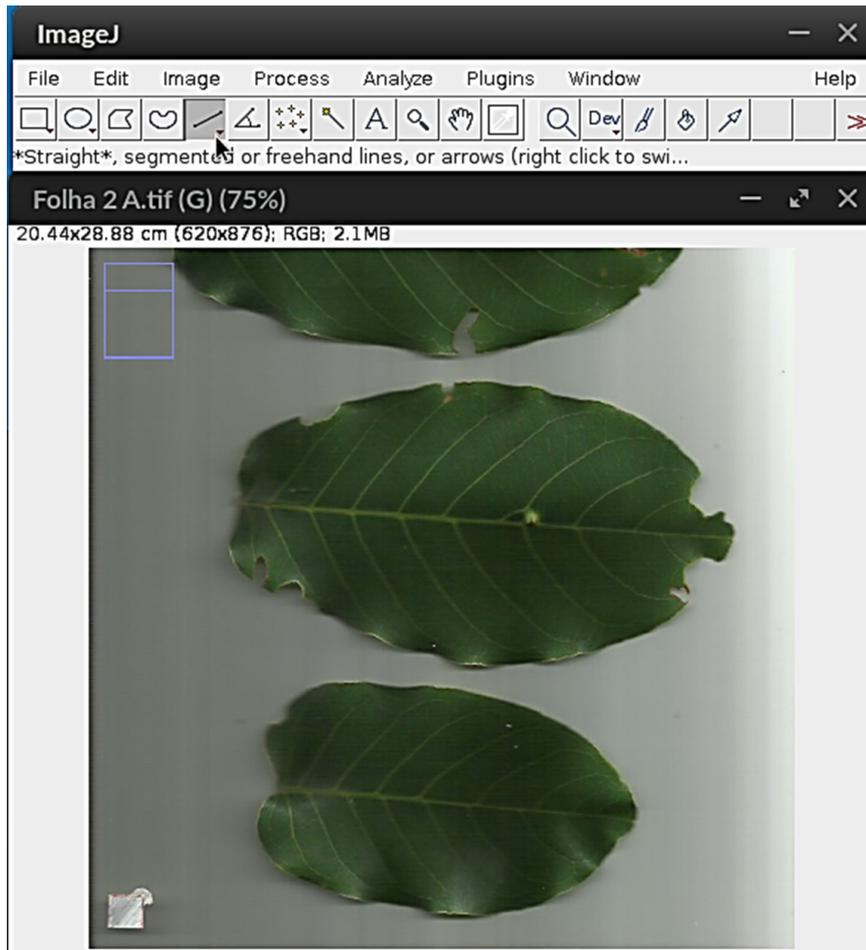


Figura 6.1. Visão geral da janela de trabalho do ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

Passo 1 – Abrindo a imagem: na barra de comando, clicar em “File” → “Open...” ou por meio do comando Ctrl + O. Escolher o arquivo desejado. Para as próximas imagens, caso elas sejam sequenciais, é possível abri-las clicando em “Open Next” (Figura 6.2).

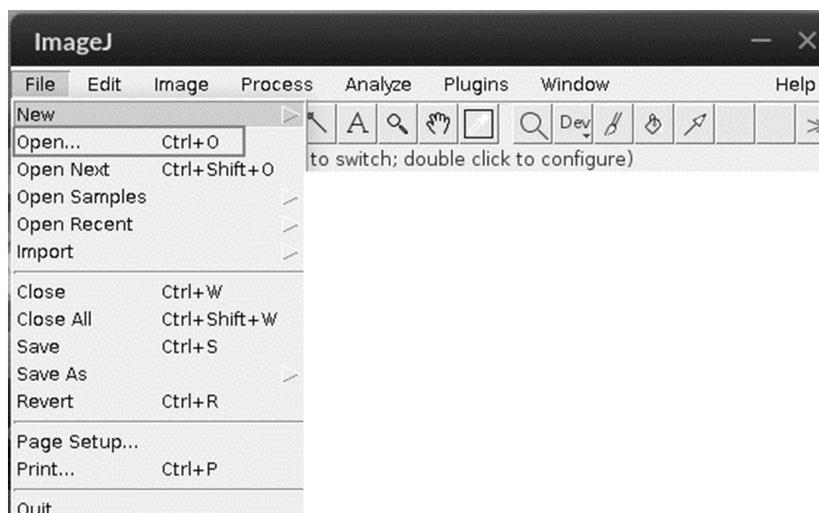


Figura 6.2. Como abrir as imagens no software ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

Passo 2 – Calibrando a escala: com a imagem aberta, dar zoom na área de tamanho conhecida (no exemplo, utilizou-se um recorte de 1 cm² disposto no canto superior direito da imagem). Para dar zoom, basta levar o mouse até a área de interesse e pressionar a tecla “+”, para aumentar o zoom, ou “-”, para diminuir, quantas vezes for necessário. Clicar na ferramenta linha (“Straight”) na barra de ferramentas (Figura 6.3).

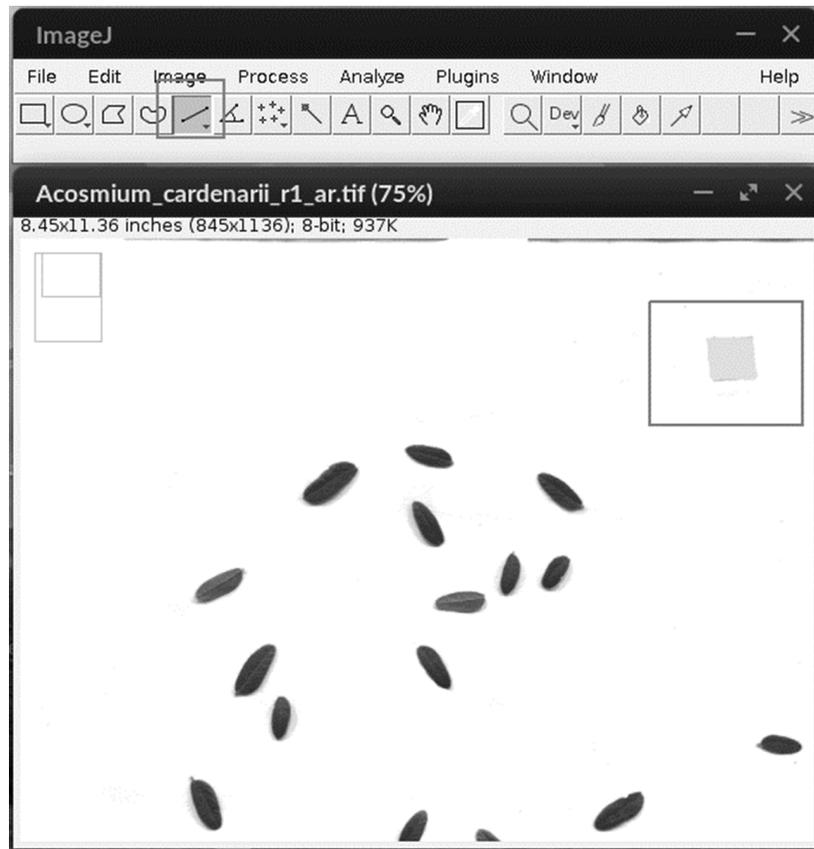


Figura 6.3. Quadrado de papel de 1 cm² colocado no momento de escanear as unidades foliares, utilizado para calibrar a escala da imagem no software ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

Com a ferramenta selecionada, manter pressionada a tecla shift do teclado ao traçar uma linha na área de tamanho conhecido, e clicar em “Analyze → Set Scale”. Na caixa de diálogo, inserir em “Know distance” o valor conhecido (no caso do exemplo, 1 cm, mas é possível calibrar para 10 mm convertendo as unidades); em “Unit of length”, a unidade de medida (no exemplo, cm); marcar a caixa “Global” para que a escala esteja disponível para as próximas imagens; clicar em “Ok”. Em “Distance in pixels”, pode ser observada a quantidade de pixel pelo qual a linha passa. Isso significa que, no caso do exemplo, são 31.251 pixels/1cm (Figura 6.4).

Esse processo deve ser feito todas as vezes que o ImageJ for fechado, pois as configurações não ficam salvas. Manter a linha a mais reta possível, pressionando a tecla shift, é importante para que a quantidade de pixels selecionada seja exatamente a correspondente à escala. Logo após a calibração da escala, é

interessante testá-la, fazendo a mensuração de uma área conhecida (traçar uma linha em área conhecida e clicar em “M” ou “Ctrl + M” no teclado, para averiguar que a escala está correta).

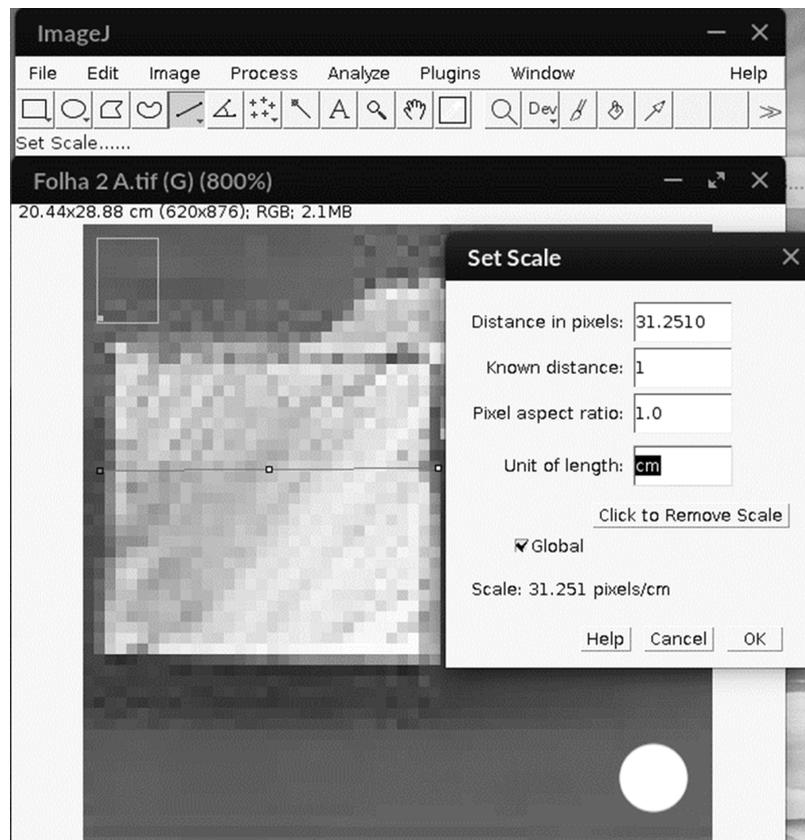


Figura 6.4. Calibrando o software ImageJ por meioda escala de 1 cm².
Fonte: Dos autores (2021).

Deve-se estar atento ao fato de que, ao calibrar a imagem, a resolução de todas as fotos deve ser a mesma da imagem utilizada na calibração, pois a quantidade de pixels influencia na medida estipulada pelo ImageJ. Em caso de mudanças na resolução da imagem, a escala deve ser calibrada novamente.

Passo 3 – Medindo a área foliar: caso as imagens sejam coloridas, antes de proceder a mensuração, no menu de comandos, clicar em “Image → Type → 8-bit”, o que deixará as imagens em escala de cinza (Figura 6.5). Este procedimento é necessário para evitar erros ocasionais ao prosseguir com a mensuração.

Após esse passo, ou se as imagens já foram escaneadas em escala de cinza, na barra de comandos, clicar em “Process → Binary → Make binary”. Este comando tem a função de converter a imagem de uma escala de cinza para preto e branco, determinando uma cor sólida para as áreas das unidades foliares que serão entendidas pelo programa e mensuradas como um objeto único (Figura 6.6).

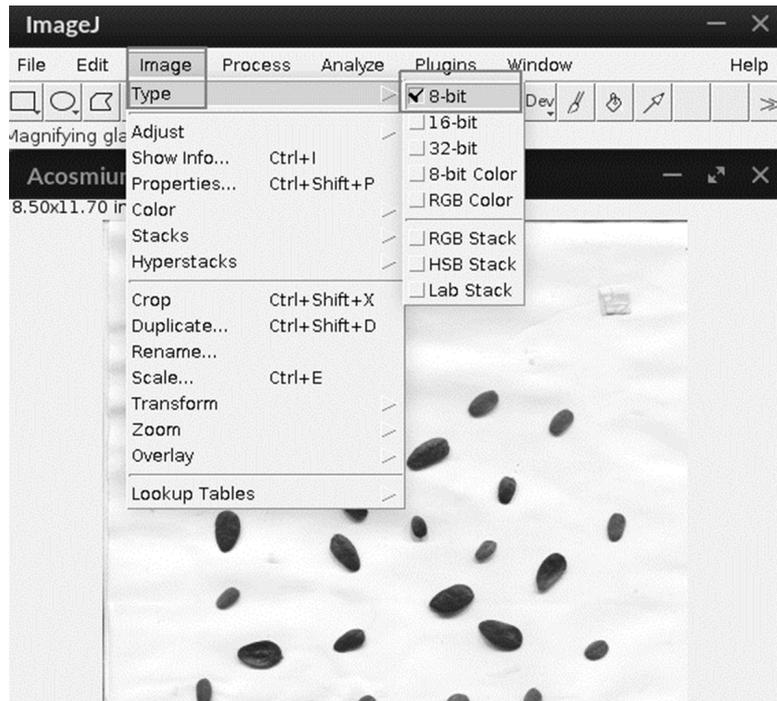


Figura 6.5. Como ajustar as imagens para escalas de cinza no software ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

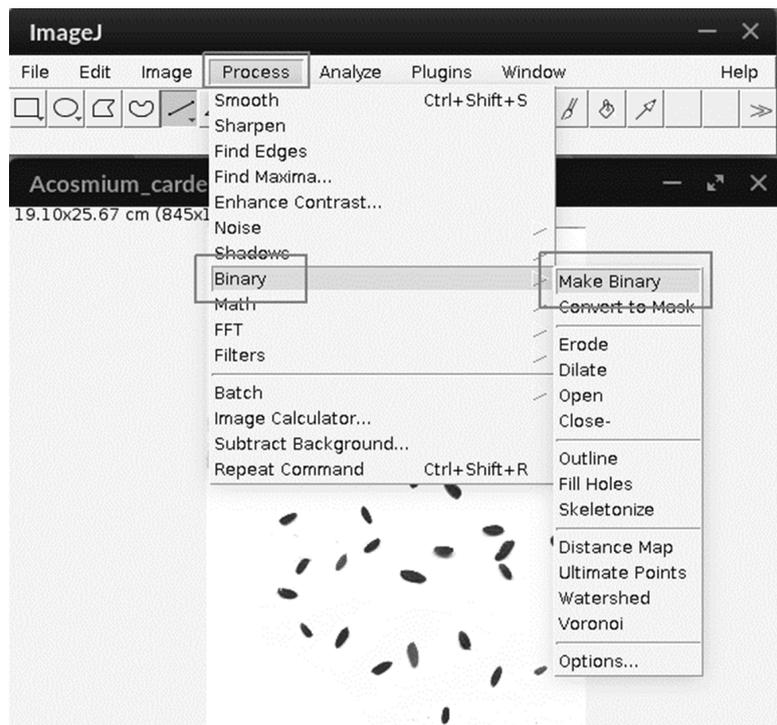


Figura 6.6. Como converter as imagens em escalas de cinza para imagens binárias (em preto e branco) no software ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

Clicar novamente em “Process → Binary → Fill Holes”, para preencher espaços em branco que por ventura surgirem devido a diferenças na luz nas áreas mais claras da imagem (Figura 6.7). Na guia “Analyze” → “Set Measurements...” → marcar a caixa “Add to

overlay” (Figuras 6.8 e 6.9). Essa ação permitirá que, ao mensurar cada unidade foliar, estas fiquem marcadas com uma numeração, indicando que a mensuração foi feita, evitando que a mesma unidade foliar seja mensurada mais de uma vez. Quando a quantidade de unidades foliares é pequena, visualmente é difícil confundi-las. Entretanto, quando se trabalha com foliólulos com áreas muito pequenas, esse passo é fundamental.

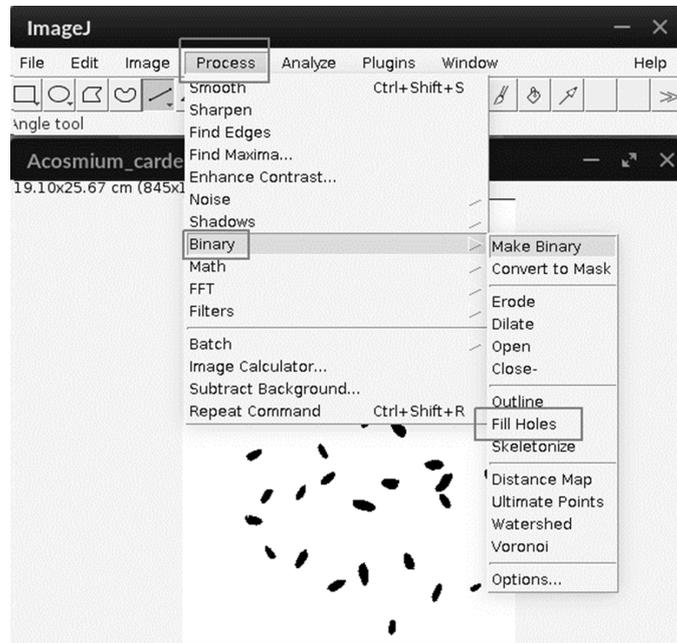


Figura 6.7. Como preencher os possíveis espaços vazios gerados pela conversão da imagem em binária (preto e branco) no software ImageJ.

Fonte: Dos autores (2021).

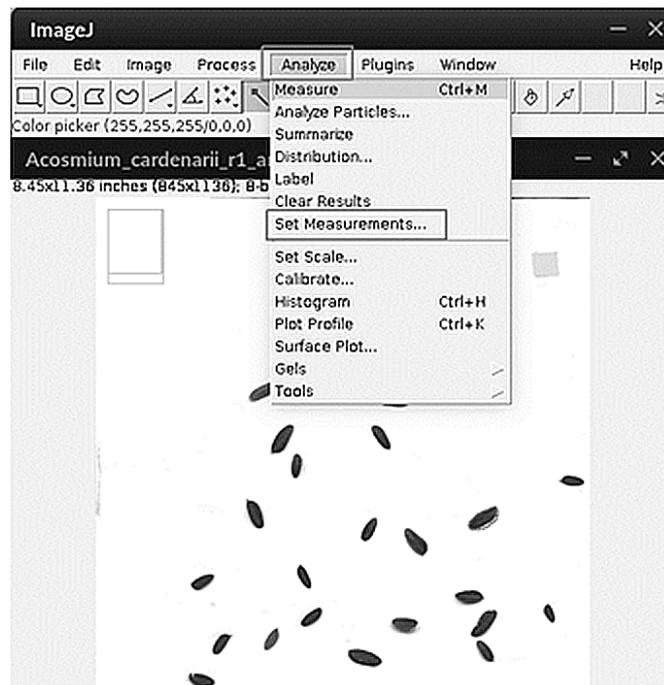


Figura 6.8. Como numerar as unidades foliares mensuradas no software ImageJ – passo 1.

Fonte: Dos autores (2021).

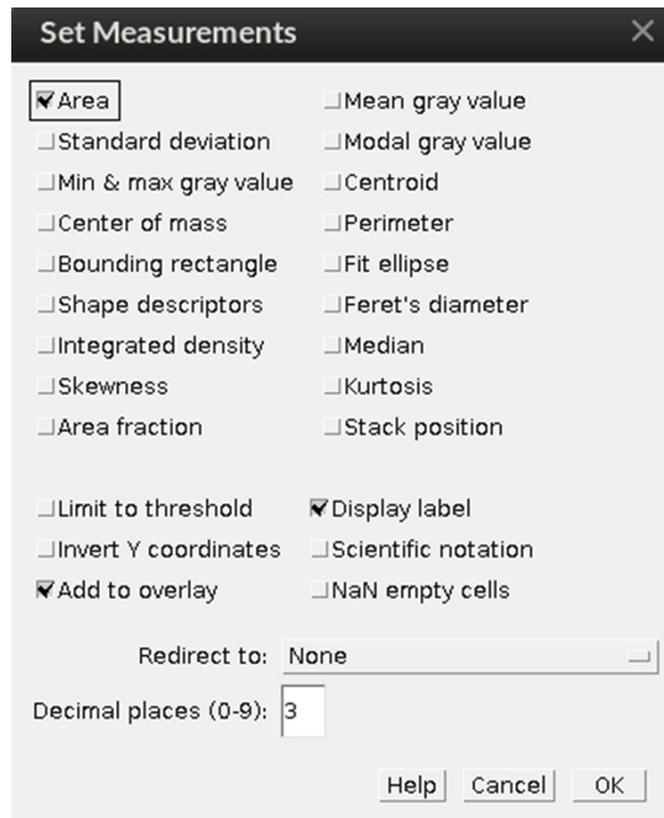


Figura 6.9. Como numerar as unidades foliares mensuradas no software ImageJ – passo 2 – adicionando “etiqueta” numerada.

Fonte: Dos autores (2021).

Selecionar, na barra de ferramentas, a varinha mágica “Wand”; clicar com a varinha mágica na área da imagem no interior da área da unidade foliar e, no teclado, pressionar “M” ou “Ctrl+M”. As áreas serão marcadas em amarelo e com um número. Repetir os dois passos anteriores para cada uma das unidades foliares. Uma guia com os valores será aberta (Figura 6.10). Copiar e colar apenas os valores de “Área” para o bloco de notas ou planilha.

Vale ressaltar que a unidade depende daquela usada na calibração da escala, no caso do exemplo, a área será em cm^2 . É preciso tomar cuidado com os valores copiados e colados, atentando-se para as vírgulas e pontos, que muitas vezes não são lidos corretamente pelo programa de destino.

6.1.1. Casos especiais

Em muitos casos, mesmo tomando os devidos cuidados, áreas sombreadas podem estar presentes nas imagens das unidades foliares. Por descuido, pequenas áreas mínimas, de poucos pixels, também podem aparecer conectando duas unidades foliares, que, por estarem unidas, serão entendidas como apenas uma unidade pelo programa. Nesses casos, devem ser feitas algumas correções antes das mensurações.

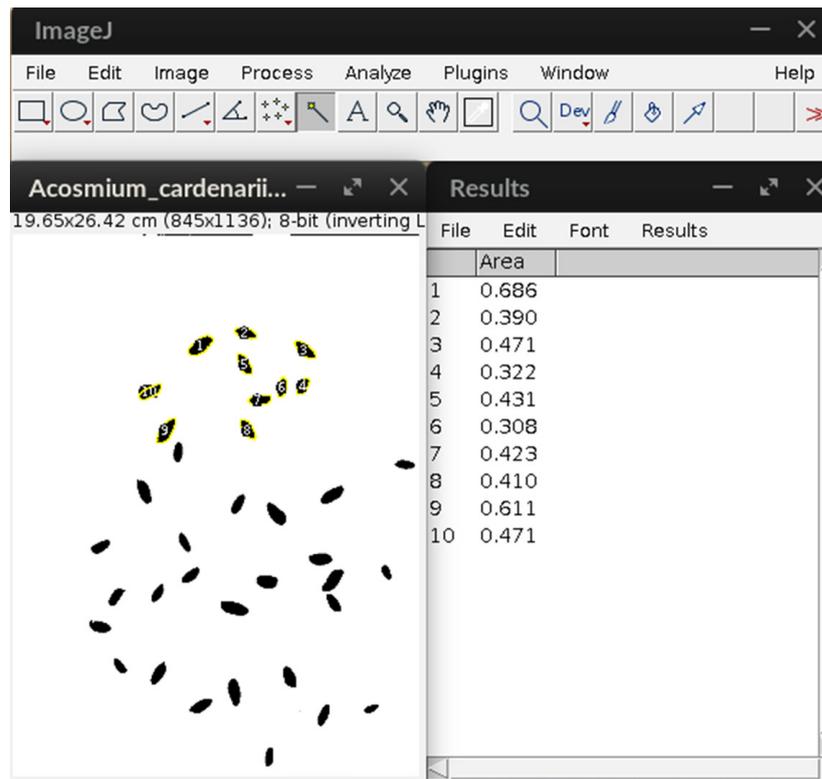


Figura 6.10. Janela do software ImageJ evidenciando a ferramenta varinha mágica, ou “Wand” selecionada, parte das unidades foliares mensurada (etiquetadas de amarelo, com a numeração), parte das unidades foliares ainda não mensuradas (as que se encontram sem a etiqueta amarela) e a caixa de diálogo contendo as medidas das áreas foliares já mensuradas.

Fonte: Dos autores (2021).

Algumas dessas correções são passíveis de serem realizadas no próprio ImageJ, como no caso de pequenas áreas conectadas (Figura 6.11), que podem ser separadas pela ferramenta “Paintbrush”. Nesta situação, todos os processos descritos acima são os mesmos, até o processo “Fill Holes”. Neste ponto, as áreas conectadas poderão ser observadas com precisão. Deve-se proceder posicionando o cursor do mouse em cima da área, dar zoom utilizando a tecla “+” no teclado, o suficiente para aproximar bastante e visualizar exatamente os pixels que se conectam. Em seguida, selecionar a ferramenta “Paintbrush”, dar clique duplo sobre ela para diminuir o tamanho do pincel, clicar e arrastar o mouse sobre a região que está conectando as unidades foliares. Após serem separadas, pode-se prosseguir com os procedimentos já descritos, observando, por meio da seleção em amarelo, se as áreas foram de fato separadas.

As áreas sombreadas ocorrem principalmente pelo mau posicionamento das unidades foliares no scanner ou devido às especificidades de cada espécie, como por exemplo, a presença de margens onduladas no limbo foliar ou folhas mais suculentas. Áreas sombreadas aparecem como regiões escuras na imagem, que podem ser interpretadas pelo programa como parte do limbo, o que leva a uma superestimação da área foliar. Ao realizar a mensuração da área foliar, é essencial

que o sombreamento seja corretamente removido dos valores finais. Uma das alternativas para corrigir o sombreamento, quando a área sombreada é pequena, é removê-la manualmente com o auxílio da ferramenta “Paintbrush”, como feito anteriormente, e prosseguir com a mensuração como já descrito.

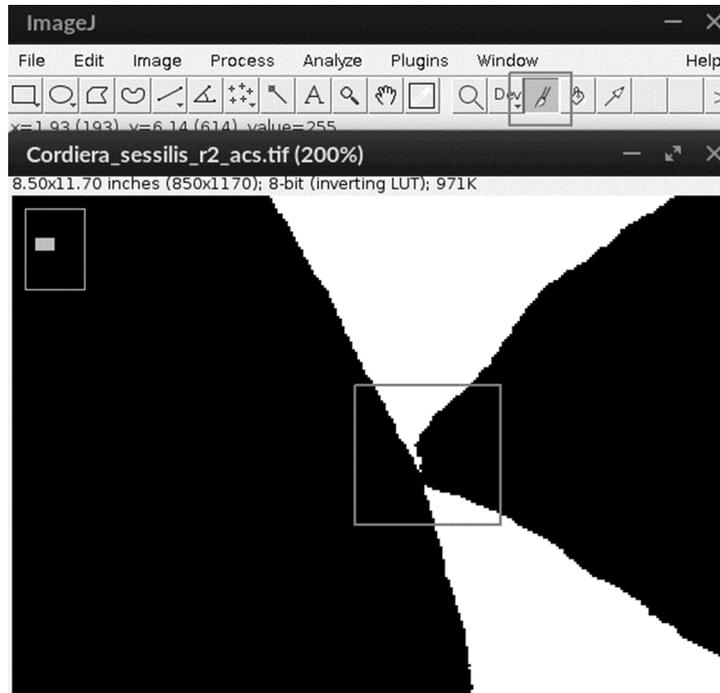


Figura 6.11. Áreas de unidades foliares conectadas por pixels no software ImageJ.
 Fonte: Dos autores (2021).

Caso contrário, é possível recorrer à ferramenta de criação de polígonos “Polygon selections”. Com o auxílio desta ferramenta, deve-se contornar toda a área da unidade foliar, excluindo as regiões sombreadas. Após fechar o polígono, caso houver algum ponto incorreto, é possível corrigi-lo arrastando os pequenos quadrados que conectam as linhas do polígono para onde for mais adequado. Após toda a área ser selecionada, pressionar “M” ou “Ctrl+M” no teclado (Figura 6.12). Repetir o processo para todas as unidades foliares. Neste procedimento, não é necessário converter a imagem para 8-bit, já que a seleção da área é feita manualmente.

Esta tarefa ainda pode ser realizada de uma terceira forma, com a ferramenta varinha mágica “Wand”. Para tanto, deve-se selecionar a ferramenta e clicar na região central do limbo foliar. Após, dar clique duplo na ferramenta “Wand” para abrir sua caixa de diálogo, aumentar gradativamente os valores de “Tolerance” até que toda a área do limbo seja selecionada em amarelo, e excluindo as áreas sombreadas, clicar em “OK” (Figura 6.13). Pressionar “M” ou “Ctrl+M” no teclado. Repetir o processo para todas as unidades foliares. Assim como no procedimento anterior, não é necessário converter a imagem para 8-bit, inclusive é possível trabalhar com imagens coloridas, já que a seleção da área é feita manualmente.

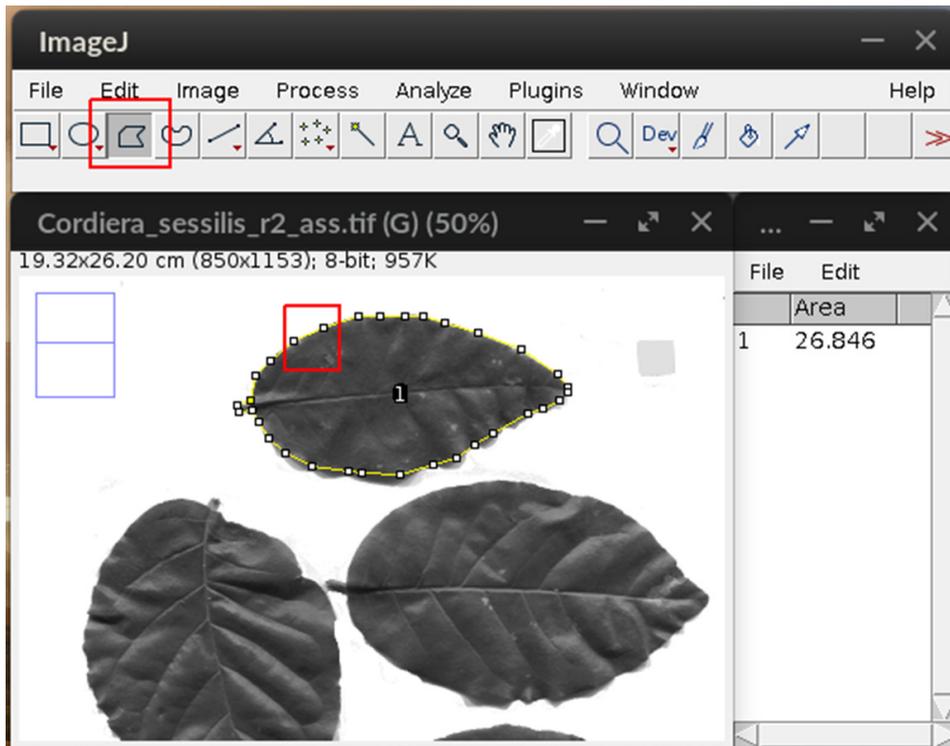


Figura 6.12. Como fazer a seleção e mensuração manual da área foliar por meio da ferramenta “Polygon selections” no software ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

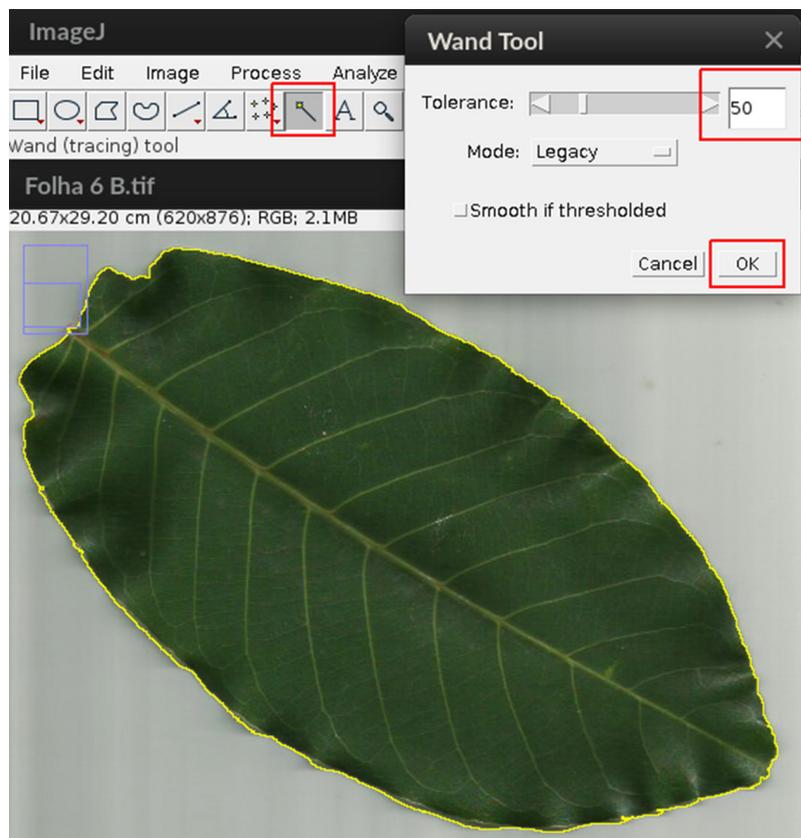


Figura 6.13. Como fazer a seleção e mensuração manual da área foliar por meio da ferramenta “Wand”, ou varinha mágica, no software ImageJ.
Fonte: Dos autores (2021).

6.2. Mensurando as características funcionais relativas aos vasos xilemáticos

Algumas características funcionais hidráulicas são obtidas a partir das lâminas anatômicas, e, a partir destas, podem ser calculadas outras características funcionais. Dentre elas, é possível citar a densidade de vasos e a área total de vasos. A mensuração das características funcionais relativas aos vasos do xilema requer a preparação prévia das imagens para deixá-las compatíveis e passíveis de serem mensuradas pelo ImageJ. Esse preparo é realizado no programa GIMP, um programa específico para a manipulação de imagens, que facilitará o trabalho no ImageJ.

6.2.1. Criação da escala

A densidades de vasos e a área total de vasos são obtidas a partir da média da quantidade de vasos e da área ocupada pelos vasos, consecutivamente, em 3 diferentes regiões de 1 mm^2 . Para facilitar o processo e evitar a conversão desnecessária de dados, que aumentam a propensão a erros, é possível a criação de uma escala de 1 mm^2 , em forma de moldura digital, que será usada para as mensurações. Esse trabalho será realizado no GIMP, conforme descrito a seguir:

Passo 1: abrir no GIMP a imagem com a barra de escala fotografada na mesma lente objetiva (10x) utilizada para as imagens das secções transversais do xilema, por meio do menu “Arquivo → Abrir...” (Figura 6.14).



Figura 6.14. Como abrir a imagem contendo a barra de escala fotografada no microscópio, no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 2: criar uma nova camada no menu “Camada → Nova camada...”. Na caixa de diálogo aberta, em “Etiqueta de cor”, selecionar a opção “sem cor de plano de fundo”, designada por um pequeno quadrado com um x (Figuras 6.15 e 6.16). Clicar em “ok”.

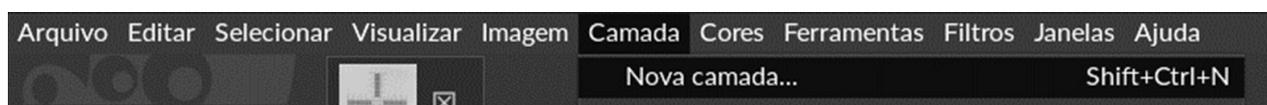


Figura 6.15. Como criar uma nova camada no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

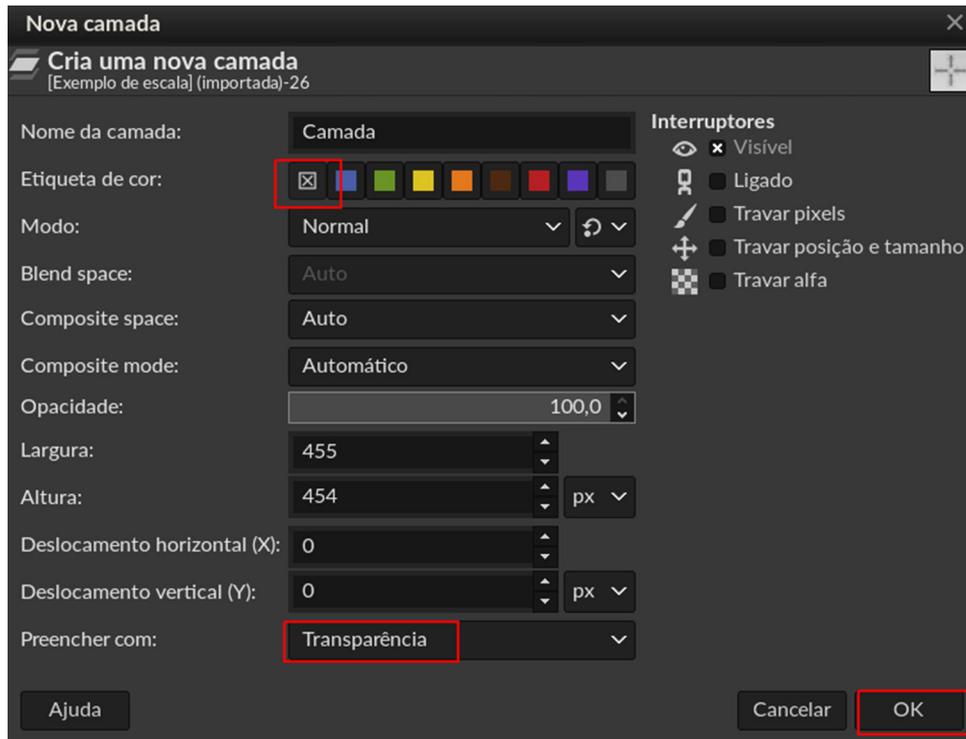


Figura 6.16. Como criar uma nova camada transparente (sem cor de plano de fundo) no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

Certifique-se de que a nova camada está sobreposta à camada da escala na barra de ferramentas à esquerda da tela. A ordem das camadas na barra de ferramentas é a mesma ordem de sobreposição (Figura 6.17). Caso a ordem esteja invertida, basta clicar sobre a camada desejada e arrastá-la para a posição correta. Após arrastar a camada, é importante observar se a camada que está selecionada é a transparente (a de coloração mais forte na listagem é sempre a que está selecionada), se não for, basta clicar sobre ela. É importante sempre observar se a camada que você pretende trabalhar é a camada que está selecionada.

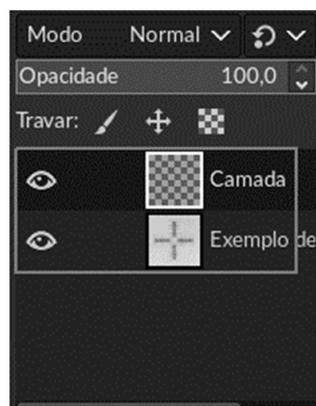


Figura 6.17. Ordem de sobreposição das camadas no software GIMP. A primeira camada é a que ficará por cima na imagem final.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 3: delimitar a área de 1 mm², arrastando linhas de grade a partir das régua superior e esquerda do plano de trabalho. Basta clicar em qualquer lugar da régua e arrastá-la até a posição desejada, de modo a formar um quadrado com arestas de 1mm, delimitadas pelo tamanho da escala utilizada (no caso do exemplo, a escala coincide com uma área de 1mm de largura por 1 mm de altura, o que facilita o trabalho (Figura 6.18).

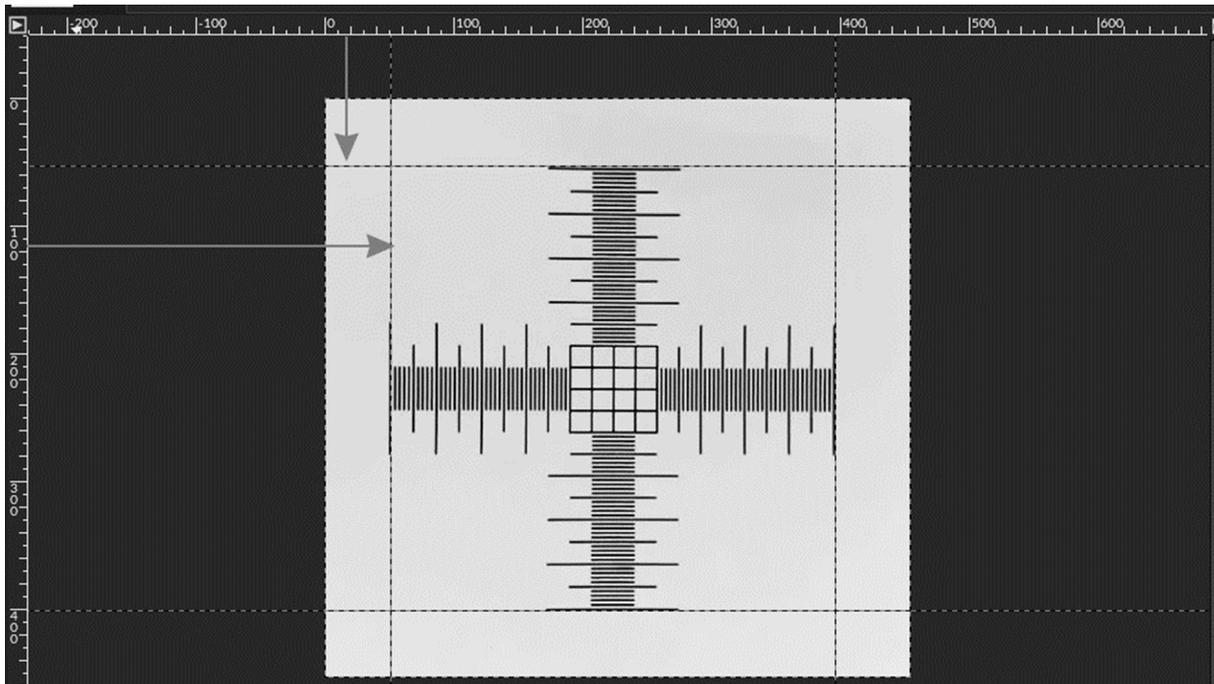


Figura 6.18. Como demarcar a área de 1 mm² para criar uma moldura fixa desta dimensão no software GIMP – parte 1.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 4: Contornar a área de 1 mm² demarcada pelas linhas de grade com o auxílio da ferramenta “Pincel”. Na barra de ferramentas do lado esquerdo, selecionar a ferramenta “Pincel”, o tamanho (10 pontos ou 12) e uma cor que se destaque das cores das imagens que serão mensuradas (vermelho, rosa etc.). Na barra de ferramentas à direita da tela, selecionar o formato do pincel de cor sólida (Hardness 100) (Figura 6.19). Pressionando a tecla “Shift” no teclado, clicar em um dos vértices do quadrado formado pelas linhas de grade, arrastar o mouse e clicar em cada um dos outros 3 vértices, até contornar toda moldura (Figura 6.20).

Passo 5: remover a camada com a imagem da escala utilizada para fazer a moldura de 1 mm², clicando com o botão direito na camada e selecionando o comando “Remover camada” na guia aberta. Ao final, deve aparecer apenas a camada com a moldura (Figura 6.21).

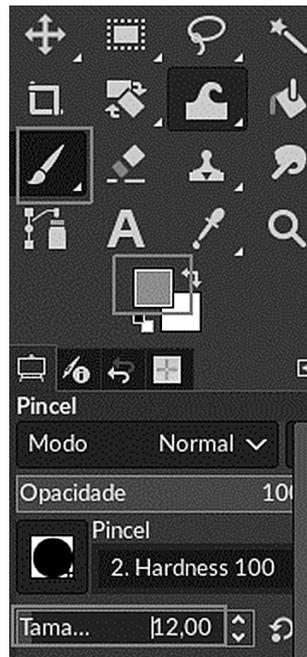


Figura 6.19. Como demarcar a área de 1 mm² para criar uma moldura fixa desta dimensão no software GIMP – parte 2.

Fonte: Dos autores (2021).

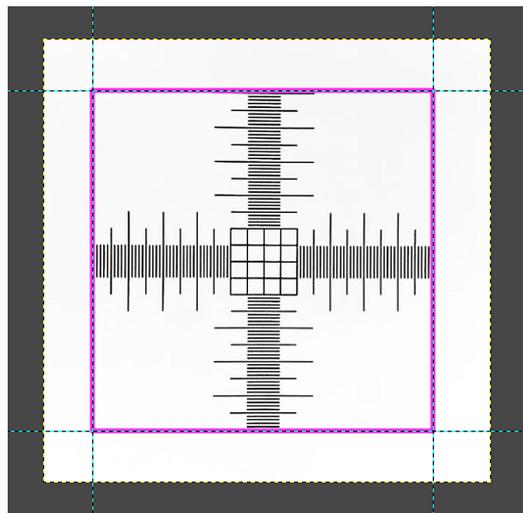


Figura 6.20. Área de 1 mm² colorida e pronta no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

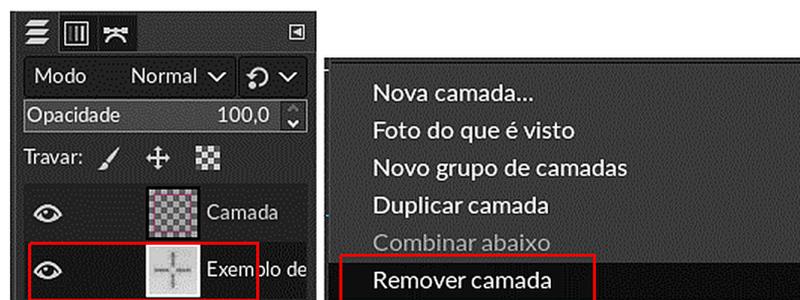


Figura 6.21. Como remover a camada que não vai mais ser utilizada no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 6: Exportar a imagem na guia “Arquivo → Export as...”. Na caixa de diálogo aberta, nomear o arquivo e clicar em “Exportar”. Exportar em formato “.tiff”, compressão LZW, caso seja solicitada a compressão (Figura 6.22). É importante ressaltar que o processo de exportar salva a imagem, enquanto que, em “salvar” ou “salvar como”, a janela do GIMP com as camadas e o trabalho que está sendo desenvolvido fica salva, sendo possível entrar no projeto e continuar de onde parou, posteriormente. Para verificar se a moldura está com a escala correta, é possível utilizar o ImageJ. Após calibrar a escala do programa, selecionar na barra de ferramentas a varinha mágica “Wand”, clicar no interior da área da moldura e, no teclado, pressionar “M” ou “Ctrl+M”. O resultado deve ser igual a 1 mm².

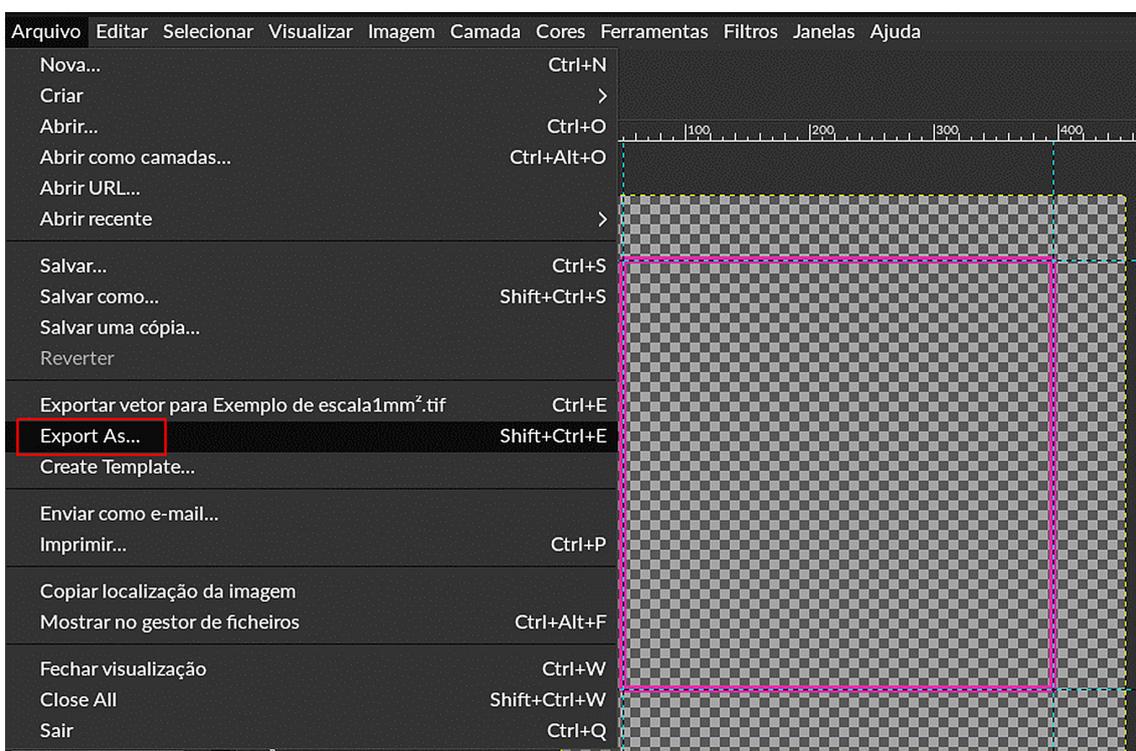


Figura 6.22. Exportando (salvando) a imagem gerada no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

6.2.2. Preparando as imagens no GIMP

Esta etapa consiste basicamente em preencher com uma cor sólida o lúmen de todos os vasos que se encontram dentro do perímetro da moldura de 1 mm², possibilitando maior confiabilidade dos dados medidos pelo ImageJ. As etapas seguem descritas nos passos abaixo:

Passo 1: abrir no GIMP a imagem da secção transversal do xilema, por meio do menu “Arquivo → Abrir...”. Este passo está demonstrado no início do tópico 6.2.1, na Figura 6.14.

Passo 2: abrir como camada a imagem da moldura de 1 mm² criada previamente no menu “Arquivo → Abrir como camadas...”, passo demonstrado na Figura 6.15, no início do tópico 6.2.1.

Passo 4: criar uma nova camada no menu “Camada → Nova camada...”. Na caixa de diálogo aberta, em “Etiqueta de cor”, selecionar a opção “sem cor de plano de fundo”, designada por um pequeno quadrado com um x. Clicar em “ok”. Este passo está exemplificado na Figura 6.16, no início do tópico 6.2.1. Certificar-se de que a nova camada está sobreposta às outras duas camadas na barra de ferramentas à esquerda da tela. A ordem das camadas na barra de ferramentas é a mesma ordem de sobreposição. A nova camada deve ser a superior, pois é nela que os lúmens dos vasos serão preenchidos (Figura 6.23). Caso a ordem esteja invertida, basta clicar sobre a camada desejada e arrastá-la para a posição correta.

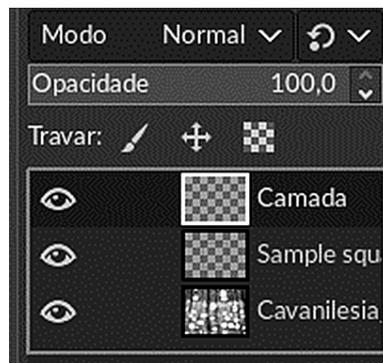


Figura 6.23. Ordem de sobreposição das camadas no software GIMP.
Fonte: Dos autores (2021).

Passo 5: se necessário, arrastar a imagem utilizando a “ferramenta de movimentos”, posicionando o lúmen dos vasos dentro da moldura de 1mm², de forma a evitar que parte de um vaso fique fora da moldura com a área de 1 mm² pré-estabelecida (Figura 6.24). Em muitos casos, essa é uma tarefa difícil, e é possível que alguns vasos sejam cortados parcialmente pelas arestas da moldura. Nestes casos, fica a critério do pesquisador contabilizá-los ou não, entretanto, o critério adotado deve ser aplicado a todas as imagens analisadas e deve constar na metodologia dos trabalhos publicados a partir daqueles dados, para que os leitores tenham ciência da metodologia, caso utilizem os valores para comparações.

Passo 6: preencher o lúmen dos vasos com o auxílio da ferramenta “Pincel”. Na barra de ferramentas do lado esquerdo, selecionar a ferramenta “Pincel”, o tamanho (de acordo com o tamanho do lúmen a ser preenchido) e uma cor que se destaque das cores das imagens que serão mensuradas (vermelho, preto, etc.) (Figura 6.25). Na barra de ferramentas à direita da tela, selecionar o formato do pincel de cor sólida.

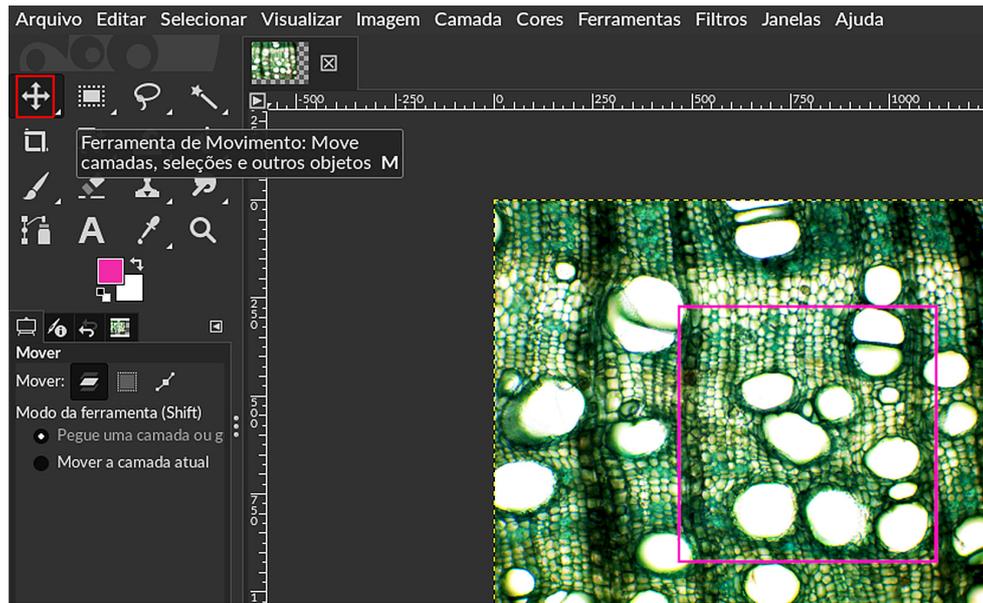


Figura 6.24. Enquadramento da foto microscópica contendo tecido de xilema na moldura de 1 mm² com auxílio do botão “ferramenta de movimentos” no software GIMP. Fonte: Dos autores (2021).

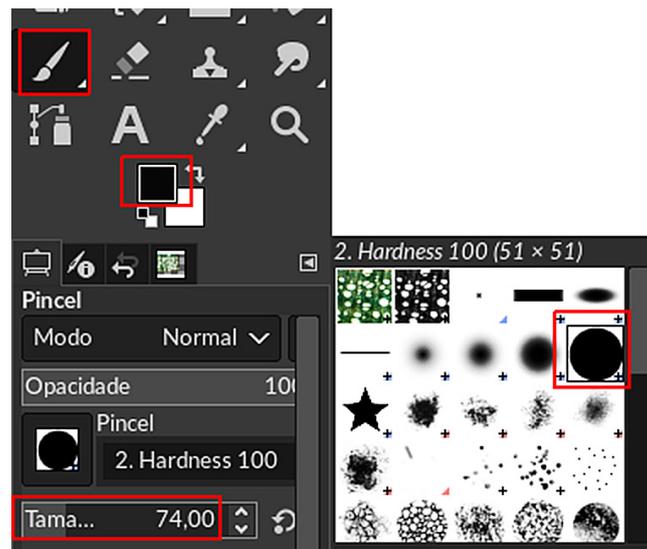


Figura 6.25. Preenchimento dos vasos de xilema com auxílio do botão “Pincel” no modo “Hardness 100” no software GIMP. Fonte: Dos autores (2021).

Passo 7: dar zoom na área a ser preenchida, clicando na tecla “+” do teclado. Preencher criteriosamente o lúmen de todos os vasos dentro da moldura de 1 mm², com o auxílio do pincel (Figura 6.26).

Passo 8: remover a camada com a imagem das micro secções, clicando com o botão direito na camada e selecionando o comando “Remover camada” na guia aberta (Figura 6.27). Ao final, devem aparecer apenas as camadas da moldura de 1mm² e o lúmen dos vasos pintados (Figura 6.28).

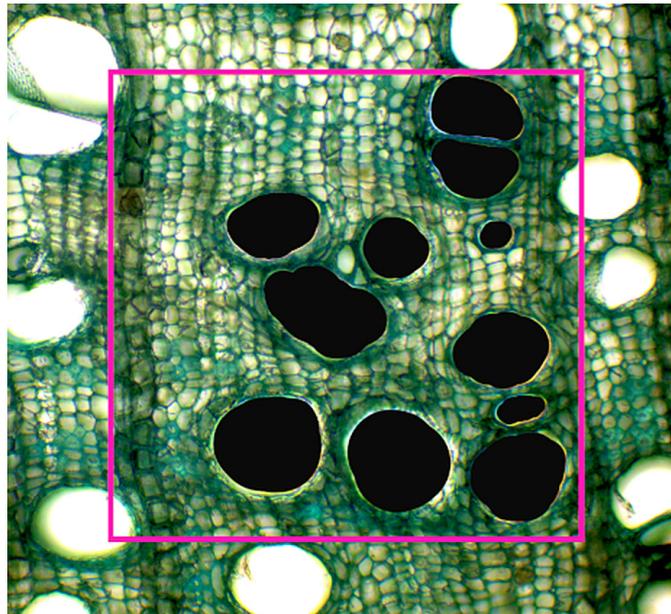


Figura 6.26. Preenchimento criterioso do lúmen dos vasos de xilema com auxílio do botão “Pincel” no modo “Hardness 100” no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

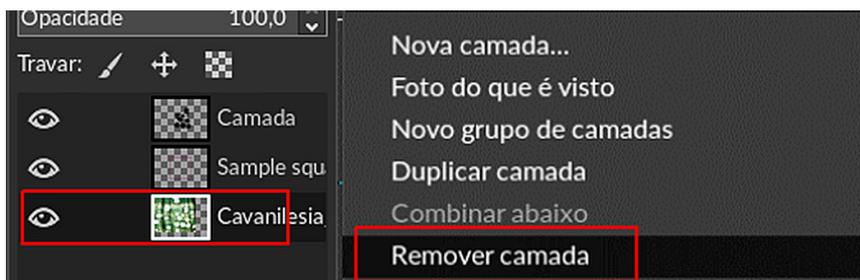


Figura 6.27. Remoção da camada com a imagem das micro secções no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

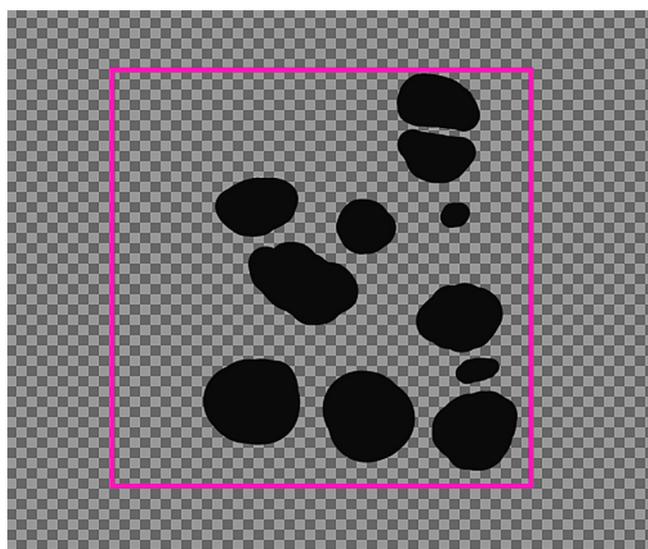


Figura 6.28. Imagem contendo a moldura e os vasos de xilema coloridos no software GIMP.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 9: Exportar a imagem conforme a Figura 6.22, na guia “Arquivo → Export as...”. Na caixa de diálogo aberta, nomear o arquivo e clicar em “Exportar”. Salvar em formato “.tiff”. Agora, as imagens estão prontas para a mensuração no ImageJ.

6.2.3. Utilizando o ImageJ

Passo 1 – Abrindo a imagem: na barra de comando, clicar em “File” → “Open...” ou por meio do comando Ctrl + O (Figura 6.29). Escolher o arquivo desejado. Para as próximas imagens, caso elas sejam sequenciais, é possível abri-las clicando em “Open Next”.

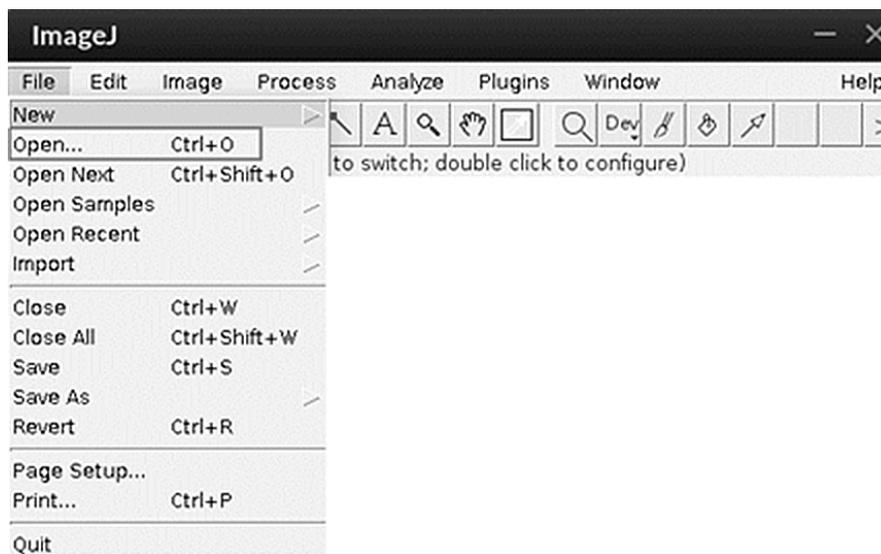


Figura 6.29. Como abrir as imagens no software ImageJ.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 2 – Calibrando a escala: com a imagem aberta, dar zoom na área de tamanho conhecida (no exemplo, observa-se a área conhecida de cada aresta da moldura, que equivale a 1mm). Para dar zoom, basta levar o mouse até a área de interesse e pressionar a tecla “+”, para aumentar o zoom, ou “-”, para diminuir, quantas vezes for necessário. Clicar na ferramenta linha (“Straight”), na barra de ferramentas. Com a ferramenta selecionada, manter pressionada a tecla shift do teclado ao traçar uma linha na área de tamanho conhecido, e clicar em “Analyze → Set Scale”. Na caixa de diálogo, inserir em “Know distance”, o valor conhecido (no caso do exemplo, 1 mm, mas é possível converter a unidade para micrômetro ou para a unidade de trabalho desejado); em “Unit of length”, a unidade de medida (no exemplo, mm); marcar a caixa “Global”, para que a escala esteja disponível para as próximas imagens; clicar em “Ok”. Em “Distance in pixels”, pode ser observada a quantidade de pixel pelo qual a linha passa, isso significa que, no caso do exemplo, são 652 pixels/mm (Figura 6.30).

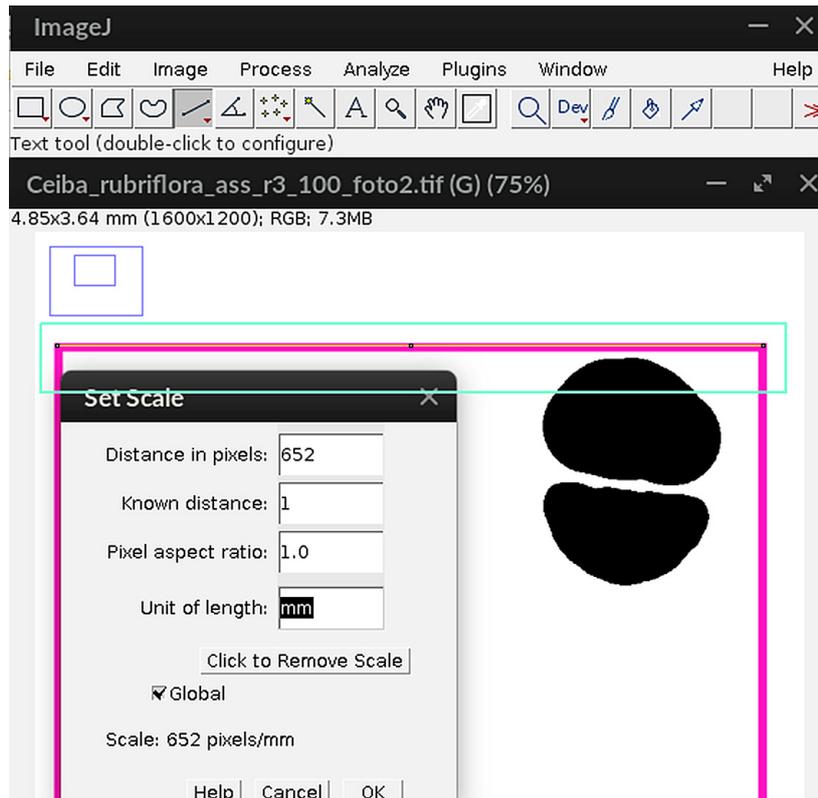


Figura 6.30. Calibrando a escala no software ImageJ, utilizando a moldura da própria imagem.

Fonte: Dos autores (2021).

Esse processo deve ser refeito todas as vezes que o ImageJ for fechado, pois as configurações não ficam salvas. É importante manter a linha a mais reta possível, pressionando a tecla shift, para que a quantidade de pixels selecionada seja exatamente o correspondente à escala. Logo após a calibração da escala, é interessante testá-la, fazendo a mensuração de uma área conhecida (traçar uma linha em área conhecida e clicar em “M” ou “Ctrl + M” no teclado, para averiguar que a escala está correta. É importante estar atento ao fato de que, ao calibrar a imagem, a resolução de todas as fotos deve ser a mesma da imagem utilizada na calibração, pois a quantidade de pixels influencia na medida estipulada pelo ImageJ. Em caso de mudanças na resolução da imagem, a escala deve ser calibrada novamente.

Outra forma de calibrar a imagem, é utilizar a própria barra de escala utilizada para criar a moldura de 1mm² (Figura 6.31). Os passos são parecidos, a diferença é que se deve:

- Abrir a imagem com a escala micrométrica, dar zoom na área de tamanho conhecida (no exemplo, utilizou-se uma barra micrométrica de 0.5 mm graduada em 0.1mm). Para dar zoom, basta levar o mouse até a área de interesse e pressionar a tecla “+”, para aumentar o zoom, ou “-”, para diminuir, quantas vezes for necessário.
- Clicar na ferramenta linha (“Straight”), na barra de ferramentas.

- Com a ferramenta selecionada, manter pressionada a tecla shift do teclado, ao traçar uma linha na área de tamanho conhecido, e clicar em “Analyze → Set Scale”.
- Na caixa de diálogo, inserir em “Known distance” o valor conhecido (no caso do exemplo, 0.1 mm; atenção para sempre utilizar ponto, em detrimento de vírgula, para as casas decimais, pois o programa não reconhece as vírgulas).
- Em “Unit of length”, inserir a unidade de medida (no exemplo, mm; se estiver utilizando micrômetro como unidade, basta digitar “um”, que o programa entenderá a letra “u” como μ).
- Marcar a caixa “Global”, para que a escala esteja disponível para as próximas imagens; clicar em “Ok”.

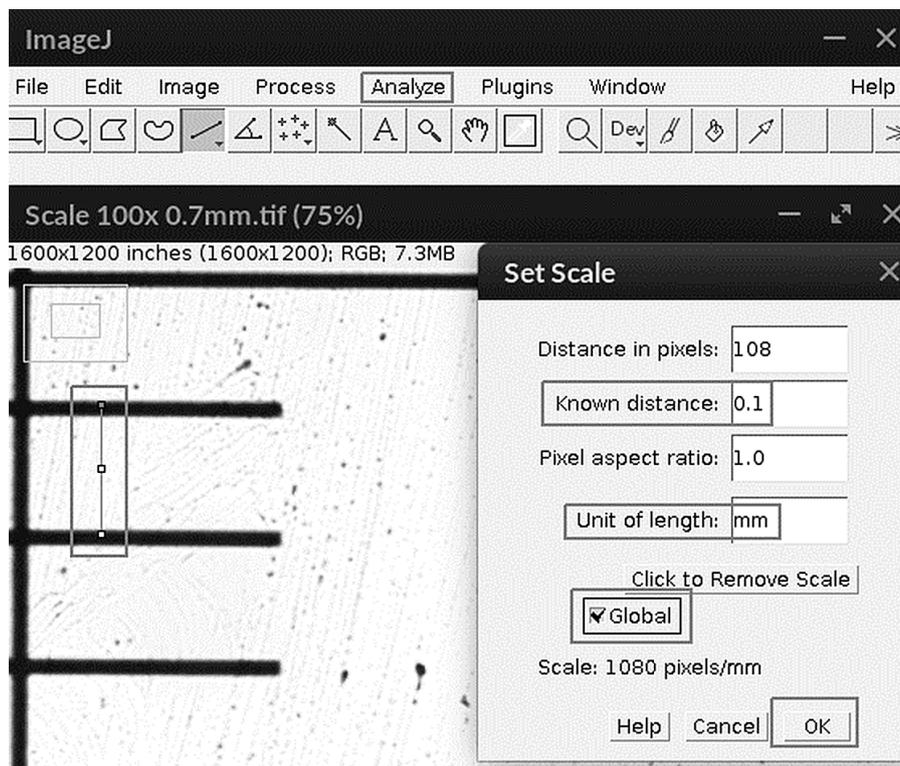


Figura 6.31. Calibrando a escala no software ImageJ, utilizando a barra de escala micrométrica.

Fonte: Dos autores (2021).

Esse processo deve ser feito todas as vezes que o ImageJ for fechado, pois as configurações não ficam salvas. Deve-se estar atento ao fato de que, ao calibrar a imagem, a resolução de todas as fotos deve ser a mesma da imagem utilizada na calibração, pois a quantidade de pixels influencia na medida estipulada pelo ImageJ. Em caso de mudanças na resolução da imagem, a escala deve ser calibrada novamente com outra imagem de resolução compatível.

Passo 3 – Contagem de vasos múltiplos: os vasos múltiplos (ou agrupados) são aqueles cujas paredes celulares estão em contato; não são apenas vasos próximos

(Figura 6.32). São mais facilmente visualizáveis na fotografia da lâmina anatômica, então, caso a imagem dos vasos coloridos levante dúvidas, basta recorrer à foto original. Para contá-los, abrir no menu “Plugins → cell_couter”, previamente instalado conforme o primeiro tópico deste capítulo (Figura 6.33).

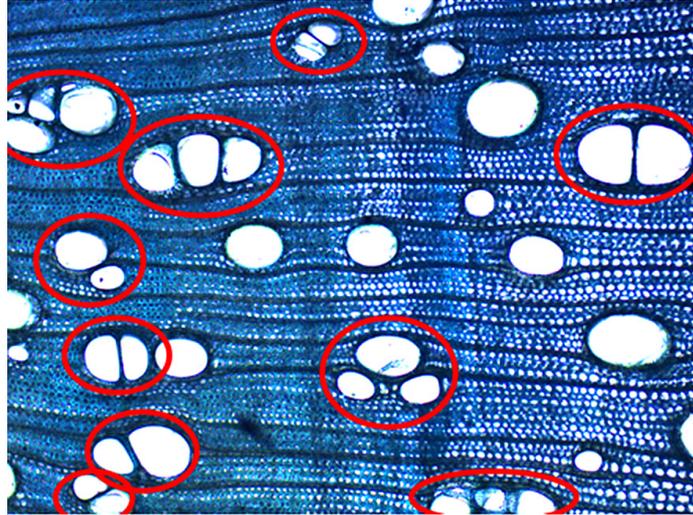


Figura 6.32. Imagem de Imagem de micro secção transversal de ramos de *Albizia polycephala* (Benth.) Killip ex Record obtida a partir de câmera digital acoplada a microscópio óptico. Aumento de 100x e uso de lente objetiva de 10x. Os vasos múltiplos estão circulado de vermelho.

Fonte: Dos autores (2021).

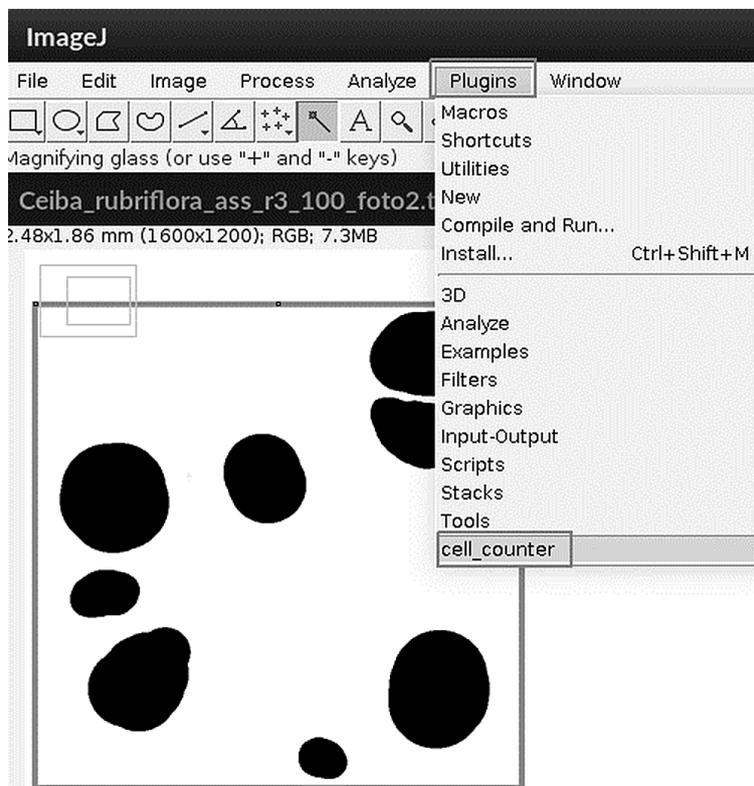


Figura 6.33. Como contar vasos múltiplos no software ImageJ.

Fonte: Dos autores (2021).

Selecionar, na barra de ferramentas, a varinha mágica “Wand”; na caixa de diálogo “Cell counter”, clicar em “Type 1” e selecionar com o mouse todas os vasos do mesmo tipo (Por exemplo, definir e selecionar “Type 1” como vasos solitários e clicar sobre todos os vasos solitários; definir e selecionar “Type 2” como vasos múltiplos e clicar sobre todos os vasos múltiplos). Ao clicar sobre os vasos, uma marcação do tipo 1 ou 2 fica em coloração diferente na imagem, ao mesmo tempo em que é contabilizada na caixa de diálogo do “Cell counter” (Figura 6.34). Ao final, transferir os dados para a planilha de análise.

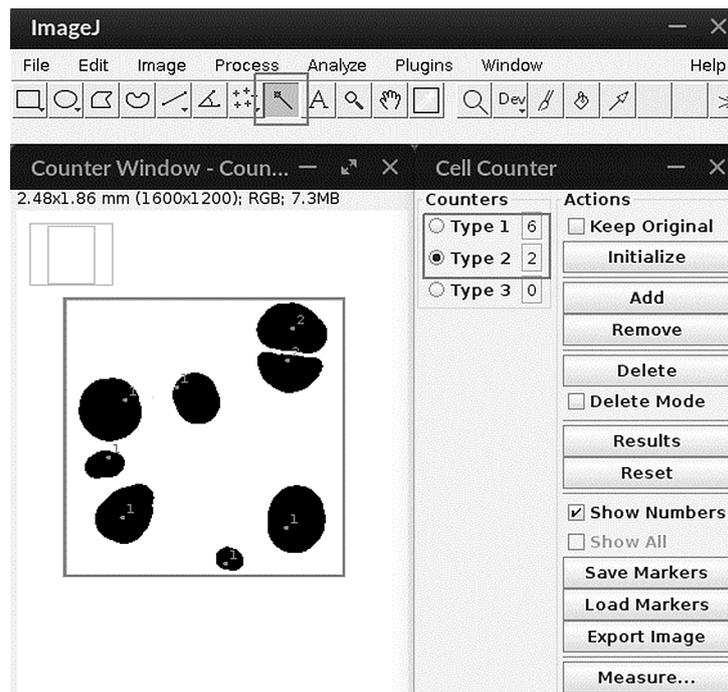


Figura 6.34. Como contar vasos múltiplos e vasos solitários usando o plugin “cell conter” e o botão “Wand” ou varinha mágica no software ImageJ.

Fonte: Dos autores (2021).

Passo 4 – Mensurando a área de vasos: com a escala previamente calibrada, clicar na guia “Analyze” → “Set Measurements...” → marcar a caixa “Add to overlay”. Essa ação permitirá que, ao mensurar cada vaso, estes fiquem marcados com uma numeração, indicando que a mensuração foi feita. Quando a quantidade de vasos é pequena, visualmente é difícil confundi-los. Entretanto, quando se trabalha com espécies com altas densidades de vasos, esta ferramenta é essencial. As Figuras 6.8 e 6.9 deste capítulo demonstram este procedimento para a medição de área foliar. Para a medição da área do vaso, o procedimento é o mesmo.

Selecionar, na barra de ferramentas, a varinha mágica “Wand”; clicar com a varinha mágica na área da imagem no interior do vaso e, no teclado, pressionar “M” ou “Ctrl+M”. As áreas serão marcadas em amarelo e marcadas com um número. Repetir os dois passos anteriores para cada um dos vasos. Uma guia com os valores

será aberta (Figura 6.35). Copiar e colar apenas os valores de “Área” para o bloco de notas ou planilha, assim como a quantidade total de vasos. Lembrando que a unidade depende daquela usada na calibração da escala, no caso do exemplo, a área será em mm². Cuidado com os valores copiados e colados, atentando-se para as vírgulas e pontos, que muitas vezes não são lidos corretamente pelo programa de destino.

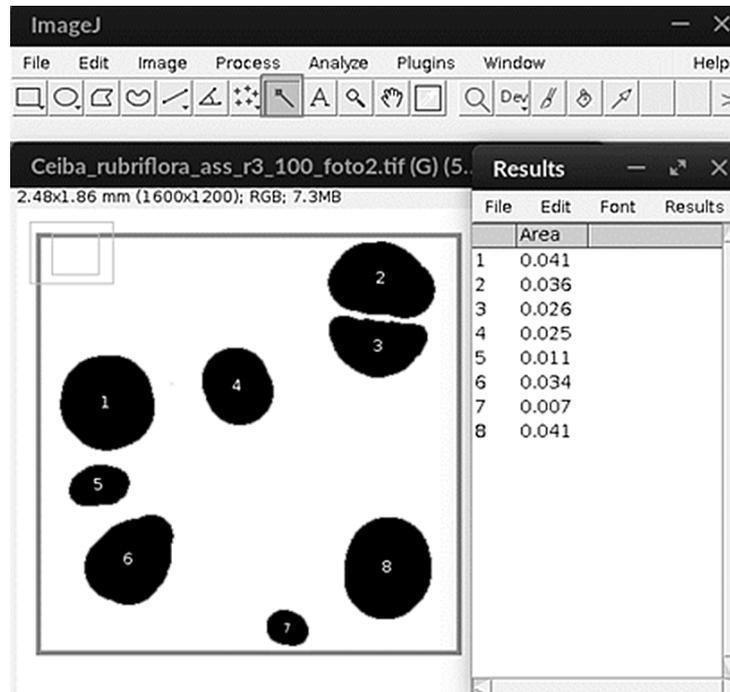


Figura 6.35. Como medir a área dos vasos de xilema por meio do botão “Wand” ou varinha mágica no software ImageJ. Note que a imagem mostra as etiquetas numeradas em cada um dos vasos, a caixa de diálogo aberta com a mensuração por vaso e o número total de vasos na figura.

Fonte: Dos autores (2021).

6.3. Referências

OLIVOTO, T. Package ‘pliman’. 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/pliman/pliman.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2021.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 mar. 2020.

7. Métodos de análise de características funcionais para estudos ecológicos em comunidades

Cléber Rodrigo de Sousa
Vinícius de Andrade Maia
Rubens Manoel dos Santos

Após realizar todos os procedimentos de coleta de dados em campo e em laboratório e obter as características funcionais como descrito nos capítulos anteriores, é chegada a etapa em que todos os esforços são convertidos em números e as suas relações podem ser testadas: a etapa de tratamento e análise de dados. Após todo o esforço humano e financeiro já despendido, é essencial que as informações obtidas sejam trabalhadas de forma a possibilitar que os objetivos propostos sejam alcançados, que as inferências obtidas sejam confiáveis e que se possa extrair o máximo que os dados possam oferecer. Assim, nesse capítulo, é apresentado brevemente como trabalhar informações de características funcionais, desde os cuidados com as planilhas até explanações de algumas métricas ecológicas possíveis de serem obtidas por meio dos dados. Além disso, também serão apresentadas algumas possíveis aplicações destas análises, bem como fontes e perspectivas adicionais. A ideia do capítulo é explanar de forma breve sobre o assunto, em que informações mais profundas podem ser obtidas nas referências citadas no final.

7.1. Tabulação de dados de características funcionais

Em todo o processo de coleta de informações sobre características funcionais, coletam-se valores (atributos) referentes às variáveis de interesse da unidade amostral mais básica empregada (indivíduo, folha, ramo, etc.). Assim, realiza-se uma mensuração de uma determinada variável e o valor obtido deve ser registrado em uma planilha física ou eletrônica. Recomenda-se que, sempre que possível, os registros sejam feitos diretamente em planilhas eletrônicas, para que a ocorrência de erros comuns na digitação seja minimizada. Contudo, muitas variáveis são coletadas diretamente em campo, em situações em que utilizar dispositivos eletrônicos não é possível, ou operacionalmente inviável, sendo inevitável utilizar planilhas físicas. Nas duas situações, entretanto, é possível que os registros sejam realizados no formato desejável para a realização das análises posteriores (que será discutido a seguir), para que o processo de manejo dos dados seja reduzido ao máximo, assim minimizando tempo e esforço necessários para a análise, assim como para diminuir as chances de erros que possam comprometer sua qualidade. Vale ressaltar que a planilha com os dados brutos deve ser guardada em modo de segurança, e outra planilha, com os mesmos dados, deve ser utilizada para as análises, resguardando assim os dados originais.

A recomendação de planilha para tabulação de dados de características funcionais segue um padrão adotado nas ciências de dados como um todo, em que novas observações são sempre acrescentadas como novas linhas, e que variáveis e/ou atributos são acrescentados como novas colunas (Figura 7.1). Portanto, as colunas servem para caracterizar e adicionar informações para as observações. Este formato permite a manipulação fácil para qualquer outro formato, e também já é um formato direto para análises estatísticas frequentemente utilizadas.

local	parcela	n_arv	spp	rep	sub_rep	var1	var2	var3
site1	2	92	sp15	1	1	0.30	4.60	0.06
site1	3	130	sp15	2	1	0.17	4.83	0.06
site1	3	139	sp15	3	1	0.30	4.77	0.07
site2	14	64	sp27	1	1	0.53	11.33	0.14
site2	14	75	sp27	3	1	0.37	11.83	0.16
site2	14	79	sp27	2	1	0.63	10.57	0.15
site3	11	533	sp14	1	1	0.00	0.50	0.09
site3	12	576	sp14	2	1	0.00	0.73	0.08
site3	12	625	sp14	3	1	0.00	0.50	0.12
site3	13	725	sp1	1	1			

Figura 7.1. Modelo de planilha para tabulação dos dados de características funcionais considerado o mais adequado. Note que todos os caracteres estão em minúsculo e que não há espaços entre termos. “local” se refere à área de coleta, “parcela”, à unidade amostral dentro da área (se aplicável), “n_arv”, à identidade da árvore utilizada para a coleta, “spp”, à identificação da espécie, “rep”, ao número da repetição da espécie na área; as colunas com “var” se referem às variáveis de características funcionais utilizadas. As células marcadas em cinza são células vazias a serem preenchidas com a nova amostra incluída.

Fonte: Dos autores (2021).

A partir do apresentado na Figura 7.1, é possível discutir alguns pontos importantes, em que é recomendado que o leitor volte a visualizá-la para que o entendimento possa ser potencializado.

- **Novas repetições são acrescentadas como novas linhas.** Neste modelo de planilha, uma nova repetição ou amostra é acrescentada como uma nova linha e todas as suas informações preenchidas, mesmo que algumas delas sejam compartilhadas com a amostra anterior (nesse caso, a informação é repetida), como, por exemplo, as informações de “local”, “parcela”, “spp”, e até mesmo “n_arv”. Na Figura 7.1, note que cada espécie de cada local de coleta tem três repetições e que cada uma delas está em uma linha diferente, com suas respectivas medidas para as características funcionais avaliadas. A nova repetição representada em cinza está sendo acrescentada como uma nova linha a ser preenchida com os valores mensurados.

- **Novas variáveis são acrescentadas como novas colunas.** Neste formato, uma nova variável mensurada é acrescentada como uma nova coluna, estando diretamente relacionada às informações da amostra, tanto informações de caracterização, quanto as informações obtidas para outras variáveis de características funcionais. Assim, na Figura 7.1, a medida de “4.6” variável 2 (var2) da repetição “1” da espécie ‘sp15’ da parcela “2” do local de coleta “site1” está diretamente relacionada com a medida “0.06” da variável 3 (var3) da mesma repetição. A ligação entre tais valores permite a análise de relação entre estas variáveis, o que pode ser essencial para a obtenção das inferências do estudo.

- **O número de linhas por amostra é definido pela variável de maior nível de detalhe.** É comum, em coletas de dados de características funcionais, serem mensuradas variáveis funcionais com diferentes níveis de amostragem, em que, por exemplo, para algumas, o nível de amostragem é de indivíduo, enquanto outras podem ter sido coletadas em nível de folha ou ramo do indivíduo, existindo mais de uma medição por indivíduo. Neste caso, por exemplo, a espécie “sp15” da parcela “2” da área de estudo “sitel” teria 3 medidas de densidade da madeira, (g/cm^3), uma para cada indivíduo, mas cada um deles teve pelo menos 5 folhas mensuradas para comprimento foliar (cm^2). Assim, o número de linhas empregado para esta amostra vai ser determinado pela quantidade de medidas realizadas na variável comprimento foliar (15 medidas, 5 por indivíduo). Nesse caso, deve ser adicionada uma coluna com a informação do segundo nível de amostragem, que fará referência somente às variáveis específicas (Figura 7.2). Note que, na Figura 8.2, todas as medidas de área foliar realizadas na repetição 1 estão preenchidas com “1” na coluna “rep”, e têm números de “1” a “5” na coluna “sub_rep” (sub-réplica).

Uma questão adicional é o que fazer com as células das variáveis mensuradas em nível de réplica. Existem algumas possibilidades, mas que contam, sobretudo, com o cuidado do pesquisador. A primeira delas é repetir o valor de densidade da madeira obtido para a amostra única da repetição para todas as células das sub-réplicas. Esta prática funciona e é frequentemente adotada, mas deve ser sempre considerada com cautela em processamentos futuros, considerando que a média se mantém igual, mas que o desvio padrão da amostra pode ser alterado. Outra possibilidade é deixar estas células vazias ou mesmo preenche-las com algum código específico, como “NA”. Esta opção é mais adequada, considerando que, com ela, é possível filtrar facilmente os valores reais. Assim, note que, na Figura 7.2, somente a primeira célula de cada repetição está preenchida com dados de densidade da madeira.

- **Evite o uso de caracteres em maiúsculo e espaços entre termos.** Recomenda-se que, ao preencher uma planilha com dados para serem analisados, seja adotado um padrão em que não são adotados caracteres em maiúsculo, considerando que a maioria dos softwares reconhece diferenças entre uma mesma palavra escrita com diferentes capitalizações. Da mesma forma, deve-se evitar o uso de espaços entre termos, considerando a dificuldade de visualização de erros, pois, em uma planilha extensa, é difícil ao usuário detectar onde erroneamente foram adotados dois espaços ao invés de um. Quando planilhas com tais erros avançam para a etapa de análise em softwares estatísticos, palavras de mesmo significado podem ser entendidas como termos ou fatores diferentes. Por exemplo, “área foliar”, “Área Foliar”, “área foliar” (dois espaços) seriam entendidos como termos diferentes. Recomenda-se que seja sempre adotada letra minúscula, e a não utilização de espaço, e que, quando for necessário, o espaço seja substituído por “_” (será melhor detalhado a seguir). Veja que, nas Figuras 7.1 e 7.2, não há letras em maiúsculos, nem a adoção de espaços entre termos.

local	parcela	n_arv	spp	rep	sub_rep	dens_mad	comp_folha
site1	3	92	sp15	1	1	0.65	4.60
site1	3	92	sp15	1	2	NA	4.00
site1	3	92	sp15	1	3	NA	4.53
site1	3	92	sp15	1	4	NA	4.99
site1	3	92	sp15	1	5	NA	3.90
site1	3	130	sp15	2	1	0.62	4.83
site1	3	130	sp15	2	2	NA	4.75
site1	3	130	sp15	2	3	NA	4.22
site1	3	130	sp15	2	4	NA	4.15
site1	3	130	sp15	2	5	NA	4.63
site1	3	139	sp15	3	1	0.59	4.77
site1	3	139	sp15	3	2	NA	4.79
site1	3	139	sp15	3	3	NA	4.55
site1	3	139	sp15	3	4	NA	4.66
site1	3	139	sp15	3	5	NA	3.98

Figura 7.2. Modelo de planilha para tabulação dos dados de características funcionais quando variáveis apresentam diferentes níveis de amostragem. Note que todos caracteres estão em minúsculo e que não há espaços entre termos. “local” se refere à área de coleta, “parcela”, à unidade amostral dentro da área (se aplicável), “n_arv”, ao número da árvore utilizada para a coleta, “spp”, à identificação da espécie, “rep”, ao número da repetição da espécie na área, “sub_rep”, ao número da subréplica, “dens_mad”, à densidade da madeira (g/cm^3), e “comp_folha”, ao comprimento da folha (cm).

Fonte: Dos autores (2021).

- **Evite o uso de hífen, barras, parênteses e outros símbolos.** Recomenda-se que, no preenchimento, seja evitada a utilização de símbolos, acentos, barras, parênteses, asteriscos e outros, em função de grande parte deles ser utilizada nos comandos operadores básicos de softwares estatísticos. Assim, o software pode ler tais símbolos como parte de uma operação, e não com o sentido real desejado. Existem formas de evitar estes problemas dentro dos softwares, no entanto, é mais vantajoso evitar sua ocorrência de antemão, para evitar erros e otimizar o processo. Em função disso, recomenda-se o uso do “_” para substituir os espaços (quando necessários). Nesta mesma situação, por exemplo, um hífen “-” poderia ser entendido como um sinal de subtração. Note que, na Figura 7.1, foi adotado o “_” para separar adequadamente termos necessários, tais como “n_arv”, que remete ao número da árvore coletada.

A adoção destes símbolos é muito comum para explicar as variáveis ou suas unidades, tais como “(cm)”, para mostrar que uma determinada variável foi medida em centímetros. Esta é uma informação extremamente valiosa e que deve ser conservada ao longo de todo o processo de análise e interpretação, contudo, é recomendada a criação de uma aba ou arquivo externo em que todos os códigos são apresentados com seus nomes por extenso e unidades utilizadas.

- **Evite o uso dos nomes dos autores das espécies.** Nomes de autores em espécies normalmente contêm uma série de caracteres, espaços e pontos que podem gerar os

problemas descritos anteriormente. Um exemplo é a espécie *Chloroleucon acacioides* (Ducke) Barneby & J.W.Grimes, em que os nomes dos autores são quase maiores que a identificação propriamente dita. Recomenda-se que, nas planilhas, sejam adotados somente o gênero e o epíteto específico, e que, se necessário, os nomes completos sejam utilizados somente nos relatórios, artigos e trabalhos finais.

- **Tenha cuidado com a utilização de vírgulas e pontos.** Outro problema muito comum ao lidar com planilhas é a padronização de utilização dos separados decimais e de milhar. O padrão brasileiro é de “,” (vírgula) para decimais e “.” (ponto) para separação de milhares. Contudo, softwares estatísticos baseados em língua inglesa comumente adotam o contrário, o que pode gerar alguns erros e estimativas incorretas. Assim, deve-se atentar fortemente a qual padrão adotar, considerando que, se adotar o padrão brasileiro, deve-se “avisar” o software dessa utilização. Recomenda-se que, caso exista o costume de utilizar tais softwares (como R), seja realizada uma alteração nas configurações de seu computador para o padrão estrangeiro. Isso evita uma etapa no processo de análise e reduz a chance de erros no processo.

Como significam coisas distintas, sempre deve-se atentar à utilização dos dois símbolos durante a digitação dos dados, para que não se utilize “,” quando o correto é “.” e vice-versa. Erros de digitação pontuais também podem acontecer, e é recomendado que o pesquisador procure por tais inconsistências antes de partir para a análise propriamente dita, por meio de recurso como “localizar” em planilhas eletrônicas, procurando pela presença do sinal não utilizado (depende do padrão adotado).

7.2. Lidando com problemas posteriores à coleta de dados

Após os dados serem tabulados e a etapa de coleta de dados finalmente ser finalizada, chega a hora de iniciar os trabalhos de exploração e análise. Ao fim da tabulação, e também várias vezes ao longo de todo o processo de análise, é recomendável que o pesquisador esteja atento a alguns dos erros citados no tópico anterior e que submeta os dados a testes o tempo inteiro, considerando que é muito comum passarem alguns erros. Contudo, mesmo tomando todos os cuidados descritos anteriormente, ainda podem surgir alguns problemas. Este tópico discutirá alguns deles.

7.2.1. Dados faltantes

Ao lidar com banco de dados, é muito comum existirem células sem valores preenchidos, o que pode ser explicado por vários fatores distintos. No caso de pesquisas de características funcionais, após uma exaustiva coleta de dados em campo, muitas vezes em locais de difícil acesso, pode acontecer de algumas amostras serem perdidas (calor, umidade, fungos etc.) ou não apresentarem qualidade suficiente para a realização. Muitas vezes, é inviável retornar ao local de coleta e aquela amostra permanece sem valor

para uma determinada variável. Outra possibilidade é a amostra de uma determinada espécie apresentar características intrínsecas que dificultam a mensuração pelo método adotado para as demais espécies, como, por exemplo, folhas extremamente pequenas. Uma última possibilidade mais extrema é a ocorrência de falhas na digitação, descarte das amostras e das planilhas de campo (se houver), e não ser possível realizar uma nova mensuração. Em todas elas, o resultado é o mesmo: uma célula vazia.

Para lidar com esse problema, existem algumas alternativas, que apresentam vantagens e desvantagens. A primeira e mais direta é remover a amostra da análise. Contudo, considere que, ao adotar tal ação, outras variáveis mensuradas na mesma amostra também serão perdidas e será como se a amostra nunca tivesse existido no conjunto de dados. Esta estratégia tem a vantagem de não evitar que valor possivelmente enviesado seja adotado (detalhes a seguir), porém, tem a desvantagem de reduzir a variabilidade e intensidade amostral de outras variáveis (esse aspecto só se aplica quando a análise será realizada utilizando mais de um traço). Em função disso, em situações em que os dados faltantes ocorrem em várias linhas e em diversas variáveis, a estratégia de remoção acaba reduzindo o conjunto amostral de forma significativa. Assim, ela pode ser utilizada em situações de poucos valores faltantes, e deve ser evitada quando eles são representativos.

Outra possibilidade é substituir a célula faltante por um valor, que pode ser a média do indivíduo, amostra, site ou outra unidade amostral de interesse, ou uma estimativa realizada com o auxílio de outras variáveis que apresentam forte relação à variável de interesse. No primeiro caso, considerando o indivíduo como unidade amostral, um valor faltante de densidade da madeira para a repetição 3 da “spl” da área de coleta “site1” pode ser a média dos valores das repetições 1 e 2, ou mesmo a média dos outros valores da espécie observados no mesmo site, ou então a média dos valores observados em todas as amostras do site juntos. Recomenda-se a adoção da média dos valores das repetições da espécie na área de estudo em primeiro momento, considerando a maior tendência de similaridade de valores. Ao adotar a média, o valor faltante é substituído por um valor que reproduz o padrão já existente nos dados. Assim, o valor que será adotado não se diferenciará dos valores já existentes, embora, em uma mensuração real, um valor expressivamente menor ou maior que os observados pudessem ocorrer. Este é o método mais comum de preenchimento em situações em que os dados faltantes têm elevada representatividade no banco de dados, e que eliminar linhas não é viável. No geral, a média é uma boa aposta do valor faltante.

A segunda possibilidade ocorre por meio de estimativa da variável de interesse que apresenta dados faltantes utilizando outra variável fortemente relacionada. Por exemplo, considere as variáveis YY e XX, que apresentam uma relação biológica forte. Se o banco de dados apresentar dados completos da variável XX, é possível utilizar métodos estatísticos (como regressões lineares) para estimar os valores faltantes de YY,

baseado na relação obtida entre YY e XX na amostra como um todo. Contudo, considere que é necessário avaliar a qualidade da estimativa mediante uma série de critérios e que, não necessariamente, os valores obtidos representarão o dado faltante de forma adequada. É importante considerar que, mesmo quando o ajuste for suficientemente bom, o valor obtido também será uma reprodução dos valores já obtidos, embora, em uma mensuração real, este pudesse estar fora do intervalo de valores observados.

Em situações em que os dados faltantes não são representativos, outra possibilidade é manter as células vazias, mas somente na situação em que estes dados serão utilizados para análises em nível de comunidade, como será detalhado a seguir. Mais à frente, o leitor verá que os dados obtidos serão convertidos em uma tabela de valores médios por espécie ou população, e que deixar células vazias não comprometerá os resultados, considerando que as médias são obtidas para cada variável separadamente.

Em situações de variáveis categóricas, a estratégia direta a ser adotada é avaliar qual a categoria observada nas demais amostras da população. Em estudos de características funcionais, na maioria das vezes, não se trabalha com variáveis categóricas que variem expressivamente dentro de uma mesma espécie, o que facilita a resolução do problema. Porém, caso isso aconteça, duas opções são possíveis: preencher o dado faltante com a categoria mais frequente nas amostras da mesma espécie (mesmo em outros locais de coleta), ou preencher as células faltantes com um código único que indique que aquela não é uma categoria válida, como, por exemplo, “not_cat” (grosso modo, “sem categoria”). Neste último caso, é possível evitar a eliminação de valores de outras variáveis e também não há o risco de assumir uma categoria para a amostra em situações de alta variabilidade. Por fim, pode-se usar a existência de uma relação obrigatória entre a variável categórica que apresenta dados faltantes e outra variável categórica, em situações em que tais variáveis apresentam uma relação biológica obrigatória.

Nas situações em que a célula com valor ou categoria faltante é substituída por um conteúdo válido baseado em alguma das estratégias apresentadas, é importante ter registrado quais células de quais colunas passaram por este processo. Ao fazer isso, fica garantido que, se no futuro, houver problemas nas análises, será possível adotar uma outra estratégia potencialmente mais efetiva. Recomenda-se que, para isso, seja acrescentada uma coluna para cada variável que teve células vazias preenchidas de alguma forma, e que, nesta coluna, sejam indicadas as linhas com dados faltantes. É possível adotar textos ou números, como “sim” e “não”, “0” e “1” etc. Assim, se as variáveis “area_fol” e “dens_mad” passaram por correções, duas colunas devem ser adicionadas com nomes explicativos, tais como “area_fol_na” e “dens_mad_na”. Além disso, mantenha sempre um registro de qual método foi empregado, e sempre o descreva na metodologia de artigos, relatórios e trabalhos finais.

7.2.2. Valores inválidos

Mesmo após todos os cuidados durante a coleta e tabulação dos dados, é comum que ocorram células preenchidas com valores que levantam suspeitas de ocorrências de erros em alguma etapa do processo. Por exemplo, quando são mensuradas variáveis que têm um intervalo de valor definido, como de 0 a 100, e algumas células apresentam valores maiores que isso. Ou então, amostras que apresentam densidade da madeira com valores que fogem da realidade biológica da variável, como 5 g/cm^3 , enquanto é conhecido que valores superiores a 1.5 g/cm^3 já não são comuns. Além disso, podem ser observados valores em uma determinada repetição muito distintos das outras repetições da mesma espécie. Obviamente, podem existir variações dentro de uma mesma espécie, mas a tendência é que elas não sejam expressivas e que, nestas situações, cabe a verificação. Estes erros podem ser originados de erros de digitação ou mesmo erros de mensuração, e cabe investigar a causa para que uma decisão assertiva possa ser tomada.

Em tais situações, recomenda-se a consulta de versões anteriores de campo, planilhas físicas (se houver) e às amostras propriamente ditas (se possível). Ao realizar tal verificação, erros de posicionamento da vírgula ou de digitação de um número a mais, que mudam totalmente a magnitude do valor, são facilmente encontrados e corrigidos. Por exemplo, durante a digitação, o pesquisador pode ter digitado “500” onde era “50”, ou então “0,125” (com vírgula) ao invés de “0.125” (com ponto). Se o computador utilizado estiver configurado com “.”, como separar decimal (como o meu), o valor “0,125” será convertido automaticamente para “125.0”. A permanência de tais erros pode implicar inferências não condizentes com a realidade e interpretações ecológicas equivocadas.

7.3. Obtenção de métricas de diversidade funcional em comunidades

Agora que os dados de características funcionais obtidos estão organizados, eventualmente corrigidos e com informações confiáveis, pode-se proceder à etapa de utilização destes dados para obtenção de informações sobre os padrões funcionais de comunidades. Dados de características funcionais podem ser usados em outros contextos (como em anatomia ecológica), mas, neste capítulo, será abordada somente sua utilização em associação com dados de ocorrência ou abundância de espécies em comunidades, com o objetivo final de obtenção de informações sobre diversidade funcional em nível de comunidade.

Para isso, nos próximos dois tópicos, será mostrado como montar as planilhas básicas a serem utilizadas (tópico 1) para a obtenção de seis medidas de diversidade funcional disponíveis no pacote FD (LALIBERTÉ; LEGENDRE; SHIPLEY, 2015) do

programa R (R CORE TEAM, 2020). Existem outros pacotes, inclusive em outros softwares, que podem obter estas e outras métricas. Contudo, em função do amplo uso deste pacote em estudos em ecológica de comunidades, os tópicos a seguir serão restritos a ele e às métricas disponíveis.

7.3.1. Construção de planilhas para obtenção das métricas

A obtenção das métricas de diversidade funcional ocorre mediante o cruzamento de duas bases de dados: a primeira refere-se aos valores médios das características funcionais para a espécie ou população (mais detalhe a respeito a seguir), e a segunda, a uma matriz de ocorrência, abundância ou área basal (ou biomassa) (também pode ser utilizada a abundância relativa ou área basal relativa da espécie na comunidade para controlar diferenças em esforços amostrais) para as mesmas espécies e populações nas áreas de estudo ou parcela. A seguir, serão detalhadas as duas situações citadas, em que os passos para a obtenção das bases de dados serão apresentados.

7.3.1.1. Análises em nível de espécie

As análises em nível de espécie são adotadas em estudos em escala local e/ou em que não existem diferenças expressivas entre indivíduos dentro de uma mesma espécie coletados em diferentes áreas. Dessa forma, a partir dos dados coletados, será obtida uma base de dados com os valores médios das características funcionais para cada uma das espécies coletadas, utilizando, para isso, TODAS as informações disponíveis sobre elas. A obtenção desta média pode ser realizada em softwares de planilhas eletrônicas, por meio do recurso de “tabelas dinâmicas”, ou em softwares estatísticos. Assim, por exemplo, considerando que, na base de dados da Figura 7.2, só há indivíduos da espécie “sp15” na área de estudo “site1”, os valores mensurados para cada característica funcional serão utilizados para a obtenção de uma média que represente o comportamento médio da espécie para tais características. Este procedimento é realizado para todas as espécies, obtendo-se uma planilha como a apresentada na Figura 7.3.

Com a base de dados de valores médios das características funcionais para as espécies presentes na amostra, o próximo passo é obter a base de dados relativa aos padrões ecológicos destas mesmas espécies nas áreas de estudo ou parcelas. Para isso, é necessário ter em mãos os dados de ocorrência das espécies nos sites (listas florísticas), de abundância ou de biomassa (baseados em inventários florestais). Cada informação ecológica tem particularidades nas inferências, para as quais eu recomendo que o pesquisador recorra a estudos básicos de ecologia para um maior detalhamento a respeito. De maneira geral, dados de ocorrência são adotados na ausência de dados de abundância ou área basal. As informações de abundância de indivíduos estão fortemente relacionadas à ocupação e distribuição, enquanto a área basal/biomassa tende a estar

relacionada ao sucesso na ocupação (*fitness*). Em cada caso, deve-se trabalhar a base de dados existente (em seu formato específico), para que seja obtida uma matriz em um formato similar ao apresentado na Figura 7.4. Esta mesma base de dados pode ser preenchida com dados de ocorrência (0 ou 1), abundância de indivíduos ou área basal (ou biomassa) de cada espécie em cada área de estudo.

spp	dens_mad	comp_fol	esp_fol
sp1	1.05	5.00	0.13
sp2	1.02	6.04	0.12
sp3	0.99	3.00	0.15
sp4	0.96	17.28	0.11
sp5	1.08	7.55	0.12
sp6	1.10	5.27	0.19
sp7	1.07	4.77	0.14
sp8	1.02	5.80	0.10
sp9	0.88	13.22	0.27
sp10	1.01	23.67	0.34
sp11	0.89	5.21	0.30
sp12	1.11	5.50	0.15
sp13	1.03	10.66	0.21
sp14	0.77	8.83	0.17
sp15	1.09	10.44	0.14

Figura 7.3. Base de dados com valores médios para três características funcionais para 15 espécies. “dens_mad” refere-se à densidade da madeira (g/cm³), “comp_fol”, ao comprimento da folha (cm), e “esp_fol”, à espessura foliar (mm).

Fonte: Dos autores (2021).

	sp1	sp2	sp3	sp4	sp5	sp6	sp7	sp8	sp9	sp10	sp11	sp12	sp13	sp14	sp15
site1	1	0	0	1	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	16
site2	2	0	2	1	0	0	0	0	0	5	5	0	0	18	0
site3	0	0	5	3	0	11	12	0	0	0	0	0	0	0	2
site4	0	2	5	0	0	13	0	0	0	0	11	0	5	8	0
site5	3	0	13	1	0	0	0	0	0	4	0	4	5	0	0
site6	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	3	0	1	7
site7	1	5	0	8	0	0	3	0	0	8	15	0	22	0	0
site8	0	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	8	0	0	11
site9	1	0	0	9	7	0	4	0	0	10	15	0	85	0	0
site10	0	15	0	0	1	5	5	0	0	0	0	10	0	0	13
site11	2	0	0	7	0	0	0	2	2	11	0	0	17	1	0
site12	1	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	8	15	1	15
site13	0	0	0	3	0	0	1	5	0	15	0	0	18	0	0
site14	2	25	0	0	0	0	0	1	1	0	0	7	7	3	14
site15	1	0	0	0	0	0	0	13	0	23	6	0	8	0	0
site16	0	20	0	1	0	5	2	0	0	0	0	10	0	5	2
site17	0	0	0	0	0	0	3	0	7	8	0	0	0	6	2
site18	10	2	0	2	0	2	5	0	0	0	0	52	0	5	0
site19	0	0	0	0	0	0	9	0	0	30	0	0	0	2	7
site20	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	12	0

Figura 7.4. Matriz com abundância de indivíduos de 15 espécies em 20 áreas de estudo (“site”). Note que as células poderiam estar preenchidas também com dados de ocorrência (0 ou 1) ou de área basal/biomassa.

Fonte: Dos autores (2021).

7.3.1.2. Análises em nível de população

Outra possibilidade de organização da base de dados ocorre quando existem diferenças ambientais e ecológicas importantes entre áreas de coleta, que podem implicar diferenças significativas entre indivíduos de uma mesma espécie coletados em diferentes áreas. Nestes casos, deve-se considerar trabalhar os dados em nível de população, que, basicamente, se refere à espécie X na área de estudo Y. Nesta situação, a planilha de valores médios conterà as espécies existentes, considerando suas ocorrências nas várias áreas de estudo. Assim, por exemplo, se a espécie “sp1” ocorrer e tiver amostras de características funcionais coletadas nas áreas de estudo “site1”, “site2” e “site3”, a planilha conterà três linhas contendo informações sobre a espécie, com as médias das características funcionais da espécie em cada área de estudo, com códigos como “sp1_site1”, “sp1_site2” e “sp1_site3”, como demonstrado na Figura 7.5. Ao adotar tal estratégia, a planilha considerará que uma mesma espécie pode apresentar variações intraespecíficas significativas, ocasionadas por variações em características ambientais das áreas de estudo.

spp	dens_mad	comp_fol	esp_fol
sp1_site1	1.05	5.00	0.13
sp1_site2	1.10	6.04	0.12
sp1_site3	0.80	5.00	0.15
sp1_site4	0.96	5.45	0.11
sp2_site1	0.50	7.80	0.12
sp2_site2	0.66	8.00	0.19
sp3_site3	0.70	3.50	0.14
sp3_site6	0.50	3.89	0.10
sp4_site7	0.88	13.22	0.27
sp4_site10	1.01	15.35	0.34
sp5_site1	0.89	20.50	0.30
sp5_site10	1.01	21.30	0.15

Figura 7.5. Valores médios por população (espécies nas áreas de estudo) para três características funcionais coletadas. dens_mad” refere-se à densidade da madeira (g/cm³), “comp_fol”, ao comprimento da folha (cm), e “esp_fol”, à espessura foliar (mm). Fonte: Dos autores (2021).

Em seguida, a mesma ideia é aplicada na obtenção da base de dados de ocorrência, abundância e área basal (ou biomassa) nas áreas de estudo, contudo, neste caso, as colunas são preenchidas com as populações, ao invés de espécies. O modelo obtido é similar ao apresentado na Figura 7.6. Note que uma mesma espécie que ocorra em mais de uma área de estudo terá mais de uma coluna, com diferenças relacionadas às populações em questão. Uma população só terá valores preenchidos para a área de estudo específica, ou para subamostras desta área de estudo, quando aplicável.

	sp1_site1	sp1_site2	sp1_site3	sp1_site4	sp2_site1
site1	15	0	0	0	15
site2	0	23	0	0	0
site3	0	0	5	0	0
site4	0	0	0	12	0
site5	0	0	0	0	0
site6	0	0	0	0	0
site7	0	0	0	0	0
site8	0	0	0	0	0
site9	0	0	0	0	0
site10	0	0	0	0	0

Figura 7.6. Matriz com abundância de indivíduos das populações (espécies nas áreas de estudo) nas áreas de estudo (“site”). Note que as células poderiam estar preenchidas também com dados de ocorrência (0 ou 1) ou de área basal/biomassa, e que uma população relativa a uma determinada área de estudo (“site”) só tem indivíduos no site a que está relacionada.

Fonte: Dos autores (2021).

7.4. Métricas de diversidade funcional do pacote “FD” do programa R

O pacote FD (LALIBERTÉ; LEGENDRE; SHIPLEY, 2015) do programa R (RCORE TEAM, 2020) oferece a possibilidade de obtenção de seis medidas de diversidade funcional, apresentadas a seguir. Todas elas utilizam as planilhas apresentadas anteriormente, podendo ser utilizadas em nível de espécie ou de população. Os índices seguem os trabalhos de Botta-Dukát (2005), Laliberté e Legendre (2010), Lavorel *et al.* (2008) e Villéger, Mason e Mouillot (2008):

- **Riqueza funcional:** mensura a quantidade de nicho ocupado por espécies dentro de uma comunidade, a partir da sua ocorrência em cada comunidade (área de estudo ou parcela). Tende a estar fortemente correlacionada com a riqueza de espécies.
- **Equitatividade funcional:** mensura a equitatividade da distribuição da abundância dentro de um site, considerando o espaço funcional existente no banco de dados como um todo. Assim, avalia a regularidade de espaçamento entre pontos e suas abundâncias dentro do espaço funcional. Uma maior equitatividade funcional em uma comunidade implica que os grupos funcionais existentes se diferenciam entre si de forma parecida.
- **Divergência funcional:** mensura o quão dispersas ou agrupadas as espécies estão no espaço funcional, tomando como base as suas abundâncias. Um maior valor de divergência funcional implica que os grupos funcionais presentes apresentam valores mais divergentes dentro do espaço funcional, considerando suas abundâncias.

- **Dispersão funcional:** mede a distância média das espécies existentes a um ponto de referência (centroide ou mediana) de todas as espécies no espaço funcional. Quanto maior a dispersão funcional, mais dispersos são os comportamentos funcionais dentro de uma comunidade, considerando também suas abundâncias.

- **RAO *entropy*:** mede a dissimilaridade média das espécies em relação às suas características funcionais, considerando as suas abundâncias nas comunidades.

- **Média ponderada dos caracteres funcionais (*community-level weighted means of trait values - CWM*):** Esta é a principal medida oferecida pelo pacote e provavelmente a que o pesquisador mais usará em seus estudos, sendo comumente chamada de “composição funcional”. Os CWMs consistem em uma média ponderada do valor de cada característica funcional (*trait*) para uma comunidade, considerando os valores médios dos *traits* das espécies e uma matriz de ponderação que pode conter dados de ocorrência, abundância ou área basal (ou biomassa). A interpretação é simples: o valor obtido de um determinado *trait* em uma comunidade é o valor próximo ao mais comum a ser observado naquela comunidade. O cálculo do CWM é intuitivo e pode inclusive ser realizado em planilhas eletrônicas a partir da equação:

$$CWM_{yz} = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i * W_{iz})}{\sum_{z=1}^n (W_z)}$$

A qual demonstra a obtenção do valor médio de uma característica funcional Y em uma comunidade z, em que Y se refere ao valor observado da característica funcional para a espécie i, e W, à ocorrência, abundância ou área basal (ou biomassa) da espécie i na comunidade z.

Considerando um exemplo em que uma comunidade tem somente duas espécies: “sp1” e “sp2”, que têm seus valores médios para densidade da madeira (g/cm³) de 0.52 e 0.87. A espécie “sp1” tem 5 indivíduos na comunidade “A”, enquanto espécies “sp2” têm 10 indivíduos. Nesta situação, o CWM da densidade da madeira para a comunidade “A” seria obtido da seguinte forma:

$$CWM_{dm} = \frac{(0.52 * 5 + 0.87 * 10)}{15} = 0.75$$

Assim, cada comunidade, área de estudo ou parcela (depende do nível de amostragem) terá um valor de CWM para cada característica funcional, obtido por meio do cruzamento entre os dados médios das espécies ou populações (como representado nas Figuras 7.3 e 7.5), e das abundâncias destas mesmas espécies e populações nestas comunidades, áreas de estudo ou parcelas (como observado nas Figuras 7.4 e 7.6). Nesta etapa, os cálculos em nível de população seguem a mesma

lógica, em que cada população é considerada como uma unidade separada para a utilização dos valores médios e para as abundâncias (ou outra medida ponderadora).

7.4.1. Recomendações adicionais

Após os cálculos, o resultado será uma base de dados com valores das variáveis descritas anteriormente para cada uma das unidades amostrais, que poderão ser utilizados em conjunto com as mais diversas informações externas para testar pesquisas ecológicas relevantes. Exemplos são a sua utilização com variáveis climáticas, de solo, de impacto antrópico, tanto em padrões espaciais de variação, quanto ao longo do tempo. Recomenda-se a associação de tais informações com fontes externas de dados, para que sua pesquisa ganhe complexidade e o nível de alcance de suas inferências seja potencializado.

Como já demonstrado, as métricas aqui apresentadas são calculadas no programa R (R CORE TEAM, 2020). Embora algumas medidas e análises possam ser realizadas fora deste programa, a maioria das ferramentas disponíveis para análise em pesquisa científica estão restritas a esta plataforma. Assim, há a possibilidade de que muitos pesquisadores ainda não tenham familiaridade com sua utilização, porém, recomenda-se que todas as análises para pesquisas em padrões funcionais sejam executadas nesta plataforma. Primeiro, porque algumas destas medidas só podem ser obtidas nesta plataforma, e segundo, porque sua utilização atesta, aos leitores do futuro artigo e à comunidade científica, uma garantia de padronização de métodos, que está disponível nos pacotes utilizados.

Coletar dados de características funcionais é uma tarefa árdua e que nem sempre está disponível para todos os interessados em desenvolver pesquisas nesta área. Alguns bancos globais de características funcionais são uma alternativa, tais como o *Global Wood Density database* (ZANNE *et al.*, 2009) e o *Inside Wood* (WHEELER, 2011), que contêm dados de densidade da madeira para espécies arbóreas; o *Seed Information Database — SID* (ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2020), que contém informações sobre características de sementes de espécies de plantas, e o TRY (KATTGE *et al.*, 2011), para *traits* diversos sobre organismos em diferentes regiões.

7.5. Referências

BOTTA-DUKÁT, Z. Rao's quadratic entropy as a measure of functional diversity based on multiple traits. *Journal of Vegetation Science*, Uppsala, v. 16, n. 5, p. 533-540, 2005.

KATTGE, J. *et al.* TRY—a global database of plant traits. *Global Change Biology*, Oxford, v. 17, n. 9, p. 2905-2935, 2011.

- LALIBERTÉ, E.; LEGENDRE, P. A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits. *Ecology*, Bethesda, v. 91, n. 1, p. 299-305, 2010.
- LALIBERTÉ, A. E.; LEGENDRE, P.; SHIPLEY, B. **Package FD**: measuring functional diversity (FD) from multiple traits, and other tools for functional ecology. R package version 1.0-12. 2015. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/FD/FD.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2021.
- LAVOREL, S. *et al.* Assessing functional diversity in the field—methodology matters! *Functional Ecology*, Oxford, v. 22, n. 1, p. 134-147, 2008.
- R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Seed Information Database (SID)**: version 7.1. 2020. Disponível em: <http://data.kew.org/sid>. Acesso em: 1 maio 2020.
- VILLÉGER, S.; MASON, N. W. H.; MOUILLOT, D. New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. *Ecology*, Bethesda, v. 89, n. 8, p. 2290-2301, 2008.
- WHEELER, E. A. Inside wood—A web resource for hardwood anatomy. *Iawa Journal*, Utrecht, v. 32, n. 2, p. 199-211, 2011.
- ZANNE, A. E. *et al.* **Global wood density database**. 2009. (Dryad Digital Repository). Disponível em: <http://datadryad.org/handle/10255/dryad.235>. Acesso em: 15 mar. 2020.

Dados dos autores

Camila Laís Farrapo



Graduada em Engenharia Florestal (2013), Mestre (2015) e Doutora (2019) em Engenharia de Biomateriais pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). Desde 2013, é técnica administrativa em educação de nível superior, ocupando o cargo de Engenheira Florestal do departamento de Ciências Florestais da UFLA. Atua auxiliando no desenvolvimento de pesquisas, principalmente nas áreas de dendrocronologia, estrutura e dinâmica de populações e comunidades florestais, bem como no gerenciamento de banco de dados.

Cléber Rodrigo de Souza



Graduado, mestre e doutor em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde é pós-doutorando em Engenharia Florestal. Desenvolve pesquisas em ecologia de florestas tropicais, atuando principalmente nos temas: estrutura e dinâmica de florestas, fitogeografia e padrões de estoque e estocagem de carbono.

Fernanda Moreira Gianasi



Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas (2016), especialização em Educação Ambiental e Mestre em Botânica Aplicada (2019) pela Universidade Federal de Lavras, com dissertação defendida na área de Diversidade Funcional de Florestas Tropicais Sazonalmente Secas. Atualmente, é doutoranda do curso de Botânica Aplicada pela Universidade Federal de Lavras, atuando no desenvolvimento de projetos nas áreas de ecologia florestal, diversidade funcional e anatomia vegetal de espécies de ambientes sazonais.

Nathalle Cristine Alencar Fagundes



Graduada em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Faculdade de Saúde Ibituruna (2010), Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Montes Claros (2014), Doutora em Botânica Aplicada pela Universidade Federal de Lavras (2019), onde fez o Pós-Doutorado (2021). Professora, Coordenadora do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Bolsista de Produtividade em Pesquisa (PQ/UEMG) e líder do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Extensão em Ecologia e Agrobiodiversidade (NEPEEA), na Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade Ituiutaba.

Rubens Manoel dos Santos

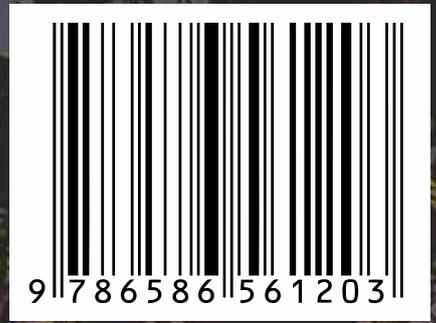


Possui graduação em Biologia Bacharelado pela Universidade Estadual de Montes Claros (2003), Mestrado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Lavras (2006) e Doutorado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Lavras (2009). Atualmente, é Professor, Coordenador do Laboratório de Fitogeografia e Ecologia Evolutiva e do Núcleo de Estudos em Ecologia e Conservação da Flora – NEECFLORA - da Universidade Federal de Lavras. É Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, Nível 2. Tem experiência na área de Ecologia Florestal, com ênfase em estrutura e dinâmica de comunidades vegetais, dendrologia, fitogeografia, ecologia funcional e evolutiva, estoque e estocagem de carbono; e na área de Botânica, com ênfase em anatomia vegetal, anatomia ecológica e ecofisiologia.

Vinícius Andrade Maia



Graduado, mestre e doutorando em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal - UFLA. Possui experiência nas áreas de inventário, estrutura e dinâmica de populações e comunidades florestais; biodiversidade, estoques de carbono e produtividade florestal, ciência de dados e estatística.



9786586561203