

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – BOT**

**Descrição da Arquitetura foliar e Análise Morfométrica
das folhas de *Spathicarpa* Hook. (Araceae).**

LUCIANO COELHO MILHOMENS FONSÊCA

Brasília
2006

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA – BOT

**Descrição da Arquitetura foliar e Análise Morfométrica
das folhas de *Spathicarpa* Hook. (Araceae).**

Luciano Coêlho Milhomens Fonsêca

Orientadora: Carolyn Elinore Barnes Proença, Ph. D.

Dissertação apresentada ao Departamento
de Botânica do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em
Botânica.

Brasília
Abril, 2006

**Descrição da Arquitetura foliar e Análise Morfométrica
das folhas de *Spathicarpa* Hook. (Araceae).**

Aprovada por:

Dra. Carolyn Elinore Barnes Proença
Departamento de Botânica - IB/BOT
Universidade de Brasília - UnB
Presidente da Banca Examinadora
(Orientadora)

Dra. Lúcia Helena Soares e Silva
Departamento de Botânica - IB/BOT
Universidade de Brasília - UnB
Membro Titular da Banca Examinadora

Dra. Rosana Tidon Franco
Departamento de Genética e Morfologia – IB/GEM
Universidade de Brasília - UnB
Membro Titular da Banca Examinadora

Dr. Eduardo Gomes Gonçalves
Centro de Ciências da Educação e Humanidades - CCEH
Universidade Católica de Brasília – UCB
Membro Suplente da Banca Examinadora

Brasília, 20 de abril de 2006.

O homem se torna muitas vezes o que ele acredita que é. Se eu insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que eu acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo.

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Agradeço,

Aos meus pais (Panso e Pê). Amo vocês. Obrigado!

Ao Qüífede e Rogério, também amo vocês. Obrigado!

À “Minha” Dani, amo muito você. Obrigado!

E ao meu amigo Chien (o Abú). Amo você, obrigado!

À Carol, antes de tudo minha grande amiga. Obrigado por acreditar sempre em mim e me ensinar a “nobre e linda arte de encaixotar o vento”.

Ao Eduardo, mentor deste plano maluco e genial. Obrigado, muito obrigado. Sem dúvida, o mico astronauta conseguiu aprender a tirar coco.

À Lúcia e à Graça minhas queridas “professoramigas”. Aprendi bastante com vocês. Obrigado pela companhia ao longo destes anos.

À Dalva, à Eneida, ao Luiz e a todo pessoal do Laboratório de Anatomia Vegetal. Muito obrigado pela amizade e sempre prestimosa acolhida.

Ao Augusto (o devorador de problemas da Pós), a Lourdes e a todo pessoal do Laboratório de Fisiologia. Obrigado.

Ao Fabian, o Fábio e todo pessoal da “Terra do Panda”.

À Rosana pela sempre prestimosa atenção e auxílio. A morfometria é legal, né? Obrigado.

Tratei todos os professores pelo que são: meus amigos.

Aos meus amigos de curso: José Paulo (baiano, gente boa, o cara que eu chamaria para fotografar cortes anatômicos), Paulo (grande pessoa, imbatível consumidor de café),

Eduardo (o cavaleiro que enfrentou o dragão graminorubiásico e um grande fornecedor de jóias guloséimicas), Floriano (sem dúvida o mais aplicado taxonomista de sua geração) Janayna (pessoa incrível capaz de domar mares de batatas fritas de isopor) e Camila (manipuladora de raios gama que nunca assistiu o Senhor dos Anéis).

Ao João (“o João”, gosto musical impecável e dono de tiradas clínicas), Andresa (que pegou os sapatos da bruxa-do-norte), Ellen (que pegou o magneto do irmão enquanto ele dormia), Luciana (capaz de comer um x-bomba), Stefano (Stafano ou Etevaldo, meu ninja lindo), Denise (as baquetas mais rápidas do oeste), Cris (isolada da civilização, cuja mãe faz os melhores biscoitos de queijo), Silvia (outra doida que cozinha folhas na soda), Emanuel (eliminou o crack das futuras tortas de maracujá), Íris (presa tantas vezes nos calabouços da Pós) e Murilo (“pescador IRGA” goiano de gosto musical duvidoso, exilado no IBGE).

À Michelle (sempre com fome), Prof. George (a quem muitas vezes servi de tradutor e que não perde uma hora do lanche), Nalva (cuja filha todo mês faz aniversário), Iriode (paraquedista com uma pereba nas costas e duas alianças de crisma), Dani (que nunca está com fome), Miguel (o aprendiz de Jedi do celular inquebrável) e a Vivi (incrível vizinha do Iriode).

Aos meus queridos amigos e professores que fugiam e me deixavam sem jaleco, José Aires e José do Carmo, com os quais aprendi muito. Obrigado pelos grandes momentos que passei no Herbário. Se um dia você for ao herbário procure por eles. À Josemília obrigado pelos momentos divertidos e por toda ajuda. Você é uma pessoa incrível (mas a Laura não é). Obrigados pelos almoços, conseguidos às custas de muita reclamação (ela não sabe cozinhar, mas as irmãs sabem). E ao Vando, motorista da corrida maluca que eu nunca consegui atolar.

Às minhas amigas: Suzi (querida companhia que quando podia, era cinéfila de fim-de-semana), Andrea (uma de minhas internas prediletas que me mostrou o “shopping”), Dulce (fantástica pessoa de idéias incríveis que sempre escutou as doideras que eu inventava e

dava o maior apoio), Renata (que não acha seu disco voador; uma pessoa maravilhosa como ela realmente pertence a outro planeta).

Agradeço especialmente à Van pelas dicas culinárias e de etiqueta. Sem você eu nunca saberia o que era um twinset e nem que existia uma barbie chocolate. Ela não é patilene (Josemília, comunicação pessoal) como parece. Eu poderia falar coisas mais sérias de você, mas não iria ficar divertido e se eu tivesse que contar cada momento singular que compartilhamos os Agradecimentos ficariam enormes. Pode me chamar de murrinha, tá!

Agradeço especialmente à Bia. Você é incrível. Acredite em você. Eu acredito de olhos fechados. Quando você aparecer no Faustão terei grande honra em dizer que conheço você. Isso não vai demorar. Outra coisa: nunca deixe de comer miojos sabor “tudo que tinha na geladeira”.

Agradeço especialmente à Si. Foi muito divertido tecer comentários sobre a filogenia dos buracos com você. Hoje em dia nem chove mais quando saímos do herbário, né?. Você é fantástica. Obrigado pelas fotos. Sem seu olho clínico minha empreitada maluca não teria dado certo. Mais uma coisa: sempre que você quiser comer alguma bugiganga láctica eu distraio a Van.

Ao senhor Herbário pela acolhida de tantos belos anos. Muito obrigado.

Agora, alguns agradecimentos técnicos: à Prefeitura do *Campus* pelo auxílio com as lâminas; ao Edgar e ao Lorenzi pela acolhida e ajuda indispensável em Nova Odessa.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por bancar projetos malucos como o meu. Continuem acreditando no amanhã. Muito obrigado.

Amo todos vocês!

Índice

Resumo	x
Abstract	xi
Capítulo 1 – Descrição da arquitetura foliar de <i>Spathicarpa</i> Hook. (Araceae)	1
Introdução	2
Material e Métodos	4
Resultados	7
Descrição do padrão foliar de <i>Spathicarpa</i>	7
1. <i>Spathicarpa gardneri</i> Schott	7
2. <i>Spathicarpa hastifolia</i> Hook.	7
3. <i>Spathicarpa lanceolata</i> Engl.	8
4. <i>Spathicarpa sagittifolia</i> Schott ...	9
Chave para as espécies de <i>Spathicarpa</i> baseada em arquitetura foliar	11
Discussão	11
Técnica de Diafanização	11
Arquitetura foliar de <i>Spathicarpa</i>	12
Presença de lóbulos	14
Considerações finais	15
Referências Bibliográficas	16
Capítulo 2 – Análise Morfométrica das folhas de <i>Spathicarpa</i> Hook. (Araceae)	20
Introdução	21
Material e Métodos	24
Material estudado	24
Aquisição das imagens dos contornos	26
Análise Elíptica de Fourier	26
Análise Estatística	27
Análise de validação estatística	29
Resultados e Discussão.....	30
Análise Multivariada de Variância - MANOVA	30
Análise de Componentes Principais – ACP	31
Análise Discriminante	33
Análise de Agrupamento	35
Considerações finais	38
Referências Bibliográficas	41

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Padrões de venação em <i>Spathicarpa</i> Hook.	10
--	----

Capítulo 2

Figura 1. Fragmento do cladograma de consenso da tribo Spathicarpeae, baseado na combinação dos dois marcadores moleculares (trnL-F e matK) com os dados fenotípicos, utilizando o método bayesiano.	23
Figura 2. Gráfico de dispersão formado pelos dois primeiros componentes principais (PC1 x PC2) ...	32
Figura 3. Gráfico da Análise Discriminante formado pelos escores dos contornos foliares de <i>Spathicarpa</i> ...	34
Figura 4. Análise de Agrupamento das folhas de <i>Spathicarpa</i> Hook.	37
Figura 5. Variação morfológica “panorâmica” das folhas de <i>Spathicarpa</i> Hook. ...	40

Índice de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Lista dos acessos utilizados na Análise Elíptica de Fourier das folhas de <i>Spathicarpa</i> Hook.	25
Tabela 2. Arranjo da matriz de coeficientes normalizados, obtida pela Análise Elíptica de Fourier.	28
Tabela 3. Resultados do Teste de Significância para a Análise Multivariada de Variância – MANOVA.	30
Tabela 4. Autovalores (Eigenvalues) e contribuição dos componentes principais efetivos.	31

Resumo

A morfologia das folhas sempre desempenhou papel importante na taxonomia vegetal, particularmente, representando uma possibilidade de auxílio no reconhecimento de grupos taxonômicos definidos, predominantemente, com base em caracteres reprodutivos como o gênero *Spathicarpa* Hook. (Araceae). O presente estudo teve como objetivos: descrever o padrão de arquitetura foliar e caracterizar, segundo aspectos morfométricos, utilizando a Análise Elíptica de Fourier, as folhas de *Spathicarpa gardneri* Schott, *S. hastifolia* Hook., *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott, visando características diagnósticas vegetativas para o gênero. Foram amostradas 48 folhas pertencentes a *Spathicarpa gardneri*, 54 a *S. hastifolia*, 48 a *S. lanceolata* e 35 folhas de *S. sagittifolia*, todas retiradas de nove acessos diferentes, totalizando 185 folhas amostradas. Em linhas gerais, a técnica de diafanização consistiu inicialmente em submeter folhas frescas, estocadas em álcool etílico 70% com detergente comercial, ao hidróxido de sódio (5%) e hipoclorito de sódio (5%) para clareamento e alvejamento, respectivamente. Em seguida, estas passaram por uma bateria de desidratação etanólica crescente (10 a 100%) e por uma série com xileno (xileno-etanol 100% 1:1 e xileno). Foram então coradas com safranina e colocadas novamente em xileno-etanol 100% 1:1 para diferenciar. Para a Análise Elíptica de Fourier, os contornos foliares foram reconstruídos digitalmente através de 20 harmônicas. Os coeficientes normalizados obtidos foram tratados como variáveis capazes de representar o contorno das 185 folhas em um espaço bidimensional, bem como as variações potenciais da forma existentes. Estas variáveis foram testadas estatisticamente através de análises multivariadas. Das quatro espécies estudadas, somente *S. lanceolata* apresenta características foliares diagnósticas, não sendo possível diferenciar, com base na arquitetura das folhas nem através da Análise Elíptica de Fourier dos contornos foliares, as demais espécies.

Palavras-chave: “Técnica de diafanização”, “Arquitetura foliar”, lóbulos, morfometria, “Análise Elíptica de Fourier”

Abstract

The study of leaf morphology has always played a significant role in plant taxonomy, especially in the identification of taxa which are defined by reproductive characteristics such as genus *Spathicarpa* Hook. (Araceae). The present study has as its objective: to describe leaf architecture patterns and to characterize by morphometric methods the leaves of *Spathicarpa gardneri* Schott, *S. hastifolia* Hook., *S. lanceolata* Engl. and *S. sagittifolia* Schott in a search for vegetative taxonomically diagnostic characters in the genus. A total of 185 specimens were sampled, 48 of *S. gardneri*, 54 of *S. gardneri*, 48 of *S. lanceolata*, and 35 of *S. sagittifolia*, collected from 9 different accessions growing under the same environmental conditions. Along general lines, the successful leaf clearing technique developed involved initially maintaining leaves in ethyl alcohol 70% with commercial detergent, sodium hydroxide (5%) and sodium hypochloride for clearing and whitening, respectively. The leaves were then run through a dehydration ethanol series (10 to 100%) and through a xylene series (xylene-ethanol 100% 1:1 and xylene). As a last step, leaves were died with safranin and then put again into xylene-ethanol 100% 1:1 to differentiate. Leaf contours were digitally reconstructed using Fourier elliptic analysis with 20 harmonics. The normalized coefficients obtained were treated as variables capable of representing the contour of the 185 leaves in bidimensional space, as well as potential leaf contour variation. These variables were treated statistically by multivariate analysis. Amongst the four species treated, only *S. lanceolata* presents diagnostic leaf characteristics. It is not possible to differentiate, neither on the basis of leaf architecture nor Fourier elliptic analysis of leaf contours, amongst the remaining three species. These results show that morphological circumscription of species *S. gardneri*, *S. hastifolia* and *S. sagittifolia* based on leaf characters is not possible.

Key words: “Technique for leaf clearing”, “leaf architecture”, lobules, morphometrics, “Elliptic Fourier Analysis”

Capítulo 1

Descrição da arquitetura foliar de *Spathicarpa* Hook. (Araceae)

Introdução

As folhas são, tipicamente, estruturas simétricas bilateralmente achatadas, oriundas das células laterais do meristema apical do caule (HARPER & FREELING, 1996) em um padrão característico que varia com a espécie. Exibem variados graus de complexidade, distribuídos entre estruturas simples e altamente subdivididas (SINHA, 1999) e podem diferir não somente entre indivíduos de uma mesma população, mas dentro da mesma planta. (MCCAULEY & EVERT, 1988; SMITH & HAKE, 1992).

A morfologia das folhas sempre desempenhou papel importante na sistemática vegetal como um todo, particularmente para caracterizar e identificar *taxa* onde a variação nas estruturas florais não é informativa (STACE, 1989). As características foliares também podem ser utilizadas em estudos evolutivos, sendo consideradas tão úteis quanto características florais, morfologia do pólen e a maioria das características anatômicas utilizadas tradicionalmente na sistemática (HICKEY & TAYLOR, 1991).

A caracterização da arquitetura das folhas de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, no que diz respeito à forma e outros elementos ligados à expressão da estrutura foliar, como a venação, tem se desenvolvido como resultado de uma pesquisa profunda visando a identificação de fósseis (HICKEY, 1973). A incorporação deste sistema na corrente sistemática representou grande avanço nas possibilidades de classificação e diferenciação de grupos problemáticos (LEAF ARCHITECTURE WORKING GROUP, 1999).

A compreensão da arquitetura das folhas, através da diafanização⁵, pode fornecer importantes subsídios taxonômicos, correntemente utilizados por diversos autores. DICKINSON (1987) estudou a morfologia e a anatomia das Staphyleaceae. HERSHKOVITZ (1992) utilizou a morfologia foliar para propor que *Cistanthe tweedyi* permaneça em *Cistanthe*, rejeitando sua transferência para *Lewisia* (Portulacaceae). DEDE (1962) estudou 80 gêneros de Rutaceae, apresentando sete tipos de venação básicos baseados na relação espacial existente entre o padrão de venação e as cavidades secretoras. HICKEY & TAYLOR (1991) forneceram uma

⁵ A diafanização consiste em tratar amostras biológicas de modo a torná-las semitransparentes. É muito utilizada no estudo da venação, epidermes, estruturas reprodutoras, etc. Existem diferentes metodologias para a diafanização de folhas que variam enormemente, desde os reagentes utilizados para alvejamento (misturas que degradam diversos compostos, como por exemplo pigmentos, entre outros), à duração da etapa de desidratação (retirada da água dos tecidos, empregando-se, em geral, soluções alcoólicas crescentes), e com relação ao meio de montagem (KRAUS & ARDUIN, 1997).

concisa e acurada descrição da arquitetura foliar de *Ticodendron* (Ticodendraceae), além de inferirem um padrão evolutivo e postularem relacionamentos filogenéticos com algumas famílias e gêneros próximos.

As folhas das Araceae são, comumente, descritas com base em particularidades da forma da folha, das bainhas e dos pecíolos (GONÇALVES, 1997 e GONÇALVES, 2002), mas outras abordagens foram utilizadas por outros autores. RAY (1987a, 1987b e 1988) classifica os tipos foliares com base em seu relacionamento com a organização dos ramos, ou seja, os termos aplicados não descrevem aspectos da folha, mas características dos caules e de como estas folhas estão inseridas. MURATA *et al.* (1990), considerando a organização dos ramos (filotaxia, posição relativa das folhas e catafilos e padrões de alongamento) e peculiaridades na ramificação e na produção das folhagens e das inflorescências, além do número de cromossomos, propõe mudanças na classificação do gênero *Typhonium*.

Além disso, as Araceae apresentam acentuado polimorfismo foliar. RAY (1987b) reconhece dois ciclos de produção de folhas morfologicamente distintas (heterofilia) em *Syngonium*. RAY (1990), estudando os padrões de desenvolvimento das folhas, apresenta aspectos de produção foliar relacionados com isomorfia, alomorfia e metamorfose, neste último ressaltando a ocorrência de abrupta mudança na forma foliar.

Assim, Araceae é uma família na qual são evidentes padrões elaborados de desenvolvimento dos ramos e produção das folhas, tendo estes reais implicações taxonômicas. Porém, são necessários mais estudos voltados para a morfologia foliar, sobretudo, sobre a arquitetura foliar que pode ocasionar avanços nas possibilidades de classificação e diferenciação de grupos problemáticos, notoriamente presentes em Araceae.

Ressalta-se ainda a dificuldade de identificação das espécies de Araceae somente com critérios vegetativos, pois as características diagnósticas são muitas vezes florais, sendo necessário, até mesmo, o cultivo até o florescimento para uma adequada determinação (CROAT, 1985).

A tribo Spathicarpeae, restrita à América do Sul, representa um dos grupos mais pobremente compreendido dentro das Araceae. Oito gêneros têm sido reconhecidos na Tribo: *Asterostigma* Fisch. & C.A. Mey., *Gearum* N.E.Br., *Gorgonidium* Schott, *Mangonia* Schott, *Spathanthium* Schott, *Spathicarpa* Hook., *Synandropadix* Engl. e *Taccarum* Brongn. *ex* Schott (GONÇALVES, 2002).

O gênero *Spathicarpa* é amplamente distribuído no Brasil extra-amazônico, ocorrendo do Ceará ao Rio Grande do Sul, além da Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia, em altitudes de 0 a 1100m. É composto, em sua maioria, por ervas geófitas, crescendo em solos bem drenados e por uma espécie helofítica (*Spathicarpa lanceolata* Engl.), que ocorre em banhados no sul do Brasil e Paraguai (GONÇALVES, 2002).

GONÇALVES (2002) utilizou dois marcadores moleculares (trnL-F e matK), uma matriz fenotípica e combinações destes para construir um cladograma da Tribo Spathicarpeae. O clado contendo o gênero *Spathicarpa* apresenta-se monofilético, com quatro espécies reconhecíveis: *S. gardneri* Schott, *S. hastifolia* Hook., *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott.

Porém, apesar de distintas do ponto de vista molecular, quanto à descrição morfológica destas quatro espécies, GONÇALVES (2002), sobretudo considerando os aspectos vegetativos, apresentou algumas considerações importantes: *S. hastifolia* é uma espécie de grande polimorfismo foliar, fato que causa dificuldades de circunscrição da espécie, principalmente com relação a *S. gardneri* e *S. sagittifolia*. *Spathicarpa lanceolata* parece ser uma espécie bem distinta dentro do gênero, tanto do ponto de vista morfológico, quanto ecológico.

O presente trabalho tem como objetivos: apresentar um método eficiente para diafanização de folhas similares as de *Spathicarpa*; descrever o padrão de venação das folhas de *Spathicarpa gardneri*, *S. hastifolia*, *S. lanceolata* e de *S. sagittifolia*; e testar a utilização da arquitetura foliar de *Spathicarpa* como ferramenta taxonômica capaz de fornecer características diagnósticas vegetativas entre estas quatro espécies.

Material e Métodos

As folhas de *Spathicarpa gardneri* Schott, *S. hastifolia* Hook., *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott foram coletadas de amostras cultivadas, localizadas no Instituto Plantarum, em Nova Odessa, São Paulo (47°19'51''W e 22°47'20''S). A temperatura média anual é de 26°C, oscilando entre a mínima de 10°C e máxima de 35°C. A umidade relativa média é de 76% e a precipitação pluviométrica é de 1.317 mm/ano. A altitude média é de 540m.

A prática de diafanização foi realizada no Herbário da Universidade de Brasília (UB). Para cada uma das quatro espécies, foram retiradas folhas consideradas maduras, ou seja, plenamente desenvolvidas, estando estas, em sua maioria, intactas e sem ferimentos. Foram diafanizadas 48 folhas pertencentes a *Spathicarpa gardneri*, 54 a *S. hastifolia*, 48 a *S. lanceolata* e 35 folhas de *S. sagittifolia*, totalizando 185 folhas amostradas. As folhas foram diafanizadas inteiras para que não ocorresse qualquer distorção da venação ou da forma da folha como um todo, decorrente do processo de montagem de pedaços.

A técnica de diafanização adotada (e descrita a seguir) foi uma modificação da proposta por SHOBE & LERSTEN (1967), na qual, em linhas gerais, ao álcool etílico foi adicionado detergente comercial (lava-louças, princípios ativos: ácido sulfônico e lauril éter sulfato de sódio) e o cloral hidratado foi substituído por hipoclorito de sódio, além de não ser utilizado o corante *fast green*. Assim, a técnica utilizada no presente estudo consistiu em:

- Estocar folhas frescas em álcool etílico 70% com cerca de 5-10ml de detergente comercial (lava-louças), até que os pigmentos sejam completamente ou parcialmente retirados (período de 25 a 60 dias);
- Retirar da solução; lavar em água destilada até a completa remoção do fixador e do detergente (3 trocas, 10 min cada);
- Colocar em solução de soda, utilizando bandejas plásticas de tamanho suficiente para manter as folhas inteiras estendidas, contendo hidróxido de sódio 5% por um período de 8 a 12 horas⁶;
- Após este período, retirar da solução; lavar as folhas em água destilada (novamente, 3 trocas, 10 min cada);
- Colocar as folhas em bandejas plásticas contendo solução de Hipoclorito de Sódio a 5% (Água sanitária comercial; cerca de 2% de cloro ativo) por 6 a 12 horas;
- Lavar em água destilada (3 trocas, 10 min cada);
- Desidratar em série etanólica crescente (10, 30, 50, 70, 90 e 100%; 1 hora cada); entre as trocas de álcool o material deve passar diretamente de solução para solução;
- Passar em xileno-etanol 100% 1:1 (2 horas);

- Corar de 10-20 segundos com safranina (1%);
- Diferenciar o material por cerca de 72 horas em xileno-etanol 100% 1:1; e finalmente
- Passar em xileno (1 hora);

Cada folha diafanizada foi montada em lâminas de vidro temporárias. A montagem em duas lâminas foi utilizada para prevenir eventuais distorções dimensionais na posterior aquisição das imagens, estando as amostras, após a secagem, basicamente, planificadas. As lâminas foram secas em estufa a 45°C por cerca de 36 horas. Algumas lâminas permanentes foram feitas utilizando verniz acrílico da Acrilex que apresenta boa transparência, custo bastante reduzido, porém secagem lenta.

As lâminas montadas foram fotografadas digitalmente, em diferentes níveis de detalhamento (folha inteira e porções menores para evidenciar padrões acurados na venação) utilizando uma câmera SONY Cyber Shot, Modelo DSC-P200 com resolução de 7.2 MegaPixels. As fotografias foram tiradas na maior resolução, manualmente, com a câmera posicionada ortogonalmente às lâminas de vidro, deste modo, reduzindo distorções no real posicionamento das nervuras e na forma das folhas como um todo (ROHLF, 2003). Algumas destas fotografias foram tratadas, digitalmente, com o auxílio do programa computacional PHOTOSHOP 6.0 (ADOBE SYSTEMS CORP., 2002).

Para a descrição e classificação dos padrões de nervação foi utilizado o Manual of Leaf Architecture (LEAF ARCHITECTURE WORKING GROUP, 1999) do Instituto Smithsonian, além de alguns padrões propostos por HICKEY (1973).

⁶ O Hidróxido de sódio apresenta base higroscópica, devendo ser armazenado em recipientes plásticos. Alerta: deve ser colocado aos poucos em água; NUNCA INVERTER A ORDEM! (KRAUS & ARDUIN, 1997).

Resultados

Descrição do padrão foliar de *Spathicarpa*

1. *Spathicarpa gardneri* Schott (Fig. 1; A e H).

Folha simples, peciolada, ovada, obovada, elíptica ou lanceolada, raramente hastada, algo assimétrica, membranácea a cartácea. **Pecíolo** verde claro, cilíndrico a levemente achatado, algo canaliculado, inserido marginalmente. **Lâmina** verde fosco adaxialmente, mais clara e brilhante abaxialmente, freqüentemente com manchas argêntas, em padrão variado; *marginis* inteiras; *base* obtusa, truncada, cordada, sagitada ou hastada, por vezes assimétrica, *ápice* curto acuminado. **Venação** pinada, algo campilodrifforme, camptódroma, broquidódroma, com nervuras até a quarta ordem; *nervuras secundárias* 5 a 7 pares, adaxialmente impressas e proeminentes abaxialmente, mais próximas entre si na porção basal, com os ângulos de divergência variando entre 25° e 100° no último par basal; *nervuras intersecundárias* predominantemente exmediais, ocorrentes, sobretudo, na porção central da lâmina; *nervuras terciárias* sinuosas, reticuladas em polígonos regulares, ramificadas exmedialmente; *Nervuras quaternárias* reticuladas em polígonos regulares; *aréolas* bem desenvolvidas com 4 a 5 lados, em de 1 a 4 por mm²; *Vênulas* presentes ou ausentes, quando presentes predominantemente não ramificadas, raro ramificadas uma única vez; *nervura coletora* (ou fimbrial), presente ou não, formada pelas terminações das veias secundárias, ao se encontrarem na margem da folha em direção ao ápice.

Ecologia: Ocorre em áreas de caatinga, cerrado, florestas mesofíticas e em afloramentos calcários (GONÇALVES, 2002). É a única espécie do gênero a apresentar indivíduos de folhas variegadas.

2. *Spathicarpa hastifolia* Hook. (Fig. 1; B e F).

Folha simples, quase orbicular, longo-elíptica, sagitada, cordada, hastada a quase trilobada, às vezes assimétrica, membranácea. **Pecíolo** cilíndrico a levemente achatado, inserido marginalmente. **Lâmina** verde a verde escura adaxialmente, mais

clara abaxialmente; *margem* inteira; *base* obtusa, truncada, cordada, hastado a hastado-tripartida; *ápice* obtuso a longo acuminado. **Venação** pinada a suprabasal actinodrifome, camptódroma, broquidódroma a eucamptódroma, com nervuras até a quarta ordem; *nervuras secundárias* 5 a 8 pares, impressas adaxialmente, salientes abaxialmente, mais próximas entre si na porção basal, com os ângulos de divergência variando entre 25° e 120° no último par basal de algumas folhas hastado-lobadas ou hastado-tripartidas; *nervuras intersecundárias* são predominantemente exmediais; *nervuras terciárias* sinuosas, reticuladas em polígonos regulares, ramificadas exmedialmente; *nervuras quaternárias* reticuladas em polígonos regulares; *aréolas* bem desenvolvidas com 4 a 5 lados, em de 1 a 5 por mm²; *vênulas* presentes ou ausentes, quando presentes, predominantemente não estão ramificadas, raro ramificadas uma única vez; *nervura coletora* (ou fimbrial), presente ou não, formada pelas terminações das veias secundárias, ao se encontrarem na margem da folha em direção ao ápice.

Ecologia: Ocorre em solo bem drenado, em florestas decíduas ou semidecíduas, capões de mata e afloramentos calcários. É comum em áreas perturbadas de florestas, assim como áreas recém-abertas e roças (GONÇALVES, 2002).

3. *Spathicarpa lanceolata* Engl. (Fig. 1; C e E).

Folha simples, lanceolada, oblanceolada ou longo-elíptica, predominantemente simétrica, membranácea a subcoriácea. **Pecíolo** cilíndrico, inserido marginalmente. **Lâmina** verde claro adaxialmente, mais clara abaxialmente; *margem* inteira; *base* aguda a obtusa; *ápice* acuminado. **Venação** pinada, camptódroma, eucamptódroma, com nervuras até quarta ordem; *nervuras secundárias* 7 a 9 pares, proeminentes abaxialmente, sobretudo a nervura central; espaçadas uniformemente ao longo de toda a folha, com os ângulos de divergência variando entre 25° e 45° no último par basal; *nervuras intersecundárias* predominantemente exmediais; *nervuras terciárias* retas a algo sinuosas, em polígonos regulares formando retículos alongados longitudinalmente; ramificadas exmedialmente; *nervuras quaternárias* reticuladas em polígonos regulares alongados; *aréolas* algo desenvolvidas, comumente com 4 lados, podendo apresentar 5 lados, de 2 a 4 por mm²; *vênulas* não observadas por

dificuldades na coloração do material; *nervura coletora* (ou fimbrial), aparentemente, ausente.

Ecologia: Ocorre em áreas de banhados nos planaltos de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraguai. É a única espécie do gênero helofítica e com distribuição subtropical (GONÇALVES, 2002).

4. *Spathicarpa sagittifolia* Schott (Fig. 1; D e G).

Folha simples, sagitada, cordada, algumas vezes deltóide, às vezes assimétrica, membranácea a cartácea. **Pecíolo** cilíndrico a levemente achatado, algo canaliculado, inserido marginalmente. **Lâmina** verde brilhante adaxialmente, mais clara abaxialmente; *margem* inteira; *base* truncada, cordada ou sagitada; *ápice* curto acuminado. **Venação** pinada a suprabasal actinodrifforme, camptódroma, broquidódroma / eucamptódroma, com nervuras até a quarta ordem; *nervuras secundárias* 5 a 7 pares, levemente impressas adaxialmente, proeminentes abaxialmente, mais próximas entre si na porção basal, com os ângulos de divergência variando entre 30° e 100° no último par basal de algumas folhas bastante sagitadas; *nervuras intersecundárias* são predominantemente exmediais, evidentes, sobretudo, na porção central da lâmina; *nervuras terciárias* sinuosas, reticuladas em polígonos regulares, ramificadas exmedialmente; *nervuras quaternárias* reticuladas em polígonos regulares; *aréolas* bem desenvolvidas com 4 a 5 lados, em de 1 a 5 por mm²; *vênulas* presentes ou ausentes, quando presentes predominantemente não ramificadas, raro ramificadas uma única vez; *nervura coletora* (ou fimbrial), presente ou não, formada pelas terminações das veias secundárias, ao se encontrarem na margem da folha em direção ao ápice.

Ecologia: Espécie tipicamente tropical, ocorrendo em áreas da Mata Atlântica, sendo encontrada do Rio de Janeiro até a Bahia (GONÇALVES, 2002).

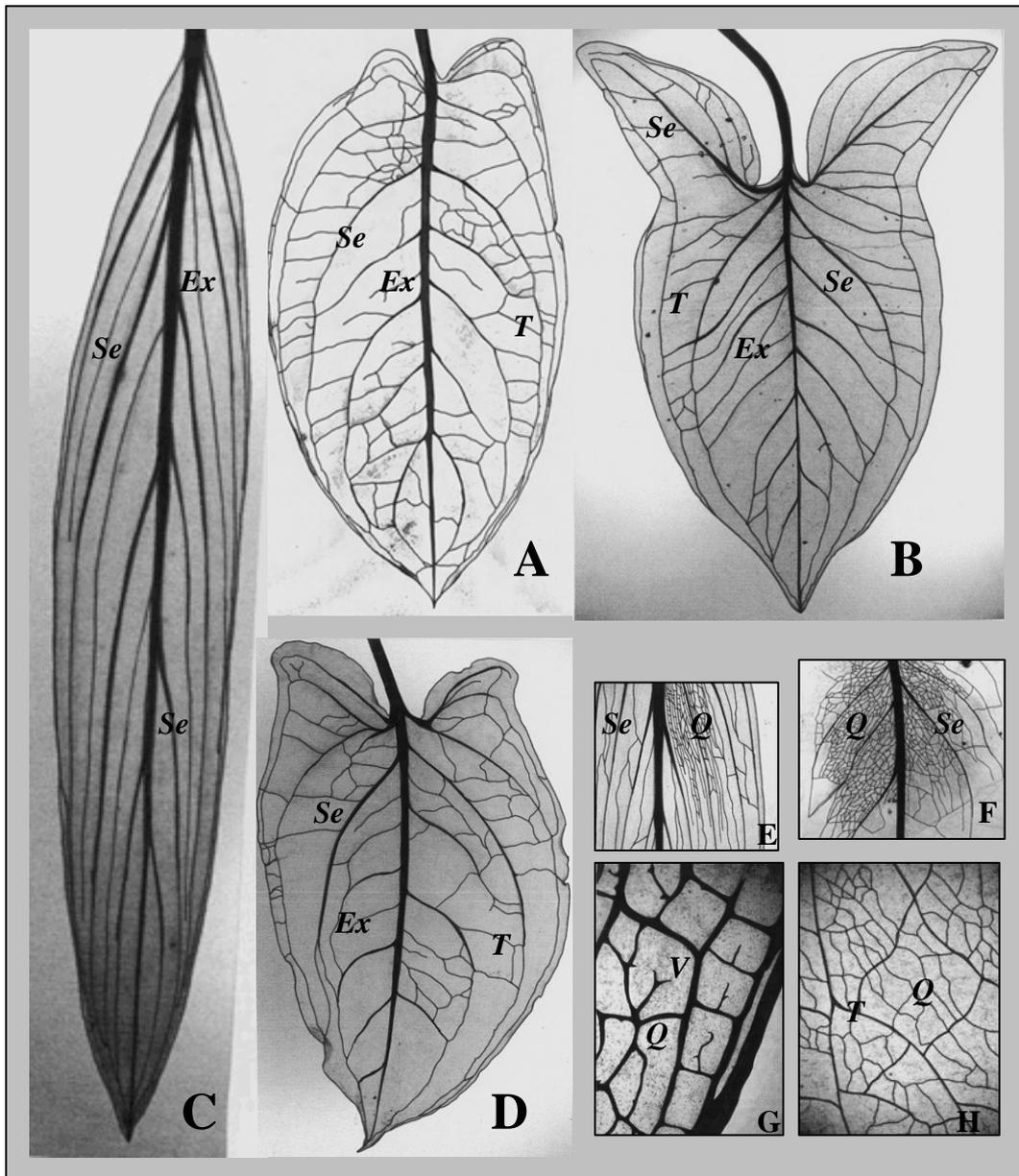


Figura 1. Padrões de venação em *Spathicarpa* Hook⁷. A. folha de *Spathicarpa gardneri* Schott; B. folha de *S. hastifolia* Hook.; C. folha de *S. lanceolata* Engl.; D. folha de *S. sagittifolia* Schott; E. detalhe da folha de *S. lanceolata*; F. detalhe de *S. hastifolia*; G. detalhe de *S. sagittifolia*; H. detalhe de *S. gardneri*. *Se*: nervuras secundárias; *T*: nervuras terciárias; *Q*: nervuras quaternárias; *Ex*: nervura exmedial; *V*: vênulas.

⁷ As folhas representadas na prancha são aquelas cuja forma e os padrões gerais de venação mais se repetem para cada espécie (algo como um “aspecto médio”), porém podem existir grandes variações

Chave para as espécies de *Spathicarpa* baseada em arquitetura foliar

1. Folha lanceolada ou estreito-elíptica; base sem lóbulos, aguda a obtusa 2
 2. Venação broquidódroma; nervuras secundárias 5-8 pares, mais próximas entre si na porção basal 3
 3. Manchas argêntneas comumente presentes na lâmina foliar **1. *S. gardneri***
 3. Manchas argêntneas nunca presentes na lâmina foliar **2. *S. hastifolia***
 2. Venação eucamptódroma; nervuras secundárias 5-9 pares, igualmente espaçadas entre si ao longo de toda a lâmina **3. *S. lanceolata***
1. Folha ovada, obovada, elípticas, cordadas, deltóides, trilobadas ou hastadas; base com ou sem lóbulos, raro obtusa, geralmente cordada, sagitada, hastada ou hastada-tripartida 4
 4. Folhas hastadas a hastado-tripartidas com ângulo de divergência entre as nervuras do último par basal superior a 100°; lóbulos nítidos **2. *S. hastifolia***
 4. Folha ovada, obovada, elíptica, cordada, deltóide ou hastada, com ângulo de divergência entre as nervuras do último par basal inferiores a 100°; lóbulos ausentes a nítidos **Complexo *S. gardneri* + *S. hastifolia* + *S. sagittifolia***

Discussão

Técnica de Diafanização

Variações na técnica de diafanização de folhas proposta por SHOBE & LERSTEN (1967) são comuns na literatura (como em MCCAULEY & EVERT, 1988; BEEBE & EVERT, 1990; DANNENHOFFER *et al.*, 1990 e DANNENHOFFER & EVERT, 1994).

tanto na forma quanto na arquitetura foliar (descritas anteriormente) em qualquer uma das quatro espécies.

A adição de detergente comercial ao álcool etílico (GONÇALVES, comunicação pessoal, 2004), foi baseada na suposição que o agente que impedia a ação do fixador fosse uma resistente cutícula foliar, composta basicamente por ceras e gorduras, além de outros componentes (ESAÚ, 1974). O longo período de imersão (25 a 60 dias) foi o suficiente para que o detergente fosse capaz de retirar esta cutícula, permitindo que o fixador penetrasse na folha e removesse grande parte de seus pigmentos.

Ressalta-se ainda que, quando as folhas foram submetidas a concentrações superiores a 5%, tanto de NaOH quanto de Hipoclorito de Sódio, houve rápida degradação dos tecidos foliares, evidenciada pela formação de bolhas, caracterizando o descolamento da epiderme, ou completo rompimento dos tecidos, levando a destruição da amostra em questão.

Outra peculiaridade na diafanização das folhas de *Spathicarpa* foi a grande afinidade com o corante. Qualquer exposição da folha à safranina, superior a 20 segundos, causava coramento quase completo de todas os tecidos foliares. Se o tempo de exposição fosse curto demais, eram coradas apenas regiões circulares (em quantidades e extensão variadas) do tecido, nas quais a etapa de diferenciação agia promovendo a completa retirada do corante.

Portanto, apesar das dificuldades e das peculiaridades apresentadas pelas folhas estudadas, foi possível estabelecer um protocolo adequado de diafanização para as folhas de *Spathicarpa* Hook. Acredita-se ainda que esta técnica possa ser aplicada para folhas de outros gêneros de Araceae ou mesmo outras famílias de monocotiledôneas que apresentem características similares.

Arquitetura foliar de *Spathicarpa*

O gênero *Spathicarpa* apresenta um notável polimorfismo foliar. Das quatro espécies estudadas, somente *S. lanceolata* apresenta características diagnósticas consistentes (folhas predominantemente lanceoladas, nunca apresentando lóbulos, base sempre aguda a obtusa; padrão geral de venação camptódromo, eucamptódromo; até 9 pares de nervuras secundárias, uniformemente dispostas ao longo da folha; ângulo de divergência do último par basal máximo de 45°; nervuras quaternárias reticuladas, alongadas longitudinalmente, com predominância de quatro lados).

As outras três espécies formam um complexo, compartilhando a grande maioria das características (folhas de forma variada, nunca lanceoladas, lóbulos presentes ou ausentes, padrão geral de venação camptódromo, broquidódromo a eucamptódromo; até 7(-8) pares de nervuras secundárias, mais próximas entre si na porção basal; ângulo de divergência do último par basal máximo de 120°; nervuras quaternárias em retículos de cinco lados). Porém, algumas tendências podem ser observadas: quanto à coloração, somente *S. gardneri* pode apresentar manchas argêntas na lâmina foliar, porém embora esta seja uma característica de ocorrência comum, existem folhas sem qualquer mancha e, quanto à forma, somente *S. hastifolia* pode apresentar folha hastada-tripartida e *S. sagittifolia*, comumente sagitadas.

As folhas destas últimas três espécies de *Spathicarpa* exibem formas semelhantes, provavelmente, devido a questões genéticas. Tal afirmação concorda com PARKHURST & LOUCKS (1972) que afirmam ser o tamanho e a forma das folhas controlados pela hereditariedade, fato demonstrado em seus estudos pela alta variação de tipos que ocorre entre diferentes espécies que coexistem num determinado ambiente.

Ainda, é conveniente lembrar que a gênese da forma foliar ocorre durante um breve período de morfogênese inicial, sendo mais influenciada pela formação das nervuras secundárias, uma vez que as nervuras de menor calibre só surgem durante a expansão da folha (DENGLER & KANG, 2001). Assim, a formação e desenvolvimento das nervuras secundárias em *Spathicarpa* poderia ser responsável por grande parte da forma e complexidade da nervação na folha plenamente expandida, sobretudo, estando ligada ao surgimento dos lóbulos. Ressalta-se, neste ponto, que quanto maior é a complexidade do arranjo das nervuras secundárias, maior é a complexidade exibida pelos lóbulos em *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*.

Finalmente, a espessa cutícula presente em *Spathicarpa* poderia atuar como elemento estabilizante da folha (BAKER, 1974), já que as nervuras das folhas das monocotiledôneas, comumente, não apresentam lignina associada ao xilema (ESAÚ, 1974). A este efeito estabilizante da cutícula soma-se, provavelmente, o elevado conteúdo de água das folhas, atuando mecanicamente através do turgor, e uma estabilidade adicional na região da margem pela presença da nervura coletora.

Presença de lóbulos foliares

Folhas providas de lóbulos parecem representar um tipo foliar mais elaborado dentro de *Spathicarpa*, podendo estar relacionadas com fatores como o desenvolvimento dos meristemas ou mesmo o diâmetro dos entrenós (RAY, 1986; 1987a e 1987c). Além disso, em *Spathicarpa*, indivíduos estiolados têm os lóbulos suprimidos ou produzem folhas relativamente mais simples, sugerindo que algum fator ambiental (HANSON, 1917; BISSING, 1982; e ROTH-NEBELSICK *et al.*, 2001), tal qual umidade, temperatura ou insolação ou, mais provavelmente, a combinação destes, também está influenciando na produção dos lóbulos.

Folhas estreitas, segundo PARHURST & LOUCKS (1972), parecem ser mais eficientes em condições mais secas, mais quentes e de maior insolação. Uma redução na largura da folha pode estar relacionada a um aumento na temperatura (EZCURRA *et al.*, 1997). Ressalta-se, ainda, que um decréscimo no tamanho foliar, além de afetar propriedades mecânicas, atua também acelerando a perda de calor e reduzindo as trocas gasosas (ROTH-NEBELSICK *et al.*, 2001). Assim, nas folhas de *S. lanceolata* o arranjo das nervuras de forma agrupada e paralela, fisicamente, parece ser a melhor forma de estabilizar uma estrutura delgada e lanceolada, fornecendo uma adequada sustentação, necessária para manter o limbo foliar ereto em condições de campo.

Além disso, quanto maior a densidade das nervuras, mais canais por unidade de área estão disponíveis para a condução auxiliando, portanto, na transpiração e conseqüentemente na manutenção do suprimento de água das folhas de *S. lanceolata*. É conveniente lembrar que embora seu habitat característico seja os campos alagados de altitude do sul do Brasil, a água parece ser obtida às custas de elevadas taxas de transpiração, provavelmente, devido à insolação constante e a ação do vento que retirariam a umidade foliar numa taxa alta, talvez impondo a planta um déficit hídrico e nutricional em meio a tanta disponibilidade de água.

Finalmente, os resultados aqui apresentados devem ser cuidadosamente avaliados. Segundo McLELLAN (2000), as folhas que se desenvolveram sob condições controladas são diferentes das desenvolvidas no campo. Como os acessos estudados eram cultivados, provavelmente, as plantas de *Spathicarpa* receberam níveis maiores de nutrientes, tiveram uma constante disponibilidade de água e

experimentaram temperaturas diferentes, quando comparadas às condições de campo. Estas diferenças podem contribuir para diferenças na arquitetura das folhas.

Considerações finais

Estes resultados mostram ser, realmente, difícil a circunscrição das espécies *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*, baseada em características vegetativas concordando com GONÇALVES (2002). Assim, apesar de distintas do ponto de vista molecular, sua diferenciação, quanto à arquitetura foliar, não é possível. Por outro lado, *S. lanceolata* constitui, claramente, uma espécie distinta das demais. No Capítulo 2, utilizando-se a Análise Elíptica de Fourier para comparar os contornos foliares das espécies de *Spathicarpa*, resultados similares foram encontrados: apenas *S. lanceolata*, difere das outras três espécies que têm formas foliares estatisticamente similares entre si.

Assim, das quatro espécies estudadas, somente *S. lanceolata* apresenta características vegetativas diagnósticas consistentes, não sendo possível diferenciar, com base nos padrões gerais da arquitetura foliar, entre *S. hastifolia*, *S. gardneri* e *S. sagittifolia*.

Referências Bibliográficas

- ADOBE SYSTEMS INCORPORATED. 2000. **Photoshop 6.0**. Todos os direitos reservados.
- BAKER, E.A. 1974. The influence of environment of leaf wax development in *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *New Phytol.*, **73**(5): 955-966.
- BEEBE, D.U. & EVERT, R.F. 1990. The morphology and anatomy of the leaf of *Moricandia arvensis* (L.) DC. (Brassicaceae). *Bot. Gaz.*, **151**(2): 184-203.
- BISSING, D.R. 1982. Evolution of leaf architecture in chaparral species *Fremontodendron californicum* ssp. *Californicum* (Sterculiaceae). *Amer. J. Bot.*, **69**(6): 957-972.
- CROAT, T.B. 1985. Collecting and preparing specimens of Araceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **72**(2): 252-258.
- DANNENHOFFER, J.M.; EBERT Jr., W. & EVERT, R.F. 1990. Leaf vasculature in barley, *Hordeum vulgare* (Poaceae). *Amer. J. Bot.*, **77**(5): 636-652.
- DANNENHOFFER, J.M. & EVERT, R.F. 1994. Development of the vascular system in the leaf of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int. J. Plant. Sci.*, **155**(2): 143-157.
- DEDE, R.A. 1962. Foliar patterns in the Rutaceae. *Amer. J. Bot.*, **49**(5): 490-497.
- DENGLER, N. & KANG, J. 2001. Vascular patterning and leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 50-56.
- DICKINSON, W.C. 1987. Leaf and nodal anatomy and systematics of Staphyleaceae. *Bot. Gaz.*, **148**(3): 475-489.
- ESAÚ, K. 1974. **Anatomia das plantas com sementes**. Edgard Blücher. 293p.

- EZCURRA, C.; RUGGIERO, A. & CRISCI, J.V. 1997. Phylogeny of *Chuquiraga* sect. *Acanthophyllae* (Asteraceae – Barnadesioideae), and the evolution of its leaf morphology in relation to climate. *Syst. Bot.*, 22(1): 151-163.
- GONÇALVES, E.G. 1997. **Araceae no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, UnB; Brasília.
- _____. 2002. **Sistemática e evolução da tribo Spathicarpeae (Araceae)**. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 148p.
- HANSON, H.C. 1917. Leaf-structure as related to environment. *Amer. Jour. Bot.*, 4(9): 533-560.
- HARPER, L. & FREELING, M. 1996. Studies on early leaf development. *Current Opinion in Biotechnology*, 7:139-144.
- HERSHKOVITZ, M.A. 1992. Leaf morphology and taxonomic analysis of *Cistanthe tweedyi* (nee *Lewisia tweedyi*; Portulacaceae). *Syst. Bot.*, 17(2): 220-238.
- HICKEY, L.J. 1973. Classification of architecture of dicotyledonous leaves. *Amer. J. Bot.*, 60(1): 17-33.
- HICKEY, L.J. & TAYLOR, D.W. 1991. The leaf architecture of *Ticodendron* and the application of foliar characters in discerning its relationships. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 78: 105-130.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 198p.
- LEAF ARCHITECTURE WORKING GROUP. 1999. **Manual of leaf Architecture - Morphological description and categorization of dicotyledonous and net-**

veined monocotyledonous angiosperms. Department of Paleobiology, Smithsonian Institution, Washington, DC. 65p.

McCAULEY, M.M. & EVERT, R.F. 1988. Morphology and vasculature of leaf of potato (*Solanum tuberosum*). *Amer. J. Bot.*, **75**(3): 377-390.

McLELLAN, T. 2000. Geographic variation and plasticity of leaf shape and size in *Begonia dregei* and *B. homonyma* (Begoniaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 132: 79-95.

MURATA, J. 1990. Diversity of shoot morphology in *Typhonium* (Araceae). *Amer. J. Bot.*, **77**(11): 1475-1481.

PARKHURST, D.F. & LOUCKS, O.L. 1972. Optimal leaf size in relation to environment. *Jour. Ecology*, 60(2): 505-537.

RAY, T.S. 1986. Growth correlations within the segment in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **73**: 993-1001.

RAY, T.S. 1987a. Leaf types in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **74**(9): 1359-1372.

_____. 1987b. Diversity of shoot organization in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **74**(9): 1373-1387.

_____. 1987c. Cyclic heterophylly in *Singonium* (Araceae). *Amer. J. Bot.*, 74(1): 16-26.

_____. 1988. Survey of shoot organization in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **75**(1): 56-84.

_____. 1990. Metamorphosis in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **77**(12): 1599-1609.

ROHLF, F.J. 2003. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics. *J. Hum. Evolution*, **44**: 665-683.

ROTH-NEBELSICK, A; UHL, D.; MOSBRUGGER, V. & KERP, H. 2001.
Evolution and function of leaf venation architecture: a review. *Ann. Bot.*, 87:
553-566.

SINHA, N. 1999. Leaf development in angiosperms. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant
Mol. Biol.*, **50**: 419-446.

SHOBE, W.R. & LERSTEN, N.R. 1967. A technique for clearing and staining
Gymnosperm leaves. *Bot. Gaz.*, **128**(2): 150-152.

STACE, C.A. 1989. **Plant taxonomy and biosystematics**. 2nd ed. Cambridge:
Cambridge University Press. 264p.

Capítulo 2

Análise Morfométrica das folhas de *Spathicarpa* Hook. (Araceae)

Introdução

A morfologia das folhas sempre desempenhou papel importante na taxonomia vegetal como um todo, particularmente para caracterizar e identificar *taxa* onde a variação nas estruturas florais não é informativa (STACE, 1989).

Normalmente, nas descrições taxonômicas clássicas, a folha é descrita subjetivamente, utilizando frases descritivas e, não objetivamente como uma descrição “quantitativa” (WATERS, 1977). Esta descrição quantitativa pode ser feita através da morfometria, ou seja, a descrição, análise e interpretação da forma e de sua variação na biologia (ROHLF, 1990b).

A morfometria tem experimentado surpreendente avanço em suas técnicas e padrões de interpretação, sobretudo a partir da década de 90 (MONTEIRO & REIS, 1999). Vários estudos foram realizados e novos conceitos formulados. Não demorou muito para que a morfometria se firmasse dentro da Botânica como poderosa ferramenta de análise taxonômica. Porém, as folhas apresentam problemas morfométricos mais complexos que os crânios e as asas de inseto (freqüentemente estudados), pois às vezes assumem as mais variadas formas, com diferentes proporções entre comprimento e diâmetro, com diferenças na extensão dos lóbulos que por ventura tenham, além do tamanho e das formas das saliências das margens, como dentes ou serras (McLELLAN & ENDLER, 1998).

Alguns exemplos deste casamento vantajoso, entre taxonomia e morfometria, são: a caracterização de três espécies de *Nothofagus* (Nothofagaceae) com base em marcadores anatômicos, análise de contornos e características descritivas da arquitetura das folhas, como o padrão de venação e o ângulo de divergência das nervuras (PREMOLI, 1996); e a combinação entre dados filogenéticos e morfométricos do fruto feita com sucesso em *Lithocarpus* (Fagaceae) (CANNON & MANOS, 2001). Em Araceae, tem-se os trabalhos de RAY (1992), analisando a forma das folhas em *Syngonium*, valendo-se de "contornos homólogos" (combinação da análise de contornos e marcos anatômicos) e o de JEAN & BARABÉ (2001) que aplicaram modelagem matemática para elucidar a organização das flores (antotaxia) no espádice.

Os métodos para contornos são, muitas vezes, aplicados quando não existem marcos anatômicos homólogos claramente identificáveis¹ e precisos (McLELLAN & ENDLER, 1998; MONTEIRO & REIS, 1999 E ROHLF, 1990a). A análise do contorno pode revelar aspectos da forma não capturados pelos marcos, como a curvatura e rugosidade de um contorno, tendo sido aplicada com sucesso na análise da forma de organismos invertebrados, de porções da anatomia de vertebrados (YOUNKER & EHRLICH, 1977; ROHLF & ARCHIE, 1984, FERSON *et al.*, 1985; RENAUD *et al.*, 1996; RENAUD, 1999; LESTREL, 1997; McLELLAN & ENDLER, 1998) e na análise da forma de órgãos vegetais (ROBERTS *et al.*, 1983; RAY, 1992; McLELLAN, 1993; PREMOLI, 1996; CURRIE *et al.*, 2000 e MEADE & PARNELL, 2003).

Em comparações prévias dos métodos de análise de contorno existentes (ROHLF & ARCHIE, 1984 e McLELLAN & ENDLER, 1998), a Análise Elíptica de Fourier (KUHL & GIARDINA, 1982) mostrou ser uma técnica que produz resultados razoáveis com formas biológicas que exibem segmentos côncavos (como os lóbulos foliares, por exemplo), podendo ser considerada como uma análise poderosa da forma de contornos fechados complexos (EHRLICH *et al.*, 1983; ROHLF & ARCHIE, 1984; e CRÔNIER *et al.*, 1998). Além disso, pode ser aplicada para delinear qualquer tipo de forma com um contorno bidimensional (IWATA *et al.*, 2002b e 2004), sendo apropriada para análises de contornos, como os das folhas, onde existe a repetição periódica de partes, bem como variações da forma dentro de certos limites da escala (McLELLAN & ENDLER, 1998).

Porém, existem controvérsias na utilização das séries de Fourier na morfometria. BOOKSTEIN *et al.* (1982) levantaram uma série de questões sobre as aplicações dos métodos de Fourier na sistemática, entre elas a forte falta de homologia e de significado biológico dos coeficientes de Fourier, além da complexidade matemática envolvida. LESTREL (1997) defende que embora estas dificuldades sejam bem fundamentadas,

¹ Acreditando-se que os pontos de ramificação das nervuras das folhas de *Spathicarpa* poderiam representar marcos anatômicos que permitissem adequado reconhecimento de homologia e admitindo-se que seria possível o reconhecimento destes pontos homólogos entre as folhas de uma mesma espécie, assim como entre as folhas das quatro espécies consideradas, inicialmente, tentou-se utilizar como ferramenta de análise a morfometria geométrica. Porém, testes iniciais mostraram ser inviável esta abordagem, pois além de ser difícil marcar, acuradamente, estes pontos homólogos, existia uma elevada plasticidade na arquitetura foliar, sobretudo, quanto ao nível de desenvolvimento dos lóbulos. Assim, com base nestas análises preliminares, acredita-se não ser possível qualquer análise utilizando marcos anatômicos baseada nas folhas de *Spathicarpa* Hook.

talvez tenham sido superestimadas. FERSON *et al.* (1985) afirmam ser possível e viável quantificar a variação da forma, independentemente da informação sobre homologia, que deve ser vista como um conceito em fluxo dinâmico (EHRlich *et al.*, 1983) e que existem poucos estudos que avaliam conjuntamente métodos morfométricos baseados na Análise de Fourier utilizando dados empíricos (ROHLF & ARCHIE, 1984 e McLELLAN & ENDLER, 1998). E sobre a interpretação biológica e o aspecto matemático, SCHMITTBUHL (1998) e SCHMITTBUHL *et al.* (2003) propõe alterações na Análise Elíptica de Fourier possibilitando uma interpretação biológica direta segundo parâmetros geométricos simples.

Apesar destas controvérsias, a Análise Elíptica de Fourier tem sido utilizada em vários estudos biológicos e paleontológicos da forma (ROHLF & ARCHIE, 1984; FERSON *et al.*, 1985; SCHMITTBUHL *et al.*, 2001; RENAUD *et al.*, 1996; CRÔNIER *et al.*, 1998; PALMER *et al.*, 2004 e BELETTI *et al.*, 2005).

Com base em dois marcadores moleculares (trnL-F e matK), uma matriz fenotípica, além de combinações destes, GONÇALVES (2002) estudou a tribo Spathicarpeae (Araceae), reconhecendo o clado contendo o gênero *Spathicarpa* como monofilético. Este clado apresentava quatro espécies fortemente diferenciadas: *S. gardneri* Schott, *S. hastifolia* Hook., *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott (Figura 1).

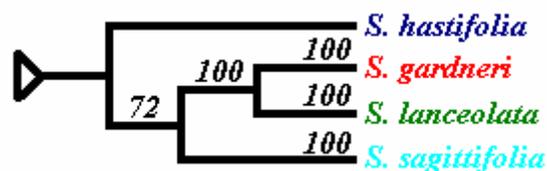


Figura 1. Fragmento do cladograma de consenso da tribo Spathicarpeae, baseado na combinação dos dois marcadores moleculares (trnL-F e matK) com os dados fenotípicos, utilizando o método bayesiano. Os valores representam a porcentagem de ocorrência dos ramos no consenso da maioria (modificado de GONÇALVES, 2002).

Porém, apesar de distintas do ponto de vista molecular, GONÇALVES (2002) encontrou dificuldades para a caracterização morfológica das espécies de *Spathicarpa*, sobretudo considerando os aspectos vegetativos. *S. hastifolia* é uma espécie de grande

polimorfismo foliar, fato que causa dificuldades de circunscrição da espécie, principalmente com relação a *S. gardneri* e *S. sagittifolia*. *Spathicarpa lanceolata* parece ser a única espécie bem distinta dentro do gênero, tanto do ponto de vista morfológico, quanto ecológico.

Se a aplicação da Análise Elíptica de Fourier nos contornos foliares das quatro espécies de *Spathicarpa*, além de fornecer uma possível ferramenta de identificação entre as espécies, refletir sua filogenia, a Análise Elíptica de Fourier seria um método de inferência filogenética de menor custo quando comparado ao aparato e as condições necessárias para os estudos moleculares.

Portanto, o presente estudo, utilizando morfometria referenciada por uma hipótese filogenética robusta baseada em seqüências moleculares, visa: caracterizar o gênero *Spathicarpa* Hook. segundo aspectos morfométricos de suas folhas, utilizando como análise de contornos a Análise Elíptica de Fourier e testar a eficiência da análise de contornos em separar entre as quatro espécies de *Spathicarpa*.

Material e Métodos

Material estudado

As espécies escolhidas foram *Spathicarpa gardneri* Schott, *S. hastifolia* Hook., *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott, ou seja, todas as quatro espécies reconhecidas por GONÇALVES (2002) para o gênero *Spathicarpa* Hook.

Para cada uma das quatro espécies, foram retiradas folhas maduras, ou seja, plenamente desenvolvidas, estando estas, em sua maioria, intactas e sem ferimentos. Foram amostradas 48 folhas pertencentes a *Spathicarpa gardneri*, 54 a *S. hastifolia*, 48 a *S. lanceolata* e 35 folhas de *S. sagittifolia*, todas retiradas de nove acessos diferentes (Tabela 1), totalizando 185 folhas amostradas.

Todas as folhas amostradas são provenientes de cultivos particulares do especialista em Araceae Eduardo Gonçalves, da Universidade Católica de Brasília - UCB, localizados no Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo (47°19'51''W e 22°47'20''S). Em Nova Odessa, a temperatura média anual é de 26°C, oscilando entre a

mínima de 10°C e máxima de 35°C; a umidade relativa média é de 76% e a precipitação pluviométrica é de 1.317 mm/ano; e a altitude média é de 540m. A identificação das amostras foi feita pelo especialista em questão.

Tabela 1. Lista dos acessos utilizados na Análise Elíptica de Fourier das folhas de *Spathicarpa* Hook.

Espécie	Coletor / no.	Sigla	Localidade
<i>Spathicarpa gardneri</i>	Gonçalves 376	g376	Januária-MG
<i>Spathicarpa gardneri</i>	Gonçalves et al. 637	g637	Distrito Federal-DF
<i>Spathicarpa gardneri</i>	Gonçalves 645	g645	Arraias-TO
<i>Spathicarpa gardneri</i>	Gonçalves 682	g682	Arraias/Combinado-TO
<i>Spathicarpa gardneri</i>	Gonçalves et al. 836	g836	Ipu-CE
<i>Spathicarpa hastifolia</i>	Gonçalves & Lorenzi 605	h605	Guaíba-RS
<i>Spathicarpa hastifolia</i>	Gonçalves & Lorenzi 610	h610	Bom Jesus-RS
<i>Spathicarpa hastifolia.</i>	Gonçalves & Lorenzi 614	h614	Picada Café-RS
<i>Spathicarpa hastifolia</i>	Gonçalves & Lorenzi 626	h626	São Bento do Sul-SC
<i>Spathicarpa lanceolata</i>	Gonçalves & Lorenzi 612	l(612)	Bom Jesus-RS
<i>Spathicarpa sagittifolia</i>	Gonçalves et al. 784	s784	Ilhéus-BA

Foi premissa do estudo que todas as plantas cresceram sobre as mesmas condições ambientais, cada uma morfologicamente expressando características adultas consistentes sendo consideradas representativas da variação existente na forma em populações naturais. Apesar de *Spathicarpa* apresentar folhas monopodiais e simpodiais (RAY, 1986; GONÇALVES, 2002), como ambas apresentam lâminas expandidas que constituem a folhagem do indivíduo (RAY, 1990), não houve distinção na coleta das folhas e nem foram considerados aspectos como o grau de desenvolvimento do meristema ou o diâmetro do entrenó (como os examinados por RAY, 1986). Ressalta-se ainda que RAY (1990) afirma que transferência entre os crescimentos não é acompanhada por uma mudança significativa na forma dos órgãos, esta ocorrendo mais amplamente nas espécies trepadeiras o que não é o caso das *Spathicarpa* onde todas são geofíticas.

Aquisição das imagens dos contornos

Os contornos estimados correspondem à vista ortogonal da face abaxial das folhas de *Spathicarpa*, montadas nas lâminas temporárias e fotografadas digitalmente, para o processo de descrição da arquitetura foliar (ver Capítulo 1). Nas quatro espécies estudadas, assim como, comumente, nas Araceae como um todo (CROAT, 1985), a nervação é proeminente nesta face.

As lâminas montadas foram fotografadas utilizando-se uma câmera SONY Cyber Shot, Modelo DSC-P200 com resolução de 7.2 MegaPixels. As fotografias foram tiradas na maior resolução, manualmente, com a câmera posicionada ortogonalmente às lâminas de vidro, deste modo, reduzindo distorções no real posicionamento das nervuras e na forma das folhas como um todo (ROHLF, 2003).

Em alguns casos, foi necessário posterior tratamento digital das imagens adquiridas, devido às peculiaridades dos programas de análise morfométrica. Estes tratamentos foram feitos com o auxílio do programa computacional PHOTOSHOP 6.0 (ADOBE SYSTEMS, 2002) e consistiram na inversão da revelação, clareamento, correção de foco, nitidez e contraste, ampliações e realce ou retirada do fundo.

Análise elíptica de Fourier

Considerando que os marcos anatômicos não podem ser facilmente definidos e posicionados nas nervuras das folhas de *Spathicarpa*, a aplicação de um método de ajustamento de contornos foi considerada mais relevante para o estudo da variação nas folhas de *Spathicarpa*.

Para a análise dos contornos foi adotada a Análise Elíptica de Fourier, utilizada no estudo de contornos fechados complexos, descrita por KUHL & GIARDINA (1982).

Em linhas gerais, esta técnica ajusta cada contorno através de uma soma potencialmente infinita de funções trigonométricas (senos e cosenos) de comprimento de onda decrescentes, chamadas harmônicas. Seu princípio é decompor qualquer contorno em projeções deste posicionadas nos eixos x e y . Estas duas variáveis são então expandidas como séries de Fourier. Para cada harmônica quatro coeficientes são

computados: a_n e b_n para as coordenadas x e c_n e d_n para as coordenadas y . A contribuição de cada harmônica, com as variações em x e y , é uma elipse. A reconstrução de um contorno teórico pode ser obtida de qualquer conjunto de coeficientes a_n , b_n , c_n e d_n utilizando-se a Inversa da Transformada de Fourier (CRÔNIER *et al.*, 1998). Para maiores detalhes computacionais da análise elíptica de Fourier devem ser consultadas as obras de KUHLE & GIARDINA (1982); ROHLF & ARCHIE (1984) e YOSHIOKA *et al.* (2004).

Os coeficientes elípticos de Fourier, que foram normalizados para evitar variações relacionadas ao tamanho, a rotação e o ponto de início do desenho do contorno, promovendo a degeneração dos primeiros três coeficientes: $a_1=1$, $b_1=c_1=0$. Então, para N harmônicas existem $4N - 3$ coeficientes normalizados não triviais (FERSON *et al.*, 1985). Portanto, no caso de *Spathicarpa*, onde a forma das folhas foi aproximada pelas primeiras 20 harmônicas, $N=20$, existindo 77 coeficientes normalizados de Fourier.

A série de análises desde o processamento das fotografias digitais até o cálculo dos escores dos componentes principais foi feita utilizando o programa computacional SHAPE (IWATA & UKAI, 2002), sendo a variação da forma quantificada pela Análise de Componentes Principais visualizada usando a Inversa da Transformação de Fourier (ROHLF & ARCHIE, 1984).

Não foi calculada nenhuma Série de Eficácia, para reduzir o número de harmônicas iniciais, mesmo sabendo-se que grande parte da informação amostrada pode ser redundante e que estas séries fornecem maior discriminação entre os grupos nas amostras iniciais quando comparadas apenas aos coeficientes normalizados (McLELLAN & ENDLER, 1998). Porém, com a aplicação das Séries, a informação sobre as rugosidades da forma é perdida (RENAUD, 1999) e imagens não podem ser reconstruídas adequadamente. Para maiores informações sobre as Séries de Eficácia ver, por exemplo, CRÔNIER *et al.* (1998).

Análise Estatística

Os coeficientes normalizados foram arranjados como colunas de vetores (d_1 , a_2 , b_2 , c_2 , d_2 , a_3 , b_3 , ..., a_n , b_n , c_n , d_n), sendo tratados como variáveis capazes de

representar o contorno em um espaço bidimensional, bem como as variações potenciais existentes. Como cada uma das vinte harmônicas consideradas é definida por quatro coeficientes, cada folha amostrada é descrita por 77 variáveis (ver Tabela 2).

Tabela 2. Arranjo da matriz de coeficientes normalizados, obtida pela Análise Elíptica de Fourier.

Folhas	Coeficientes normalizados											
	D1	A2	b2	c2	d2	a3	b3	...	a20	b20	c20	d20
1												
2												
3												
...												
184												
185												

Uma MANOVA (Análise multivariada de variância) foi feita nestas variáveis utilizando o programa computacional PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.34 (HAMMER *et al.*, 1995), com o objetivo de mostrar o relacionamento existente entre as médias dos grupos (quatro espécies). A significância da análise de componentes principais foi validada a partir do teste Wilk's Lambda (nível de significância de $p=0,01$).

Para resumir a informação nos 77 coeficientes normalizados e como uma análise exploratória, procedeu-se uma Análise de Componentes Principais, também utilizando o PAST, baseada na matriz de variância-covariância, sendo os escores dos componentes utilizados para estudar as peculiaridades da forma das folhas.

A Análise de Componentes Principais, basicamente, fornece índices não correlacionados (estimam diferentes dimensões dos dados originais) capazes de quantificar, em poucos eixos principais, a variação existente num conjunto de variáveis inicial (os 77 coeficientes normalizados citados anteriormente), permitindo uma compreensível representação cartesiana, bi ou tridimensional dessa variação (MANLY, 1986).

Foram plotados gráficos de dispersão utilizando os escores dos componentes principais calculados, para permitir que relações entre os contornos das amostras fossem

inferidas de acordo com sua posição em uma região particular dos eixos coordenados. Técnica útil e poderosa, segundo ROHLF & ARCHIE (1984).

Ainda utilizando o PAST e considerando a matriz de coeficientes normalizados, procedeu-se uma Análise Discriminante, onde os grupos testados são conhecidos de antemão (MAINLY, 1986), com o objetivo de maximizar as possíveis diferenças entre os contornos pertencentes a uma determinada espécie e o restante do conjunto amostral, ou seja, para testar a possibilidade de qualquer uma das quatro espécies de *Spathicarpa* apresentar contornos estatisticamente característicos que possibilitem sua distinção das demais espécies. Por exemplo, se considerarmos *S. hastifolia* (acessos previamente identificados pelo especialista do grupo), a Análise Discriminante testou a possibilidade de separação entre as 54 folhas de *S. hastifolia* e as 131 folhas restantes. Os escores dos dois conjuntos de contornos foram então plotados ao longo deste eixo na forma de histograma. O Teste T^2 de Hotelling foi utilizado para testar a existência de diferença significativa entre valores médios de pares de grupos (MAINLY, 1986) e a porcentagem de correta classificação das folhas dentro dos grupos também foi calculada.

Também foi realizada uma Análise de Agrupamento, na qual, ao contrário da Análise Discriminante, os grupos não são conhecidos de antemão (MAINLY, 1986), para c, com base na matriz de coeficientes normalizados. A rotina de agrupamento hierárquico foi conduzida utilizando-se como algoritmo de agrupamento o UPGMA (Unweighted pair-group average) e a matriz de distância computada com base na distância euclidiana entre as 185 folhas de *Spathicarpa*, que é uma medida robusta e largamente aplicada nas Análises de Agrupamento de dados quantitativos (MAINLY, 1986 e HAMMER *et al.*, 2005).

Análise de validação estatística

Os agrupamentos entre as folhas e as nuvens de probabilidade da forma para cada uma das quatro espécies estudadas poderia ter a configuração afetada pelo tamanho amostral diferenciado (48 folhas de *S. gardneri*; 54 folhas de *S. hastifolia*; 48 folhas de *S. lanceolata* e 35 folhas de *S. sagittifolia*) de cada espécie.

Para podermos afirmar que as diferenças na forma se devessem simplesmente a desvios na distribuição do total de folhas estudado, foi feita uma análise de validação. Esta análise consistiu na re-amostragem, feita por sorteio aleatório, de 35 folhas de cada uma das quatro espécies (este valor foi escolhido arbitrariamente e é igual ao número mínimo total de folhas amostrado em *S. sagittifolia*), formando um novo conjunto amostral de 140 folhas. Foram realizados 15 sorteios como este, ou seja, foram analisados 15 sorteios de 140 folhas cada. Para cada conjunto de 140 folhas foram feitos todos os procedimentos estatísticos adotados para o conjunto original de 185 folhas (MANOVA, PCA, Análise Discriminante e Análise de Agrupamento).

Resultados e Discussão

Análise Multivariada de Variância - MANOVA

A MANOVA dos coeficientes normalizados de Fourier, das folhas das quatro espécies de *Spathicarpa*, indica diferenças estatisticamente significativas na forma das folhas em *Spathicarpa* apenas entre dois grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados do Teste de Significância para a Análise Multivariada de Variância – MANOVA.

Teste de Significância		
Wilk's Lambda	0,005213	
Df1	231	
Df2	315,8	
F	6,524	
Eigenvalue 1	14,61	Percentual: 74,37
Eigenvalue 2	2,986	Percentual: 15,2

Análise de Componentes Principais - ACP

A contribuição do primeiro componente foi alta (66%) e os primeiros três componentes, cada um com contribuições superiores a 5%, cumulativamente totalizaram pouco menos de 85% da variação total (ver Tabela 4). Ressalta-se ainda que a maior parte da variação está contida nos sete primeiros componentes principais. Valores cumulativos entre 75 e 80% para os componentes principais efetivos são indicativos de um bom ajustamento dos componentes principais (ROBERTS *et al.*, 1983).

Porém, altos valores dos primeiros componentes principais não representam uma boa separação taxonômica entre os grupos, apenas indicam que os eixos PC1 e PC2 da ACP representam bem a variação existente nos dados iniciais, ou seja, nos 77 coeficientes normalizados de Fourier.

Tabela 4. Autovalores (Eigenvalues) e contribuição dos componentes principais efetivos.

Componentes	Eigenvalue	Proporção(%)	Cumulativa(%)
1	0,04665	66,2372	66,2372
2	0,00934	13,2563	79,4936
3	0,00301	4,2753	83,7688
4	0,00259	3,6808	87,4497
5	0,00212	3,0124	90,462
6	0,00175	2,4819	92,9439
7	0,00126	1,7823	94,7262
Variância Total	0,0704		

O contorno de cada folha é representado pelos pontos do gráfico de dispersão formado pelos dois primeiros componentes principais (Figura 2) e, mesmo não existindo uma estrutura taxonômica dos dados, formas similares estão plotadas lado a lado no gráfico. Assim, existem mudanças consistentes na forma das folhas quando caminhamos ao longo dos eixos, seja da esquerda para a direita (ou vice-versa) ou de cima para baixo (ou vice-versa), definindo o espaço amostral das possíveis formas foliares em *Spathicarpa*.

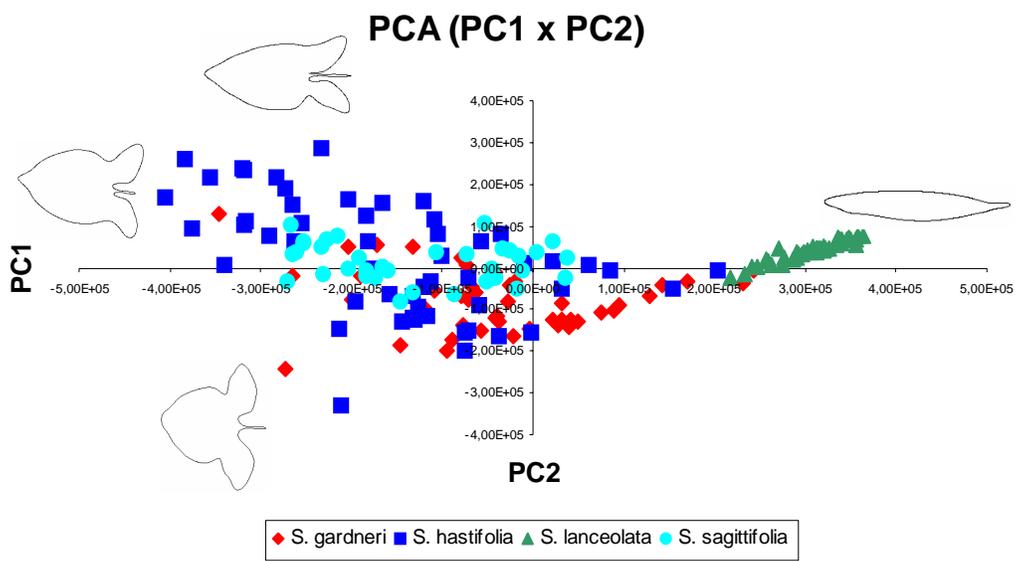


Figura 2. Gráfico de dispersão formado pelos dois primeiros componentes principais (PC1 x PC2). Losangos: *Spathicarpa gardneri* Schott; Quadrados: *S. hastifolia* Hook.; Triângulos: *S. lanceolata* Engl.; e Quadrados: *S. sagittifolia* Schott.

O gráfico mostra que apenas o grupo formado pelas folhas de *Spathicarpa lanceolata* é distinto, estando posicionado à esquerda no gráfico. Não existe separação aparente entre os outros grupos, porém *S. hastifolia* apresenta maior amplitude de variação, ou seja, suas folhas podem aparentemente assumir maior número de formas diferentes.

No eixo 1 (PC1) as folhas da direita são mais lanceoladas que as da esquerda, sendo toda a porção esquerda constituída por folhas lobadas, sagitadas e hastadas. Já a variação do eixo 2 (PC2) é mais difícil de descrever, mas folhas mais largas estariam posicionadas na porção de baixo do eixo e folhas mais estreitas acima. Aparentemente, a forma central da qual variariam as demais seria a sagitada, estando praticamente todas as *Spathicarpa sagittifolia* dispostas centralmente. GONÇALVES (2005, comunicação pessoal) afirma que, provavelmente, *S. sagittifolia* ocupe um habitat ideal para as *Spathicarpa*.

Ainda é possível outra interpretação baseada na distribuição das folhas de *Spathicarpa*, exibida pelo eixo PC1 x PC2. Sabendo-se que o lóbulo central é a parte da

lâmina restante quando descontados os lóbulos de fato, ditos laterais (RAY, 1986). No caso de *Spathicarpa*, a ACP parece mostrar que o eixo PC1 é responsável pela formação dos lóbulos laterais, quando caminhamos da direita para a esquerda, enquanto o PC2 é responsável por alterações na largura do lóbulo central, que aumenta de cima para baixo. Como, por definição, os eixos formados pelos componentes principais são independentes entre si (MAINLY, 1986), não existe qualquer relação entre a formação dos lóbulos laterais e o lóbulo central.

Este resultado está de acordo com o estudo de RAY (1986) em *Syngonium standleyanum* onde o autor afirma não existir qualquer alometria entre o lóbulo central e os lóbulos laterais. Parece então aceitável que uma lâmina de qualquer tamanho possa praticamente assumir qualquer forma (RAY, 1986), tornando a diferenciação das espécies *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*, com base em seus contornos dispostos através dos eixos PC1 x PC2, inviável.

Assim, estatisticamente, estas três espécies ocupariam praticamente o mesmo espaço da forma, o que quer dizer que podem assumir a mesma forma, invalidando a utilização da análise dos contornos como característica diagnóstica entre estas espécies, com base na Análise de Componentes Principais.

Análise Discriminante

Spathicarpa lanceolata apresentou uma distribuição claramente disjunta das espécies restantes (Figura 3), ou seja, suas folhas apresentam contornos característicos diferentes de qualquer uma das outras três espécies estudadas (Teste T^2 de Hotelling significativo e porcentagem de correta classificação de 100%). Os valores do Teste T^2 de Hotelling calculados para *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*, não são estatisticamente significantes. *S. gardneri* e *S. hastifolia* foram as espécies que mais compartilharam formas com as demais (provavelmente, entre si como pode ser visto na Figura 2), mesmo apresentando porcentagens de correta classificação de 86% e 94%, respectivamente. *S. sagittifolia*, embora apresente uma distribuição de formas mais restrita, mostrou porcentagem de correta classificação de 94%, mas ainda assim não pode

ser graficamente separada das demais (compartilha formas foliares com *S. gardneri* e *S. hastifolia*).

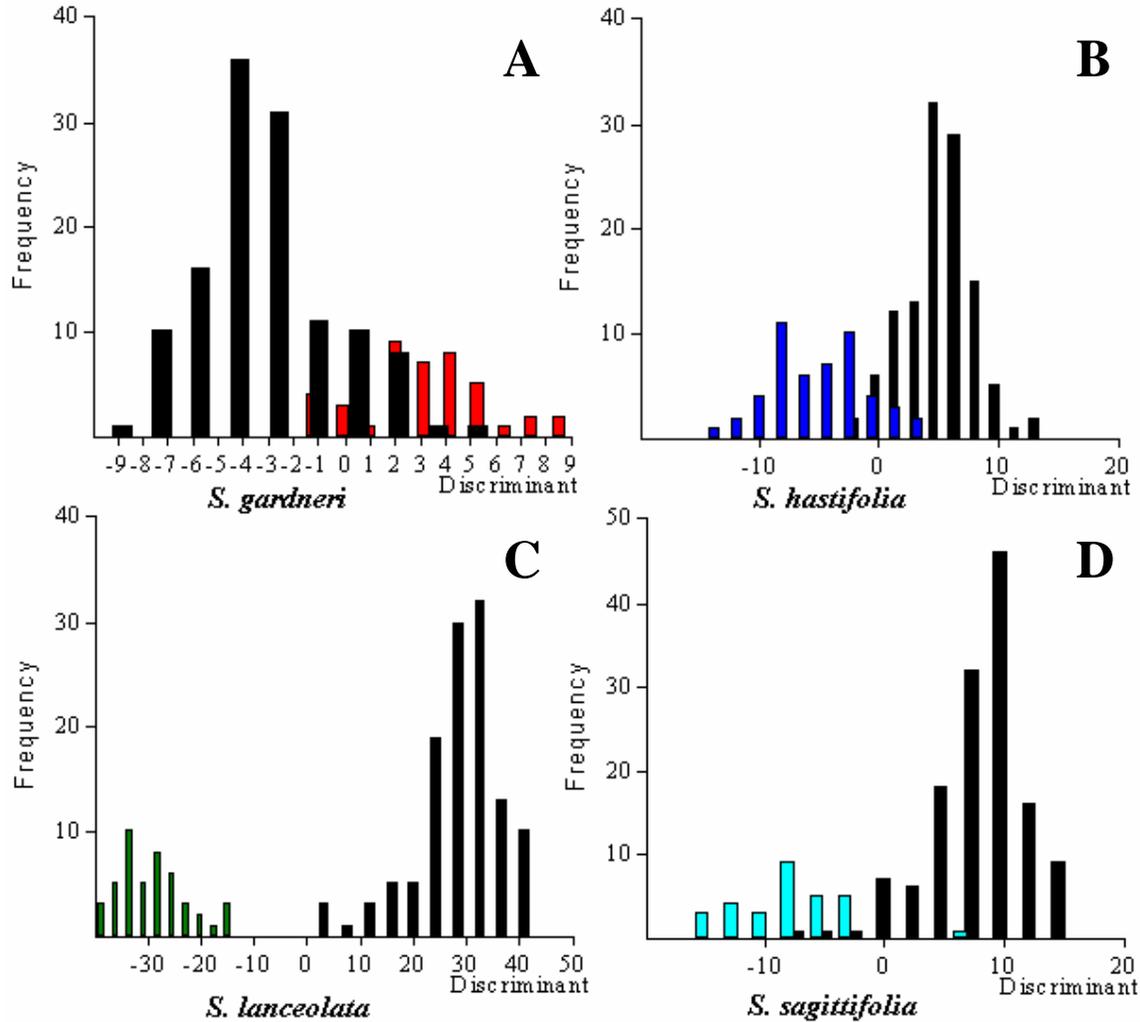


Figura 3. Gráfico da Análise Discriminante formado pelos escores dos contornos foliares de *Spathicarpa*. Barras vermelhas: *Spathicarpa gardneri* Schott; barras azul-escuras: *S. hastifolia* Hook.; barras verdes: *S. lanceolata* Engl.; barras azul-claras: *S. sagittifolia* Schott; e barras pretas: restante dos contornos que não pertencem a espécie.

Embora, a porcentagem de correta alocação represente, claramente, um indicativo do quão bem os grupos podem ser separados utilizando-se as variáveis disponíveis (MAINLY, 1986), a decisão sobre a separação das espécies de *Spathicarpa* na Análise

Discriminante deve ser tomada, também, através da análise gráfica e da análise da existência de diferença estatística entre as médias dos grupos pelo Teste T^2 de Hotelling (MAINLY, 1986 e HAMMER *et al.*, 2005).

Desta feita, mesmo sendo altas as porcentagens de correta alocação, como não existe isolamento gráfico entre os escores das formas exibidas por *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*, nem tão pouco existe diferença estatística significativa entre as médias dos escores individuais destas três espécies, não é possível diferenciar estas espécies, baseando-se na Análise Discriminante. Porém, algumas inferências podem ser feitas: (a) os elevados valores percentuais de correta classificação devem estar relacionados com a existência, tanto em *S. gardneri*, quanto em *S. hastifolia* e *S. sagittifolia* de contornos restritos apenas a estas espécies (porção dos histogramas de cada espécie que não está sobreposta) e (b) como as formas exibidas por *S. lanceolata* são, estatisticamente, distintas das demais espécies, sua presença no conjunto amostral restante pode ter influenciado estas porcentagens.

Finalmente, para determinar qual característica morfométrica foi a mais importante para separar os grupos, a estrutura dos escores na Análise Discriminante pode ser observada. Quando a magnitude absoluta do coeficiente é alta, ou esta característica é muito importante na formação da função discriminante, ou esta característica é razoável para separar os grupos (MAINLY, 1986). As primeiras cinco variáveis, ou seja, os primeiros cinco coeficientes normalizados de Fourier (*1d* a *2a*) são os que mais contribuem para a separação dos grupos na Análise Discriminante. Ressalta-se que os primeiros coeficientes de Fourier são responsáveis por descrever a forma como um todo, ao contrário dos de maior ordem que são responsáveis por nuances do contorno, como rugosidades na margem (ROHLF & ARCHIE, 1984; CRÔNIER *et al.*, 1998; RENAUD, 1999 e YOSHIOKA *et al.*, 2004). Lembra-se que as folhas de *Spathicarpa* apresentam folhas de margem inteira (ver Capítulo 1).

Análise de Agrupamento

Embora, não se saiba de antemão os grupos (espécies de *Spathicarpa*) na Análise de Agrupamento (MAINLY, 1986), para uma melhor compreensão dos resultados

obtidos, após o agrupamento, as formas foliares foram pintadas de acordo com a cor de cada espécie (Figura 4). Não foram representadas todas as 185 folhas, sendo as formas similares, pertencentes a uma mesma espécie e a um mesmo acesso omitidas, sem prejuízo para a visualização da topologia geral do agrupamento. Lembra-se ainda que, obtido um dendograma, estamos livres para decidir quantos agrupamentos devemos considerar, desde que façam algum sentido (MAINLY, 1986).

A Análise de Agrupamento identificou nove grupos distintos de contornos similares. O grupo A foi o que primeiro divergiu, sendo formado, exclusivamente, por folhas hastadas e quase tripartidas, pertencentes à espécie *S. hastifolia*. Lembra-se que apenas *S. hastifolia* pode apresentar folhas hastadas ou tripartidas, onde os lóbulos laterais são bem desenvolvidos (ver Capítulo 1). Logo em seguida divergem os grupos H e I. O Grupo H é composto quase que inteiramente (há uma única folha de *S. gardneri*) pelas folhas de *S. lanceolata* que ocorreram apenas neste grupo. Este grupo é inteiramente formado por folhas lanceoladas, sem lóbulos laterais. O grupo I apresenta folhas com lóbulos laterais diminutos ou ausentes e é formado por folhas pertencentes a *S. gardneri* e a *S. hastifolia*. Ressalta-se que este grupo inclui contornos de transição entre as formas tipicamente lanceoladas e as formas com lóbulos. Nos seis grupos restantes (B, C, D, E, F e G) a grande maioria das folhas apresenta lóbulos (exceto um subgrupo formado por folhas de *S. gardneri* no grupo D). Novamente, existe um grupo formado quase que exclusivamente por *S. hastifolia*, cujos indivíduos apresentam as folhas hastadas ou quase tripartidas (Grupo F). Nos grupos B, C, D e G ocorrem de forma aparentemente aleatória formas foliares de *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*.

Ressalta-se ainda que, com exceção do grupo H, no qual as folhas são praticamente todas provenientes do mesmo acesso, em nenhum dos outros grupos houve qualquer agrupamento das folhas por acesso. Por exemplo, o grupo B é formado por três espécies e seis acessos diferentes (dois de *S. gardneri*, um de *S. sagittifolia* e três de *S. hastifolia*). Portanto, parece não existir diferenças morfométricas entre os contornos de diferentes acessos, em uma mesma espécie, considerando-se a Análise de Agrupamento.

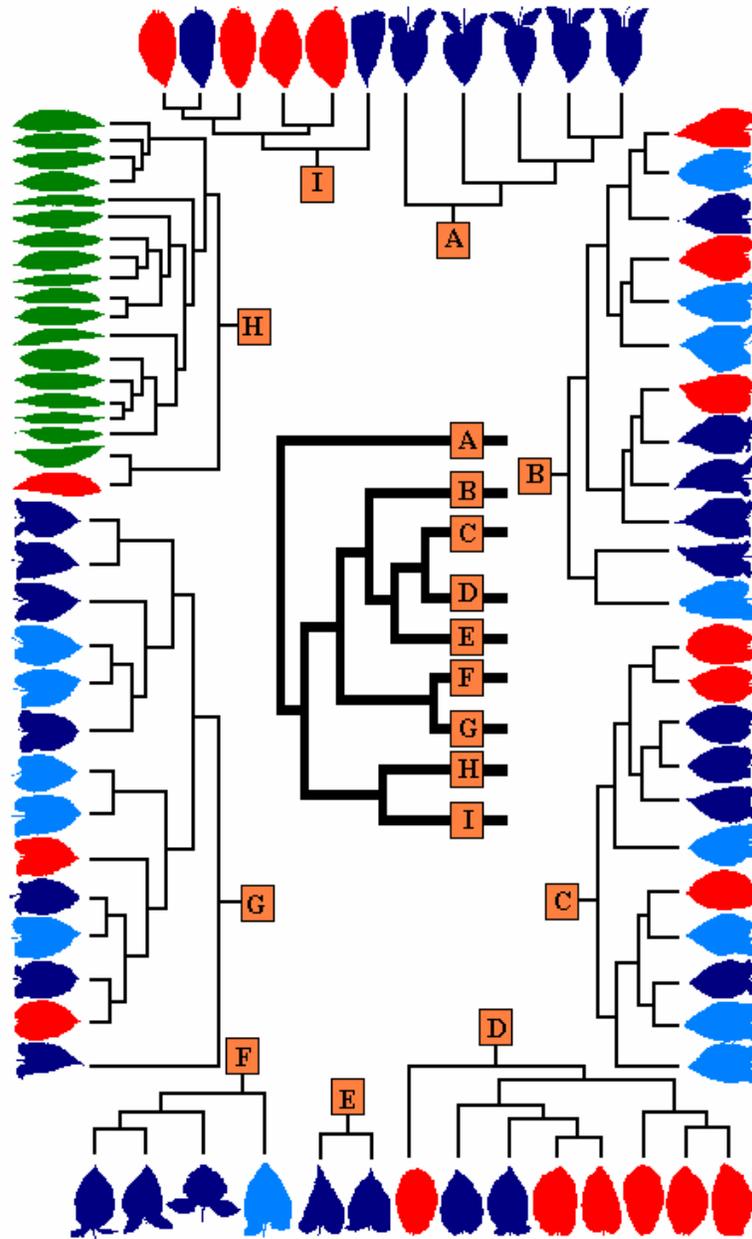


Figura 4. Análise de Agrupamento das folhas de *Spathicarpa* Hook. Folhas vermelhas: *Spathicarpa gardneri* Schott; folhas azul-escuras: *S. hastifolia* Hook.; folhas verdes: *S. lanceolata* Engl.; folhas azul-claras: *S. sagittifolia* Schott.

É importante deixar claro que os agrupamentos não apresentam nenhuma evolução entre os tipos foliares, apenas a relação existente entre as formas; sendo que as similares são colocadas em um mesmo grupo. Qualquer afirmação evolutiva sobre a

relação entre as formas seria somente especulação e não estaria considerando a história evolutiva dos *taxa* analisados.

Outra consideração importante é que muitos algoritmos podem ser utilizados na Análise de Agrupamento e que não existe um método mais adequado ou um método melhor. Além disso, infelizmente, diferentes algoritmos não necessariamente produzem os mesmos resultados, partindo de um mesmo conjunto inicial de dados (MAINLY, 1986).

Considerações finais

A Análise Elíptica de Fourier, dos contornos foliares das quatro espécies de *Spathicarpa*, embora seja capaz de caracterizar adequadamente os contornos individuais de cada uma das 185 folhas analisadas, não constitui uma ferramenta precisa de identificação e distinção entre as todas as espécies de *Spathicarpa*. Estes resultados mostram ser, realmente, difícil a circunscrição das espécies *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia*, baseada em características vegetativas, corroborando com GONÇALVES (2002). Nem mesmo sua diferenciação, quanto à arquitetura foliar, é possível (Capítulo 1). Assim, apenas *S. lanceolata* pode ser estatisticamente diferenciada das demais espécies, apresentando contornos característicos e significativos.

A Análise de Validação confirmou a utilidade do procedimento amostral adotado, ou seja, embora o número de folhas amostradas para cada espécie fosse diferente (48 folhas *S. gardneri*, 54 a *S. hastifolia*, 48 a *S. lanceolata* e 35 folhas de *S. sagittifolia*, totalizando 185 folhas amostradas), esta diferença não é suficiente para alterar a nuvem de probabilidade da forma entre as espécies de *Spathicarpa*. Nem a Análise de Componentes Principais, nem a Análise Discriminante sofreram qualquer alteração em seus resultados. Apenas, foram observados pequenos rearranjos na topologia dos agrupamentos, porém os grandes grupos originais (A, B, C, D, E, F, G, H e I) permaneceram inalterados.

Tomando-se o gráfico de dispersão PC1 x PC2 (Figura 2), como o espaço da variação da forma foliar de *Spathicarpa* (ROHLF & ARCHIE, 1984), aliado aos

resultados da Análise Discriminante e da Análise de Agrupamento, algumas inferências sobre as formas foliares em *Spathicarpa* podem ser feitas:

- *S. hastifolia* apresenta maior amplitude de variação, ou seja, suas folhas podem, aparentemente, assumir maior número de formas diferentes. Como esta espécie ocupa uma posição basal dentro do grupo (Figura 1) ela poderia representar um “estoque ancestral de possibilidades foliares” do qual derivam as outras três espécies;
- *S. gardneri* manteria, embora em menor escala que *S. hastifolia*, parte deste “estoque ancestral”, experimentando possibilidades foliares ao longo de sua amplitude geográfica e ecológica (Capítulo 1), mais diversificada que *S. lanceolata* e *S. sagittifolia*;
- *S. lanceolata* apresentaria elevada especialização em sua forma foliar, sendo esta bastante restrita e claramente distinta das demais, possivelmente, refletindo sua distribuição geográfica e ecologia características (*S. lanceolata* é a única espécie helófito, ocorrendo em banhados de elevada altitude na região sul do Brasil); e
- *S. sagittifolia*, que embora ainda compartilhando formas com *S. gardneri* e *S. hastifolia*, apresentaria relativa especialização, ocupando uma posição central no espaço da forma. Como *S. sagittifolia* ocorre em um habitat, possivelmente, ideal para as *Spathicarpa* (GONÇALVES, 2005 comunicação pessoal), podemos inferir que a forma sagitada, comumente exibida pelas folhas desta espécie, seria a forma foliar da qual as demais derivaram.

Ressalta-se ainda que: a confirmação que as folhas de *S. gardneri*, *S. hastifolia* e *S. sagittifolia* não são diferentes, nem considerando a arquitetura foliar, nem a forma dos contornos foliares, mas que são espécies consistentes molecularmente, abrem portas para estudos ecológicos, fisiológicos e genéticos, necessários para o entendimento deste padrão.

Finalmente, a expectativa inicial era que a análise das formas das folhas de *Spathicarpa* pudesse refletir a classificação taxonômica, ou possivelmente a filogenia; o que não ocorreu. Porém, a ordenação permitiu resumir e mostrar a diversidade de formas existentes nas folhas das quatro espécies de *Spathicarpa*, bem como forneceu uma

maneira “panorâmica” de observar esta variação (Figura 5) o que comumente, utilizando técnicas convencionais, não seria possível.

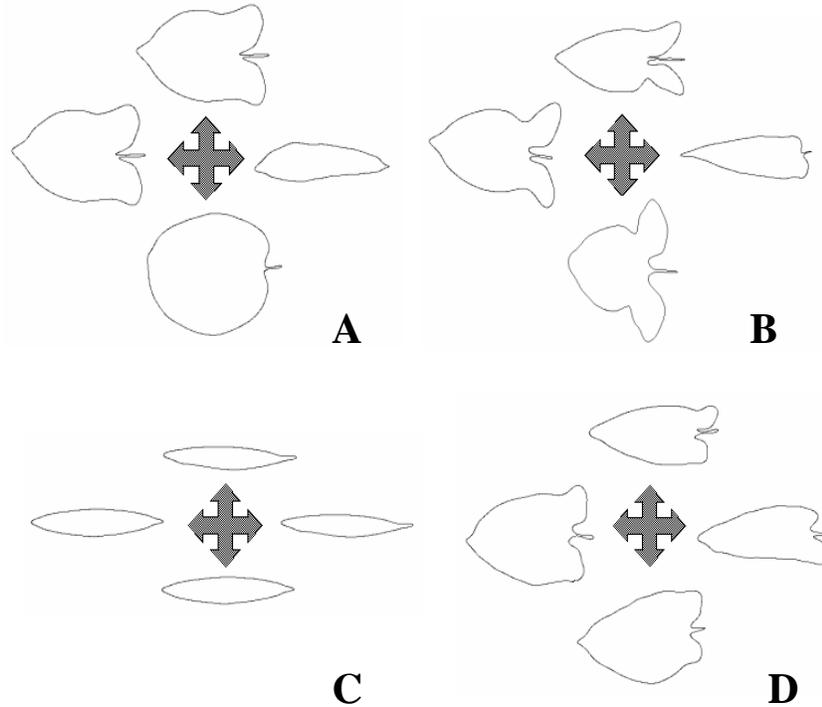


Figura 5. Variação morfológica “panorâmica” das folhas de *Spathicarpa* Hook. (A) *Spathicarpa gardneri* Schott; (B) *S. hastifolia* Hook.; (C) *S. lanceolata* Engl.; e (D) *S. sagittifolia* Schott.

Assim, *Spathicarpa lanceolata* tem as folhas claramente lanceoladas e sem qualquer evidência de lóbulos. *S. hastifolia* é a espécie com maior amplitude de variação, exibindo desde formas completamente hastadas até folhas praticamente largo-elípticas, ou seja, sem lóbulos, englobando em amplo espectro a variação existente em *S. gardneri* e *S. sagittifolia*; (b) *S. sagittifolia*, dentre as três últimas espécies, apresenta a variação mais restrita em sua forma, em grande parte contida na variação exibida por *S. gardneri*.

Referências Bibliográficas

- ADOBE SYSTEMS INCORPORATED. 2000. **PHOTOSHOP 6.0**. 2000.. Todos os direitos reservados.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. & VIANA, M.P. 2005. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Animal Repr. Sc.*, **85**: 105-116.
- BOOKSTEIN, F.L.; STRAUSS, R.E.; HUMPHRIES, J.M.; CHERNOFF, B.; ELDER, R.L. & SMITH, G.R. 1982. A comment upon the use of Fourier methods in systematics. *Syst. Zool.*, **31**(3): 85-92.
- CANNON, C.H. & MANOS, P.S. 2001. Combining and Comparing Morphometric Shape Descriptors with a Molecular Phylogeny: The Case of Fruit Type evolution in Bornean *Lithocarpus* (Fagaceae). *Syst. Biol.*, **50**(6): 860-880.
- CROAT, T.B. 1985. Collecting and preparing specimens of Araceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **72**(2): 252-258.
- CRÔNIER, C.; RENAUD, S.; FEIST, R. & AUFRAY, J. 1998. Ontogeny of *Trimerocephalus lelievrei* (Trilobita, Phacopita), a representative of the Late Devonian phacopine paedomorphocline: a morfometric approach. *Paleobiology*, **24**(3): 359-370.
- CURRIE, A.J.; GANESHANANDAM, D.A.; NOITON, D.A.; GARRICK, D.; SHELBOURNE, C.J. & ORAGUZIE, N. 2000. Quantitative evaluation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) fruit shape by principal component analysis of Fourier descriptors. *Euphytica*, **111**: 219-227.

- EHRlich, R.; PHARR JR., R.B. & HEALY-WILLIAMS, N. 1983. Comments on validity of Fourier descriptors in systematics: a reply to Bookstein *et al.* *Syst. Zool.*, **32**(2): 202-206.
- FERSON, S.; ROHLF, F.J. & KOEHN, R.K. 1985. Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Syst. Zool.*, **34**(1): 59-68.
- GONÇALVES, E.G. 1997. **Araceae no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, UnB; Brasília.
- _____. 2002. **Sistemática e evolução da tribo Spathicarpeae (Araceae)**. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 148p.
- HAMMER, Ø; HARPER, D.A. & RYAN, P.D. 1995. **PAST - PAleontological STatistics, ver. 1.34**. Kluwer Academic Publishers. 66p.
- IWATA, H. & UKAI, Y. 2002. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Heredity*, **93**: 384-385.
- IWATA, H.; NESUMI, H.; NINOMIYA, S.; TAKANO, Y. & UKAI, Y. 2002. Diallel analysis of leaf shape variations of *Citrus* varieties based on elliptic Fourier descriptors. *Breed. Sci.*, **52**: 89-94.
- IWATA, H.; NIKURA, S.; MATSUURA, S.; TAKANO, Y. & UKAI, Y. 2004. Genetic control of root shape at different growth stages in radish (*Raphanus sativus* L.). *Breed. Sci.*, **54**: 117-124.
- JEAN, R.V. & BARABÉ, D. 2001. Application of Two Mathematical Models to the Araceae, a Family of Plants with Enigmatic Phyllotaxis. *Ann. Bot.*, **88**: 173-186.

- KUHL, F.P. & GIARDINA, C.R. 1982. Elliptic Fourier features of a close contour. *Comp. Graph. Image Proc.*, **18**: 259-278.
- LESTREL, P.E. 1997. **Fourier descriptors and their applications in biology**. Cambridge: Cambridge University Press. 446p.
- MANLY, B.F. 1986. **Multivariate statistical methods: a primer**. Chapman & Hall: London. 163p.
- McLELLAN, T. 1993. The roles of heterochrony and heteroblasty in the diversification of leaf shapes in *Begonia dregei* (Begoniaceae). *Amer. J. Bot.*, **80**(7): 796-804.
- McLELLAN, T. & ENDLER, J. 1998. The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects. *Syst. Biol.*, **47**(2): 264-283.
- MEADE, C. & PARNELL, J. 2003. Multivariate analysis of leaf shape patterns in Asian species of the *Uvaria* group (Annonaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, **143**:231-242.
- MONTEIRO, L.R. & REIS, S.F. 1999. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ed. Holos, Ribeirão Preto-SP. 198p.
- PALMER, M.; PONS, G.X. & LINDE, M. 2004. Discriminating between geographical groups of a mediterranean commercial clam (*Chamelea gallina* (L.): Veneridae) by shape analysis. *Fisheries Research*, **67**: 93-98.
- PREMOLI, A.C. 1996. Leaf architecture of South American Nothofagus (Nothofagaceae) using traditional and new methods in morphometrics. *Bot. J. Linn. Soc.*, **121**: 25-40.

- RAY, T.S. 1986. Growth correlations within the segment in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **73**: 993-1001.
- RAY, T.S. 1990. Metamorphosis in the Araceae. *Amer. J. Bot.*, **77**(12): 1599-1609.
- _____. 1992. Landmark Eigenshape Analysis: Homologous Contours: Leaf shape in *Syngonium* (Araceae). *Amer. J. Bot.*, **79**(1): 69-76.
- RENAUD, S.; MICHAUX, J.; JAEGER, J. & AUFFRAY, J. 1996. Fourier analysis applied to *Stephanomys* (Rodentia, Muridae) molar: nonprogressive evolutionary pattern in gradual lineage. *Paleobiology*, **22**(2): 255-265.
- RENAUD, S. 1999. Size and shape variability in relation to species differences e climatic gradients in African rodent *Oenomys*. *J. Biogeogr.*, **26**: 857-865.
- ROBERTS, D.M.; WARREN, A. & CURDS, C.R. 1983. Morphometric analysis of outline shape applied to the peritrich genus *Vorticella*. *Syst. Zool.*, **32**(4): 377-388.
- ROHLF, F.J. & ARCHIE, J.W. 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Syst. Zool.*, **33**(3): 302-317.
- ROHLF, F.J. 1990a. **Chapter 7 - Fitting curves outlines.** In: Rohlf, F.J. & Bookstein, F.L. (eds.). Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. University of Michigan Museum of Zoology, Special publ. No. 2. Pp. 167-177.
- _____. 1990b. Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **21**: 299-316.
- _____. 2003. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics. *J. Hum. Evolution*, **44**: 665-683.

- SCHMITTBUHL, M. 1998. Morphological quantification of outlines. *Biol. Cel.*, **90**: 247-290.
- SCHMITTBUHL, M.; Le MINOR, J.M.; TARONI, F. & MANGIN, P. 2001. Sexual dimorphism of the human mandible: demonstration by elliptical Fourier Analysis. *Int. J. Legal Med.*, **115**: 100-101.
- SCHMITTBUHL, M.; ALLENBACH, B.; Le MINOR, J.M. & SCHAAF, A. 2003. Elliptical descriptors: some simplified morphometric parameters for the quantification of complex outlines. *Math. Geol.*, **35**(7): 853-871.
- STACE, C.A. 1989. **Plant taxonomy and biosystematics**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press. 264p.
- WATERS, J.A. 1977. Quantification of shape by use of Fourier analysis: the Mississippian blastoid genus *Pentremites*. *Paleobiology*, **3**: 288-299.
- YOSHIOKA, Y.; IWATA, H.; OSHAWA, R. & NINOMIYA, S. 2004. Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by elliptical Fourier descriptors and Principal Component Analysis. *Ann. Bot.*, **94**: 657-664.
- YOUNKER, J.L. & EHRLICH. 1977. Fourier biometrics: harmonic amplitudes as multivariate shape descriptors. *Syst. Zool.*, **26**: 336-342.