

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre

Gisele Medeiros Mendes

**PADRÕES DE HERBIVORIA POR INSETOS EM
ESPÉCIES DE PLANTAS TROPICAIS**

Belo Horizonte,

2022

Gisele Medeiros Mendes

**PADRÕES DE HERBIVORIA POR INSETOS EM
ESPÉCIES DE PLANTAS TROPICAIS**

Versão final

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ecologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana G. Cornelissen

Belo Horizonte,

2022

043

Mendes, Gisele Medeiros.

Padrões de herbivoria por insetos em espécies de plantas tropicais
[manuscrito] / Gisele Medeiros Mendes. – 2022.

98 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Tatiana G. Cornelissen.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre.

1. Ecologia. 2. Folhas de Planta. 3. Herbivoria. 4. Insetos. I. Cornelissen, Tatiana Garabini. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 502.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E MANEJO DA VIDA SILVESTRE



Ata da Defesa de Tese

Nº 211
Entrada: 2017/2

Gisele Medeiros Mendes

No dia 26 de agosto de 2022, às 14:00 horas, por vídeo conferência, teve lugar a defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, de autoria do(a) doutorando(a) Gisele Medeiros Mendes, orientando do Professor Tatiana Garabini Cornelissen, intitulada: “**Padrões de Herbivoria em Espécies de Plantas Tropicais**”. Abrindo a sessão, o(a) Presidente(a) da Comissão, Doutor(a) Tatiana Garabini Cornelissen, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra para o(a) candidato(a) para apresentação de seu trabalho. Estiveram presentes a Banca Examinadora composta pelos Doutores: Mário Marcos do Espírito Santo (UNIMONTES), Alan Nilo da Costa (UFU), Fernanda Vieira da Costa (UFMG), Flávio de Carvalho Camarota (UFMG) e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Após a arguição, apenas os senhores examinadores permaneceram no recinto para avaliação e deliberação acerca do resultado final, sendo a decisão da banca pela:

(X) Aprovação da tese, com eventuais correções mínimas e entrega de versão final pelo orientador diretamente à Secretaria do Programa, no prazo máximo de 30 dias;

() Reavaliação da tese com avaliação pelos membros da banca do documento revisado, sem nova defesa, no prazo máximo de 30 dias, sob possibilidade de reprovação;

() Reformulação da tese com indicação de nova defesa em data estabelecida a critério do Colegiado em observância às Normas Gerais da Pós-graduação na UFMG e ao Regimento do PPG-ECMVS;

() Reprovação

A banca indica esta tese aos Prêmios CAPES e UFMG de teses? () SIM (X) NÃO

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2022.

Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana Garabini Cornelissen, Membro**, em 01/09/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário Marcos do Espírito Santo, Usuário Externo**, em 02/09/2022, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alan Nilo da Costa, Usuário Externo**, em 03/09/2022, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávio de Carvalho Camarota, Usuário Externo**, em 05/09/2022, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Vieira Da Costa, Usuária Externa**, em 15/09/2022, às 10:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1719676** e o código CRC **1DD20A78**.

Financiamentos:



Apoios e Colaborações:



Dedico ao pequeno Gael e a todas as mães que
tiveram que interromper o sonho da pós-
graduação pela falta de apoio a maternidade.

AGRADECIMENTOS

À Tati, minha orientadora, pelo imensurável apoio e incentivo nesses dez anos de parceria, e pela amizade, carinho e conselhos, tanto na esfera pessoal quanto profissional.

Obrigada por tanto Tati.

Aos participantes da rede TROPherb, muito obrigada pela parceria e contribuição para uma melhor compreensão dos níveis de herbivoria.

Aos professores deste programa de pós-graduação, obrigada pelo conhecimento compartilhado e pela seriedade com que realizam seu trabalho.

Funcionários do Instituto de Ciências biológicas-UFMG, em especial aos secretários do curso, Fred e Cris, por todo o apoio administrativo, pelo carinho, e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores, Mário Marcos do Espírito Santo; Alan Nilo da Costa; Fernanda Vieira da Costa; Flávio de Carvalho Camarota; Milton Barbosa da Silva Júnior e Irene Gélvez Zúñiga por aceitarem gentilmente o convite para avaliar este trabalho.

À minha família em especial, meus pais - Crizete e José - e irmãos - Ciro e Ivan – obrigada pelo exemplo, carinho, apoio e por acreditarem em mim.

Ao Gleizer, obrigada por tudo! Pelo apoio, suporte, amizade, amor, e principalmente pelas partições em boa parte das coletas.

À Maria Gabriela, pela amizade e parceria.

À minha rede de apoio: Crizete, José, Gisele Nonato, Héver, Milena, Naty e Lú, muito obrigada pelo apoio. Sem o apoio de cada um de vocês, nada disso teria sido possível.

E a todos os outros que de alguma forma fizeram parte desse ciclo.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Este trabalho é o resultado de um estudo que têm como foco a herbivoria foliar por insetos mastigadores em ambientes naturais. Visando ampliar o conhecimento sobre a herbivoria, avaliamos as taxas de remoção foliar por insetos para uma ampla diversidade de espécies. Esta tese está dividida em três capítulos. Inicialmente, no **capítulo 1**, disponibilizamos uma extensa base de dados sobre o nível e a frequência de herbivoria para mais de 57.000 folhas, atualizando e expandindo os dados sobre herbivoria foliar por insetos mastigadores. Criamos esse extenso conjunto para fornecer os dados brutos necessários para testar hipóteses gerais relacionadas às interações planta-herbívoros em grandes escalas espaciais. A partir dessa base de dados, no **capítulo 2**, nós avaliamos a variação nas taxas de herbivoria em espécies de plantas da região tropical e subtropical, a fim de determinar se os traços funcionais das plantas (SLA e forma de vida) influenciam no nível e frequência de herbivoria, e se os padrões detectados são semelhantes entre as diferentes fitofisionomias. E por fim, no **capítulo 3**, testamos as metodologias amplamente utilizadas para aferição das taxas de herbivoria e sugerimos metodologias padronizadas com o intuito de diminuir os vieses metodológicos que impedem a melhor compreensão dos níveis de remoção de tecido vegetal por insetos.

Palavras-chave: herbivoria; desfolha; consumo de folhas; interações planta-herbívoros; consumo primário; interações tróficas; gradientes latitudinais, quantificação da herbivoria, área foliar, área foliar removida, métodos em ecologia, medidas de área foliar.

ABSTRACT

This work is the result of a study that focused on foliar herbivory by chewing insects in natural environments. In order to expand the knowledge about herbivory, we evaluated the rates of leaf removal by insects for a wide diversity of species. This thesis is divided into three chapters. Initially, in **chapter 1**, we provided an extensive database on the level and frequency of herbivory for more than 57,000 leaves, updating and expanding the data on foliar herbivory by chewing insects. We created this extensive set to provide the raw data needed to test general hypotheses related to plant-herbivore interactions at large spatial scales. From this database, in **chapter 2**, we evaluated the variation in herbivory rates in tropical and subtropical plant species in order to determine whether plant functional traits (SLA and life form) influence the level and frequency of herbivory, and whether the patterns detected are similar among the different phytophysiognomies. Finally, in **chapter 3**, we tested the methodologies widely used for measuring herbivory rates and suggested standardized methodologies in order to reduce methodological biases and to contribute to a better understanding of the levels of plant tissue removal by insects.

Keywords: herbivory; defoliation; leaf consumption; plant-herbivore interactions; primary consumption; trophic interactions; latitudinal gradients; herbivory quantification; leaf area; leaf area removed; methods in ecology; leaf area measurement.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO I. QUANTA ÁREA FOLIAR OS INSETOS CONSOMEM? Um conjunto de dados de herbivoria por insetos amostrado globalmente com um protocolo padronizado.....	14
INTRODUÇÃO	16
METADADOS.....	18
CLASSE I. Descritores do Conjunto de Dados.....	18
CLASSE II. Descritores da Origem da Pesquisa	23
CLASSE III. Situação e Acessibilidade do Conjunto de Dados	24
CLASSE IV. Descritores Estruturais dos Dados.....	25
CLASSE V. Descritores suplementares	27
AGRADECIMENTOS.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO II. HERBIVORIA EM PLANTAS TROPICAIS: Efeitos dos Traços Foliares, do Habitat e da Filogenia no Consumo por Insetos Mastigadores.....	29
INTRODUÇÃO	30
MÉTODOS	33
<i>Amostragem</i>	34
<i>Processamento dos dados</i>	34
<i>Análises dos dados</i>	34
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	41
<i>Padrões de Herbivoria</i>	41
<i>Variação entre as fitofisionomias</i>	43
<i>Variação entre as Formas de Vida das Plantas</i>	44
<i>Área foliar específica (SLA)</i>	45
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO III: QUANTIFICANDO A HERBIVORIA. Qual método utilizar para quantificar adequadamente a herbivoria por insetos?.....	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MÉTODOS	57
2.1 <i>Estimativas visuais simples - experimento</i>	57
2.2 <i>Comparações entre os diferentes métodos</i>	58
2.3 <i>Comparações entre dados de imagens e traços foliares</i>	60
2.4 <i>Análises estatísticas</i>	61
3. RESULTADOS.....	62

3.1 Estimativas visuais simples - experimento	62
3.2 Comparações entre os diferentes métodos de quantificação da herbivoria	64
3.3 Comparações entre Dados das Imagens e Traços Foliare.....	65
4. DISCUSSÃO.....	68
4.1 Estimativa visual simples	69
4.2 Comparações entre os métodos.....	70
4.3 Comparações entre Dados das Imagens e Traços Foliare.....	72
5. CONCLUSÃO	74
6. REFERÊNCIAS.....	75
CONCLUSÃO GERAL	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A - Protocolo de Coleta	80
APÊNDICE B - Quiz_TropHerb. Rede de Herbivoria Tropical.....	83
APÊNDICE C - Protocolo de processamento de imagens para cálculo de herbivoria no R.....	93

INTRODUÇÃO GERAL

Interações entre insetos e plantas têm funções primordiais na dinâmica de populações (Marquis, 1984), na estrutura de comunidades (López-Carretero *et al.*, 2018), bem como nos processos evolutivos e serviços ecossistêmicos (Turcotte *et al.*, 2014a; Rossetti *et al.*, 2017). Tais interações podem ser positivas, como a polinização, por exemplo, ou negativas, como no caso da herbivoria. A herbivoria foliar é uma interação negativa visto que o consumo do tecido foliar para obtenção da energia necessária a sobrevivência e desenvolvimento dos insetos herbívoros pode impor efeitos prejudiciais às plantas (Coley & Barone, 1996), tais como: redução das taxas fotossintéticas (Kozlov & Zvereva, 2017), ativação das defesas físicas e químicas induzidas pela herbivoria (Coley *et al.*, 1985; Coley & Aide, 1991), desencadeamento da abscisão prematura das folhas (Zvereva & Kozlov, 2014) e imposição de custos metabólicos que podem afetar o crescimento e a reprodução (Marquis 1984, Price 2002, Kozlov & Zvereva 2017).

Apesar de sua importância, pouco se sabe acerca de quanto da área foliar é removida pela alimentação de insetos a nível global (Turcotte *et al.*, 2014a) e, como esse valor varia em função das linhagens de plantas e entre plantas com diferentes histórias de vida. Algumas tentativas foram feitas para revisar, globalmente, a quantidade de biomassa vegetal perdida para os insetos através dessa interação (Coley & Barone, 1996; Metcalfe *et al.*, 2014; Turcotte *et al.*, 2014b; Kozlov *et al.*, 2015a). No entanto, nossa compreensão das taxas de herbivoria em ambientes tropicais permanece limitada. Embora se acredite que os ecossistemas tropicais experimentam maiores níveis de herbivoria do que os ambientes temperados (Coley & Aide, 1991; Coley & Barone, 1996), tais padrões não foram confirmados por avaliações globais (Turcotte *et al.*, 2014a, 2014b; Kozlov *et al.*, 2015a). Em um dos conjuntos de dados mais completos sobre estimativas de herbivoria por insetos em todo o mundo, existem consideravelmente mais dados relativos à região temperada, com 287 espécies de plantas avaliadas, quando comparada à amostragem nos trópicos com apenas 33 espécies de plantas avaliadas, (Kozlov *et al.*, 2015a), indicando que esta região pode estar sub-representada. Existe a necessidade, portanto, de ampliar a base de dados de herbivoria para a região tropical a fim de se obter estimativas robustas da perda de área foliar por insetos herbívoros.

Diversas características da história de vida das plantas e traços foliares influenciam os níveis de herbivoria (Reich *et al.*, 2003). Atualmente, muita informação já foi acumulada sobre os mecanismos de seleção de plantas por insetos herbívoros (revisão em Bernays & Chapman,

2007) e vários fatores têm sido avaliados. A aparência de plantas e folhas e a área foliar específica (do inglês SLA: specific leaf area) são características funcionais que diferem entre as espécies e entre os indivíduos e, estas podem explicar as variações encontradas na quantidade de biomassa vegetal consumida por insetos herbívoros, sendo estas maiores em árvores de crescimento moderado e com maior área foliar específica (Ribeiro & Fernandes, 2000; Wright *et al.*, 2004; Kozlov *et al.*, 2015b).

Apesar dos esforços na tentativa de determinar o impacto de insetos herbívoros na remoção de biomassa vegetal, a compilação dos dados torna-se difícil. Os dados publicados disponíveis nem sempre são coletados ou medidos de forma padronizada, seja devido a não aleatoriedade da seleção dos objetos de estudo, à escolha seletiva dos dados, ou até mesmo devido à forma imprecisa de quantificação da quantidade de tecido foliar perdido (Kozlov *et al.*, 2015b), o que pode resultar em estimativas tendenciosas dos níveis de herbivoria.

Nessa tese, focamos exclusivamente na guilda de insetos mastigadores de folhas, uma vez que, a maior parte - aproximadamente 90% - do dano foliar em plantas lenhosas é causado pela alimentação desses insetos (Kozlov *et al.*, 2015a). Considerando a demanda por estudos adicionais que avaliem a herbivoria em plantas tropicais, no capítulo 1 desta tese, disponibilizamos uma extensa base de dados sobre o nível e a frequência de herbivoria para mais de 57.000 folhas, atualizando e expandindo os dados sobre herbivoria foliar por insetos mastigadores. Criamos esse extenso conjunto para fornecer os dados brutos necessários para testar hipóteses gerais relacionadas às interações planta-herbívoro em grandes escalas espaciais. A partir dessa base de dados, no capítulo 2, nós avaliamos a variação nas taxas de herbivoria em espécies de plantas da região tropical e subtropical, a fim de determinar se os traços funcionais das plantas (SLA e forma de vida) influenciam no nível e frequência de herbivoria, e se os padrões detectados são semelhantes entre as diferentes fitofisionomias. E por fim, no capítulo 3, testamos as metodologias amplamente utilizadas para aferição das taxas de herbivoria e sugerimos metodologias padronizadas com o intuito de diminuir os vieses metodológicos que impedem a melhor compreensão dos níveis de remoção de tecido vegetal por insetos.

CAPÍTULO I. QUANTA ÁREA FOLIAR OS INSETOS CONSOMEM? Um conjunto de dados de herbivoria por insetos amostrado globalmente com um protocolo padronizado

Data Papers

Ecology, 102(4), 2021, e03301
© 2021 The Authors. *Ecology* © 2021 The Ecological Society of America

How much leaf area do insects eat? A data set of insect herbivory sampled globally with a standardized protocol

GISELE M. MENDES ¹, FERNANDO A. O. SILVEIRA, ² CAROLINA OLIVEIRA, ¹ WESLEY DÁTILLO, ³ ROGER GUEVARA, ⁴ BETSABÉ RUIZ-GUERRA, ⁵ MARIA GABRIELA BOAVENTURA, ^{6,7} SERSHEN, ^{8,9} SYD RAMDHANI, ¹⁰ SHYAM S. PHARTYAL, ¹¹ SÉRVIO P. RIBEIRO, ¹² VÍCTOR DINIZ PINTO, ¹³ HERALDO L. VASCONCELOS, ¹⁴ RICHARD TITO, ¹⁵ CÁSSIO CARDOSO PEREIRA, ¹⁶ BÁRBARA CARVALHO, ¹⁷ GABRIEL M. CARVALHO, ¹⁸ EK DEL-VAL, ¹⁹ ELISE BUISSON, ²⁰ ANDRÉ J. ARRUDA, ²¹ JEAN-BAPTISTE TOTI, ²² FABIO DE O. ROQUE, ²³ ALLAN HENRIQUE SOUZA, ²⁴ FABIO BOLZAN, ²⁵ FREDERICO NEVES, ²⁶ JULIANA KUCHENBECKER, ²⁷ GUILHERME RAMOS DEMETRIO, ²⁸ LUZIENE SEIXAS, ²⁹ GUSTAVO Q. ROMERO, ³⁰ PAULA M. DE Omena, ³¹ JHONATHAN O. SILVA, ³² LUCAS PAOLUCCI, ³³ ELENIR OUEIROZ, ³⁴ MARK K. J. OOI, ³⁵ CHARLOTTE H. MILLS, ³⁶ PILLE GERHOLD, ³⁷ ANNE MERZIN, ³⁸ JHONNY C. MASSANTE, ³⁹ RAMIRO AGUILAR, ⁴⁰ LUCAS M. CARBONE, ⁴¹ RICARDO CAMPOS, ⁴² INÁCIO GOMES, ⁴³ GABRIELA ZORZAL, ⁴⁴ RICARDO SOLAR, ⁴⁵ LETÍCIA RAMOS, ⁴⁶ TATHIANA SOBRINHO, ⁴⁷ PEDRO SANDERS, ⁴⁸ AND TATIANA CORNELISSEN ⁴⁹

*Correspondências e solicitações de materiais devem ser endereçadas a Tatiana G. Cornelissen (taticornelissen@gmail.com).

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Red de Ecoetología, Instituto de Ecología AC, carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, CP 91073, Xalapa, Veracruz, México.

⁴Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología AC, carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, CP 91073, Xalapa, Veracruz, México.

⁵Red de Interacciones Multitróficas, Instituto de Ecología AC, carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, CP 91073, Xalapa, Veracruz, México.

⁶Department for Biodiversity & Conservation Biology, University of the Western Cape, Private Bag X17, Bellville, 7535, South Africa.

⁷Institute of Natural Resources, P.O. Box 100396, Scottsville, 3209, South Africa.

⁸School of Life Sciences, Westville Campus, University of KwaZulu-Natal, Private Bag X54001, Durban, 4000.

⁹School of Ecology & Environment Studies (SEES), Nalanda University, 803116, Rajgir, Bihar, India.

¹⁰Laboratory of Ecohealth, Ecology of Canopy Insects and Natural Succession, Nupeb-Ufop, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

¹¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

¹²Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, 38405-302, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

¹³Instituto de Ciencias de la Naturaleza, Territorio y Energías Renovables, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima 15088, Peru.

¹⁴Departamento de Biogeografía y Cambio Global, Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), C/Serrano 115 dpdo, 28006, Madrid, Spain.

¹⁵Departamento de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, Universidad Rey Juan Carlos, Calle Tulipán s/n, 28933, Móstoles, Madrid, Spain.

¹⁶Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (Unam), Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Col. San José de La Huerta, 58190, Morelia, Michoacán, México.

¹⁷Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), CNRS, IRD, Aix Marseille Université, IUT site Agroparc, BP 61207, F-84911, Avignon cedex 09, France.

¹⁸Laboratório de Ecologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Postal 549, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.

¹⁹Laboratório de Ecologia de Plantas, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), CP 549, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

²⁰Laboratório de Ecologia de Insetos E3-257, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Laboratório de Ecologia de Insetos E3-257, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²²Laboratório de Ecologia Vegetal, Unidade Educacional Penedo, Campus Arapiraca, Universidade de Alagoas, 57200-000, Penedo, Alagoas, Brazil.

²³Laboratory of Multitrophic Interactions and Biodiversity, Department of Animal Biology, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil.

²⁴Laboratório de Ecologia Básica e Aplicada, Colegiado de Ecologia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Thomaz Guimarães S/Nº, 48970-000, Senhor do Bonfim, Bahia, Brazil.

²⁵Laboratório de Interações Inseto-microrganismo, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

²⁶Centre for Ecosystem Science, School of Biological Earth and Environmental Sciences, UNSW Sydney, Sydney, NSW 2052, Australia.

²⁷School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AJ, UK.

²⁸Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Vanemuise 46, 51014, Estonia.

²⁹Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences, Kreutzwaldi 5, 51006, Tartu, Estonia.

³⁰Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba – Conicet, C.C. 495, (X5000JJC), Córdoba, Argentina.

³¹Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos, Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), Rodovia BR 101 Norte, Km 60, 29932-540, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.

³²Institute of Biological Sciences, Universidade Federal do Pará (UFPA), Av. Perimetral 2-224, 66077-830, Belém, Pará, Brazil.

RESUMO

A herbivoria é onipresente. Apesar de seu potencial papel na distribuição e desempenho das plantas, a herbivoria permanece em grande parte não documentada para a maioria das espécies de plantas. Algumas tentativas iniciais foram feitas para revisar, globalmente, quanto de área foliar é removida através da alimentação por insetos mastigadores. Kozlov e colaboradores (2015a), em uma das revisões mais abrangentes sobre padrões globais de herbivoria, compilaram estudos publicados sobre remoção foliar e dados amostrados sobre níveis globais de herbivoria usando um protocolo padronizado. No entanto, na revisão de Kozlov e colaboradores (2015a), apenas 15 locais de amostragem (compreendendo 33 espécies de plantas) foram avaliados em áreas tropicais. No Brasil, que ocupa o primeiro lugar em biodiversidade vegetal com um total de 46.097 espécies, sendo quase metade (43%) endêmica, foi amostrado um único ponto de dados, abrangendo apenas duas espécies vegetais. Em uma tentativa de ampliar o conhecimento sobre herbivoria em espécies de plantas tropicais e fornecer os dados brutos necessários para testar hipóteses gerais relacionadas às interações planta-herbívoros em grandes escalas espaciais, propusemos uma rede conjunta e colaborativa para avaliar a herbivoria em plantas tropicais. Essa rede nos permitiu atualizar e expandir os dados sobre herbivoria de insetos em espécies de plantas tropicais e algumas espécies temperadas, a título de comparações. Nosso conjunto de dados, coletado com um protocolo padronizado, abrange 45 locais de amostragem de nove países e inclui medições de herbivoria foliar de 57.239 folhas de 209 espécies de plantas vasculares pertencentes a 65 famílias de regiões tropical e temperada. O novo conjunto de dados inclui um total de 32 locais de amostragem de áreas tropicais ao redor do globo, compreendendo 152 espécies, 146 delas sendo amostradas no Brasil. Para áreas temperadas, inclui 13 locais de amostragem, compreendendo 59 espécies. Assim, quando comparado com a mais recente revisão abrangente de herbivoria de insetos (Kozlov *et al.* 2015a), este trabalho aumentou a base de dados disponíveis para as plantas tropicais em mais de 460% (de 33 para 152 espécies) e a amostragem brasileira aumentou em 7.300% (de 2 para 146 espécies). Dados sobre níveis precisos de herbivoria são apresentados para mais de 57.000 folhas em todo o mundo.

Palavras-chave: herbivoria; desfolha; consumo de folhas; interações planta-herbívoros; consumo primário; interações tróficas; gradientes latitudinais.

ABSTRACT

Herbivory is ubiquitous. Despite being a potential driver of plant distribution and performance, herbivory remains largely undocumented. Some early attempts have been made to review, globally, how much leaf area is removed through insect feeding. Kozlov *et al.* (2015a), in one of the most comprehensive reviews regarding global patterns of herbivory, have compiled published studies regarding foliar removal and sampled data on global herbivory levels using a standardized protocol. However, in the review by Kozlov *et al.* (2015a), only 15 sampling sites, comprising 33 plant species, were evaluated in tropical areas around the globe. In Brazil, which ranks first in terms of plant biodiversity, with a total of 46,097 species, almost half (43%) being endemic, a single data point was sampled, covering only two plant species. In an attempt to increase knowledge regarding herbivory in tropical plant species and to provide the raw data needed to test general hypotheses related to plant–herbivore interactions across large spatial scales, we proposed a joint, collaborative network to evaluate tropical herbivory. This network allowed us to update and expand the data on insect herbivory in tropical and temperate plant species. Our dataset, collected with a standardized protocol, covers 45 sampling sites from nine countries and includes leaf herbivory measurements of 57,239 leaves from 209 species of vascular plants belonging to 65 families from tropical and temperate regions. They expand previous datasets by including a total of 32 sampling sites from tropical areas around the globe, comprising 152 species, 146 of them being sampled in Brazil. For temperate areas, it includes 13 sampling sites, comprising 59 species. Thus, when compared to the most recent comprehensive review of insect herbivory (Kozlov *et al.* 2015a), our dataset has increased the base of available data for the tropical plants in more than 460% (from 33 to 152 species) and the Brazilian sampling was increased in 7,300% (from 2 to 146 species). Data on precise levels of herbivory are presented for more than 57,000 leaves worldwide.

Keywords: herbivory; defoliation; leaf consumption; plant-herbivore interactions; primary consumption; trophic interactions; latitudinal gradients.

INTRODUÇÃO

Herbívoros são onipresentes em ecossistemas terrestres e é praticamente impossível achar uma planta madura que não apresente marcas de herbivoria por insetos (Kozlov & Zvereva, 2017). Tem sido demonstrado que esta interação molda os caminhos evolutivos das plantas (Becerra, 2015), afeta a dinâmica populacional das plantas (Myers e Sarfraz, 2017), a organização da comunidade (Rossetti *et al.*, 2017) e o funcionamento dos ecossistemas (Crutsinger *et al.*, 2008). Apesar da importância das interações planta-herbívoros para os processos ecológicos e ecossistêmicos, ainda não temos estimativas robustas dos níveis de herbivoria para a maioria das espécies de plantas. Além disso, os dados publicados disponíveis nem sempre são coletados de forma padronizada, devido à não aleatoriedade da seleção das

plantas ou dados publicados, o que pode resultar em estimativas tendenciosas dos níveis de herbivoria, dificultando a comparação dos dados (Kozlov *et al.*, 2015b).

Algumas tentativas iniciais foram feitas para revisar, globalmente, quanto de área foliar é removida pela alimentação de insetos (por exemplo, Coley e Barone 1996, Metcalfe *et al.* 2014). Na revisão mais abrangente sobre herbivoria de insetos, Kozlov e colaboradores, (2015a) compilaram estudos publicados sobre a remoção foliar e dados amostrados através de um protocolo padronizado sobre níveis globais de herbivoria. Um total de 3.482 pontos de dados foram avaliados computando a porcentagem de área foliar removida por insetos para quase 950 espécies de plantas em 836 áreas em todo o mundo e em todas as zonas climáticas (Kozlov *et al.*, 2015a). Este é, de longe, um dos conjuntos de dados mais completos sobre estimativas de herbivoria por insetos em todo o mundo. Chamou nossa atenção, porém, que entre os dados amostrados com um protocolo padronizado, um único ponto de dados com apenas duas espécies de plantas foi avaliado no Brasil, que detém a maior biodiversidade de plantas (Zappi *et al.*, 2015) - com um total de 46.097 espécies - sendo quase a metade (43%) endêmica. Além disso, na revisão de estudos publicada em Kozlov e colaboradores (2015a), apenas 33 espécies de plantas de 13 famílias botânicas foram avaliadas nos trópicos.

Plantas em áreas tropicais são hospedeiras de mais herbívoros e muitas vezes herbívoros mais especializados, o que pode causar maiores danos às plantas hospedeiras (Novotny *et al.*, 2006). Além disso, um número maior de herbívoros nos trópicos - em comparação com as comunidades temperadas - pode resultar em diferenças na diversidade de plantas hospedeiras, no número de espécies herbívoras por hospedeiro e na especificidade do hospedeiro (Novotny *et al.*, 2006). Há necessidade, portanto, de ampliar o banco de dados de herbivoria para as plantas tropicais a fim de se obter valores mais realistas da perda de área foliar por insetos herbívoros.

Assim, nós propusemos uma rede conjunta e colaborativa para aumentar o conhecimento sobre herbivoria em espécies de plantas tropicais: a TROPHERB HERBIVORY NETWORK - uma rede global e inclusiva de pesquisadores com o objetivo de avaliar os padrões de danos às plantas tropicais causados por insetos herbívoros. Neste primeiro conjunto de dados, avaliamos os níveis de herbivoria para mais de 57.000 folhas, atualizando e expandindo os dados sobre herbivoria de insetos em 152 espécies de plantas tropicais (principalmente espécies brasileiras). Plantas de clima temperado também foram incorporadas para futuras comparações. Os dados foram amostrados com o auxílio de um protocolo padronizado (Apêndice A) para controlar diferentes formas de viés, com um gradiente

latitudinal de mais de 30 graus. Criamos esse conjunto de dados para fornecer os dados brutos necessários para testar hipóteses gerais relacionadas às interações planta-herbívoro em grandes escalas espaciais.

METADADOS

CLASSE I. Descritores do Conjunto de Dados

A. Identidade do conjunto de dados:

Título: Quanta área foliar os insetos consomem? Um conjunto de dados de herbivoria por insetos amostrados globalmente com um protocolo padronizado

B. Código de identificação do conjunto de dados:

Código de identificação do conjunto de dados sugerido: Global_leaf_herbivory.csv

C. Descrição do conjunto de dados:

Pesquisadores principais:

1. **Gisele Medeiros Mendes.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
2. **Fernando A. O. Silveira.** Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
3. **Carolina Oliveira.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
4. **Wesley Dáttilo.** Red de Ecoetología, Instituto de Ecología AC, carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, CP 91073, Xalapa, Veracruz, Mexico.
5. **Roger Guevara.** Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología AC, carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, CP 91073, Xalapa, Veracruz, Mexico.
6. **Betsabé Ruiz-Guerra.** Red de Interacciones Multitróficas, Instituto de Ecología AC, carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, CP 91073, Xalapa, Veracruz, Mexico.

7. **Maria Gabriela Boaventura.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
8. **Sershen.** ¹ Department for Biodiversity & Conservation Biology, University of the Western Cape, Private Bag X17, Bellville, 7535, South Africa. ²Institute of Natural Resources, P.O. Box 100396, Scottsville, 3209, South Africa.
9. **Syd Ramdhani.** School of Life Sciences, Westville Campus, University of KwaZulu-Natal, Private Bag X54001, Durban, 4000.
10. **Shyam S. Phartyal.** School of Ecology & Environment Studies (SEES), Nalanda University, 803116, Rajgir, Bihar, India.
11. **Sérvio P. Ribeiro.** Laboratory of Ecohealth, Ecology of Canopy Insects and Natural Succession, Nupeb-Ufop, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.
12. **Victor Diniz Pinto.** Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
13. **Heraldo L. Vasconcelos.** Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, 38405-302, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.
14. **Richard Tito.** Instituto de Ciencias de la Naturaleza, Territorio y Energías Renovables, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima 15088, Peru.
15. **Cássio Cardoso Pereira.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
16. **Bárbara Carvalho.** Departamento de Biogeografía y Cambio Global, Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), C/Serrano 115 dpdo, 28006, Madrid, Spain.
17. **Gabriel M. Carvalho.** Departamento de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, Universidad Rey Juan Carlos, Calle Tulipán s/n, 28933, Móstoles, Madrid, Spain.
18. **Ek del-Val.** Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (Unam), Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Col. San José de La Huerta, 58190, Morelia, Michoacán, México.
19. **Elise Buisson.** Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), CNRS, IRD, Aix Marseille Université, IUT site Agroparc, BP 61207, F-84911, Avignon cedex 09, France.
20. **Andre J. Arruda.** Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), CNRS, IRD, Aix Marseille Université, IUT site Agroparc, BP 61207, F-84911, Avignon cedex 09, France.

21. **Jean-Baptiste Toth.** Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), CNRS, IRD, Aix Marseille Université, IUT site Agroparc, BP 61207, F-84911, Avignon cedex 09, France.
22. **Fabio de O. Roque.** Laboratório de Ecologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Postal 549, Campo Grande, Mato Grosso do Sul CEP 79070-900, Brazil.
23. **Allan Henrique Souza.** Laboratório de Ecologia de Plantas, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), CP 549, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.
24. **Fabio Bolzan.** Laboratório de Ecologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Postal 549, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.
25. **Frederico Neves.** Laboratório de Ecologia de Insetos E3-257, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
26. **Juliana Kuchenbecker.** Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Laboratório de Ecologia de Insetos E3-257, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
27. **Guilherme Ramos Demetrio.** Laboratório de Ecologia Vegetal, Unidade Educacional Penedo, Campus Arapiraca, Universidade de Alagoas, 57200-000, Penedo, Alagoas, Brazil.
28. **Luziene Seixas.** Laboratório de Ecologia Vegetal, Unidade Educacional Penedo, Campus Arapiraca, Universidade de Alagoas, 57200-000, Penedo, Alagoas, Brazil.
29. **Gustavo Q. Romero.** Laboratory of Multitrophic Interactions and Biodiversity, Department of Animal Biology, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), 13083-862 Campinas, São Paulo, Brazil.
30. **Paula M. de Omena.** Institute of Biological Sciences, Universidade Federal do Pará (UFPA), Av. Perimetral 2-224, 66077-830, Belém, Pará, Brazil.
31. **Jhonathan O. Silva.** Laboratório de Ecologia Básica e Aplicada, Colegiado de Ecologia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Thomaz Guimarães S/Nº, 48970-000, Senhor do Bonfim, Bahia, Brazil.
32. **Lucas Paolucci.** Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
33. **Elenir Queiroz.** Laboratório de Interações Inseto-microrganismo, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
34. **Mark K. J. Ooi.** Centre for Ecosystem Science, School of Biological Earth and Environmental Sciences, UNSW Sydney, Sydney, NSW 2052, Australia.

35. **Charlotte H. Mills**^{1,2}. ¹Centre for Ecosystem Science, School of Biological Earth and Environmental Sciences, UNSW Sydney, Sydney, NSW 2052, Australia. ²School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknights, Reading RG6 6AJ, UK.
36. **Pille Gerhold**^{1,2}. ¹Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Vanemuise 46, 51014, Estonia. ²Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian University of Life Sciences, Kreutzwaldi 5, 51006, Tartu, Estonia.
37. **Anne Merzin**. Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Vanemuise 46, 51014, Estonia.
38. **Jhonny C. Massante**. Institute of Ecology and Earth Sciences, University of Tartu, Vanemuise 46, 51014, Estonia.
39. **Ramiro Aguilar**. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Cordoba – Conicet, C.C. 495, (X5000JJC), Cordoba, Argentina.
40. **Lucas Manuel Carbone**. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Cordoba – Conicet, C.C. 495, (X5000JJC), Cordoba, Argentina.
41. **Ricardo Campos**. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
42. **Inácio Gomes**. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
43. **Gabriela Zorzal**. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
44. **Ricardo Solar**. Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
45. **Letícia Ramos**. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
46. **Tathiana Sobrinho**. Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos, Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), Rodovia BR 101 Norte, Km 60, 29932-540, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.
47. **Pedro Sanders**. Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos, Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), Rodovia BR 101 Norte, Km 60, 29932-540, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.
48. **Tatiana Cornelissen**. Centro de Síntese Ecológica e Conservação L3-175, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E. Descrição:

O conjunto de dados apresenta informações de herbivoria foliar de 38 locais em nove países: Argentina, Austrália, Brasil, Espanha, Estônia, França, Índia, México e África do Sul (Fig.1). Inclui 57.239 medições de herbivoria em folhas de 209 espécies de plantas vasculares pertencentes a 65 famílias, amostradas nas regiões tropical - principalmente espécies de plantas brasileiras - e temperada. A amostragem e medidas foram realizadas seguindo um protocolo padronizado (Apêndice A). O novo conjunto de dados inclui um total de 27 locais de amostragem, compreendendo 152 espécies pertencentes a 42 famílias na região tropical ao redor do globo. Dentre elas, 146 espécies, pertencentes a 41 famílias, foram amostradas no Brasil. Para áreas temperadas, incluímos 13 locais de amostragem e 59 espécies de plantas pertencentes a 41 famílias. Os níveis de herbivoria foram avaliados como porcentagem de perda de área foliar (corrigida pelo tamanho da folha) com foco em herbívoros mastigadores. Para cada planta hospedeira, os dados incluem informações sobre a classificação científica (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e nome científico); a localização do local de estudo (coordenadas textuais, latitude decimal, longitude decimal, altitude, país, estado, cidade e localidade); a forma de vida (liana, arbusto, arvoreta, árvore); a data de amostragem; o método utilizado para estimar a porcentagem de área foliar perdida (Bioleaf ou ImageJ); o número de réplicas das plantas e o nome do coletor.



Figura 1. Localização dos pontos onde os dados de herbivoria foram coletados para 209 espécies de plantas, categorizados em: 🌿 Região Tropical ou 🌳 Região Temperada.

CLASSE II. Descritores da Origem da Pesquisa

A. Descrição geral do projeto

1. Identificação: Dados expandidos e atualizados de herbivoria por insetos em espécies de plantas vasculares nas regiões tropical e temperada - principalmente espécies brasileiras - com um protocolo padronizado para amostragem de dados e medidas de herbivoria.

2. Origem: O projeto “Quanto da folha os insetos consomem? Padrões latitudinais em herbivoria” é parte da tese de doutorado de Gisele M. Mendes na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A compilação dos dados sobre herbivoria foliar foi coordenada pela Dra. Tatiana G. Cornelissen (UFMG). Todas as bases de dados foram montadas com a ajuda de todos os outros autores.

3. Período do Estudo: A coleta de dados aconteceu entre março de 2017 a fevereiro de 2020.

4. Objetivos: Fornecer medidas exatas de herbivoria foliar (porcentagem de perda de área foliar) amostradas com um protocolo padronizado em todo o mundo, aumentando os dados para espécies tropicais e também fornecer dados brutos que possam ser usados para testar hipóteses gerais relacionadas a interações planta-herbívoros em grandes escalas espaciais.

5. Resumo: Igual ao anterior.

6. Fontes de financiamento: A compilação deste conjunto de dados foi apoiada por subsídios e bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

B. Descrição específica do subprojeto

1. Estabelecimento da rede de herbivoria: A criação da rede foi discutida durante a 54ª reunião anual da “Association for Tropical Biology and Conservation (ATBC)” em Mérida (MX), 2017. A ideia original do projeto foi concebida pela coordenadora do projeto Tatiana G.

Cornelissen durante o simpósio “Interações insetos-plantas: padrões e processos em um mundo em mudança” (ATBC 2017), no qual foi detectado que os níveis de herbivoria relatados na literatura para espécies de plantas tropicais podem ser inferiores aos níveis de herbivoria comumente detectados no campo. A rede é composta por 48 pesquisadores de nove países.

2. Descrição dos pontos de amostragem: Os dados foram amostrados em 43 localidades, compreendendo regiões tropical e temperada no Brasil, México, Espanha, Argentina, Austrália, Estônia, França, Índia e África do Sul.

3. Amostragem dos dados: Um protocolo para amostragem de dados foi desenvolvido e distribuído entre os pesquisadores (Apêndice A). As amostras foram coletadas em áreas naturais. Em cada local, as coordenadas (latitude e longitude) foram registradas e as cinco espécies vegetais mais abundantes foram selecionadas e identificadas. Cinco repetições de cada espécie foram selecionadas para amostragem e, de cada indivíduo, foi escolhido um galho a uma distância de pelo menos 2,0 metros. De cada ramo, 50 folhas foram amostradas (5 espécies x 5 repetições x 1 ramo por repetição: 50 folhas/ramo). As folhas foram numeradas, prensadas e secas em estufa. Cada folha amostrada (n=1.250 por localidade) foi digitalizada e a perda de área foliar foi determinada usando o software ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004), após calibrar cada imagem para mm, ou o software Bioleaf (Machado *et al.*, 2016). A herbivoria foi medida como a razão entre a soma das perdas de área foliar sobre a lâmina foliar pela área foliar total, multiplicada por 100 para converter em porcentagem. Os dados foram coletados entre março de 2017 a fevereiro de 2020 e processados por G. Mendes, T. Cornelissen e demais participantes da rede.

4. Dados taxonômicos: todos os registros das espécies tiveram sua classificação taxonômica revisada e atualizada. Para informações taxonômicas usamos <<https://www.gbif.org/>>.

CLASSE III. Situação e Acessibilidade do Conjunto de Dados

A. Situação

Última atualização: novembro de 2020.

Data do último arquivo: novembro de 2020.

Status do metadado: última atualização em novembro de 2020, versão enviada à publicação.

Verificação dos dados: Verificamos todas as informações como nomes de espécies e localização. As informações taxonômicas foram revisadas e erros de transcrição foram corrigidos.

B. Acessibilidade

Contato: Gisele M. Mendes (giselemm@ufmg.br). Centro de Síntese Ecológica e Conservação, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-910, bloco L3. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Restrições de direitos autorais: nenhuma.

Restrições de propriedade: por favor, cite este artigo ao usar os dados atuais e nos informe como esses serão usados nas publicações.

Custos: Nenhum.

CLASSE IV. Descritores Estruturais dos Dados

A. Arquivo do conjunto de dados

Identificação: global_leaf_herbivory.csv

Tamanho: 57, 240 registros, 16.5 MB (17,371,680 bytes).

Formato e modo de armazenamento: valores separados por vírgulas (.csv).

Informações do cabeçalho: consulte as descrições das colunas na seção B.

Atributos alfanuméricos: misto.

Anomalias dos dados: as informações ausentes foram classificadas como “NA”.

B. Informações das variáveis

1) Informações sobre Espécies de Plantas

Variáveis	Descrição	Níveis	Exemplo
Reino	Reino taxonômico	um	Plantae
Filo	Filo taxonômico	um	Tracheophyta
Classe	Classe taxonômica	dois	Magnoliopsida; Liliopsida
Ordem	Ordem taxonômica	27	Myrtales
Família	Família taxonômica	65	Melastomataceae
Gênero	Gênero taxonômico	142	Miconia
Espécie	Nome científico da espécie (<i>Gênero especie</i>)	209	<i>Miconia corallina</i>
Forma de vida	Forma de crescimento da planta	04	Liana; Arbusto; Subarbusto; Árvore;
Guilda (herbívoro)	Guilda de insetos herbívoros que consumiram a área foliar perdida	um	Mastigadores

2) Informações do local de estudo: descrição dos campos relacionados com a localização de cada local de estudo.

Variáveis	Descrição	Níveis	Exemplo
Número de identificação do registro	código de entrada do registro do conjunto de dados: country.locality.specie.plant.leaf	57.239	BR.Itacolomi.Mic.cor.1.1
País	Nome do país onde está localizado o local de amostragem	nove	Brazil
Estado	Estado ou Província com base nas coordenadas geográficas	21	Minas Gerais
Município	Município do local de estudo com base nas coordenadas geográficas	40	Ouro Preto
Local de estudo	Nome do local de estudo	38	Parque Estadual do Itacolomi
Latitude	Latitude decimal datum SAD 69	Grau decimal	-20,427500
Longitude	Longitude decimal datum SAD 69	Grau decimal	-43,497500
Coordenadas	Coordenadas do local de estudo: graus, minutos, segundos (DD°MM'SS")	Vários	20° 25' 39.0" S 43° 29' 51.0" W
Altitude	Metros acima do nível do mar	3 to 2273 m	1772

3) Método de amostragem

Variáveis	Descrição	Níveis	Exemplo
Dia	Dia da amostragem	1 to 31	6
Mês	Mês da amostragem	12	7
Ano	Ano da amostragem	2017 to 2020	2018
Método de medição	Software usado para estimar a porcentagem de herbivoria	dois	ImageJ ou Bioleaf

CLASSE V. Descritores suplementares

A. Aquisição dos dados

1. Histórico de solicitações dos dados: nenhum.

2. Histórico de atualizações do conjunto de dados: nenhum.

3. Procedimentos de entrada/verificação dos dados

G. Histórico de uso do conjunto de dados: nenhum.

AGRADECIMENTOS

GM, TC e os autores agradecem ao CNPq, Fapemig e Capes (código financeiro 001) e GSG.

PG agradece ao Conselho de Pesquisa da Estônia (concessão PRG741) e WD agradece a

Ricardo Madrigal por sua ajuda na estimativa de herbivoria nas folhas de Los Tuxtlas (México).

REFERÊNCIAS

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with imageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–41.
- Becerra, J.X. (2015) Macroevolutionary and geographical intensification of chemical defense in plants driven by insect herbivore selection pressure. *Current Opinion in Insect Science*, **8**, 15–21.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and Plant Defenses in Tropical Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 305–335.
- Crutsinger, G.M., Habenicht, M.N., Classen, A.T., Schweitzer, J.A. & Sanders, N.J. (2008) Galling by *Rhopalomyia solidaginis* alters *Solidago altissima* architecture and litter nutrient dynamics in an old-field ecosystem. *Plant and Soil*, **303**, 95–103.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015a) Global patterns in background losses of woody plant foliage to insects. *Global Ecology and Biogeography*, **24**, 1126–1135.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015b) Background losses of woody plant foliage to insects show variable relationships with plant functional traits across the globe. *Journal of Ecology*, **103**, 1519–1528.
- Kozlov, M. V. & Zvereva, E.L. (2017) Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology. In *Progress in Botany*. pp. 313–355.
- Machado, B.B., Orue, J.P.M., Arruda, M.S., Santos, C. V., Sarath, D.S., Goncalves, W.N., *et al.* (2016) BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. *Computers and Electronics in Agriculture*, **129**, 44–55.
- Metcalf, D.B., Asner, G.P., Martin, R.E., Silva Espejo, J.E., Huasco, W.H., Farfán Amézquita, F.F., *et al.* (2014) Herbivory makes major contributions to ecosystem carbon and nutrient cycling in tropical forests. *Ecology Letters*, **17**, 324–332.
- Myers, J.H. & Sarfraz, R.M. (2017) Impacts of Insect Herbivores on Plant Populations. *Annual Review of Entomology*, **62**, 207–230.
- Novotny, V., Drozd, P., Miller, S.E., Kulfan, M., Janda, M., Basset, Y., *et al.* (2006) Why Are There So Many Species of Herbivorous Insects in Tropical Rainforests? *Science*, **313**, 1115–1118.
- Rossetti, M.R., Tschardtke, T., Aguilar, R. & Batáry, P. (2017) Responses of insect herbivores and herbivory to habitat fragmentation: a hierarchical meta-analysis. *Ecology Letters*, **20**, 264–272.
- Zappi, D.C., Ranzato Filardi, F.L., Leitman, P., Souza, V.C., Walter, B.M.T., Pirani, J.R., *et al.* (2015) Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguesia*, **66**, 1085–1113.

CAPÍTULO II. HERBIVORIA EM PLANTAS TROPICAIS: Efeitos dos Traços Foliare, do Habitat e da Filogenia no Consumo por Insetos Mastigadores

RESUMO

A herbivoria é uma das principais vias de condução de energia entre os níveis tróficos basais até os níveis superiores, e mesmo em níveis baixos já pode ser suficiente para reduzir o desempenho das plantas. Algumas tentativas iniciais foram feitas para revisar, globalmente, quanta área foliar é removida pela alimentação de insetos. No entanto, não há um consenso a respeito dos níveis de herbivoria e como esse valor varia em função das linhagens de plantas e entre plantas com diferentes histórias de vida. A aparência de plantas e a área foliar específica (SLA) são características funcionais que podem explicar as variações encontradas na frequência e níveis de herbivoria, sendo esses valores maiores em árvores de crescimento moderado e com maior área foliar específica. Considerando a demanda por estudos adicionais - em largas escalas e padronizados - que abranjam a herbivoria em plantas tropicais, nós avaliamos a variação nos níveis de herbivoria de 166 espécies de plantas a fim de determinar quais traços funcionais influenciam os níveis de herbivoria e testamos se os padrões detectados são semelhantes entre as diferentes fitofisionomias para um grande conjunto de espécies. Nós concluímos que as taxas de herbivoria não variam tão substancialmente em todo o mundo, portanto nossos dados não apoiam a ideia de que a herbivoria seja mais intensa nos trópicos. Entretanto, os níveis de herbivoria foram influenciadas por traços funcionais das plantas. A área foliar específica e a fitofisionomia podem ser bons previsores das perdas de tecido foliar em diversas plantas não-relacionadas filogeneticamente. Entretanto, nós não encontramos suportes para detectar diferenças nos níveis de herbivoria entre as formas de vida.

Palavras-chave: herbivoria; consumo de folhas; interações planta-herbívoros; consumo primário; interações tróficas; gradientes latitudinais.

INTRODUÇÃO

A herbivoria foliar, ou seja, o consumo de biomassa vegetal por insetos herbívoros, é uma interação amplamente difundida em todas as vegetações ao redor do globo (Kozlov & Zvereva 2017), sendo considerada uma das mais importantes interações ecológicas e evolutivas da natureza (Turcotte *et al.* 2014) e um importante fator de impacto na performance de plantas (Kozlov & Zvereva 2017, Marquis *et al.*, 2001, Ribeiro & Brown 2006). Uma vez que os insetos são os principais consumidores da produção primária terrestre, a herbivoria foliar é uma das principais vias de condução de energia e nutrientes entre os níveis tróficos basais até os níveis superiores (Price 2002, Futuyma & Agrawal 2009, Turcotte *et al.* 2014). Além disso, foi demonstrado que ela molda os caminhos evolutivos das plantas (Becerra, 2015), afeta a dinâmica das populações de plantas (Myers & Sarfraz 2017), a organização de comunidades (Rossetti *et al.*, 2017) e o funcionamento dos ecossistemas (Crutsinger *et al.*, 2008).

Apesar da importância desta interação e dos esforços na tentativa de determinar o papel de insetos herbívoros na remoção de biomassa vegetal, não há ainda um consenso a respeito da quantidade de biomassa vegetal que é perdida para os insetos através da alimentação e como esse valor varia em função das linhagens de plantas e entre plantas com diferentes histórias de vida (Turcotte *et al.*, 2014a). Algumas tentativas iniciais foram feitas para revisar, globalmente, quanta área foliar é removida pela alimentação de insetos. Há 26 anos, Coley e Barone (1996) fizeram uma primeira tentativa de avaliar o nível de herbivoria em plantas em diferentes latitudes e sugeriram que os herbívoros removem cerca de 7,0% da área foliar nas regiões temperadas e 11,0% na região tropical. Metcalfe e colaboradores (2014) reavaliaram esse número para os principais biomas terrestres e sugeriram em torno de 8.0% de remoção de área foliar por herbivoria em ambientes florestais, no entanto, agruparam os dados das regiões tropical e temperada. Turcotte e colaboradores (2014) chegaram à conclusão que os insetos removem globalmente em torno de 5.3% de tecido foliar. Em uma revisão mais abrangente, Kozlov e colaboradores (2015a) compilaram estudos publicados sobre remoção foliar e dados amostrados sobre níveis globais de herbivoria usando um protocolo padronizado. Foi encontrado um valor em torno de 4.0% de área foliar removida mundialmente por insetos - não havendo diferenças significativas entre as plantas das regiões tropical e temperada. Este é, de longe, um dos conjuntos de dados mais completos sobre estimativas de herbivoria por insetos em todo o mundo. No entanto, chamou nossa atenção, que existem consideravelmente mais dados para a região temperada, com 287 espécies de plantas avaliadas, quando comparada à

amostragem nos trópicos, com apenas 33 espécies de plantas avaliadas. Além disso, um único ponto com apenas duas espécies de plantas foi avaliado no Brasil, indicando que esta região pode estar sub-representada.

A região tropical é a mais rica em diversidade de espécies de plantas e insetos (Rafael *et al.*, 2009; Zappi *et al.*, 2015). Existem 5 a 10 vezes mais espécies de plantas por 10.000 km² em áreas tropicais do que em áreas temperadas (Barthlott *et al.*, 1996), e a riqueza de espécies de plantas lenhosas é 6 vezes maior (Novotny *et al.*, 2006). Considerando-se que o Brasil, maior país em extensão territorial da região tropical, detém a maior biodiversidade de angiospermas já registradas - com um total de 46.097 espécies - sendo quase a metade (43%) endêmica (Zappi *et al.*, 2015), e possui de cerca de 90.000 espécies de insetos (Rafael *et al.*, 2009), existe a necessidade de ampliar a base de dados de herbivoria para a região tropical a fim de se obter um valor mais realístico da perda de área foliar por insetos herbívoros.

Atualmente, muita informação já foi acumulada sobre os mecanismos de seleção de plantas por insetos herbívoros (revisão em Bernays & Chapman 2007) e vários fatores têm sido avaliados, como as características estruturais e químicas de plantas hospedeiras. Apesar de a variação de compostos secundários em plantas ser sugerida como a principal explicação para a alteração nos níveis de herbivoria foliar (Fraenkel, 1959), tal visão se tornou muito simplista, uma vez que não considera a ampla diversidade de traços funcionais e características da história de vida que também afetam a suscetibilidade de uma planta a insetos herbívoros. Portanto, outros traços funcionais têm sido avaliados (Turcotte *et al.*, 2014a).

Os traços funcionais são definidos como qualquer característica morfológica, fisiológica ou fenológica, mensurável a nível de indivíduo, que impacta indiretamente a aptidão por meio de seus efeitos no crescimento, reprodução e sobrevivência (Violle *et al.*, 2007). Portanto, espécies com ou sem afinidades filogenéticas, que compartilham traços funcionais similares, respondem similarmente às condições ambientais (Lavorel *et al.*, 1997). A forma de vida e a área foliar específica (do inglês SLA: specific leaf area) são características funcionais que diferem entre as espécies e entre os indivíduos e, estas podem explicar as variações encontradas na quantidade de biomassa vegetal consumida por insetos herbívoros (Ribeiro & Fernandes 2000, Wright *et al.* 2004, Kozlov *et al.* 2015a, 2015b). A Teoria da Aparência das Plantas é definida como a probabilidade de uma planta ser encontrada por insetos herbívoros (Feeny, 1976; Endara & Coley, 2011), e qualquer característica que possa tornar a planta aparente aumenta potencialmente sua vulnerabilidade à herbivoria. Portanto, é esperado que árvores, sendo mais “aparentes”, experimentem ataques mais persistentes quando comparadas a arbusto

e lianas (Castagneyrol *et al.*, 2013; Turcotte *et al.*, 2014a). A SLA é frequentemente associada a herbivoria visto que reflete propriedades foliares que afetam diretamente a palatabilidade foliar para insetos, e conseqüentemente, pode funcionar como uma defesa mecânica (Alliende, 1989; Poorter *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2014). Assim, folhas que apresentam SLA baixos tendem a um alto investimento em defesas contra herbívoros, enquanto folhas com SLA maiores indicam baixo investimento em defesas, fazendo com que as folhas sejam mais macias e atrativas, aumentando assim a vulnerabilidade à herbivoria (Cornelissen *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2004).

Considerando-se a demanda por estudos adicionais - em largas escalas - que abranjam a herbivoria em plantas tropicais, nós avaliamos (1) a variação nos níveis e frequência de herbivoria em espécies comuns na região tropical, a fim de determinar se traços funcionais das plantas influenciam nos níveis de herbivoria e (2) se os padrões detectados são semelhantes entre as diferentes fitofisionomias para um grande conjunto de espécies de plantas. Os padrões de ocorrência de herbivoria foram avaliados utilizando-se a intensidade e a frequência do dano. Aqui, consideramos como nível de herbivoria a porcentagem média de área foliar removida por insetos herbívoros e, frequência de herbivoria como a porcentagem média de folhas atacadas.

Para isso, testamos as seguintes hipóteses: H1) O nível de herbivoria em plantas comuns nas regiões tropical é maior que o reportado na literatura e espera-se que os níveis de área removida por insetos herbívoros ultrapassem os valores estimados anteriormente nas revisões publicadas devido à sub-representatividade de pontos na região tropical; H2) A variação nos traços funcionais explicam a variação nos níveis e frequência de herbivoria em espécies de plantas tropicais, sendo que maiores danos são esperados em: (1) plantas "aparentes" aumentando de lianas para arbustos e árvores, (2) plantas de ambientes florestais comparados à ambientes abertos e (3) com maior área foliar específica (SLA).

MÉTODOS

Os dados foram extraídos de Mendes *et al.*, (2021), onde um protocolo para amostragem de dados foi desenvolvido (Apêndice A) e distribuído entre os pesquisadores participantes da rede TropHerb Herbivory - uma rede global e inclusiva que visa avaliar os padrões de danos às plantas causados por insetos herbívoros. A amostragem ocorreu entre março de 2017 a fevereiro de 2020 em quatro países das regiões Tropical e Subtropical: Brasil, Índia, México e África do Sul, incluindo ambientes florestais (Floresta Tropical Úmida) e vegetações abertas. No Brasil, foram amostradas as principais fitofisionomias: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Campo rupestre, Canga, Caatinga e Restinga. As espécies de plantas estavam distribuídas em 47 locais de amostragem compreendendo um gradiente latitudinal de 60°, de -30,396,028 a 30,236,111 (Fig. 1). Obtivemos ainda, as informações sobre a forma de vida para todas essas espécies e valores de SLA para 91 delas (56% das espécies amostradas).

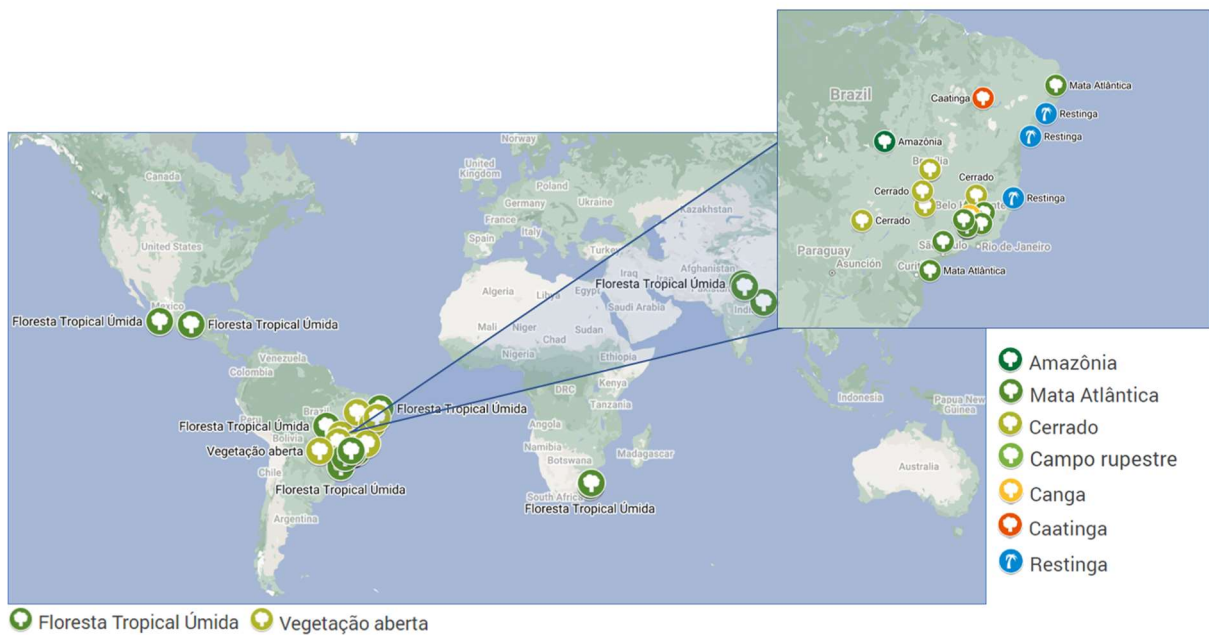


Figura 1. Localização dos pontos onde os dados de herbivoria foram coletados para 166 espécies de plantas, com indicação do tipo de vegetação, categorizadas em Floresta Tropical Úmida ou Vegetação aberta. Em destaque, no canto superior direito, as fitofisionomias brasileiras amostradas e aqui indicadas como Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Campo Rupestre, Canga, Caatinga e Restinga.

Amostragem

As amostras foram coletadas em áreas naturais e, em cada local, cinco das espécies vegetais mais abundantes foram escolhidas e identificadas. Para cada espécie, cinco repetições foram selecionadas ao acaso e, de cada indivíduo, um galho foi escolhido a uma distância de pelo menos 2,0 metros entre o pesquisador e o ramo a ser amostrado, a fim de evitar a avaliação visual do dano foliar e escolha tendenciosa das amostras. De cada ramo, 50 folhas foram colhidas (5 espécies x 5 repetições x 1 ramo por repetição) totalizando 1.250 folhas por localidade. As folhas foram numeradas, prensadas e secas em estufa. Adicionalmente, foram coletadas dez folhas intactas de cada espécie de planta, em cada local, para a determinação da área foliar específica (SLA).

Processamento dos dados

Após a secagem, cada folha amostrada ($n = 250$ folhas por espécie, 1.250 por localidade) foi digitalizada e a perda de área foliar foi determinada usando o software ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004), após calibrar cada imagem para mm, ou o software Bioleaf (Machado *et al.*, 2016). A área foliar perdida para herbivoria foi determinada pela razão entre a área foliar consumida pela área foliar total, multiplicada por 100 para converter em porcentagem. Para o cálculo da área foliar específica (SLA), 10 folhas intactas de cada espécie foram sorteadas, e tiveram sua massa medida em mg^{-1} com o auxílio de uma balança de precisão. A SLA foi definida como a razão da área foliar total (mm^2) pela massa seca da folha (mg^{-1}) (Cornelissen *et al.* 2003). Os pecíolos não foram incluídos nos cálculos. Os dados foram processados por G. Mendes, T. Cornelisen e demais participantes da rede.

Análises dos dados

Para testar a existência de um potencial efeito da diversidade filogenética na herbivoria, nós utilizamos regressões filogenéticas - PGLS (Phylogenetic Generalized Least Squares) (Symonds & Blomberg 2014), usando como variável resposta o nível e a frequência de herbivoria e como variável explicativa a matriz de distância filogenética entre as 166 espécies de plantas vasculares avaliadas. Ajustamos a covariância esperada sob um modelo multivariado de movimento Browniano (Martins & Hansen 1997) e reconstruímos a árvore filogenética

seguindo Qian e Jin (2016) e usando os pacotes *phytools* (Revell, 2012) e *nlme* (Pinheiro *et al.* 2013) no programa R (R Core Team, 2020).

Para avaliar a existência de relação entre a herbivoria e as características funcionais das plantas, o nível e frequência de herbivoria foram calculados usando-se cada indivíduo como réplica dentro da espécie e as espécies como réplicas entre as variáveis analisadas. Quando a espécie se repetiu entre os pontos de amostragens, nós calculamos o nível de herbivoria médio para os 5 indivíduos, e em seguida calculamos a média por espécie. A fim de verificar se existe influência da forma de vida no nível e frequência de herbivoria, as plantas foram agrupadas em categorias de acordo com a aparência: lianas, arbustos ou árvores (Christen Raunkiær, 1934; Clapham *et al.*, 1935). As plantas listadas na literatura como subarbustos foram incluídas na categoria arbusto e as plantas listadas como arvoretos foram incluídas na categoria árvore. Para esta categorização utilizamos informações fornecidas pelos pesquisadores e/ou dados da literatura (Lorenzi, 1992; “Global Biodiversity Information Facility - GBIF,” 2020). Devido a inexistência de réplicas suficientes capazes de representar o grupo das lianas, *Pyrostegia venusta* foi excluída das análises da influência da SLA em função da aparência das plantas e variação de SLA entre as fitofisionomias.

Neste estudo exploramos as relações entre herbivoria e características funcionais entre espécies de plantas independentemente de seus habitats e, posteriormente investigamos as fontes de variação na herbivoria entre plantas que compartilham o mesmo habitat. A variação nos níveis e frequência de herbivoria entre as formações vegetais, fitofisionomias e forma de vida foram analisadas e comparadas usando modelos lineares generalizados (GLMs). Analisamos os resíduos para verificar a adequação da distribuição e verificamos a superdispersão em todos os modelos. A relação entre herbivoria (nível e frequência) e SLA foi testada através de regressões lineares simples. Para os GLMs as análises foram conduzidas utilizando o software R Core Team (2022) e para regressão linear o software Prism[®] (“GraphPad Prism,” 2022).

RESULTADOS

Este estudo apresenta estimativas precisas de herbivoria foliar para 50.316 folhas de 166 espécies de plantas vasculares pertencentes a 57 famílias, em diversos domínios fitogeográficos das regiões tropical e subtropical, incluindo ambientes florestais e vegetações abertas. Do total de espécies avaliadas, 127 delas (76.5%) pertencentes a 42 famílias foram amostradas nas principais fitofisionomias brasileiras: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Campo rupestre, Canga, Caatinga e Restinga.

As plantas das regiões tropical e subtropical perdem, em média $5.78\% \pm 0.36$ (média \pm SE) de área foliar para insetos herbívoros mastigadores e, em média, $68.04\% \pm 2.20$ (média \pm SE) das folhas por indivíduo apresentam marcas de alimentação por insetos. Os menores níveis herbivoria foram encontrados nos fitofisionomias canga, campo rupestre e restinga - nas espécies arbustivas *Lychnophora pinaster* (Asteraceae), *Mandevilla velame* (Apocynaceae), *Pseudobriellia brasiliensis* (Asteraceae) e *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) - que tiveram níveis médios de herbivoria menores que 0.1% de área foliar consumida. Já as os maiores níveis de herbivoria foram encontrados nas espécies arbóreas *Rothmannia globosa* (Rubiaceae) com 20.7% e *Drypetes natalenses* (Putranjivaceae) com 29.9%. Em relação à frequência, *Pseudobriellia brasiliensis* (Asteraceae) apresentou a menor porcentagem com 2.8% das folhas atacadas e 56 do total de 166 espécies avaliadas tiveram mais de 90% das folhas atacadas por insetos herbívoros (Fig.2).

O método genético comparativo - PGLS inferiu que a diversidade filogenética não influenciou no nível ou na frequência de herbivoria para as 166 espécies estudadas ($P=0.136$), sendo assim as demais análises foram realizadas independentes de sinal filogenético.

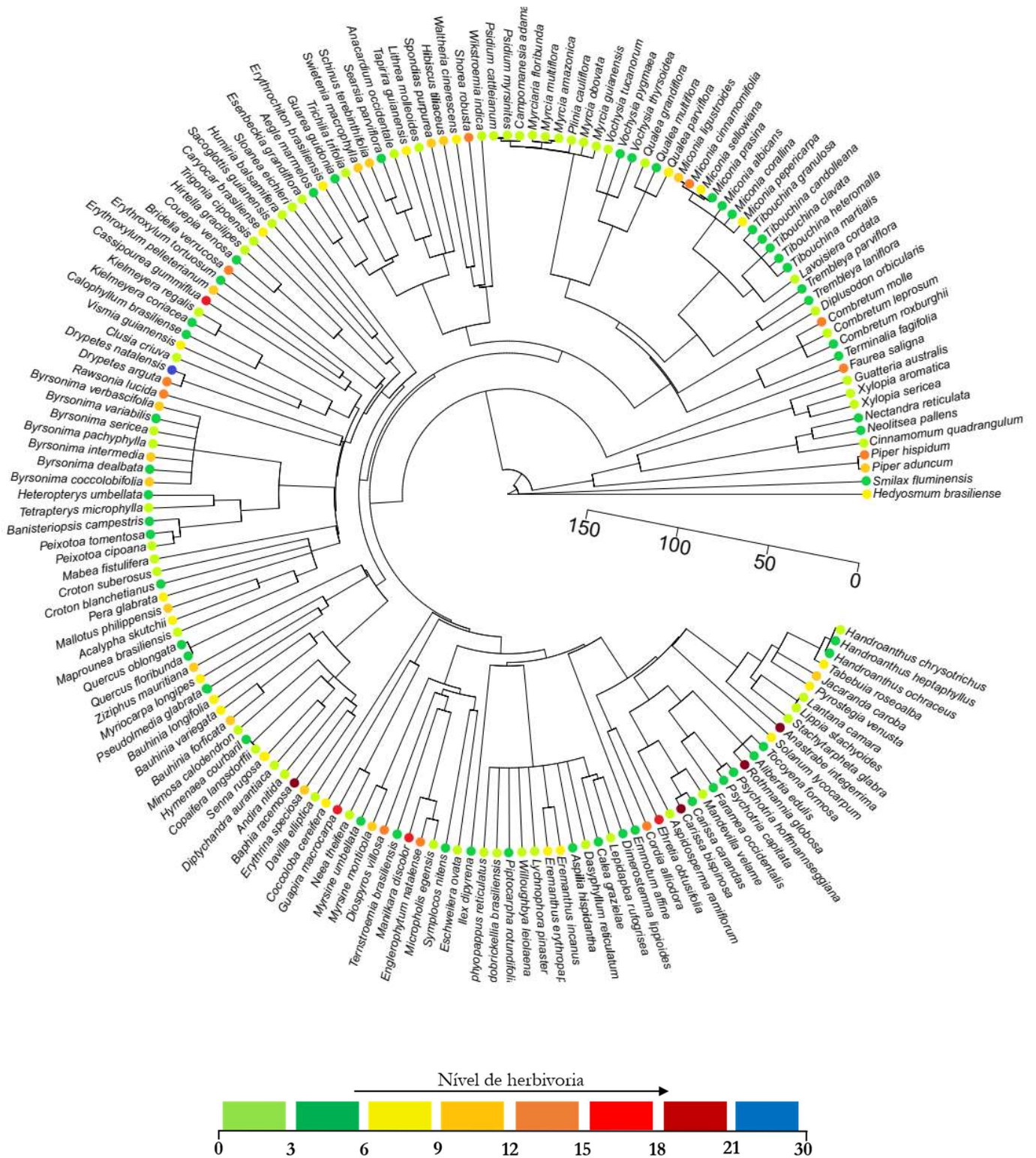


Figura 2: Reconstrução da árvore filogenética para as 166 espécies de plantas lenhosas avaliadas nesse estudo. A escala de cores representa o nível médio de herbivoria (porcentagem de área foliar removida por insetos) por espécie: verde claro 0 – 3%; verde escuro 3.01 – 6%; amarelo claro 6.01 – 9%; amarelo escuro 9.01 – 12%; laranja 12.01 – 15%; vermelho 15.01 – 18%; vinho 18.01 – 21% e azul acima de 21.01%.

O nível de herbivoria é maior nas Florestas Tropicas Úmidas quando comparado a vegetações abertas ($F_{1,169}=28.699$, $P<0.001$) (Fig. 3a). Da mesma forma, a frequência de herbivoria é menor nas vegetações abertas ($F_{1,169}=10.773$, $P<0.001$) (Fig. 3b).

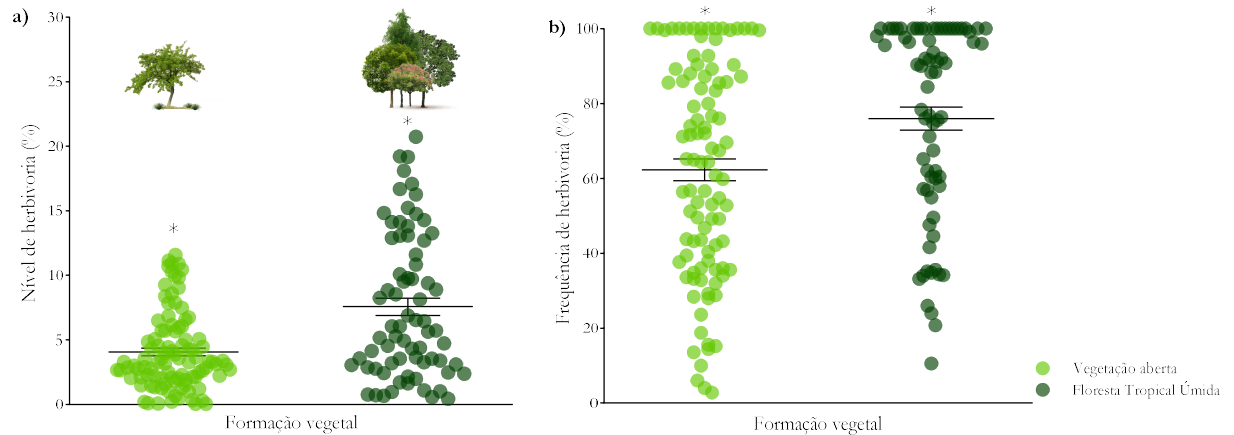


Figura 3. Porcentagem (média \pm SE) de herbivoria para 166 espécies de plantas vasculares, das regiões Tropical e Subtropical, para as diferentes formações vegetais ● vegetações abertas (n=98) e ● Floresta tropical úmida (n=72): **a)** o nível médio de área foliar removida por insetos herbívoros e **b)** a frequência em que as folhas são atacadas. Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.01$).

Nós não encontramos variação nas perdas foliares para insetos entre as formas de vida. Dessa forma, não houve variação no nível de herbivoria ($F_{2,162}=0.141$, $P>0.05$) (Fig. 4a) e a frequência de herbivoria seguiu o mesmo padrão ($F_{2,162}=1.812$, $P>0.05$) para lianas, arbustos e árvores (Fig. 4b).

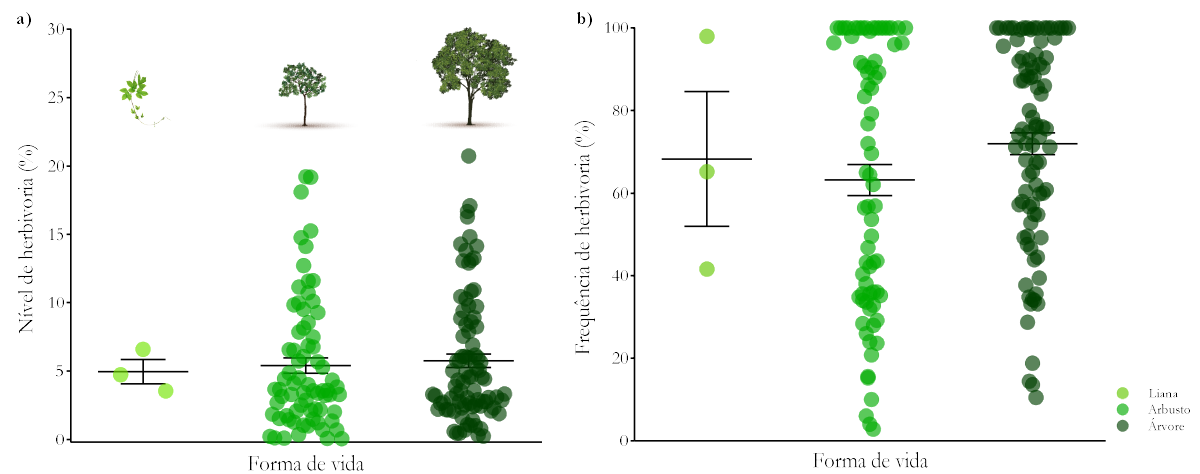


Figura 4. Porcentagem (média \pm SE) de herbivoria para 166 espécies de plantas vasculares, das regiões Tropical e Subtropical, para as diferentes formas de vida: ● liana (n= 3), ● arbusto (n = 73) e ● árvore (n = 89). **a)** o nível médio de área foliar removida por insetos herbívoro e **b)** a frequência em que as folhas são atacadas.

A herbivoria diferiu significativamente entre as fitofisionomias brasileiras (Figs. 5 e 6). Agrupando-se as fitofisionomias do Brasil em vegetações florestais e vegetações abertas, observa-se que o nível de herbivoria é maior nas Florestas Tropicais Úmidas (7.568 ± 0.656) quando comparado a vegetações abertas (4.066 ± 0.303) ($F_{6,129}=3.380$, $P<0.005$). Da mesma forma, a frequência de herbivoria é menor nas vegetações abertas (62.26 ± 2.900) do que em Florestas Tropicais Úmidas (75.95 ± 3.080) ($F_{6,129}=13.139$, $P<0.001$).

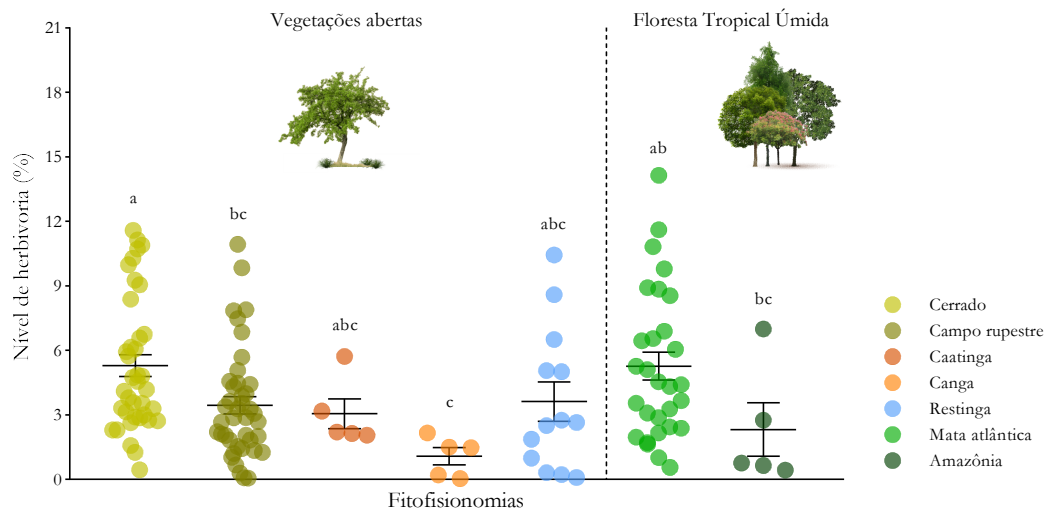


Figura 5. Porcentagem (média \pm SE) do nível de herbivoria para 127 espécies de plantas vasculares entre as fitofisionomias brasileiras: ● Cerrado (38), ● Campo rupestre (41), ● Caatinga (5), ● Canga (5), ● Restinga (13), ● Mata atlântica (29) e ● Amazônia (5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as fitofisionomias, de acordo com análise de contraste após GLM.

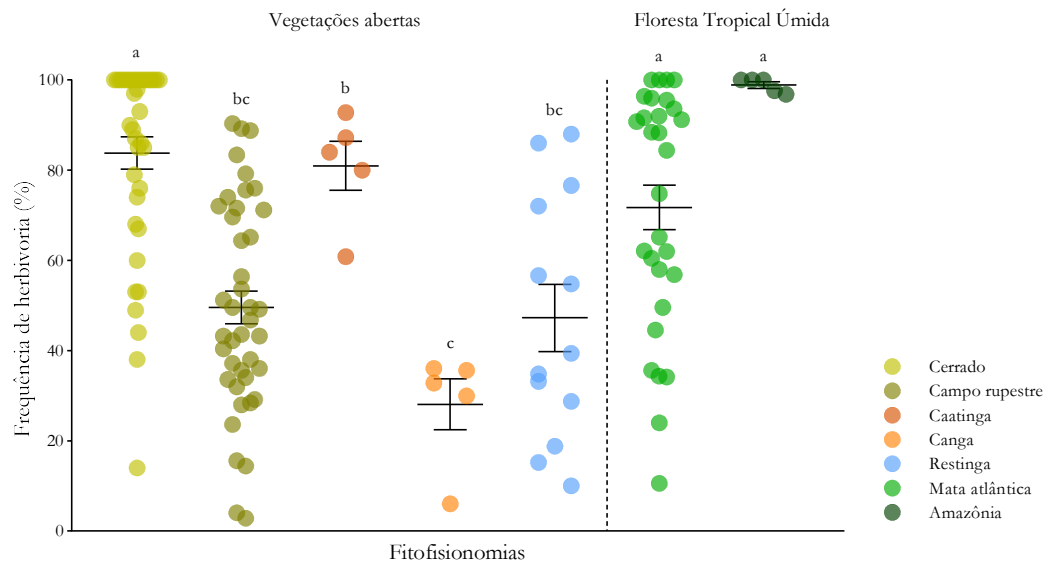


Figura 6. Porcentagem (média \pm SE) da frequência de herbivoria para 127 espécies de plantas vasculares entre as fitofisionomias brasileiras: ● Cerrado (38), ● Campo rupestre (41), ● Caatinga (5), ● Canga (5), ● Restinga (13), ● Mata atlântica (29) e ● Amazônia (5). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as fitofisionomias, de acordo com análise de contraste após GLM.

Para as 91 espécies de plantas avaliadas, observou-se uma relação positiva entre SLA e a herbivoria. Plantas com maior SLA apresentam maior porcentagem de perda de tecido foliar ($F_{1,89}=5.230$, $P<0.05$) (Fig.7a) e maior frequência de folhas atacadas ($F_{1,89}=6.968$, $P<0.01$) (Fig.7b).

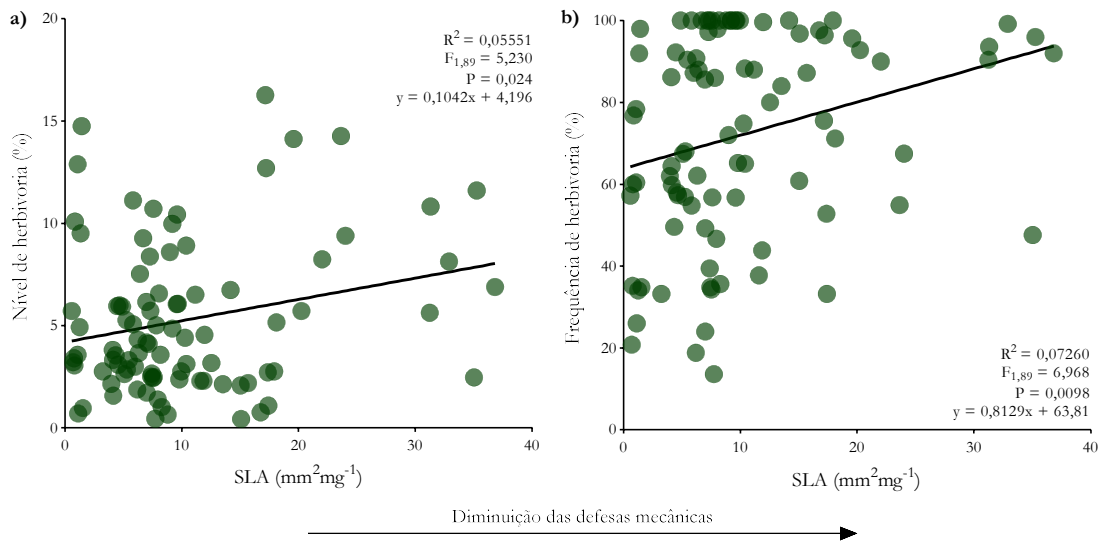


Figura 7. Relação entre a área foliar específica e herbivoria. Em **a)** nível de herbivoria e **b)** frequência de herbivoria para 91 espécies de plantas vasculares.

Adicionalmente, espécies pertencentes à fitofisionomia Floresta Tropical Úmida apresentam maiores valores de SLA quando comparadas a vegetações abertas ($F_{1,99}=2.231$, $P<0.05$) (Fig.8).

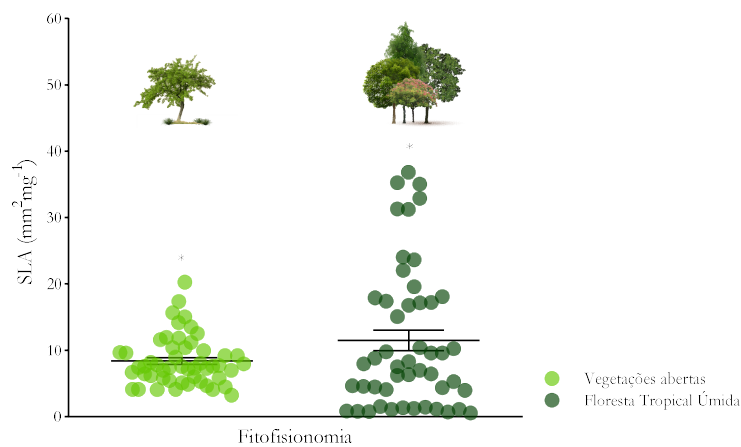


Figura 8. Área foliar específica (média \pm SD) nas fitofisionomias: ● vegetações abertas (n = 52) e ● Floresta tropical úmida (n = 49) para 91 espécies de plantas vasculares. Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.05$).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a herbivoria para uma ampla diversidade de espécies de plantas da região tropical é de 5.66% e 68.04% para nível e frequência de dano, respectivamente. Seguindo as previsões, descobrimos que a variação nos traços funcionais explica a variação nos níveis de herbivoria em espécies de plantas tropicais, sendo que maiores danos foram encontrados em plantas de ambientes florestais e com maior área foliar específica (SLA). No entanto, ao contrário das expectativas, não houve influência da forma de vida (liana, arbusto ou árvore) na herbivoria.

Padrões de Herbivoria

Este conjunto de dados gerou estimativas robustas dos níveis de herbivoria nos trópicos. Esta é uma amostragem várias vezes maior do que a publicada por Kozlov e colaboradores (2015a) e foi realizada por meio de critérios de seleção e abordagens semelhantes àqueles utilizados por esses autores. Assim, quando comparado com a mais recente e abrangente revisão de herbivoria por insetos (Kozlov *et al.*, 2015a), este trabalho aumentou a base de dados disponíveis para as plantas tropicais em mais de 400% (de 33 para 166 espécies) e a amostragem brasileira aumentou em 6.250% (de 2 para 127 espécies).

Ao contrário das expectativas, nós encontramos um valor médio do nível de herbivoria significativamente baixo se comparado a valores da literatura para plantas da região tropical, como calculado anteriormente por exemplo em Coley & Barone (1996) (11.1%) e Metcalfe *et al.* (2014) (7.9%). Entretanto, essas revisões anteriores carecem de tamanho amostral representativo e de padronização de medidas de herbivoria, utilizando, por exemplo, estimativas visuais de dano foliar de maneira categórica, o que pode levar a estimativas equivocadas da quantidade de tecido vegetal removido por insetos herbívoros. Nossas estimativas, por outro lado, estão na mesma faixa de valores das estimativas globais fornecidas por Turcotte e colaboradores (2014b) e Kozlov e colaboradores (2015b), de 5.3% e 4.1%, respectivamente. Nosso principal resultado indica que os níveis de herbivoria na região tropical para o conjunto de plantas avaliadas (166 espécies) não são mais altos do que em outras regiões como inicialmente sugerido na literatura e diversos fatores podem ser responsáveis por tal padrão. Dentre eles podemos citar o controle de insetos herbívoros por predadores e parasitas (fatores do tipo *top-down*, Jia *et al.* 2018), a generalização de dieta dos herbívoros de maneira

a ocasionar menor dano em plantas hospedeiras por "diluírem" o consumo de tecidos entre diversas espécies de plantas (Novotny *et al.* 2002, Lewinsohn & Roslin 2008), além das dificuldades de lidar com tecidos vegetais com inúmeras características de defesa químicas e físicas (Cobo-Quinche *et al.*, 2019). Esses fatores não foram avaliados em nosso estudo, mas demandam investigação detalhada da comunidade de insetos herbívoros associados a essas plantas hospedeiras e os padrões de consumo foliar entre e dentre espécies.

Gradientes latitudinais na herbivoria e na diversidade de insetos têm sido amplamente avaliados (e.g., Moles *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2016; Kozlov & Klemola, 2017) e sugere-se que espécies de clima tropical experimentam herbivoria mais intensa se comparadas a espécies de clima temperado. No entanto, enquanto alguns estudos relatam maiores taxas de herbivoria em latitudes mais baixas (Coley & Aide, 1991; Coley & Barone, 1996; Dyer & Coley, 2009; Schemske *et al.*, 2009) outros sugerem que não existe nenhuma relação entre as taxas de herbivoria e região latitudinal (Moles *et al.*, 2011a, 2011b; Salazar & Marquis, 2012; Galmán *et al.*, 2018) ou que existe uma relação mas o gradiente não é linear (Kozlov *et al.*, 2015a). Estudos recentes indicam que não há suporte para tal gradiente latitudinal da herbivoria e, em uma meta-análise avaliando 38 estudos de herbivoria ao longo do gradiente tropical-temperado (Moles *et al.*, 2011a) indicou ausência de suporte para maior consumo foliar em plantas da região tropical, assim como os resultados globais da comparação de herbivoria em dados coletados de forma padronizada em plantas tropicais e temperadas (Kozlov *et al.*, 2015ab, Kozlov & Klemola, 2017), que perdem similarmente em torno de 4.5% de tecido vegetal para herbívoros mastigadores.

Além do gradiente latitudinal na herbivoria, estudos de interações entre insetos e plantas têm indicado a necessidade de avaliar mudanças na herbivoria ao longo de gradientes ontogenéticos (Boege & Marquis 2005), temporais (Meineke *et al.*, 2019) e espaciais, especialmente ao longo de gradientes de modificação dos habitats devido à atividades antrópicas (Wagner *et al.*, 2021). Ao avaliar os impactos das mudanças ambientais nos padrões de herbivoria durante 60 anos de pesquisas, Kozlov e Zvereva (2015) relataram que, de 1964 a 1990, a herbivoria nos trópicos foi 39% maior do que na região temperada, no entanto essas diferenças desapareceram no início dos anos 2000, sugerindo que as mudanças ambientais já perturbaram um dos padrões ecológicos globais – a diminuição da herbivoria com a latitude – ao afetar os processos ecossistêmicos de forma diferente nas zonas de clima tropical e temperado.

Nossos dados contribuem para reforçar a ausência de gradiente latitudinal de herbivoria no sentido de indicar que, para um grande conjunto de plantas coletadas em diversas fitofisionomias, tanto o nível quanto a frequência de herbivoria estão dentro dos valores encontrados na literatura mais recente. Acreditamos que o próximo passo é avaliar a identidade de herbívoros e de seus inimigos naturais, assim como outros traços funcionais que influenciam na variação do consumo dentre e entre espécies. Tais valores de consumo foliar devem ser colocados em um contexto fitocêntrico, uma vez que a remoção de 4 a 5% de área foliar por insetos herbívoros pode ser suficiente para causar declínios na performance de plantas hospedeiras, em termos de desempenho, crescimento e reprodução (Schowalter, 2016).

Variação entre as fitofisionomias

Em uma escala regional, avaliando diferenças entre as fitofisionomias observamos maior perda de tecido foliar (nível e frequência de herbivoria) em florestas tropicais úmidas (Amazônia e Mata Atlântica) do que em vegetações abertas, como o campo rupestre o cerrado. Entretanto, nossos dados estão fortemente sub-representados em algumas fitofisionomias como a Amazônia (5 espécies de plantas), a canga (5 espécies de plantas) e a caatinga (4 espécies de plantas). Alguns estudos prévios realizados na região tropical, especialmente em fitofisionomias brasileiras como o Cerrado e a Mata Atlântica, relataram níveis de herbivoria relativamente baixos se comparados às estimativas publicadas. Vasconcelos (1999), por exemplo, relatou que a perda foliar média foi de apenas 3.1% e a frequência de herbivoria em torno de 70% ao explorar cerca de 80 espécies na Floresta Amazônica. De maneira similar, Zava e Cianciaruso (2014) relataram níveis de dano ainda menores, de apenas 1.35% ao avaliar plantas na vegetação de Cerrado. Nossos resultados ampliam esses conjuntos de dados e indicam que o nível e a frequência de herbivoria nas plantas da região tropical são semelhantes ao que já foi encontrado nas estimativas globais em que tal região estava subrepresentada (veja por exemplo Kozlov et al. 2015ab), mas existem diferenças entre as fitofisionomias que devem ser consideradas ao se avaliar tais valores de remoção. Nossos resultados mostram que vegetações florestais perdem, em média, 7.87% de área foliar para insetos, enquanto vegetações abertas perdem em média 4.09%. Além disso, existe ampla variação mesmo entre as vegetações abertas, tanto no nível quanto na frequência de herbivoria (veja figuras 5 e 6 neste capítulo).

De acordo com nossas previsões, tanto o nível quanto a frequência de herbivoria foram maiores em ambientes florestais quando comparado a vegetações abertas (Fig.3). Esta variação

entre diferentes fitofisionomias era esperada, uma vez que, as condições ambientais como a diversidade de espécies de plantas, a densidade relativa das espécies, as características funcionais das comunidades e a produção primária diferem entre os ambientes (Moles *et al.*, 2011a). Essas mudanças podem influenciar como as características funcionais das plantas modulam a disponibilidade e a qualidade do recurso para os insetos herbívoros, moldando assim as relações entre os traços foliares e herbivoria para diferentes fitofisionomias (Kozlov *et al.*, 2015b).

Nosso estudo avaliou de forma pioneira a variação da herbivoria entre as principais fitofisionomias brasileiras. As diferenças de herbivoria encontradas entre vegetações florestais arbóreas e vegetações abertas (mais arbustivas e herbáceas) indicam que os mecanismos de seleção de insetos herbívoros por plantas hospedeiras ou por recursos dentre as espécies e indivíduos devem ser investigados de maneira mais particular para melhor entendimento de tal variação. Nosso estudo foi desenvolvido em escala mais ampla com o objetivo de elucidar quanto de tecido foliar os insetos consomem, mas sugerimos que os próximos passos devem investigar as fontes e mecanismos de variação da herbivoria entre esses ambientes. Fatores como a qualidade das plantas, comunidades de insetos herbívoros associados, qualidade nutricional do solo e disponibilidade hídrica, dentre outros, são todos fatores que potencialmente podem ser responsáveis por tais diferenças e devem ser quantificados.

Variação entre as Formas de Vida das Plantas

A aparência de plantas é definida como a probabilidade de uma planta ser encontrada por insetos herbívoros (Feeny, 1976; Endara & Coley, 2011) e qualquer característica que possa tornar a planta aparente, ou mesmo previsível no tempo e no espaço, aumenta potencialmente sua vulnerabilidade à herbivoria (Ribeiro & Fernandes, 2000), sendo assim, são esperados maiores danos em árvores do que em arbustos e lianas. Tais previsões encontram suporte para diversas espécies de plantas lenhosas (veja Smilanich *et al.* 2016) como carvalhos (Castagneyrol *et al.*, 2013), *Ipomopsis* (Juenger *et al.*, 2005) e plântulas em florestas subtropicais (Martini *et al.*, 2021). Entretanto, testes empíricos do efeito da aparência de plantas nos níveis e/ou taxas de herbivoria têm sido realizados a nível populacional, normalmente comparando plantas focais aparentes com plantas vizinhas não aparentes.

Nosso estudo avalia a aparência de plantas em uma perspectiva mais ampla, comparando os níveis de herbivoria entre formas de vida mais aparentes, como as árvores. E ao contrário do que prediz a hipótese de aparência de plantas nós encontramos que a herbivoria não difere entre

as formas de vida para plantas na região tropical (Fig. 4), indicando que este traço funcional não influencia o nível de herbivoria e a frequência de folhas atacadas. A ausência de variação na herbivoria entre as formas de vida nos trópicos pode ser explicada pelas características específicas das comunidades de plantas e dos herbívoros nesta região, uma vez que o impacto da herbivoria no *fitness* das plantas pode variar de acordo com as condições do ambiente em que elas estão inseridas (Wise & Abrahamson, 2005).

Resultados muito similares foram reportados por Kozlov e colaboradores (2015b), que sugerem que os insetos herbívoros mastigadores tendem a não distinguir entre as diferentes formas de vida devido a elevada abundância de espécies de plantas encontradas em uma fração pequena de espaço nos trópicos e que neste caso, o componente mais importante da aparência seria a abundância e não o tamanho das plantas. Nosso protocolo de coleta sugere a seleção das espécies de plantas a serem amostradas em cada localidade baseada na abundância local (*commonness*) (veja Apêndice A) e tal fato pode enviesar as amostragens para árvores, especialmente em ambientes florestais e a ausência de diferença de herbivoria entre as formas de vida deve ser avaliada com cautela. Outro ponto importante inclui o fato de termos avaliado apenas insetos herbívoros mastigadores, e outros estudos indicam que guildas mais específicas, como os insetos minadores e os insetos formadores de galhas, tendem a apresentar variação na densidade e diversidade entre as formas de vida e plantas com diferentes arquiteturas (Espírito-Santo *et al.*, 2007; Spawton & Wetzel, 2015; Boaventura *et al.*, 2018). Por fim, para insetos herbívoros mastigadores, sugere-se que apenas uma pequena proporção nos trópicos é generalista, ou seja, o número de herbívoros que escolhem entre as várias espécies hospedeiras é reduzido, anulando assim, a importância do tamanho e aparência das plantas (Novotny *et al.*, 2002; Kozlov & Zvereva, 2015).

Área foliar específica (SLA)

Encontramos uma relação direta e positiva entre SLA e os níveis de herbivoria para um conjunto de 91 espécies de plantas amostradas em vegetações tropicais distintas. Observou-se que quanto maior o valor da SLA maiores são os níveis e a frequência de herbivoria, indicando que os insetos se alimentam de folhas mais macias (Fig.7).

A área foliar específica é uma razão que indica quanto de área uma folha constrói com uma dada quantidade de biomassa e, folhas mais grossas/espessas possuem menor área foliar específica, o que pode funcionar como defesa mecânica e então reduzir a herbivoria por insetos

(Wilson *et al.*, 1999; Cornelissen *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2004). Assim, a área foliar específica é frequentemente associada a variação no consumo por insetos herbívoros (Alliende, 1989). A SLA reflete propriedades mecânicas foliares que afetam diretamente a palatabilidade foliar para insetos e se correlaciona ainda com uma série de outras características foliares que determinam a qualidade do tecido para herbívoros (Wright *et al.*, 2004; de Ávila Silva *et al.*, 2021). Por exemplo, folhas que apresentam SLA baixo têm uma lâmina foliar mais espessa, tecido mais denso e apresentam um alto investimento em defesas contra herbívoros (Cornelissen *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2004). Por outro lado, folhas com SLA alto apresentam lâminas mais macias, palatáveis, com baixo investimento em defesas, e conseqüentemente mais atrativas para os insetos herbívoros, aumentando assim, a vulnerabilidade das folhas à herbivoria (Cornelissen *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2004). Nosso estudo indica que para plantas tropicais, tal traço funcional pode estar relacionado ao consumo de material vegetal (veja figura 7) influenciando assim a frequência de folhas atacadas e o nível de herbivoria. Tal parâmetro é facilmente amostrado em comparação às defesas químicas e biológicas (De Queiroz *et al.*, 2013), por exemplo, e sugerimos que seja avaliado em futuros estudos de herbivoria para permitir comparações com os dados aqui apresentados.

Adicionalmente, confirmando nossas previsões, as espécies pertencentes à fitofisionomia Floresta Tropical Úmida apresentaram maiores valores de SLA quando comparadas a vegetações abertas ($P < 0.05$) (veja Figura 8). Espécies que vivem em ambientes ricos em recursos tendem a ter SLA maior do que aquelas em ambientes onde os recursos são escassos (Cornelissen *et al.*, 2003), o que pode explicar maiores valores de SLA em ambientes florestais que em ambientes abertos, onde os recursos nutricionais e o stress higrótérmico tendem a ser maiores. Já as espécies de ambientes florestais, onde a luz é um recurso limitante, necessitam de maior área fotossintética para otimizar a captação de luz e, portanto, apresentam maiores valores de SLA (Evans & Poorter, 2001), o que influencia a herbivoria. Nossos resultados da herbivoria entre ambientes florestais e vegetações abertas e a relação positiva (ainda que tênue, veja figura 7) entre SLA e consumo de tecidos vegetais suportam que tal traço foliar pode ser um importante preditor da herbivoria entre espécies de plantas em diversos ambientes.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a examinar padrões em larga escala, com metodologia padronizada, nas relações entre traços funcionais e herbivoria na região tropical. Neste estudo, avaliamos a herbivoria usando métodos consistentes em uma variedade de fitofisionomias, abrangendo uma ampla faixa latitudinal, com o intuito de obter resultados que possam ser aplicados amplamente e fornecer uma estimativa mais robusta da herbivoria na região tropical de modo a permitir comparações com outros bancos de dados. Nós concluimos que a herbivoria na região tropical apresenta valores semelhantes aos dados publicados especialmente para plantas da região temperada, não dando suporte à hipótese de que a herbivoria seja geralmente mais intensa nos trópicos. Adicionalmente, os níveis de herbivoria foram influenciados pela SLA e pelo habitat, então a área foliar específica e a fitofisionomia podem ser usados como bons previsores das perdas de tecido foliar em diversas plantas.

REFERÊNCIAS

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with imageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–41.
- Alliende, M.C. (1989) Demographic Studies of a Dioecious Tree. II. The Distribution of Leaf Predation Within and Between Trees. *The Journal of Ecology*, **77**, 1048.
- Ávila Silva, L. de, Omena-Garcia, R.P., Condori-Apfata, J.A., Costa, P.M. de A., Silva, N.M., DaMatta, F.M., *et al.* (2021) Specific leaf area is modulated by nitrogen via changes in primary metabolism and parenchymal thickness in pepper. *Planta*, **253**, 16.
- Barthlott, W., Lauer, W. & Placke, A. (1996) Global Distribution of Species Diversity in Vascular Plants: Towards a World Map of Phytodiversity (Globale Verteilung der Artenvielfalt Höherer Pflanzen: Vorarbeiten zu einer Weltkarte der Phytodiversität). *Erdkunde*, **50**, 317–327.
- Becerra, J.X. (2015) Macroevolutionary and geographical intensification of chemical defense in plants driven by insect herbivore selection pressure. *Current Opinion in Insect Science*, **8**, 15–21.
- Bernays, E.A. & Chapman, R.F. (2007) *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. Chapman & Hall, New York.
- Boaventura, M.G., Pereira, C.C. & Cornelissen, T. (2018) Plant architecture influences gall abundance in a tropical montane plant species. *Acta Botanica Brasilica*, **32**, 670–674.
- Boege, K. & Marquis, R.J. (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 441–448.
- Cárdenas, R.E., Valencia, R., Kraft, N.J.B., Argoti, A. & Dangles, O. (2014) Plant traits predict inter- and intraspecific variation in susceptibility to herbivory in a hyperdiverse Neotropical rain forest tree community. *Journal of Ecology*, **102**, 939–952.
- Castagneyrol, B., Giffard, B., Péré, C. & Jactel, H. (2013) Plant apparency, an overlooked driver of associational resistance to insect herbivory. *Journal of Ecology*, **101**, 418–429.
- Christen Raunkiaer. (1934) *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography*. Universidade de Michigan.
- Clapham, A.R., Raunkiaer, C., Gilbert-Carter, H., Tansley, A.G. & Fausboll. (1935) The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography. *The Journal of Ecology*, **23**, 247.
- Cobo-Quinche, J., Endara, M.J., Valencia, R., Muñoz-Upegui, D. & Cárdenas, R.E. (2019) Physical, but not chemical, antiherbivore defense expression is related to the clustered spatial distribution of tropical trees in an Amazonian forest. *Ecology and Evolution*, **9**, 1750–1763.
- Coley, P.D. & Aide, T.M. (1991) Comparison of herbivory and plant defences in temperate and tropical broad-leaved forests. *Plant–animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions*, 25–49.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and Plant Defenses in Tropical Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 305–335.

- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., *et al.* (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, **51**, 335–380.
- Crutsinger, G.M., Habenicht, M.N., Classen, A.T., Schweitzer, J.A. & Sanders, N.J. (2008) Galling by *Rhopalomyia solidaginis* alters *Solidago altissima* architecture and litter nutrient dynamics in an old-field ecosystem. *Plant and Soil*, **303**, 95–103.
- Dyer, L.A. & Coley, P.D. (2009) Tritrophic interactions in tropical versus temperate communities. *Multitrophic Level Interactions*, 67–88.
- Endara, M.J. & Coley, P.D. (2011) The resource availability hypothesis revisited: A meta-analysis. *Functional Ecology*, **25**, 389–398.
- Espírito-Santo, M.M., S. Neves, F. De, Andrade-Neto, F.R. & Fernandes, G.W. (2007) Plant architecture and meristem dynamics as the mechanisms determining the diversity of gall-inducing insects. *Oecologia*, **153**, 353–364.
- Evans, J.R. & Poorter, H. (2001) Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: The relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment*, **24**, 755–767.
- Feeny, P. (1976) Plant Apparency and Chemical Defense. In *Biochemical Interaction Between Plants and Insects*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–40.
- Fraenkel, G.S. (1959) The Raison d’Etre of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science*, **129**, 1466–1470.
- Futuyma, D.J. & Agrawal, A.A. (2009) Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18054–18061.
- Galmán, A., Abdala-Roberts, L., Zhang, S., Berny-Mier y Teran, J.C., Rasmann, S. & Moreira, X. (2018) A global analysis of elevational gradients in leaf herbivory and its underlying drivers: Effects of plant growth form, leaf habit and climatic correlates. *Journal of Ecology*, **106**, 413–421.
- Global Biodiversity Information Facility - GBIF [WWW Document]. (2020) *Global Biodiversity Information Facility*. URL <https://www.gbif.org/> [accessed on 2020].
- GraphPad Prism [WWW Document]. (2022) *GraphPad Prism*. URL <http://www.graphpad.com/faq/viewfaq.cfm?faq=1362> [accessed on 2022].
- Jia, S., Wang, X., Yuan, Z., Lin, F., Ye, J., Hao, Z., *et al.* (2018) Global signal of top-down control of terrestrial plant communities by herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, 6237–6242.
- Juenger, T., Morton, T.C., Miller, R.E. & Bergelson, J. (2005) Scarlet gilia resistance to insect herbivory: The effects of early season browsing, plant apparency, and phytochemistry on patterns of seed fly attack. *Evolutionary Ecology*, **19**, 79–101.
- Kozlov, M. V. & Klemola, T. (2017) Hemispheric asymmetries in herbivory: do they exist? *Journal of Ecology*, **105**, 1571–1574.

- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015a) Global patterns in background losses of woody plant foliage to insects. *Global Ecology and Biogeography*, **24**, 1126–1135.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015b) Background losses of woody plant foliage to insects show variable relationships with plant functional traits across the globe. *Journal of Ecology*, **103**, 1519–1528.
- Kozlov, M. V. & Zvereva, E.L. (2015) Changes in the background losses of woody plant foliage to insects during the past 60 years: Are the predictions fulfilled? *Biology Letters*, **11**.
- Kozlov, M. V. & Zvereva, E.L. (2017) Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology. In *Progress in Botany*. pp. 313–355.
- Lavorel, S., McIntyre, S., Landsberg, J. & Forbes, T.D.A. (1997) Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**, 474–478.
- Lewinsohn, T.M. & Roslin, T. (2008) Four ways towards tropical herbivore megadiversity. *Ecology Letters*, **11**, 398–416.
- Lorenzi, H. (1992) *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Editora Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Machado, B.B., Orue, J.P.M., Arruda, M.S., Santos, C. V., Sarath, D.S., Goncalves, W.N., *et al.* (2016) BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. *Computers and Electronics in Agriculture*, **129**, 44–55.
- Martini, F., Aluthwattha, S.T., Mammides, C., Armani, M. & Goodale, U.M. (2021) Plant apparency drives leaf herbivory in seedling communities across four subtropical forests. *Oecologia*, **195**, 575–587.
- Martins, E.P. & Hansen, T.F. (1997) Phylogenies and the Comparative Method: A General Approach to Incorporating Phylogenetic Information into the Analysis of Interspecific Data. *The American Naturalist*, **149**, 646–667.
- Meineke, E.K., Classen, A.T., Sanders, N.J. & Jonathan Davies, T. (2019) Herbarium specimens reveal increasing herbivory over the past century. *Journal of Ecology*, **107**, 105–117.
- Mendes, G.M., Silveira, F.A.O., Oliveira, C., Dáttilo, W., Guevara, R., Ruiz-Guerra, B., *et al.* (2021) How much leaf area do insects eat? A data set of insect herbivory sampled globally with a standardized protocol. *Ecology*, **102**, 3301.
- Metcalf, D.B., Asner, G.P., Martin, R.E., Silva Espejo, J.E., Huasco, W.H., Farfán Amézquita, F.F., *et al.* (2014) Herbivory makes major contributions to ecosystem carbon and nutrient cycling in tropical forests. *Ecology Letters*, **17**, 324–332.
- Moles, A.T., Bonser, S.P., Poore, A.G.B., Wallis, I.R. & Foley, W.J. (2011a) Assessing the evidence for latitudinal gradients in plant defence and herbivory. *Functional Ecology*, **25**, 380–388.
- Moles, A.T., Wallis, I.R., Foley, W.J., Warton, D.I., Stegen, J.C., Bisigato, A.J., *et al.* (2011b) Putting plant resistance traits on the map: A test of the idea that plants are better defended at lower latitudes. *New Phytologist*, **191**, 777–788.

- Myers, J.H. & Sarfraz, R.M. (2017) Impacts of Insect Herbivores on Plant Populations. *Annual Review of Entomology*, **62**, 207–230.
- Novotny, V., Basset, Y., Miller, S.E., Weiblen, G.D., Bremer, B., Cizek, L., *et al.* (2002) Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature*, **416**, 841–844.
- Novotny, V., Drozd, P., Miller, S.E., Kulfan, M., Janda, M., Basset, Y., *et al.* (2006) Why Are There So Many Species of Herbivorous Insects in Tropical Rainforests? *Science*, **313**, 1115–1118.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S.S. & Sarkar, D. (2013) Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. *R package version 3.1-110*. 3. 1–113.
- Poorter, L., Plassche, M., Willems, S. & Boot, R.G.A. (2004) Leaf Traits and Herbivory Rates of Tropical Tree Species Differing in Successional Status. *Plant Biology*, **6**, 746–754.
- Price, P.W. (2002) Resource-driven terrestrial interaction webs. *Ecological Research*, **17**, 241–247.
- Qian, H. & Jin, Y. (2016) An updated megaphylogeny of plants, a tool for generating plant phylogenies and an analysis of phylogenetic community structure. *Journal of Plant Ecology*, **9**, 233–239.
- Queiroz, A.C.M. De, Costa, F.V. Da, Siqueira Neves, F. De & Fagundes, M. (2013) Does leaf ontogeny lead to changes in defensive strategies against insect herbivores? *Arthropod-Plant Interactions*, **7**, 99–107.
- R Core Team. (2020) R: A language and environment for statistical computing.
- Rafael, J.A., Aguiar, A.P. & Amorim, D. de S. (2009) Knowledge of insect diversity in Brazil: challenges and advances. *Neotropical Entomology*, **38**, 565–570.
- Revell, L.J. (2012) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 217–223.
- Ribeiro, S.P. & Fernandes, G.W. (2000) Interações entre insetos e plantas no Cerrado: teoria e hipóteses de trabalho. *Oecologia Brasiliensis*.
- Rossetti, M.R., Tschardtke, T., Aguilar, R. & Batáry, P. (2017) Responses of insect herbivores and herbivory to habitat fragmentation: a hierarchical meta-analysis. *Ecology Letters*, **20**, 264–272.
- Salazar, D. & Marquis, R.J. (2012) Herbivore pressure increases toward the equator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 12616–12620.
- Schemske, D.W., Mittelbach, G.G., Cornell, H. V., Sobel, J.M. & Roy, K. (2009) Is there a latitudinal gradient in the importance of biotic interactions? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 245–269.
- Schowalter, T.D. (2016) Herbivory. In *Insect Ecology*. Elsevier, pp. 405–443.
- Smilanich, A.M., Fincher, R.M. & Dyer, L.A. (2016) Does plant apparency matter? Thirty years of data provide limited support but reveal clear patterns of the effects of plant chemistry on herbivores. *New Phytologist*, **210**, 1044–1057.
- Spawton, K.A. & Wetzel, W.C. (2015) Gall-insect community on big sagebrush varies with plant size

- but not plant age. *Environmental Entomology*, **44**, 1095–1100.
- Symonds, M.R.E. & Blomberg, S.P. (2014) A Primer on Phylogenetic Generalised Least Squares. In *Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology* (ed. by Garamszegi, L.Z.). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 105–130.
- Turcotte, M.M., Davies, T.J., Thomsen, C.J.M. & Johnson, M.T.J. (2014a) Macroecological and macroevolutionary patterns of leaf herbivory across vascular plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20140555.
- Turcotte, M.M., Thomsen, C.J.M., Broadhead, G.T., Fine, P.V.A., Godfrey, R.M., Lamarre, G.P.A., *et al.* (2014b) Percentage leaf herbivory across vascular plant species. *Ecology*, **95**, 788–788.
- Vasconcelos, H.L. (1999) Levels of Leaf Herbivory in Amazonian Trees From. *IActa Amazonica*, **29**, 615–623.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., *et al.* (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos*, **116**, 882–892.
- Wagner, D.L., Grames, E.M., Forister, M.L., Berenbaum, M.R. & Stopak, D. (2021) Insect decline in the Anthropocene: Death by a thousand cuts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118**.
- Wilson, P.J., Thompson, K. & Hodgson, J.G. (1999) Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist*, **143**, 155–162.
- Wise, M.J. & Abrahamson, W.G. (2005) Beyond the compensatory continuum: environmental resource levels and plant tolerance of herbivory. *Oikos*, **109**, 417–428.
- Wright, I.J., Westoby, M., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., *et al.* (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821–827.
- Zappi, D.C., Ranzato Filardi, F.L., Leitman, P., Souza, V.C., Walter, B.M.T., Pirani, J.R., *et al.* (2015) Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguesia*, **66**, 1085–1113.
- Zava, P.C. & Cianciaruso, M. V. (2014) Can we use plant traits and soil characteristics to predict leaf damage in savanna woody species ?, 625–637.
- Zhang, S., Zhang, Y. & Ma, K. (2016) Latitudinal variation in herbivory: hemispheric asymmetries and the role of climatic drivers. *Journal of Ecology*, **104**, 1089–1095.

CAPÍTULO III: QUANTIFICANDO A HERBIVORIA. Qual método utilizar para quantificar adequadamente a herbivoria por insetos?

RESUMO

A herbivoria foliar, é uma interação amplamente difundida ao redor do globo e apesar de alguns esforços na tentativa de quantificar a quantidade de remoção de biomassa vegetal por herbívoros, a compilação dos dados é difícil pois não há padronização dos métodos para quantificar a herbivoria. A estimativa visual de dano é o método mais comumente utilizado. Apesar de rápida e simples, apresenta limitações, pois a repetibilidade e a exatidão das medidas são questionáveis e raramente são validadas. Outro método comumente empregado para estimar danos foliares por insetos herbívoros envolve a tomada de imagens digitais e posterior quantificação dos níveis de herbivoria com auxílio de softwares de análises de imagens. Para compreendermos a importância da herbivoria nos processos dos ecossistemas é necessário conhecer os níveis reais de área foliar removida pelos insetos herbívoros, e para isso é preciso que os estudos gerem estimativas confiáveis e passíveis de comparação. Assim, nós avaliamos a influência 1) dos métodos de determinação da herbivoria (Estimativa visual, Image J e R Core Team), 2) de traços foliares e 3) da qualidade das imagens nas estimativas geradas e sugerimos algumas recomendações metodológicas que permitam a repetibilidade e comparação dos níveis de herbivoria. Para isso, avaliamos a precisão da estimativa visual simples através de experimento onde os níveis de herbivoria de folhas com área foliar previamente conhecida foram avaliadas por diferentes pesquisadores e, então verificamos a existência de diferença entre estimativas. Verificamos ainda a influência de três métodos na quantificação dos níveis de herbivoria, e por fim, avaliamos a influência dos dados da imagem de folhas e traços foliares no cálculo dos níveis de herbivoria. Este estudo demonstrou a importância dos métodos de estimativas da herbivoria para o conhecimento dos níveis reais de área foliar perdida para insetos herbívoros. A estimativa visual superestimou em quase 50% os níveis de herbivoria, e a diferença foi ainda maior entre pesquisadores sem experiência em medidas de herbivoria e em folhas com altos níveis de dano por herbívoros. Assim, apesar de ser rápida e simples, a estimativa visual deve ser evitada. Por outro lado, nossos resultados indicaram que, ambos os softwares, R e ImageJ, medem de forma consistente os níveis de herbivoria. Os dados da qualidade das imagens, por outro lado, não influenciaram na variação nos níveis de herbivoria. Entretanto, a quantidade de folhas por imagem, o nível de herbivoria e o tamanho das folhas tiveram influência no tempo gasto para realizar as medidas. Dessa forma, os dados apresentados aqui evidenciam os vieses metodológicos na quantificação da herbivoria que podem ser minimizados com o uso de protocolos padronizados.

Palavras-chave: área foliar, quantificação de herbivoria, interação inseto-planta, nível de herbivoria, métodos para quantificar herbivoria.

1. INTRODUÇÃO

A quantidade de tecido foliar consumido por insetos herbívoros em ambientes naturais, tratada aqui como herbivoria foliar, é uma interação amplamente difundida ao redor do globo e estima-se que durante a vida de uma planta, dificilmente esta não sofrerá ataque de insetos herbívoros (Kozlov & Zvereva, 2017). Considerando-se que os insetos são os principais consumidores da produção primária terrestre, a herbivoria foliar é uma das principais vias de condução de energia entre os níveis tróficos basais até os níveis superiores (Price, 2002; Turcotte *et al.*, 2014a). E mesmo em níveis baixos de remoção foliar, em torno de 1% de consumo de biomassa, a herbivoria é um importante fator de impacto com potencial de reduzir o desempenho de plantas em termos de crescimento, reprodução e habilidades competitivas (veja Marquis 1984, Price 2002 e dados para plantas temperadas em Kozlov & Zvereva 2017).

Apesar de alguns esforços na tentativa de determinar o impacto de insetos herbívoros na remoção de biomassa vegetal, a compilação dos dados torna-se difícil pois não há protocolos padronizados para quantificar a herbivoria. Portanto, a comparação entre os dados publicados disponíveis nem é possível - seja devido à não aleatoriedade da seleção dos objetos de estudo, devido à escolha seletiva dos dados, ou até mesmo devido à forma imprecisa de quantificação da quantidade de tecido foliar perdido (Kozlov *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2016).

A estimativa visual da herbivoria, onde o nível de herbivoria é estimado a olho nu e reportado em valores exatos, ou colocado em categorias de danos, ou remoção de tecido, foi proposta na década de 90 em algumas publicações independentes (veja Lincoln & Mooney, 1984; Alliende, 1989; Dirzo & Domínguez, 1995). Neste método, uma amostra de folhas é coletada e calcula-se um "índice de dano" categórico (LDI=Leaf Damage Index) onde as folhas são categorizadas em porcentagem ou proporção de dano (<1%, 1 a 5% de dano e assim sucessivamente, em intervalos que ficam mais amplos à medida que o dano aumenta; Alliende, 1989) ou são feitas estimativas populacionais do nível de dano, onde zero representa folhas intactas e 4 representa folhas muito danificadas (Dirzo & Domínguez, 1995). Esses métodos continuam sendo comumente utilizados para estimar danos por insetos herbívoros devido à rapidez e facilidade de tomadas das medidas (Stotz *et al.*, 2001). É um método simples uma vez que pode ser realizado em qualquer lugar e não necessita de equipamentos - e rápido - já que requer um investimento mínimo de tempo, mesmo por pessoas que não têm experiência na tomada de medidas de herbivoria (Johnson *et al.*, 2016).

Nas estimativas visuais simples o dano é estimado como a porcentagem exata de área foliar removida. Enquanto na estimativa visual e posterior classificação em classes de danos,

as folhas são categorizadas em classes e os observadores estimam a porcentagem de área foliar removida de acordo com categorias. Entretanto, nem mesmo os intervalos entre as categorias de danos são padronizados e observa-se grandes variações na literatura sobre como dividir tais categorias. Em alguns estudos observa-se categorias muito amplas, como em Allende (1989) e Dirzo e Domínguez (1995) e em outros mais recentes observa-se categorias mais refinadas em classes baixas de dano, como em Kozlov & Zvereva, (2017), onde sugere-se o uso de **0** - folha intacta; **1** - 0,01 a 1%; **2** - entre 1 e 5%; **3** - entre 5 e 25%; **4** - entre 25 e 50%; **5** - entre 50 e 75%; **6** - entre 75 e 100% da área foliar perdida. Após a categorização, normalmente calcula-se o índice de herbivoria, que é definido como a soma das frequência de folhas em cada categoria, multiplicada pelo respectivo valor médio da categoria, em função do número total de folhas coletadas (Kozlov *et al.*, 2014; Kozlov & Zvereva, 2017).

Apesar de simples e rápidas, as estimativas visuais apresentam limitações, dado que a repetibilidade e a exatidão das medidas são questionáveis e raramente são validadas (Johnson *et al.*, 2016). No caso da categorização em classes de danos, especialmente, existe uma enorme amplitude dentro das categorias. Por exemplo, uma folha com 6% de área foliar removida é categorizada na mesma classe de uma folha com 25% de área foliar removida (Kozlov *et al.*, 2014). Considerando que mesmo níveis baixos de herbivoria, em torno de 1 a 3% de remoção de tecido foliar, podem ser suficientes para reduzir o desempenho das plantas (Marquis, 1984; Kozlov & Zvereva, 2017), a amplitude dessas categorias pode levar a estimativas enviesadas do verdadeiro nível de herbivoria, e conseqüentemente a conclusões equivocadas sobre o impacto desta remoção foliar no *fitness* das plantas.

Um dos métodos mais comumente empregado para estimar danos de herbívoros envolve digitalizar as folhas usando um scanner de mesa ou fotografá-las e, posteriormente quantificar os níveis de danos nos tecidos através de softwares de processamento e análises de imagens. O ImageJ (Rasband, 2022), por exemplo, foi um dos softwares pioneiramente usados na análise de imagens de várias naturezas, incluindo imagens de folhas. É um software de domínio público, executado em qualquer sistema operacional e de fácil uso (Abràmoff *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2012). Mais recentemente, foram desenvolvidos pacotes que permitiram o uso de imagens e cálculo de herbivoria também no R Core Team (R Core Team 2022). Tal procedimento tem a vantagem das medidas de área foliar removida serem mais mecanizadas e permite realizar medidas de um conjunto maior de folhas em uma única imagem, reduzindo assim, potencialmente, o tempo de execução das medidas. No entanto, diferentemente das estimativas visuais, em ambos os métodos digitais, é preciso secar, prensar, e digitalizar as

folhas, além de processar a imagem obtida antes de realizar as medições. Tais métodos consomem tempo, mas têm o potencial de gerar estimativas precisas e robustas de dano foliar, que podem assim ser comparadas entre diferentes indivíduos, espécies de plantas e diferentes populações.

Além dos métodos digitais citados anteriormente, alguns aplicativos para celulares têm sido propostos, como por exemplo o BioLeaf (Machado et al., 2016) e o LeafBite (Getman-Pickering *et al.*, 2020). O Bioleaf quantifica automaticamente o nível de herbivoria com base na área foliar usando técnicas de processamento de imagem (Machado et al., 2016). É um aplicativo portátil, não destrutivo - o que permite medições repetidas de uma mesma folha - e ao contrário do ImageJ e R, não requer a digitalização prévia das imagens. O LeafByte mede de forma rápida a área foliar, a área foliar removida por insetos mastigadores e a porcentagem de herbivoria. Além disso, ele salva automaticamente os resultados em uma planilha (com data, hora e coordenadas GPS), no telefone ou no Google Drive, reduzindo assim o tempo e os erros de transcrição (Getman-Pickering *et al.*, 2020).

Para compreendermos a importância da herbivoria para as plantas e também em processos dos ecossistemas como a produtividade e as taxas de decomposição é necessário gerar estimativas robustas e confiáveis dos danos causados por herbívoros. Assim, nós propusemos 1) avaliar a precisão dos métodos mais comumente empregados para medição da herbivoria e 2) fazer algumas recomendações metodológicas, permitindo assim a repetibilidade e comparação por outros pesquisadores.

Para isso, inicialmente, avaliamos a precisão das estimativas visuais de herbivoria através de um experimento a fim de testarmos as seguintes hipóteses: (1) Existe diferença entre os níveis de herbivoria estimados visualmente e os níveis de herbivoria previamente medidos com o uso de imagens digitais, e espera-se que a estimativa visual simples superestime os níveis de herbivoria; (2) Esta diferença entre as medidas reais e as estimadas é maior entre pesquisadores i) sem experiência em medidas de herbivoria, ii) em folhas com altos níveis de herbivoria e iii) em folhas grandes.

Partindo do pressuposto de que a estimativa visual, e posterior categorização em classes de danos, é mais propensa a vieses, e esses vieses levam à superestimação dos dados, nós avaliamos a variação entre os níveis de herbivoria e o tempo gasto para estimá-los utilizando e comparando três métodos: estimativa visual e categorização de classes de dano; medidas no ImageJ e medidas no R. Para isso, testamos as seguintes hipóteses: (3) o nível de herbivoria estimado visualmente e classificado em categorias de danos é maior que os níveis estimados

por análises de imagens, assim, espera-se que a estimativa visual superestime os níveis de herbivoria; (4) Existe uma grande diferença no tempo gasto nas medições, e este é muito menor para estimativas visuais e maior para o R seguido pelo ImageJ.

Para avaliarmos a influência dos dados da imagem das folhas e dos traços foliares no cálculo nível de herbivoria testamos as seguintes hipóteses: (5) A face foliar digitalizada, a cor e o tipo da imagem influenciam nas medidas de herbivoria e no tempo gasto para realizá-las; (6) O nível de herbivoria, o tamanho da folha e a cor da folha influenciam no tempo gasto para realizar as medidas de herbivoria.

2. MÉTODOS

Os dados utilizados extraídos de Mendes, *et al.* 2020. A partir do banco de dados de mais de 50.000 folhas, algumas espécies foram utilizadas para avaliarmos a herbivoria de acordo com a disponibilidade de pesquisadores da TropHerb (rede de herbivoria tropical) para fazer as medições nos diversos métodos aqui propostos. Conjuntos de folhas diferentes e espécies de plantas diferentes foram utilizados para cada uma das perguntas colocadas a seguir. As amostras foram coletadas em áreas naturais em quatro países da região tropical - Brasil, Índia, México e África do Sul, entre março de 2017 e fevereiro de 2020. Em cada local, cinco das espécies vegetais mais abundantes foram selecionadas e identificadas. Cinco indivíduos (réplicas) de cada espécie foram selecionados para amostragem e, de cada indivíduo, foi escolhido um ramo a uma distância de pelo menos 2,0 metros. De cada ramo, 50 folhas foram amostradas (5 espécies x 5 repetições x 1 ramo por repetição: 50 folhas/ramo).

2.1 Estimativas visuais simples - experimento

Um questionário foi desenvolvido e distribuído entre 18 pesquisadores para que estes estimassem visualmente a porcentagem de área foliar removida em algumas imagens de diferentes espécies de plantas (Apêndice B). Foram selecionadas um total de 30 folhas, de 25 espécies de plantas, de maneira que representassem uma ampla variedade de aspectos morfológicos das folhas, como forma, tamanho, cor e tipo de margem - e também amplos níveis de dano foliar, que variou de 0 (folhas intactas) a 80% (folhas altamente danificadas). Os pesquisadores foram classificados em duas categorias, de acordo com a experiência em medidas de herbivoria: pesquisadores com experiência (n = 9) possuíam dados publicados em que

medidas de herbivoria foram tomadas usando-se qualquer método e pesquisadores sem experiência (n = 9) não possuíam publicações em que medidas de herbivoria foram usadas. Para avaliarmos a precisão da estimativa visual, propusemos o uso de um índice chamado *delta herbivoria* - que é a diferença entre a medida conhecida e anteriormente calculada através da análise de imagem digital *versus* a medida estimada visualmente.

2.2 Comparações entre os diferentes métodos

Para avaliarmos a variação entre as medidas de níveis de herbivoria entre os três métodos (classificação em categorias de dano, processamento de imagens e posterior cálculo com auxílio de softwares: ImageJ e R) de um total de 250 folhas por espécie, 30 folhas foram selecionadas aleatoriamente, através de sorteio, para a comparação entre os métodos. Quando a folha sorteada estava intacta, realizamos novamente o sorteio até que se completaram as 30 folhas com algum sinal de herbivoria (qualquer nível de dano) por espécie de planta. Além disso, registramos o tempo (em minutos) necessário para classificar e/ou medir cada amostra de 30 folhas. Para esse conjunto de dados usamos 64 espécies de plantas pertencentes a 31 famílias.

2.2.1 Classificação em categorias de dano

Cada folha amostrada (n=30 por espécie de planta) foi classificada seguindo a metodologia amplamente utilizada e proposta por Alliende (1989) e também Dirzo e Domínguez (1995). Tal método estima visualmente o dano foliar e estima-se a porcentagem da área foliar que foi consumida por herbívoros, nas seguintes classes de danos: 0 - folha intacta; 1 - 0,01 a 1%; 2 - entre 1 e 5%; 3 - entre 5 e 25%; 4 - entre 25 e 50%; 5 - entre 50 e 75%; 6 - entre 75 e 100% da área foliar perdida. Em seguida, calculamos o índice de herbivoria da seguinte forma: primeiro, o número de folhas em cada classe de dano foi multiplicado pelo respectivo valor médio da área foliar danificada ou seja: 0 para folhas intactas; 0.5 - 0.01 a 1%; 3 - entre 1 e 5%; 15 - entre 5 e 25%; 37.5 - entre 25 e 50%; 62.5 - entre 50 e 75%; e 87.5 - entre 75 e 100%. O índice de herbivoria (IH) foi então obtido através da seguinte equação: $IH = \frac{\sum(n_i).i}{N}$ onde, n_i = número de folhas na categoria i de dano; i = valor médio da área foliar danificada (0 a 87.5%); e N = número total de folhas amostradas (Alliende, 1989; Cornelissen *et al.*, 2003; Kozlov *et al.*, 2014).

2.2.2 Image J

A partir das imagens das folhas selecionadas ($n = 30$ para cada espécie de planta) nós calculamos 1) a área foliar total e 2) a área foliar perdida por herbivoria com o auxílio do software ImageJ (Rasband, 2022). Após a seleção, cada imagem foi inicialmente processada antes de obtermos as medidas. Este processamento incluiu: a calibragem para mm (*analyze>set scale*), a alteração da cor da imagem para preto e branco (*image>type>8-bit*), a delimitação da área foliar (*image>adjust>threshold*), o preenchimento do contorno da folha quando necessário, ou seja, quando a área foliar removida estava localizada na margem da folha e não no interior (ferramenta "*paintbrush tool*"= tamanho 2) e a verificação de sombras ou manchas que poderiam ser confundidas com área foliar e/ou área foliar removida. Para calcular a área foliar total, selecionou-se a área de interesse com a ferramenta de rastreamento (*>wand (tracing) tool*) e aperta-se a tecla "m" de forma que uma nova janela se abrirá com os resultados da medida.

Para o cálculo da área foliar removida (i.e., herbivoria) o processo é similar, porém é preciso dar o primeiro clique com a "*wand tool*" na área a ser medida, e caso existam mais partes danificadas apertar a tecla "shift", segurar e ir clicando em todas as partes faltantes, e então, aperta-se o "m" para gerar as medidas. Desse modo, o ImageJ terá medido e somado toda a área foliar removida, porém este é um processo delicado, uma vez que qualquer descuido - seja soltando a tecla *shift* antes de terminar de selecionar todas as áreas seja dando um duplo clique - obrigará o pesquisador a retomar as medidas do início. E por fim, após obter todas as medidas, o nível de herbivoria foi determinado pela razão entre a perda de área foliar pela área foliar total, multiplicada por 100 para converter em porcentagem.

2.2.3 Software R Core Team

As imagens foram inicialmente editadas no software GIMP, e para isso um protocolo para processamento das imagens foi desenvolvido e distribuído entre 8 pesquisadores (Apêndice C). Assim como para o ImageJ, o processamento envolveu: a calibragem para mm, a alteração da cor da imagem para preto e branco (opcional), a delimitação da área foliar (*threshold*), o preenchimento do contorno da folha quando necessário (*pincel*= tamanho 2) e a verificação de sombras ou manchas que poderiam ser confundidas com área foliar e/ou área foliar removida. Após o processamento, as imagens foram analisadas no software R Core Team, através do

pacote “*EImage*” e utilizando-se o *script* desenvolvido por Leandro Maracahipes (veja Queiroz *et al.*, 2022). Cada imagem foi analisada usando-se a estimativa visual, o ImageJ e o R Core Team por pelo menos dois pesquisadores diferentes entre os três métodos, ou seja, um mesmo pesquisador pode ter estimado a herbivoria para no máximo dois métodos por espécie. Contabilizamos ainda, o tempo (em minutos) necessário para analisar cada folha e registrar os dados. Para o ImageJ[®] e R[®], incluímos também o tempo necessário para digitalizar as folhas e processar as imagens.

2.3 Comparações entre dados de imagens e traços foliares

Para avaliarmos a influência dos dados da imagem e dos traços foliares no cálculo do nível de herbivoria e no tempo gasto para realizar as medidas, vinte 20 folhas por espécie foram selecionadas de maneira que representassem uma variedade dos dados de imagens - como por exemplo: cor da imagem (colorida *versus* em preto e branco), tipo de imagem (fotografia digital por câmera *versus* imagem digitalizada com auxílio de *scanner* de mesa) e número de folhas por imagem (individual *versus* todo o conjunto) - e traços foliares, como: tamanho da folha, (pequena = até 6 cm² *versus* grande = maior que 60 cm²), cor da face foliar (face clara *versus* face escura), face foliar (abaxial ou adaxial), e níveis de herbivoria (baixo = menor que 5% de remoção de tecido foliar; médio = 6 a 15% de remoção de tecido foliar e alto = acima de 24% de remoção de tecido foliar).

As imagens foram processadas no software GIMP (GNU Image Manipulation Program 2020) de acordo com o protocolo sugerido no Apêndice C. Para cada uma das imagens originais, contendo as 20 folhas a serem analisadas, foram geradas outras 42 imagens, sendo: uma imagem colorida com todas as 20 folhas; uma imagem em preto e branco com todas as 20 folhas; um total de 20 imagens coloridas, cada uma com uma das folhas da imagem original; e por fim, 20 imagens em preto e branco, cada uma contendo uma das 20 folhas da imagem original.

Com o intuito de avaliar a influência do tipo de obtenção da imagem nas medidas de herbivoria foliar, além de imagens digitalizadas com o auxílio de um *scanner* de mesa, incluímos também fotografias das folhas. Estas fotografias foram obtidas de uma distância fixa, de 30 cm, afim de padronizar a qualidade da imagem e quantidade de pixels na escala. Além disso nos atentamos também ao fundo claro para folhas escuras e vice-versa, e ao uso de *flash* para evitar sombras na imagem obtida através da fotografia digital. Utilizou-se câmera NIKON

(d3100) acoplada a um tripé com altura fixa e base de madeira estável para a tomada de fotografias digitais. Após o processamento, as imagens foram analisadas no software R core Team usando o pacote “EBImage” e *script* proposto por Leandro Maracahipes e publicado em Queiroz e colaboradores, 2022.

2.4 Análises estatísticas

Para compararmos os dados da *Quiz* (Apêndice B), distribuída entre os pesquisadores que avaliaram a herbivoria através do método visual, e das medidas previamente conhecidas que foram tomadas com o software ImageJ, calculamos o *delta* herbivoria (que é a diferença entre as duas medidas) e testamos a diferença no delta herbivoria entre pesquisadores com e sem experiência usando um teste-t pareado. Para analisarmos e compararmos os efeitos dos métodos, dados das imagens e dos traços foliares nas estimativas de herbivoria, foram construídos modelos lineares generalizados mistos (GLMMs). A fim de estimar o efeito dos métodos nas estimativas de herbivoria, os GLMMs foram construídos usando o nível de herbivoria como variável resposta e o método (estimativa visual, Image J e R) como variável preditora. No caso dos dados das imagens e traços foliares, estes foram como variáveis preditoras, e o nível de herbivoria como variável resposta. E com o intuito de avaliarmos a variação no tempo gasto para gerar as estimativas, usamos a metodologia, os dados das imagens e os traços foliares e como variáveis explicativas e o tempo em minutos como a variável resposta. As espécies foram incluídas como efeito aleatório em todos os modelos. Quando necessário, realizamos uma análise de contraste após GLMMs para indicar as diferenças entre grupos de medidas. As análises foram realizadas utilizando o software R versão 4.1.1 (R Core Team, 2020) usando o pacote *Vegan* (Oksanen *et al.*, 2022).

3. RESULTADOS

3.1 Estimativas visuais simples - experimento

Um total de 18 pesquisadores estimaram a quantidade de área foliar removida em 30 folhas, pertencentes a 25 espécies de plantas diferentes. Observou-se que no geral, a estimativa visual superestimou os níveis de herbivoria foliar ($F_{1,58} = 38.34$, $P < 0.001$) (Fig.1). Em média, a herbivoria medida pelo ImageJ foi de 20.72% de remoção de tecidos e a estimativa visual gerou valores de herbivoria média de 29.15% de remoção, com um delta herbivoria de 8.43% para todas as folhas avaliadas.

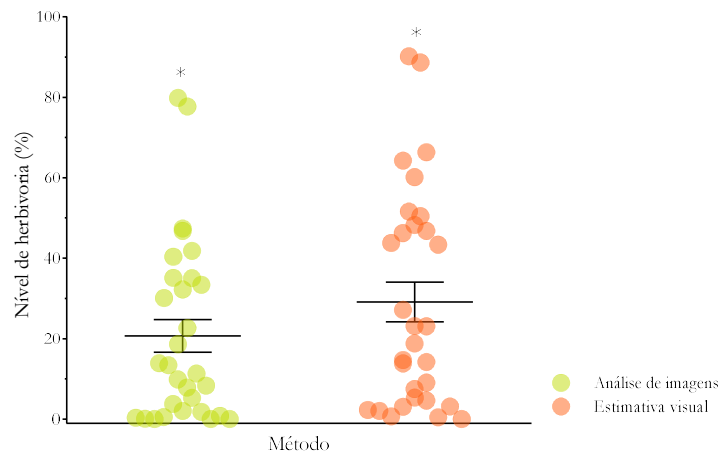


Figura 1. Nível de herbivoria (média \pm SE) em função dos métodos: ● análise de imagens pelo ImageJ (n=30 folhas) e ● estimativa visual simples (n= 30 folhas). Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.001$).

Nós detectamos um efeito da experiência anterior de um pesquisador em estimar a herbivoria na precisão das medidas (Fig.2). O delta de herbivoria, ou seja, a diferença entre a medida estimada e a medida real é, em média, significativamente menor quando o pesquisador possui experiência (delta herbivoria = 8.42) comparado a pesquisadores sem experiência em medidas de herbivoria foliar (delta herbivoria = 11.22) ($t = 4.64$, $df = 29$, $P < 0.001$).

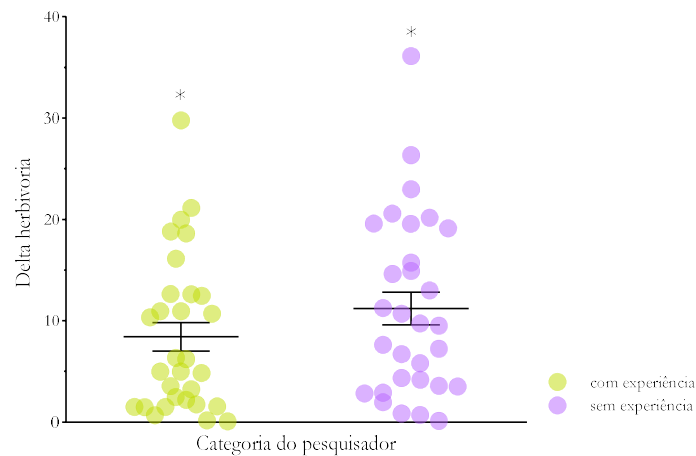


Figura 2. Diferença entre os níveis de herbivoria estimados visualmente pelos pesquisadores *versus* os mesmos níveis de herbivoria medidos através de análise de imagens (média \pm SE) em função da categoria do pesquisador: ● com experiência publicada em medições de herbivoria (n= 9); ● sem experiência publicada em medições de herbivoria (n= 9). Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.001$).

O valor de delta herbivoria diferiu ainda entre as três classes de níveis de herbivoria analisadas ($F_{2,27}=38.476$, $P<0.001$) (Fig.3). Após a análise de contraste, em níveis baixos de herbivoria o delta é menor quando comparado a níveis médios ($P<0.01$) e altos ($P<0.001$).

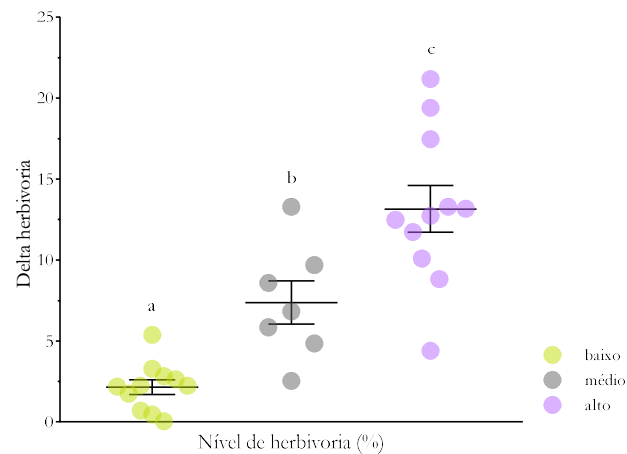


Figura 3. Diferença entre os níveis de herbivoria estimados visualmente *versus* medidos através de análise de imagens (média \pm SE) em função dos níveis de herbivoria foliar categorizados a seguir: ● baixo = de 0 a 5% de remoção de tecido foliar (n= 11); ● médio = de 6 a 15% de remoção de tecido foliar (n= 7) e ● alto = maior que 20% de remoção de tecido foliar (n=12). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os níveis de herbivoria, de acordo com análise de contraste após GLMM.

Nós não detectamos efeitos do tamanho da área foliar total na diferença entre os níveis de herbivoria estimados visualmente *versus* medidos através de análise de imagens ($F_{1,14}=1.276$, $P>0.05$) (Fig.4).

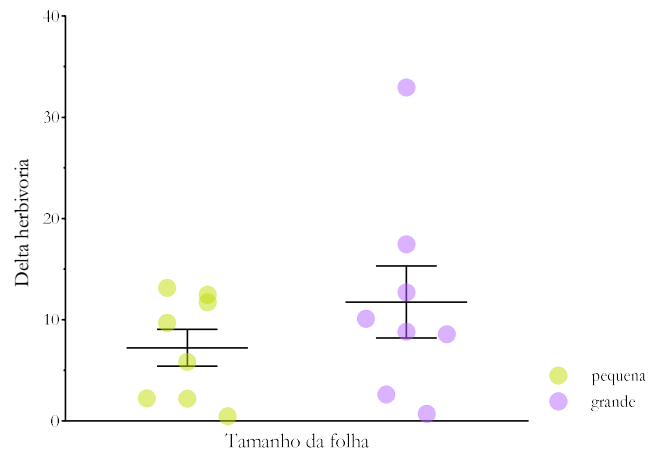


Figura 4. Diferença entre os níveis de herbivoria estimados visualmente *versus* medidos através de análise de imagens (média \pm SE) em função do tamanho da folha categorizado a seguir: ● pequena = área foliar menor que 6 cm² (n=8) e ● grande = área foliar total maior que 60 cm² (n=8).

3.2 Comparações entre os diferentes métodos de quantificação da herbivoria

Nós avaliamos 2.130 folhas de 63 espécies de plantas, incluindo nesse conjunto de dados 30 folhas por espécie. Em média, os níveis de herbivoria diferiram entre os métodos ($F_{2,210}=15.01$, $P<0.001$) (Fig.5a). Após análise de contraste, verificamos que não houve diferença entre as estimativas dos softwares R Core Team e ImageJ ($P>0.05$), enquanto a estimativa visual diferiu de ambos ($P<0.001$). Já o tempo gasto para realizar as medidas diferiu entre os três métodos ($F_{2,109}=106.478$, $P<0.001$) (Fig.5b).

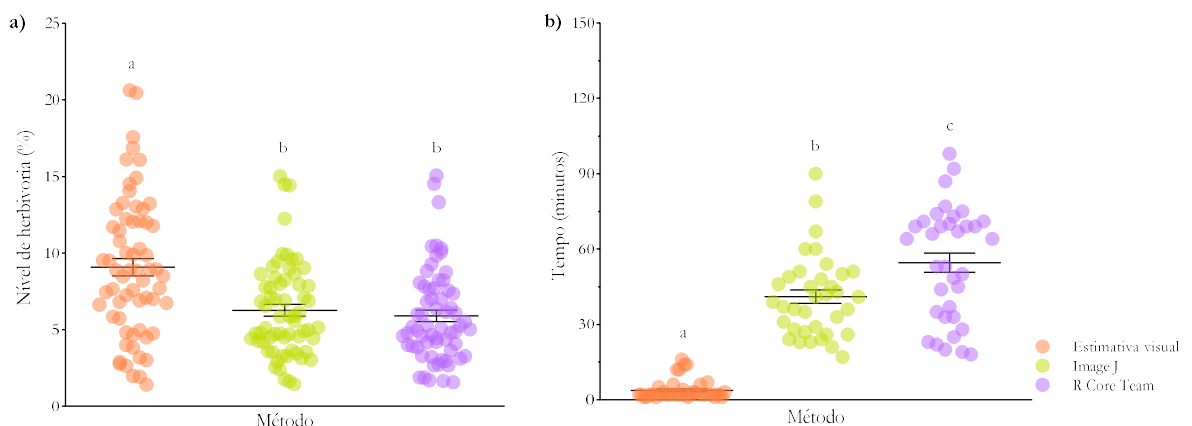


Figura 5. Estimativas de herbivoria (média \pm SE) em função dos métodos: ● estimativa visual por categorias (n=64), ● ImageJ (n=64) e ● R Core Team (n=64). Em **a)** Nível de herbivoria e **b)** Tempo gasto, em minutos, para estimar a área foliar perdida. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os métodos, de acordo com análise de contraste após GLMM.

3.3 Comparações entre Dados das Imagens e Traços Foliare

Não detectamos nenhum efeito da cor da imagem tanto na precisão das medidas de herbivoria foliar ($F_{1,170}=0.029$, $P>0.05$) quanto no tempo gasto tanto para realizá-las ($F_{1,170}=0.719$, $P>0.05$) (Fig. 6 a e b).

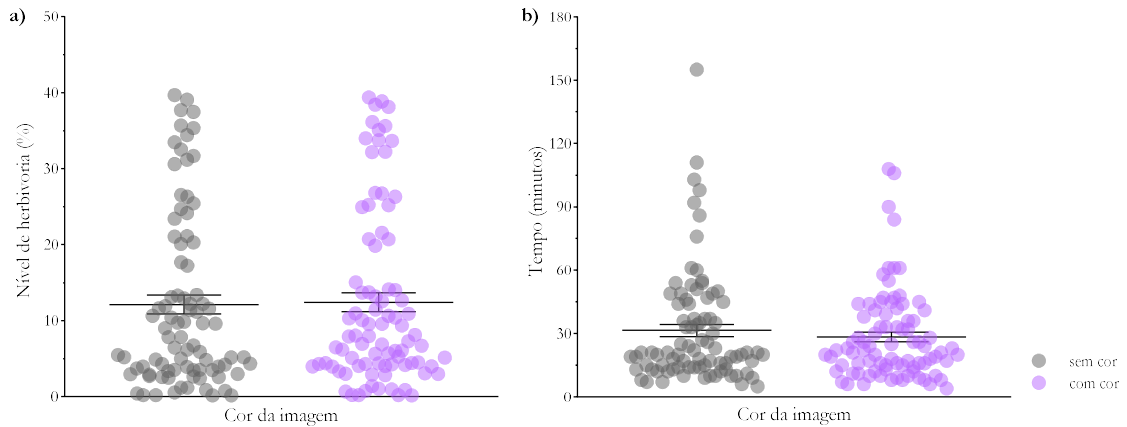


Figura 6. Estimativas (média \pm SE) em função cor da imagem: ● imagem sem cor, ou seja, em preto e branco ($n=85$) e ● imagem colorida ($n=85$). Em **a)** Nível de herbivoria e **b)** Tempo gasto, em minutos, para estimar a área foliar perdida.

Não detectamos nenhum efeito da técnica de digitalização da imagem (*scanner* ou fotografia digital) na precisão das medidas de herbivoria foliar ($F_{1,42}=0.006$, $P=0.936$), nem no tempo gasto tanto para realizar as medidas ($F_{1,42}=0.146$, $P=0.704$) (Fig. 7 a e b).

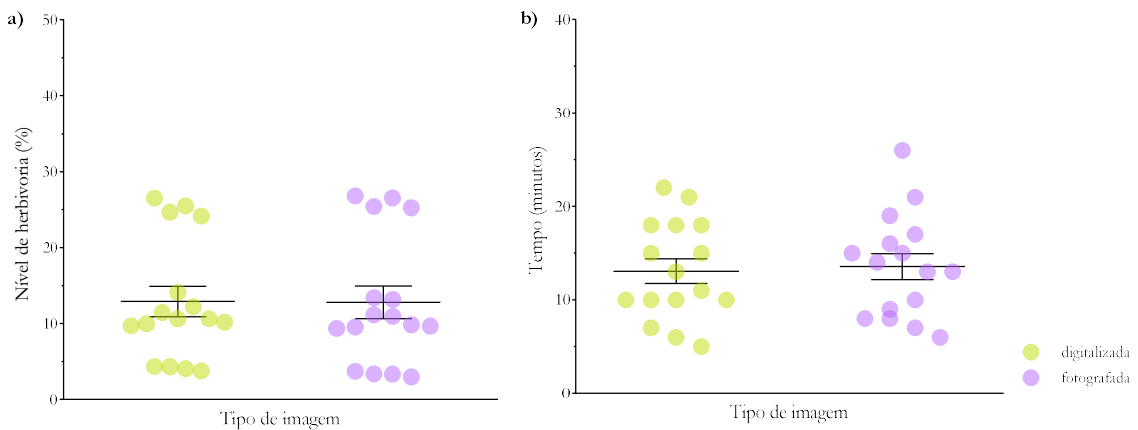


Figura 7. Estimativas (média \pm SE) em função do tipo de imagem: ● imagem digitalizada com o auxílio de um *scanner* de mesa ($n=15$) e ● imagens tomadas com fotografia digital por câmera ($n=15$). Em **a)** Nível de herbivoria e em **b)** Tempo gasto, em minutos, para estimar a área foliar perdida.

Não detectamos nenhum efeito do número de folhas por imagem na precisão das medidas de herbivoria foliar ($F_{1,168}=0.010$, $P>0.05$). No entanto, o tempo gasto em minutos para realizar as medidas diferiu entre os dois grupos ($F_{1,158}=12.172$, $P<0.01$) sendo menor para um conjunto de folhas que para folhas individualmente digitalizadas (Fig. 8 a e b).

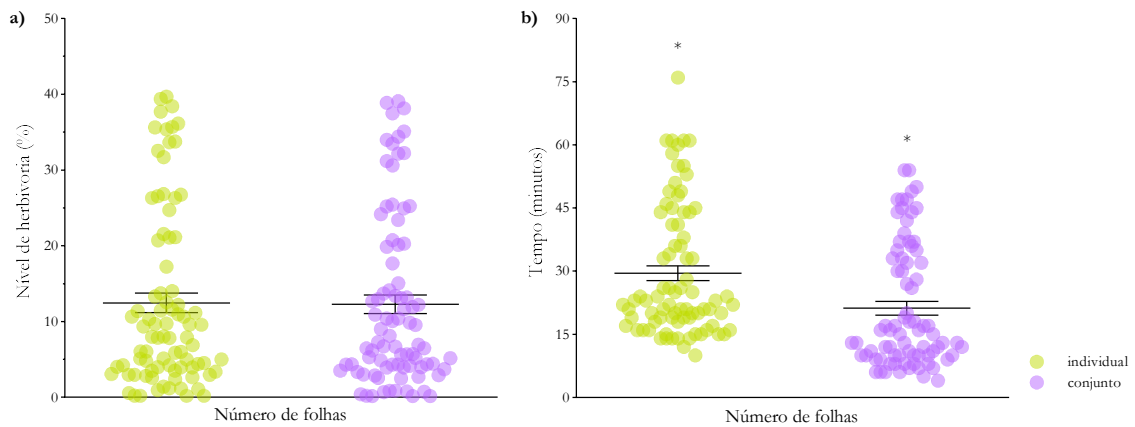


Figura 8. Estimativas (média \pm SE) em função do número de folhas por imagem: ● individual: apenas uma folha por imagem ($n=85$) e ● conjunto: todo o conjunto de folhas em uma só imagem ($n=85$). **a)** Nível de herbivoria e **b)** Tempo gasto, em minutos, para estimar a área foliar perdida. Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.05$).

Não detectamos nenhum efeito da face das folhas usadas para a digitalização e medidas nas imagens tanto para a precisão das medidas de herbivoria foliar ($F_{1,138}=0.005$, $P>0.05$) quanto para o tempo gasto em minutos para realizar as medidas diferiu ($F_{1,138}=0.179$, $P>0.05$) (Fig. 9 a e b).

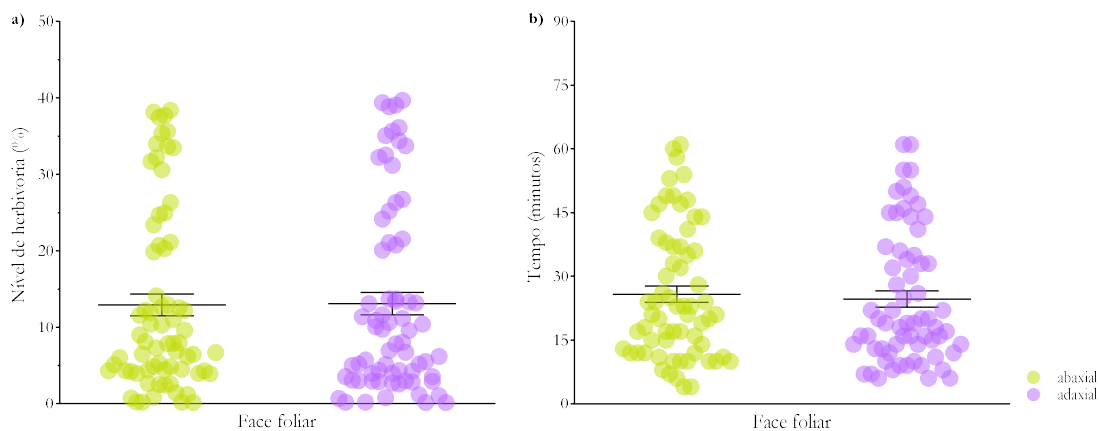


Figura 9. Estimativas (média \pm SE) em função da face foliar usada nas imagens digitais: ● abaxial ($n=85$) e ● adaxial ($n=85$). Em **a)** Nível de herbivoria e em **b)** Tempo gasto, em minutos, para estimar a área foliar perdida.

Nós detectamos diferenças no tempo gasto para estimar a área foliar perdida entre folhas com níveis de herbivoria distintos. As folhas que apresentam baixos níveis de herbivoria demandaram mais tempo para serem analisadas ($F_{1,49}=37.126$, $P<0.001$) (Fig.10).

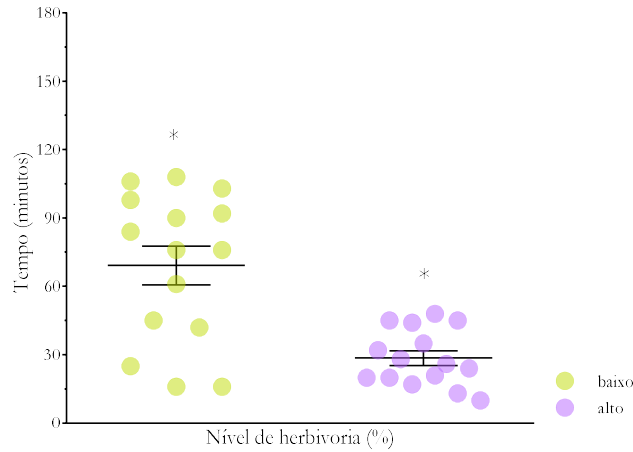


Figura 10. Tempo gasto (média \pm SE), em minutos, para estimar a área foliar perdida em função do nível de herbivoria foliar: ● baixo: menor que 6% de área foliar removida ($n=15$) e ● alto: maior que 24% de área foliar removida ($n=15$). Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.001$).

Houve diferença no tempo gasto para estimar a área foliar perdida também entre folhas com diferentes tamanhos de maneira que as folhas grandes demandam mais tempo para serem analisadas ($F_{1,48}=53.245$, $P<0.001$) (Fig.11). Não houve diferença no tempo gasto para estimar a área foliar perdida entre folhas com face foliar clara versus escura ($F_{1,60}=0.004$, $P>0.05$) (Fig.12).

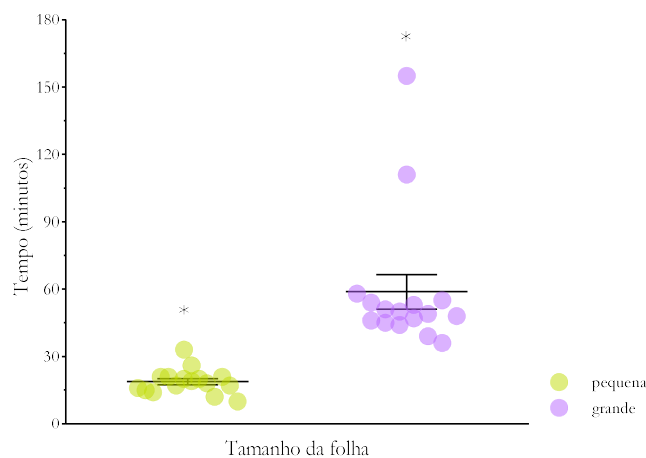


Figura 11. Tempo gasto (média \pm SE), em minutos, para estimar a área foliar perdida em função do tamanho da folha: ● pequena: até 6 cm² ($n=34$) e ● grande: maior que 60 cm² ($n=16$). Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.001$).

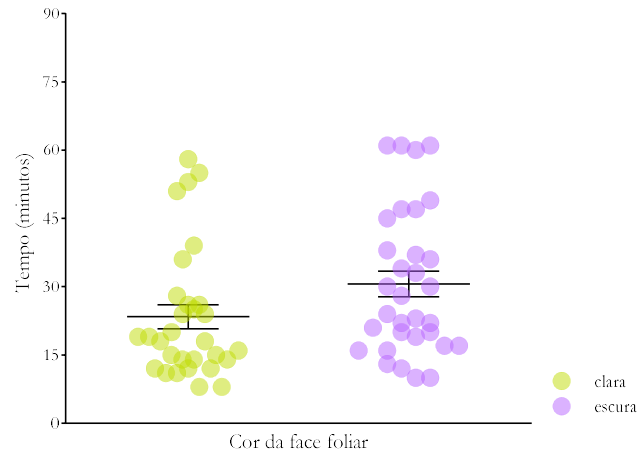


Figura 12. Tempo gasto (média \pm SE), em minutos, para estimar a área foliar perdida em função cor da face foliar: ● clara (n= 32) e ● escura (n= 32).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que estimativas visuais superestimam os níveis de herbivoria gerando estimativas quase 50% maiores quando comparadas às medidas de herbivoria tomadas com precisão através de métodos digitais. Tal resultado é ainda mais evidente para pesquisadores sem experiência em medidas de herbivoria e para folhas com alto nível de herbivoria, onde a diferença entre o estimado e o real é ainda maior. Os métodos digitais baseados nas imagens das folhas e no uso de softwares fornecem estimativas precisas de dano foliar, porém, como esperado, demandam mais tempo para realizá-las. Finalmente, o número de folhas por imagem, o tamanho da folha e o nível de herbivoria influenciam no tempo gasto para realizar as medidas, mas não na precisão das medidas. Discutimos a seguir as implicações desses resultados e fornecemos recomendações práticas para medir os danos causados por insetos herbívoros e aumentar a precisão das medidas para que possamos usar tais dados para gerar implicações das medidas de herbivoria em desempenho das plantas e em processos das comunidades e ecossistemas.

4.1 Estimativa visual simples

Confirmando nossas hipóteses, a estimativa visual superestimou os níveis de herbivoria, uma vez os valores de delta herbivoria foram maiores para este método (Fig.1). O delta médio, ou seja, a diferença nas médias geradas pela estimativa visual simples e análise de imagens, foi de aproximadamente 8%, uma diferença alta se tratando de estimativas de herbivoria, dado que a maioria das espécies de plantas sofre menos de 10% de danos foliares anualmente (Turcotte *et al.*, 2014a). Além disso, mesmo níveis relativamente baixos de dano foliar podem impor efeitos prejudiciais às plantas tais como desencadear a abscisão prematura das folhas, ativar as defesas físicas e químicas induzidas pela herbivoria e impor custos metabólicos que podem afetar o crescimento e a reprodução (Kozlov & Zvereva, 2017). Portanto, o uso da estimativa visual para quantificar a herbivoria pode gerar resultados enviesados, e conseqüentemente levar a conclusões distorcidas sobre o impacto desta interação no *fitness* das plantas.

Adicionalmente, pesquisadores com experiência publicada em medidas de herbivoria alcançaram valores de delta herbivoria menores quando comparados a pesquisadores sem experiência (Fig.2), indicando que a falta de experiência em realizar medidas dos níveis de herbivoria pode potencializar a superestimação dos resultados e causar maiores vieses na avaliação da herbivoria. Por ser um método fácil, rápido e barato, a estimativa visual é constantemente usada em avaliações de nível de herbivoria em cursos de campo, atividades didáticas e trabalhos de conclusão de curso em vários níveis (graduação, mestrado e doutorado). Quando esses dados são publicados e utilizados para outros trabalhos de síntese a partir da construção de bancos de dados que sumarizam o nível de herbivoria usando essas medidas simples, há um risco inerente de superestimar a herbivoria e também os seus efeitos nas plantas.

Folhas com maiores níveis de danos, i.e., com mais que o dobro da estimativa global de Turcotte e colaboradores (2014a) - em torno de 20% de área foliar perdida para insetos herbívoros - apresentaram os maiores valores de delta herbivoria, indicando que os pesquisadores normalmente superestimam os danos nos níveis mais altos, e essa superestimação diminui com a intensidade dos danos (Fig. 3). Desta forma, sugerimos que a superestimação em níveis mais altos possa ser explicada pela percepção visual do indivíduo. Uma vez que o pesquisador deve quebrar mentalmente a folha em seções e estimar os danos - o que requer uma noção da variedade das formas, tamanhos e dos danos foliares- é mais simples olhar para uma folha com pouca herbivoria e estimar o dano foliar, ao contrário de uma folha com alto nível de herbivoria, principalmente se o dano for marginal e não interior. Por outro

lado, nós não encontramos efeitos do tamanho da área foliar total na diferença entre os níveis de herbivoria estimados visualmente *versus* medidos através de análise de imagens (Fig.4) sugerindo que a percepção visual dos pesquisadores não foi afetada pelo tamanho da folha.

4.2 Comparações entre os métodos

Nossos resultados mostraram que as medidas geradas pela estimativa visual e posterior classificação em categorias de danos foram maiores quando comparadas às outras duas metodologias baseadas em imagens digitais e medidas usando-se softwares (Fig. 5a), corroborando nossa hipótese de que estimativas visuais levam a superestimacões dos níveis de herbivoria e geram resultados menos robustos. As estimativas visuais fornecem medidas grosseiras dos danos causados por herbívoros e ainda são influenciadas pela percepção de cada pesquisador ao olhar uma folha atacada, o que por fim limita o conhecimento dos verdadeiros níveis de herbivoria foliar (Johnson *et al.*, 2016; Getman-Pickering *et al.*, 2020). Uma vez que a maioria das espécies de plantas sofrem menos de 10% de danos foliares anualmente (Turcotte *et al.*, 2014a), diferenças que aparentemente são pequenas entre os métodos de estimativas de herbivoria se tornam especialmente importantes. Por outro lado, nossos resultados indicaram que ambos os softwares, R e ImageJ medem de forma consistente os níveis de herbivoria. Em um experimento, onde a área foliar removida foi criada artificialmente, o ImageJ foi altamente preciso ao medir 'folhas' e 'herbivoria' de tamanhos conhecidos (Getman-Pickering *et al.*, 2020). Além disso, ambos os softwares aqui utilizados são gratuitos e de domínio público, o que evidencia ainda mais nossa sugestão para que esses sejam utilizados em detrimento às estimativas visuais.

Consistentemente com o esperado, o tempo gasto para realizar as medidas foi diferente entre os três métodos (Fig.5b). As estimativas visuais requerem um tempo aproximadamente 15 vezes menor em relação aos outros dois métodos, o que pode ser uma vantagem apenas em situações que o nível de herbivoria não precisa ser robustamente preciso, como por exemplo em comparações relativas de dano feitas pelo mesmo pesquisador para diferentes espécies de plantas simultaneamente. Surpreendentemente, o tempo para medir as folhas com o software R foi mais alto quando comparado ao ImageJ (Fig.6.b). Apesar da diferença ser pequena, em média 13 minutos para cada conjunto de 20 folhas, acreditávamos que as medidas no R fossem mais rápidas do que no ImageJ visto que no R as medidas são automatizadas, o que permite lidar com um número grande de folhas com áreas danificadas/herbivoradas em questões de

segundos. Além disso, no R é possível medir, em poucos minutos, várias imagens ou até mesmo várias pastas com imagens digitais de várias espécies, desde que essas estejam na mesma escala (número de pixels em 1cm^2). E por fim, este software salva automaticamente as medições em uma planilha, evitando assim, a possibilidade de erros de transcrição. Por outro lado, no ImageJ, só é possível analisar uma folha ou imagem por vez, e para realizar as medidas de herbivoria é preciso selecionar todas as áreas danificadas/herbivoradas manualmente e transcrever os resultados para uma planilha. Esta diferença de tempo entre os dois softwares se deu muito provavelmente na etapa de preparação das imagens. As medidas no R foram feitas por vários pesquisadores utilizando-se um pacote novo (EBImage) e muitos deles ainda não conheciam este método. Elaboramos um protocolo minuciosamente detalhado com o passo a passo para a preparação das imagens com o intuito de diminuir os vieses metodológicos. É importante ressaltar ainda que no ImageJ o processamento das imagens pode ser realizado no próprio programa e ao contrário do R, as imagens processadas não foram salvas de forma que essas diferenças de execução podem ter interferido no tempo gasto total entre os dois softwares. Acreditamos que um uso mais amplo do pacote EBImage com outros conjuntos de folhas permitirá futuras comparações com o software que é mais usado atualmente (ImageJ) e até mesmo com outros aplicativos para celulares que têm sido propostos como o BioLeaf (Machado *et al.*, 2016) e LeafBite (Getman-Pickering *et al.*, 2020). Diversas vantagens dos aplicativos que medem herbivoria para telefones celulares têm sido levantadas, mas nesse estudo optamos pelo uso de softwares devido às limitações metodológicas - como a disponibilidade de espaço de armazenamento no aparelho para salvar as imagens e bateria suficiente para realizar as medições em campo - dado que as amostragens foram realizadas em ambientes naturais.

Observamos que uma das grandes vantagens do R em relação ao ImageJ é a automatização das medidas de herbivoria. Enquanto no primeiro basta definir a escala e rodar o *script*, e em questão de segundos uma tabela é gerada com os resultados, no segundo o processo é bem mais delicado, uma vez que requer uma grande atenção do pesquisador no momento de selecionar as áreas herbivoradas, sendo que qualquer descuido exigirá que o pesquisador retome as medidas do início, e, portanto, está sujeito a maiores vieses metodológicos.

4.3 Comparações entre Dados das Imagens e Traços Foliare

Como esperado, em relação aos traços foliares, encontramos diferenças no tempo gasto para estimar a área foliar perdida entre folhas com diferentes tamanhos e com diferentes níveis de herbivoria (Fig. 10 e 11). Ao contrário de nossas expectativas, o tempo gasto para estimar a área foliar perdida entre folhas a face foliar clara versus escura não diferiu (Fig.12). Nós não analisamos a influência desses traços nos níveis de herbivoria, uma vez que os dados representam os níveis de herbivoria em ambiente natural. Portanto sugerimos em pesquisas futuras a realização de experimentos com herbivoria artificial em diferentes níveis de remoção de área conhecida para avaliarmos os efeitos desses traços nos níveis de herbivoria. Entretanto, como o tempo diferiu entre esses traços foliares, sugerimos que isso deve ser levado em consideração pelos pesquisadores ao avaliarem conjuntos de folhas.

Recomendações

Primeiramente, recomendamos que as folhas devem ser secadas em estufa, prensadas e então digitalizadas para que os métodos baseados em imagens digitais e softwares possam ser utilizados em detrimento à estimativa visual. O tempo necessário para tal processamento, que é muitas vezes feito em campo (prensagem) e no laboratório (secagem em estufa) e o volume de material coletado e espaço para armazenagem devem ser levados em consideração pelo pesquisador. Entretanto, nossos dados sugerem que apesar do maior tempo necessário e maior volume de material que deve ser processado posteriormente, geramos estimativas mais precisas da herbivoria com os métodos baseados em imagens. Com o intuito de diminuir os vieses metodológicos e permitir a repetibilidade e comparação entre os dados, sugerimos que sejam utilizados assim protocolos com instruções claras e detalhadas sobre como preparar as imagens e então estimar os danos. Embora os métodos de análise de imagens exijam duas etapas – a criação de um arquivo de imagem digital e posterior cálculo da área - e, portanto, um tempo considerável para o processamento, sugerimos o uso deste método em detrimento das estimativas visuais, que, apesar de simples e rápidas, devem ser evitadas devido à superestimação dos níveis de herbivoria. É importante ressaltar que nossos dados foram coletados apenas para plantas da região tropical, onde os níveis de herbivoria ainda são sub-representados nas estimativas globais publicadas (veja Metcalfe *et al.*, 2014; Turcotte *et al.*, 2014a, 2014b; Kozlov *et al.*, 2015a, 2015b) e acreditamos assim que a padronização de métodos

é essencial para que os dados permitam comparações futuras e façam parte de bancos de dados globais dos níveis de herbivoria.

Recomendações para Cor da Imagem

Uma vez que, não detectamos diferenças nas medidas de herbivoria entre imagens coloridas e imagens em preto e branco (Fig. 6) e não detectamos diferenças no tempo gasto para ambas as cores, recomendamos o uso da imagem colorida, já que é um passo a menos na hora de processar as imagens. Além disso, a imagem colorida permite em qualquer momento do processamento da imagem, avaliar com mais detalhes as sombras, manchas e áreas faltantes.

Recomendações para Tipo de imagem

Visto que não detectamos diferenças nas medidas de herbivoria entre as técnicas de obtenção das imagens (Fig. 7), recomendamos o uso de imagens digitalizadas com o auxílio de um *scanner* de mesa. Este método evita erros de medições principalmente em relação às escalas e reduz a produção de sombras - que é muito comum em fotografias. Porém, caso o pesquisador opte por usar fotografia com câmera digital, recomendamos fortemente que as imagens sejam obtidas a uma distância padronizada, com uma régua milimetrada ao lado para o cálculo posterior da escala, use um fundo que forneça um bom contraste à cor da folha e ainda, use o flash. O uso do “*flash*” é extremamente importante porque sombras ou manchas claras criam áreas falsamente e potencialmente identificadas como herbivoria ou como parte da área foliar total, e a marcação dessas áreas para exclusão dos cálculos é muito lenta, tanto no ImageJ quanto no R.

Recomendações para Número de folhas por imagem

Como não detectamos diferenças nas medidas de herbivoria entre os números de folhas por imagem (Fig. 8), recomendamos o uso de várias folhas por imagem já que desta forma a estimativa do nível de herbivoria demanda um tempo menor. Recomendamos ainda que, as medidas sejam feitas não só por múltiplas folhas por imagens, mas também em múltiplas pastas contendo todo o conjunto de folhas a serem analisadas, especialmente no R, reduzindo assim o tempo total necessário para as medições. Tal sugestão é ainda mais importante para grandes conjuntos de folhas, como em Mendes e colaboradores (2021) onde mais de 50.000 folhas foram avaliadas.

Recomendações para Face foliar

Embora não exista diferenças nas medidas de herbivoria entre as faces foliares (Fig. 9), recomendamos o uso da face abaxial. Fazemos esta recomendação porque a nervura central pode impedir que a folha fique totalmente plana no momento da captura de imagem, criando assim sombras que podem facilmente mascarar marcas de herbivoria foliar, principalmente se estas marcas estiverem no interior da folha, ou sombras nas margens foliares que podem ser confundidas com a área foliar total.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a importância dos métodos de estimativa da herbivoria para o conhecimento dos níveis reais de área foliar perdida para insetos herbívoros. A estimativa visual superestima os níveis de herbivoria, e a diferença é ainda maior entre pesquisadores sem experiência em medidas de herbivoria e em folhas com alto nível de herbivoria. Assim, apesar de rápida, simples e amplamente difundida, sugerimos que a estimativa visual deve ser evitada. Vieses metodológicos existem tanto em métodos visuais quanto em métodos digitais, mas esses podem ser minimizados com o uso de protocolos padronizados. Dessa forma, os dados apresentados aqui evidenciam que a estimativa da área foliar perdida para insetos herbívoros pode ser realizada de maneira simples, mas com qualidade. A avaliação de quanto de tecido foliar é perdido para herbívoros é uma inquietude antiga nos estudos de interação entre insetos e plantas, seja por curiosidade para avaliar quanto de tecido os insetos removem, seja para avaliar os efeitos na performance de plantas, ou para avaliar processos ecológicos nas comunidades e nos ecossistemas, como é o caso da decomposição foliar e ciclagem de nutrientes. Assim, a avaliação precisa da herbivoria foliar nos permitirá fazer inferências mais robustas sobre o papel dessa interação antagônica entre insetos e plantas nos diversos níveis de questionamentos.

6. REFERÊNCIAS

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image processing with imageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–41. Gy ,l.ç-[
- Alliende, M.C. (1989) Demographic Studies of a Dioecious Tree. II. The Distribution of Leaf Predation Within and Between Trees. *The Journal of Ecology*, **77**, 1048.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., *et al.* (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, **51**, 335–380.
- Dirzo, R. & Domínguez, C.A. (1995) Plant–herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forests. *Seasonally Dry Tropical Forests*, 304–325.
- Getman-Pickering, Z.L., Campbell, A., Aflitto, N., Grele, A., Davis, J.K. & Ugine, T.A. (2020) LeafByte: A mobile application that measures leaf area and herbivory quickly and accurately. *Methods in Ecology and Evolution*, **11**, 215–221.
- GIMP. GNU Image Manipulation Program. (2020) .
- Johnson, M.T.J., Bertrand, J.A. & Turcotte, M.M. (2016) Precision and accuracy in quantifying herbivory. *Ecological Entomology*, **41**, 112–121.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015a) Background losses of woody plant foliage to insects show variable relationships with plant functional traits across the globe. *Journal of Ecology*, **103**, 1519–1528.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015b) Global patterns in background losses of woody plant foliage to insects. *Global Ecology and Biogeography*, **24**, 1126–1135.
- Kozlov, M. V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2014) Confirmation bias leads to overestimation of losses of woody plant foliage to insect herbivores in tropical regions. *PeerJ*, **2**, e709.
- Kozlov, M. V. & Zvereva, E.L. (2017) Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology. In *Progress in Botany*. pp. 313–355.
- Lincoln, D.E. & Mooney, H.A. (1984) Herbivory on *Diplacus aurantiacus* shrubs in sun and shade. *Oecologia*, **64**, 173–176.
- Machado, B.B., Orue, J.P.M., Arruda, M.S., Santos, C. V., Sarath, D.S., Goncalves, W.N., *et al.* (2016) BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. *Computers and Electronics in Agriculture*, **129**, 44–55.
- Marquis, R.J. (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science*, **226**, 537–539.
- Mendes, G.M., Silveira, F.A.O., Oliveira, C., Dáttilo, W., Guevara, R., Ruiz-Guerra, B., *et al.* (2021) How much leaf area do insects eat? A data set of insect herbivory sampled globally with a standardized protocol. *Ecology*, **102**, 3301.
- Metcalf, D.B., Asner, G.P., Martin, R.E., Silva Espejo, J.E., Huasco, W.H., Farfán Amézquita, F.F., *et*

- al.* (2014) Herbivory makes major contributions to ecosystem carbon and nutrient cycling in tropical forests. *Ecology Letters*, **17**, 324–332.
- Oksanen, J., Simpson, G.L. & Blanchet, F.G. (2022) Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5–7. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (Accessed April 17, 2022).
- Price, P.W. (2002) Resource-driven terrestrial interaction webs. *Ecological Research*, **17**, 241–247.
- Queiroz, E.A., Schoereder, J.H., Cornelissen, T.G., Brando, P.M., Maracahipes, L. & Paolucci, L.N. (2022) Reduced predation by arthropods and higher herbivory in burned Amazonian forests. *Biotropica*, **54**, 1052–1060.
- R Core Team. (2020) R: A language and environment for statistical computing.
- Rasband, W.S. (2022) Image J.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**, 671–675.
- Stotz, H.U., Pittendrigh, B.R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A., *et al.* (2001) Erratum: Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of arabidopsis against Egyptian cotton worm but not diamondback moth (Plant Physiology (2000) 124 (1007-1017)). *Plant Physiology*, **125**, 2203.
- Turcotte, M.M., Davies, T.J., Thomsen, C.J.M. & Johnson, M.T.J. (2014a) Macroecological and macroevolutionary patterns of leaf herbivory across vascular plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20140555.
- Turcotte, M.M., Thomsen, C.J.M., Broadhead, G.T., Fine, P.V.A., Godfrey, R.M., Lamarre, G.P.A., *et al.* (2014b) Percentage leaf herbivory across vascular plant species. *Ecology*, **95**, 788–788.

CONCLUSÃO GERAL

Esta tese disponibilizou uma extensa base de dados sobre os níveis e a frequência de herbivoria para mais de 57.000 folhas, atualizando e expandindo os dados sobre herbivoria por insetos mastigadores para uma ampla diversidade de espécies de plantas.

Este é o primeiro estudo a examinar padrões em larga escala, com metodologia padronizada, nas relações entre traços funcionais e herbivoria na região tropical. Demonstramos que a herbivoria na região tropical apresenta valores semelhantes aos dados publicados especialmente para plantas da região temperada. Adicionalmente, os níveis de herbivoria foram influenciados pela SLA e o habitat. Portanto, a área foliar específica e a fitofisionomia podem ser usados como bons previsores das perdas de tecido foliar em diversas plantas não-relacionadas filogeneticamente.

Este estudo demonstrou a importância dos métodos de estimativa da herbivoria para o conhecimento dos níveis reais de área foliar perdida para insetos herbívoros. As evidências apresentadas sugerem que a estimativa visual deve ser evitada, uma vez que este método superestima os níveis de herbivoria, e a diferença é ainda maior entre pesquisadores sem experiência em medidas de herbivoria e em folhas com alto nível de herbivoria. Os dados da qualidade das imagens não influenciaram na variação nos níveis de herbivoria. Entretanto, a quantidade de folhas por imagem, o nível de herbivoria e o tamanho das folhas tiveram influência no tempo gasto para realizar as medidas. Dessa forma, os dados apresentados aqui evidenciam os vieses metodológicos na quantificação da herbivoria que podem ser minimizados com o uso de protocolos padronizados. Assim a estimativa da área foliar perdida para insetos herbívoros pode ser realizada de maneira simples e com qualidade.

REFERÊNCIAS

- Bernays, E.A. & Chapman, R.F. (2007) *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. Chapman & Hall, New York.
- Coley, P.D. & Aide, T.M. (1991) Comparison of herbivory and plant defences in temperate and tropical broad-leaved forests. *Plant–animal interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions*, 25–49.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and Plant Defenses in Tropical Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 305–335.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895–899.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015a) Global patterns in background losses of woody plant foliage to insects. *Global Ecology and Biogeography*, **24**, 1126–1135.
- Kozlov, M. V., Lanta, V., Zverev, V. & Zvereva, E.L. (2015b) Background losses of woody plant foliage to insects show variable relationships with plant functional traits across the globe. *Journal of Ecology*, **103**, 1519–1528.
- Kozlov, M. V. & Zvereva, E.L. (2017) Background Insect Herbivory: Impacts, Patterns and Methodology. In *Progress in Botany*. pp. 313–355.
- López-Carretero, A., del-Val, E. & Boege, K. (2018) Plant-Herbivore Networks in the Tropics. *Ecological Networks in the Tropics*, 111–126.
- Marquis, R.J. (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science*, **226**, 537–539.
- Metcalfe, D.B., Asner, G.P., Martin, R.E., Silva Espejo, J.E., Huasco, W.H., Farfán Amézquita, F.F., *et al.* (2014) Herbivory makes major contributions to ecosystem carbon and nutrient cycling in tropical forests. *Ecology Letters*, **17**, 324–332.
- Price, P.W. (2002) Resource-driven terrestrial interaction webs. *Ecological Research*, **17**, 241–247.
- Reich, P. & Wright, I., Cavender-Bares, J., Craine, J. & Oleksyn, J., Westoby, M., *et al.* (2003) The Evolution of Plant Functional Variation: Traits, Spectra, and Strategies. *International Journal of Plant Sciences*, **164**, S143–S164.
- Ribeiro, S.P. & Fernandes, G.W. (2000) Interações entre insetos e plantas no Cerrado: teoria e hipóteses de trabalho. *Oecologia Brasiliensis*.
- Rossetti, M.R., Tschardtke, T., Aguilar, R. & Batáry, P. (2017) Responses of insect herbivores and herbivory to habitat fragmentation: a hierarchical meta-analysis. *Ecology Letters*, **20**, 264–272.
- Turcotte, M.M., Davies, T.J., Thomsen, C.J.M. & Johnson, M.T.J. (2014a) Macroecological and macroevolutionary patterns of leaf herbivory across vascular plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20140555.
- Turcotte, M.M., Thomsen, C.J.M., Broadhead, G.T., Fine, P.V.A., Godfrey, R.M., Lamarre, G.P.A., *et*

al. (2014b) Percentage leaf herbivory across vascular plant species. *Ecology*, **95**, 788–788.

Wright, I.J., Westoby, M., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., *et al.* (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821–827.

Zvereva, E.L. & Kozlov, M. V. (2014) Effects of herbivory on leaf life span in woody plants: A meta-analysis. *Journal of Ecology*, **102**, 873–881.

APÊNDICE A - Protocolo de Coleta

HERBIVORY NETWORK: analysis of herbivory patterns in tropical plants

Coordenadora: Tatiana G. Cornelissen
Universidade Federal de Minas Gerais - BR



Herbivoria

- a) Para este projeto, os habitats tropicais devem ser delimitados entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, abaixo de 23.5°.
- b) As amostragens devem ser feitas em áreas naturais. Estas áreas devem ter pelo menos 1 ha, estar fora de assentamentos e áreas agrícolas, e não deve haver grandes empresas a menos de 2 km da localidade selecionada.
- c) Obtenha os dados de GPS (latitude e longitude exatas) para a localidade selecionada.
- d) Selecione, dentre as espécies mais comuns da localidade, pelo menos 5 espécies de plantas lenhosas que tenham folhas. Podem ser árvores, arbustos ou ervas. Registre o nome em latim, o tipo de crescimento, os dados da coleta e qualquer outra informação que julgue ser importante.
- e) Depois de decidir sobre as 5 espécies de plantas a serem registradas para cada localidade, a escolha das plantas e dos ramos individuais a serem amostrados devem ser aleatórias.
- f) Para cada espécie, escolha 5 plantas individuais como repetições, com pelo menos 10 metros de distância entre elas. A uma distância de pelo menos dois metros da planta escolhida, selecione um ramo a ser amostrado. É importante que você não mude a sua escolha posteriormente.
- g) De cada ramo, colete as primeiras 50 folhas, começando da base do ramo até o ápice. Se o ramo selecionado tiver menos de 50 folhas, tire folhas extras do ramo mais próximo.
- h) Numere as 50 folhas de cada replicação da planta com um código de quatro dígitos que indica a espécie, a planta individual e a folha (exemplo: *Banbinia brevipes* deve ser Bb 1.1 a 1.50, Bb 2.1 a 2.50 e Bb 3.1 a 3.50).
- i) Se você não puder escrever o código com uma caneta permanente na lâmina da folha, prenda um pedaço de fita no pecíolo e escreva o código na fita.
- j) Prende todas as folhas codificadas no jornal de forma que as folhas não estejam dobradas. Observe que as 5 repetições individuais por espécie devem ser armazenadas separadamente. Você terminará com 25 amostras por localidade (5 espécies × 5 replicações × 1 ramificação por repetição (50 folhas / ramo)).
- k) Coloque as amostras em um forno a 45 ° C por 2 a 3 dias e conserve-as em local seco.

l) Após a secagem, classifique cada folha amostrada ($n = 250$ por espécie) seguindo a metodologia amplamente utilizada proposta por Alliende (1989) e Dirzo & Domínguez (1995) de acordo com a classe de danos de área foliar perdida por herbivoria:

0 - folha intacta

1 - 0.01 para 1%

2 - 1 para 5%

3 - 5 para 25%

4 - 25 para 50%

5 - 50 para 75%

6 - 75 para 100%

m) Os dados devem ser registrados para cada espécie de planta, cada replicação individual e cada uma das 50 folhas por planta, em uma planilha de Excel (exemplo fornecido).

n) Registre também o tempo (em minutos) que você precisa para classificar e registrar na folha de dados cada amostra das 50 folhas.

o) Estes dados estão sendo registrados para os mastigadores, entretanto, se as folhas também exibirem galhadores ou minadores, registre a abundância de galhas e de minas para cada folha na mesma folha de dados.

p) Tire fotos ou digitalize as folhas com auxílio de um scanner- com uma régua métrica no lado direito da imagem como referência e o código da folha voltado para cima – colocando subamostras de até 10 folhas por imagem, se possível. Se as folhas forem grandes, acomode o máximo possível em uma única imagem. Envie as fotos por e-mail com a folha de dados para o coordenador do projeto quando terminar.

APÊNDICE B - *Quiz_TropHerb*. Rede de Herbivoria Tropical



QUESTIONÁRIO_TROPHORB

Caros participantes do TropHerb! Estamos avaliando a exatidão e precisão dos métodos disponíveis para quantificar a herbivoria no campo e no laboratório. Para nosso segundo projeto, estamos pedindo aos colaboradores do TropHerb que estimem a herbivoria nas fotografias de folhas fornecidas. O objetivo é quantificar o erro geral de estimativa da Rede TropHerb como um todo e *não* testar a capacidade de qualquer colaborador específico em estimativas de herbivoria.

Planejamos usar os dados agregados desta avaliação para relatar nossa exatidão e precisão nos próximos dois manuscritos. Para isso pedimos que estime a herbivoria para as 30 folhas fornecidas, inspecionando visualmente as folhas (não use régua ou qualquer outro instrumento) e registre no espaço fornecido a quantidade de área foliar perdida, em porcentagem. Portanto, seus resultados devem ser 0, 1%, 8,5%, 25% e assim por diante... Se duas folhas forem mostradas, por favor, estime a herbivoria na folha da DIREITA (que tem uma porcentagem maior de área foliar removida), então use a folha da esquerda para comparar a formato das folhas da espécie em questão (no campo você poderá olhar para as folhas menos danificadas para ver a forma típica da folha). Também pedimos que você registre o tempo no início e no final do questionário com um cronômetro. Por favor, registre o tempo total utilizado para avaliar o grupo de 30 folhas na última questão do quiz.

Estamos pedindo que você complete esta tarefa porque acreditamos que fornecer esses dados em nossos manuscritos será necessário para convencer os revisores de que estamos sendo rigorosos na quantificação dos níveis de herbivoria. Obrigado pelo seu tempo e colaboração, como sempre!

Gisele Mendes, Tatiana Cornelissen.

e-mail: _____

Nome: _____

ESTIMATIVA DA PORCENTAGEM DE HERBIVORIA

Indique o nível de herbivoria (% da área foliar perdida). Seus resultados devem ser 0, 1%, 8,5%, 25% e assim por diante... Se duas folhas forem mostradas, por favor, estime a herbivoria na folha da DIREITA (que tem uma porcentagem maior removida). A folha da esquerda é para mostrar a forma das folhas daquela espécie (no campo você poderá olhar para as folhas menos danificadas para ver a forma típica da folha).

Dica de velocidade: O botão TAB em seu teclado fará o cursor pular para a próxima caixa de resposta. Isso é mais rápido do que passar o mouse de caixa em caixa.

Registre a hora de início do questionário: _____

1. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



2. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



3. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



4. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



5. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



6. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



7. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



8. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



9. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



10. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



11. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



12. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



13. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



14. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



15. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



16. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



17. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



18. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



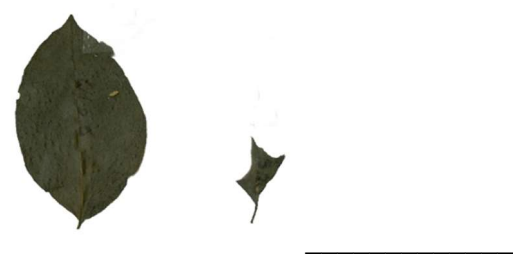
19. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



20. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



21. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



22. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



23. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



24. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



25. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



26. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



27. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



28. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



29. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



30. Qual a porcentagem de área foliar perdida?



Registre a hora do término do questionário.

Por favor, registre o tempo total utilizado para avaliar o grupo de 30 folhas.

Obrigada pelo seu tempo!

Obrigada a todos pelo esforço e contribuição para uma melhor compreensão dos níveis de
herbivoria!

APÊNDICE C - Protocolo de processamento de imagens para cálculo de herbivoria no R

Programas necessário: GIMP 2.1

Armazenamento necessário: 4 GB de espaço livre no HD.

Arquivos para análise: Será enviado ao seu e-mail uma pasta contendo as fotos a serem processadas. Faça o download para uma pasta designada especialmente para esse projeto no seu computador.

PASSOS

Para cada imagem original enviada, processar e salvar (de acordo com o protocolo): 1 imagem colorida contendo todas as 20 folhas, 1 imagem em preto e branco contendo todas as 20 folhas, 20 imagens cada uma contendo uma das folhas da imagem original colorida e 20 imagens cada uma contendo uma das folhas da imagem original em preto e branco.

#Etapa 1

#Imagem colorida (conjunto de 20 folhas, 1 ou mais pranchas por espécie).

1. Importar a imagem.

Abra o programa GIMP 2.1 → clique com o botão direito → File → open → navegue até a pasta do projeto, abra a pasta “fotos_originais_nomedaplanta” e dê um clique duplo para abrir a primeira foto.

2. Deletar o fundo da foto.

Clique na vara mágica → de um clique em qualquer área branca da foto → aperte delete. Isso deve deletar todo o fundo branco da foto. Clique na ferramenta de seleção retangular (tecla “R”) → clique em qualquer área da foto para selecionar novamente toda a foto.

3. Deletar as demais informações (nome, escala, legenda, etc.)

Utilize a ferramenta de seleção retangular (tecla r) para selecionar toda a área onde se encontra as escalas e a numeração → delete.

Obs: Caso identifique a presença de sombras (partes escuras) nas margens selecione e delete essas sombras pois podem atrapalhar a análise das imagens.

4. Desenhar o contorno de cada folha.

Delimite todo o conjunto de 20 folhas para cada espécies. Clique no lápis no painel de ferramentas do lado esquerdo da tela (atalho tecla “n”) → no painel de configurações que

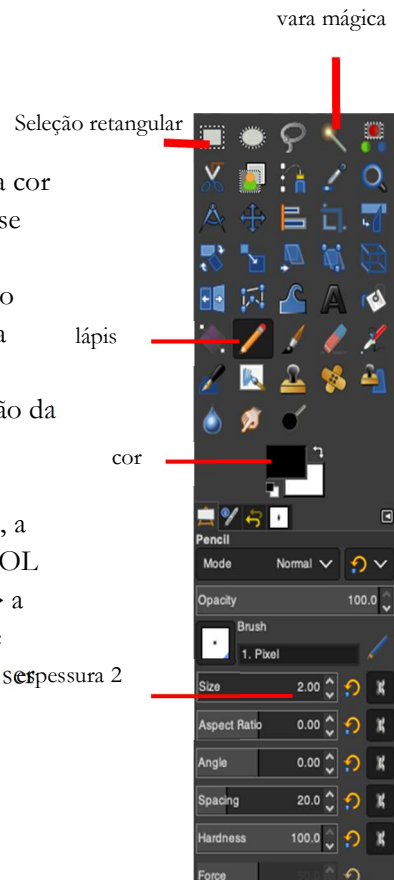
aparece logo abaixo das ferramentas selecione a cor preta → e a espessura do lápis “size” deverá ser sempre igual a 2 → então desenhe as delimitações da folha.

Obs: exclua o pecíolo de todas as folhas.

ANOTE O TEMPO GASTO NESTA ETAPA

T1 = tempo gasto para completar herbivoria (para cada espécie, ou seja, para cada conjunto de 20 folhas).

- NUNCA altere o tamanho original da imagem
- Use o CONTROL + RODA DO MOUSE para dar zoom
- Use as outras folhas como referência para o desenho
- Use CONTROL + Z para desfazer qualquer erro
- Caso tenha alguma coisa indesejada na foto (sujeira) troque a cor do lápis para branco, aumente a espessura caso necessário e use como borracha (a cor branca não é lida pelo programa)
- Vamos considerar qualquer deformidade da folha como dano
- Caso a folha tenha dobrado, tente completar a parte dobrada usando o lápis (aumente a espessura nesse caso).
- Caso perceba danos causados pela prensagem ou manipulação da folha, tais como rachaduras, corrija usando o lápis preto.
- Caso não seja possível criar delimitações separadas entre as folhas, pois a delimitação de uma folha se sobreponha a outra, a folha em questão deve ser selecionada → recortada (CONTROL + X) → um novo documento criado → CONTROL + N → a folha recortada deve então ser colada (CONTROL + V) nesse novo documento e só então o desenho das delimitações deve ser feito.



#Etapa 2

#Exportando a imagem

1. Exporte a imagem

Exportar a **imagem colorida**. Clique no botão direito → “File” → “Export as...” (atalho CONTROL + SHIFT + E) → modifique o nome da foto seguindo o modelo:

nomedaplanta.identificação(letra)daprancha.color.png

EX: **Bforticata.A.color**.png

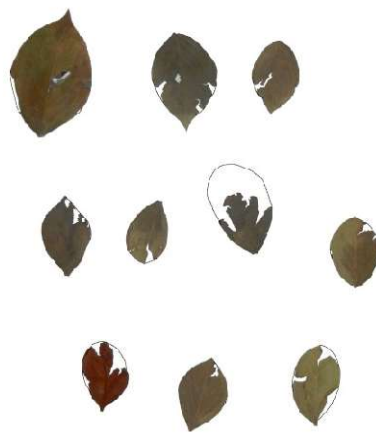
Crie uma nova pasta com o nome **plants.color** clicando em “Create Folder”, caso ainda não exista → Escolha a pasta, clique “Export” → Na caixa de configurações que vai aparecer deixe apenas “Salve resolution” e “salve color profile” marcados → clique em export. Confira se o arquivo foi salvo corretamente.

obs: Salve sempre em .png

obs2: O nome do arquivo não deve conter espaços, use apenas “_”.

obs3: salve todas as imagens das pranchas (completas e coloridas) nesta pasta.

Exemplo:



ANOTE O TEMPO GASTO NESTA ETAPA

T2 = tempo gasto para exportar a(s) imagem(s) coloridas de cada espécie, ou seja, para cada conjunto de 20 folhas). Em algumas espécies, com folhas maiores, teremos mais de uma prancha. Então, anote o tempo total gasto para exportar todas as pranchas por espécie.

#Etapa 3

#Imagem Black/White (conjunto de 20 folhas, 1 ou mais pranchas por espécie)

2. Coloque todas as folhas em Preto/branco.

Utilizando a imagem que já foi processada → clique com o botão direito → cores → Threshold → clique em spreadview e arraste a linha para conferir as áreas herbivoradas e os limites da folha → caso seja necessário, aumente ou diminua o limiar do threshold.

3. Exporte a imagem

Exportar a imagem Black/white. Clique no botão direito → “File” → “Export as...” (atalho CONTROL + SHIFT + E) → modifique o nome da imagem seguindo o modelo:

`nomedaplanta.identificação(letra)daprancha.BW.png`

EX: `Bforticata.A.BW.png`

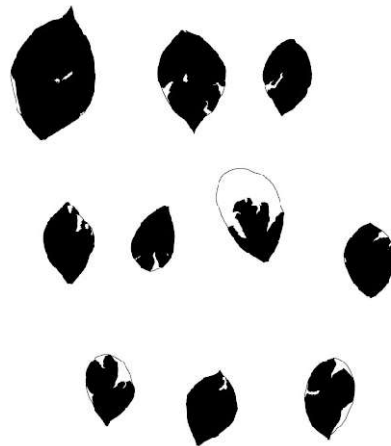
Crie uma nova pasta com **plants.BW** clicando em “Create Folder”, caso ainda não exista → Escolha a pasta, clique “Export” → Na caixa de configurações que vai aparecer deixe apenas “Salve resolution” e “salve color profile” marcados → clique em export. Confira se o arquivo foi salvo corretamente.

obs: Salve sempre em .png

obs2: O nome do arquivo não deve conter espaços, use apenas “_”.

obs3: salve todas as imagens (completas e em preto/branco) nesta pasta.

Exemplo:



ANOTE O TEMPO GASTO NESTA ETAPA

T3 = tempo gasto para exportar a(s) imagem(s) em P/B de cada espécie, ou seja, para cada conjunto de 20 folhas. Em algumas espécies, com folhas maiores, teremos mais de uma prancha. Então, anote o tempo total gasto para exportar todas as pranchas por espécie.

#Etapa 4

#Uma folha por imagem (colorida, 20 imagens por espécie)

4. Volte na imagem colorida (Control+Z)

5. Ordem de processamento das folhas.

Sequencie as folhas de 1 a 20, sempre da esquerda para direita e de cima para baixo.



6. Salve cada uma das folhas em imagens separadas.

Utilize a ferramenta de seleção retangular (tecla r) para selecionar a folha 1 → Ctrl + X para recortar
 → Ctrl + N para gerar um novo arquivo (nesta etapa confira se o tamanho/pixels do novo arquivo está de acordo com o arquivo original) → Ctrl + V para colar

7. Exporte a imagem

Exportar a **imagem colorida**. Clique no botão direito → “File” → “Export as...” (atalho CONTROL + SHIFT + E) → modifique o nome da foto seguindo o modelo:

nomedaplanta.númerodafolha.color.png

EX: **Bforticata.1.color.png**

Crie uma nova pasta com o **nomedaplanta.leaves.color** clicando em “Create Folder”, caso ainda não exista → Escolha a pasta, clique “Export” → Na caixa de configurações que vai aparecer deixe apenas “Salve resolution” e “salve color profile” marcados → clique em export.

obs: Salve sempre em .png

obs2: O nome do arquivo não deve conter espaços, use apenas “_”.

obs3: salve todas as imagens (completas e coloridas) nesta pasta.

8. Repita o processo acima (passos 8 e 9) para as demais folhas (total = 20 folhas por espécie).

ANOTE O TEMPO GASTO NESTA ETAPA

T4 = tempo gasto para exportar as 20 imagens coloridas de cada espécie.

#Etapa 5

#Uma folha por imagem (Preto/branco, 20 imagens por espécie)

9. Volte nas imagens salva no passo 12, e coloque todas as 20 folhas em Preto/branco.

Utilize as imagens que já foram processadas individualmente → volte na imagem 1 (nomedaplanta.1.color.png) → clique com o botão direito → cores → Threshold → clique em spreadview e arraste a linha para conferir as áreas herbivoradas e os limites da folha → caso seja necessário, aumente ou diminua o limiar do threshold. Repita este processo para as 20 folhas.

10. Exporte a imagem

Exportar a imagem em preto/branco. Clique no botão direito → “File” → “Export as...” (atalho CONTROL + SHIFT + E) → modifique o nome da foto seguindo o modelo:

nomedaplanta.númerodafolha. B/W.png

EX: Bforticata.1B/W.png

Crie uma nova pasta com o **nome da planta.leaves.BW** clicando em “Create Folder”, caso ainda não exista → Escolha a pasta, clique “Export” → Na caixa de configurações que vai aparecer deixe apenas “Salve resolution” e “salve color profile” marcados → clique em export.

obs: Salve sempre em .png

obs2: O nome do arquivo não deve conter espaços, use apenas “_”.

obs3: salve todas as imagens (completas e em preto/branco) nesta pasta.

11. Repita o processo acima (passos 11 e 12) para as demais folhas (total = 20 folhas por espécie).

ANOTE O TEMPO GASTO NESTA ETAPA

T5 = tempo gasto para exportar as 20 imagens em preto e branco de cada espécie.

Lista de atalhos do teclado úteis

- E = Ferramenta de seleção elíptica
- R = Ferramenta de seleção retangular
- F = Ferramenta de seleção simples
- N = Lápis
- CONTROL + RODA DO MOUSE = zoom in e zoom out
- CONTROL + Z = Desfazer
- CONTROL + O = abrir arquivo
- CONTROL + X = Recortar
- CONTROL + V = Colar
- CONTROL + N = Nova aba de trabalho
- CONTROL + A = Selecionar tudo (uma ferramenta de seleção deve estar selecionada)
- CONTROL + SHIFT + E = exportar como

***Você pode criar um novo atalho do teclado para abrir a ferramenta de threshold e deixar a imagem preto e branco de maneira mais rápida:**

Menu > Editar > Atalhos de teclado, abrirá uma janela com todas as teclas de atalho do programa > digite Threshold > clique sobre a palavra desativado > aperte as teclas que você deseja utilizar para essa função (ex: pressione Control + T). Assim, toda vez que precisar utilizar o threshold basta apertar control+T.