

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA CARDOZO

**ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS NO COMPLEXO *ANTHURIUM*
AUGUSTINUM K. KOCH & LAUCHE (ARACEAE)**

Curitiba

2013

ANA PAULA CARDOZO

**ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS NO COMPLEXO *ANTHURIUM*
AUGUSTINUM K. KOCH & LAUCHE (ARACEAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Lívia Godinho Temponi

Curitiba
2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BOTÂNICA



**“Estudos biossistemáticos no complexo Anthurium
augustinum K. Koch & Lauche (Araceae)”**

por

ANA PAULA CARDOZO

**Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores**


Prof Dr Eric de Camargo Smidt (UFPR)- PRESIDENTE


Profª Drª Viviane da Silva Pereira (UFPR)


Profª Drª Ivanilza Moreira de Andrade

Curitiba, 19 de abril de 2013.

Dedico este trabalho a minha querida Mãe, Jurema, por ter me ensinado a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Tem um tanto de tanta gente nesse trabalho que vai ser difícil não esquecer alguém, mas vamos lá. Começo agradecendo minha família: meus irmãos Izabel e Will; meu cunhado Marcos, pelo apoio incondicional. Em especial minha mãezinha (Jurema) que me ensinou perseverar sempre.

Muito obrigada aos amigos de Cascavel que sempre que eu pisava na nossa terra vermelha, proporcionavam bons momentos e que entenderam meu afastamento durante esse período.

As gurias com quem dividi moradia (Andréia, Adriana e Gabriela, Ana Paula e Simone) tornaram mais fácil a “minha vida curitibana”.

A Simone A.S., vizinha, companheira de chimarrão, amiga, obrigada pelas conversas que sempre aliviavam a tensão do dia-a-dia.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado. A FAPESP e ao CNPq-(PROTAX) pelo auxílio financeiro para coleta.

Aos amigos da Pós-graduação, Fabiano, Emanuela, Lígia, João e Tiago, Ana Marcia, Alice e Camila.

Muito obrigada a todos que ajudaram nas coletas: Lívia, Julio, Mariana, Letícia, Mathias, Werner. Não poderia deixar de agradecer o pessoal da UFRJ, Marco, Rodrigo e Luana, excepcionalmente prestativos.

Aos arólogos, Lívia, Nadruz, Luana, Rodrigo, Lilien e Letícia, que auxiliaram em alguma fase deste trabalho. Agradeço também ao Simon e a Ivanilza por terem me apresentado à morfometria.

Agradeço a todas as meninas do Laboratório de Filogenia. Obrigada principalmente a Mônica (exemplo de dedicação e de doçura) e Patrícia pela paciência e atenção dispensada nos ensinamentos moleculares (Suas Lindas). A Duane pelo companheirismo, por compartilhar as alegrias e aflições de ter “Complexo de Espécies”, muito obrigada pela ajuda e pela amizade (Conseguimos terminar sem colocar fogo em tudo Duvaine!!! (rsrs...))

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Sistemática, vou sentir muita falta dessa nossa família “torta”: A Lilien, (minha Equipeeee que só me dá orgulho), Mathias (companheiro de coleta e de festerê), Carla (pela sinceridade e senso de humor de cada dia), Junior-Bicho (pelas risadas “sensacionais”). Agradeço principalmente três “pessoinhas” dessa família. Suelen (com esse

coração) por sempre se compadecer dos problemas de todos e ter sempre uma palavra amável para dizer nos momentos difíceis. Ao Frederico (Alcântara) pelas discussões infundadas (rs...), que contribuíram tanto para meu conhecimento científico, como também para meu crescimento pessoal (ah... não podia deixar de agradecer pelos papos de boteco). E a Daniela que me acolheu prontamente nessa “cidade fria”, e que hoje considero minha irmã Branca (e viva a variabilidade genética, né Dani...), lembrando que ainda vou te importunar muito nessa vida, e quiçá na próxima (rs...).

Registro também minha gratidão aos principais responsáveis desenvolvimento desse trabalho. Eric por ter aceitado me orientar sem mesmo me conhecer. Lívia, co-orientadora e parceira de campo, que teve a idéia inicial do projeto. E a “orientadora emprestada”, Viviane, que me auxiliou em todo o processo. Muito obrigada aos três pela orientação, confiança e apoio concedido.

Por fim agradeço a Deus por ter encontrado TODOS vocês durante esta trajetória.

“...Viver!
E não ter a vergonha de
ser feliz
Cantar (e cantar e cantar).
A beleza de ser um eterno
aprendiz...”

Gonzaguinha

RESUMO

Araceae é caracterizada por sua inflorescência que compreende uma bráctea chamada espata e uma espiga denominada espádice. É uma família sub-cosmopolita e com maior diversidade nos trópicos. *Anthurium* é maior gênero de Araceae. A variação morfológica intraespecífica, comum dentro de *Anthurium*, combinada com a falta de informações geográficas e ecológicas de populações naturais, resulta na formação de complexos de espécies de difícil identificação. Um destes complexos foi abordado no presente estudo, o complexo *Anthurium augustinum* que inclui as espécies *A. augustinum*; *A. hatschbachii*, *A. jureianum*; *A. laucheanum*; *A. lhotzkyanum*; *A. lucidum*; *A. maximiliani* e *A. parvum*. Este conjunto de táxons é endêmico da Floresta Atlântica entre os estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina. Apresentam alta variação morfológica intra e interespecífica, o que torna difícil a delimitação dos táxons. No capítulo um, utilizando a morfometria foliar, através da Análise Elíptica de Fourier (EFA) e análises multivariadas, indicamos a necessidade de revisão dos nomes aceitos atualmente. Os resultados das análises de agrupamento, CVA e MANOVA associados à taxonomia clássica indicam que *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* e *A. maximiliani* são sinônimos de *A. augustinum*. No capítulo dois, acessamos a variabilidade e a estruturação genética das mesmas populações utilizando os marcadores ISSR. Os valores de heterozigosidade das populações (0,203 a 0,358) foram superiores aos encontrados em populações de espécies que apresentam as mesmas características biológicas. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) apontou alta variação dentro das populações (75%) e baixa divergência entre as populações (25%). A análise Bayesiana indicou a ocorrência de oito grupos genéticos (K=8) em um gradiente geográfico. As relações fenéticas entre os pares de populações indicam que tanto a circunscrição dos táxons aceitos atualmente, e os padrões morfológicos evidenciados no capítulo um não refletem a totalidade da variação genética acessada. Contudo, os táxons *Anthurium hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* apresentaram diferenciação genética suficiente para serem indicadas como táxons válidos. *Anthurium parvum* apesar de não ser geneticamente diferenciado, é morfológicamente distinto dos demais táxons do complexo e sugerimos que seja mantido. Não foi possível visualizar a estruturação genética para sustentar a distinção dos táxons *A. augustinum*, *A. maximiliani*, *A. laucheanum* e *A. lhotzkyanum*. Isso corrobora com o que foi verificado na morfometria e, portanto sugerimos que os táxons *Anthurium laucheanum*, *A. lhotzkyanum*, *A. maximiliani*, sejam considerados como sinônimos de *A. augustinum*.

Palavras-Chave: Morfometria, Análise Elíptica de Fourier, ISSR, variabilidade genética, *Anthurium* seção *Urospadix* Engl.

ABSTRACT

Araceae is characterized by its inflorescence comprising a bract called spathe and a spike called spadix. It is a sub-cosmopolitan family and the greatest diversity is found in the tropics. *Anthurium* Schott is a neotropical genus of Araceae with the largest number of species in the Americas. The intraspecific morphological variation is common within *Anthurium*, and combined with the lack of geographical and ecological information from natural populations, results in the formation of species complex of difficult identification. One of these complexes was addressed in this study, the complex *Anthurium augustinum* (*A. augustinum*; *A. hatschbachii*; *A. jureianum*; *A. laucheanum*; *A. lhotzkyanum*; *A. lucidum*; *A. maximiliani* and *A. parvum*). This set of taxa is endemic of the Atlantic Forest between the states of Rio de Janeiro and Santa Catarina. They have high intra and interspecific morphological variation, making it difficult the delimitation of taxa. On chapter one, using leaf morphometry through Elliptic Fourier Analysis (EFA) and multivariate analyzes, we indicate the need for revision of the currently accepted names. The results of cluster analysis, MANOVA and CVA associated with classical taxonomy indicate that *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* and *A. maximiliani* should be synonymous with *A. augustinum*. On chapter two, we assessed the variability and genetic structure of these populations using ISSR. The values of heterozygosity of populations (0.203 to 0.358) were higher than those found in populations of species that have the same biological characteristics. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed high variation within populations (75%) and low divergence among populations (25%). The Bayesian analysis indicated the occurrence of eight genetic groups ($K = 8$) in a geographical gradient. The phenetic relationships between pairs of populations indicate that both the currently accepted circumscription of taxa, and morphological patterns evidenced in chapter one does not reflect the totality of genetic variation accessed. However, the taxa *Anthurium hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* showed sufficient genetic differentiation to be appointed as valid taxa. *Anthurium parvum* despite not being genetically different is morphologically distinct from other taxa and we suggest the complex to be maintained. It was unable to visualize the genetic structure to sustain the distinction of taxa *A. augustinum*, *A. maximiliani*, *A. laucheanum* and *A. lhotzkyanum*. This corroborates with what was found in morphometry and therefore suggest that the taxa *Anthurium laucheanum*, *A. lhotzkyanum*, and *A. maximiliani*, are regarded as synonyms of *A. augustinum*.

Keywords: Morphometrics, elliptic Fourier analysis, ISSR, genetic variability, *Anthurium* section *Urospadix* Engl.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	REFERÊNCIAS	18
2	CAPÍTULO 1 - Morfometria geométrica foliar aplicada ao complexo <i>Anthurium augustinum</i> (Araceae), um grupo endêmico da Floresta Atlântica brasileira.....	24
	RESUMO.....	25
2.1	INTRODUÇÃO.....	26
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.4.	CONCLUSÕES.....	45
2.5	AGRADECIMENTOS.....	46
2.6	REFERÊNCIAS	46
3	CAPÍTULO 2 - Estrutura e variabilidade genética do complexo <i>Anthurium augustinum</i> (Araceae), um grupo endêmico da Floresta Atlântica brasileira.....	50
	RESUMO.....	51
3.2	INTRODUÇÃO.....	52
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.4	RESULTADOS.....	58
3.5	DISCUSSÃO.....	63
3.6	AGRADECIMENTOS.....	68
3.6	REFERÊNCIAS.....	68
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

1 INTRODUÇÃO

Araceae Jussieu está inserida entre as monocotiledôneas, na ordem Alismatales Dumortier, esta ordem é composta por 14 famílias e 166 gêneros e cerca de 4560 espécies (APG III, 2009). As sinapomorfias de Alismatales são a presença de anteras extrorsas e cotilédone grande (STEVENS, 2012).

A família Araceae é caracterizada por sua inflorescência que compreende uma bráctea chamada espata e uma espiga denominada espádice. A espádice contém flores pequenas, actinomorfas, gineceu sincárpico e fruto do tipo baga (GRAYUM, 1990). Ocorre em todos os continentes, exceto Antártida, porém sua maior diversidade é verificada nas regiões tropicais, especialmente nas florestas úmidas (MAYO; BOGNER; BOYCE, 1997). O continente americano é considerado o centro de diversidade da família (CROAT, 1979).

A filogenia mais recente da Araceae indica a existência de 44 clados supragenéricos (CUSIMANO *et al.*, 2011), entretanto não foi realizada uma classificação formal utilizando estes resultados. E por isso, a família é subdividida formalmente considerando as oito subfamílias monofiléticas apresentadas na filogenia realizada por Cabrera *et al.* (2008): Aroideae Juss; Gymnostachydoideae Bogner & Nicolson; Lasioideae Engl.; Lemnoideae Engl.; Monsteroideae Schott; Orontioideae Mayo, Bogner & Boyce; Pothoideae Engl. e Zamioculcadoideae Bogner & Hesse. A subfamília Pothoideae compreende cerca de 920 espécies, distribuídas em duas tribos: Potheae, que inclui *Pedicellarum* M. Hotta, *Pothoidium* Schott e *Pothos* L., e a tribo monogenérica *Anthurieae* que compreende o gênero *Anthurium* Schott (CABRERA *et al.*, 2008).

Entre os 125 gêneros aceitos atualmente em Araceae (BOYCE; CROAT, 2012), *Anthurium* Schott é o maior deles, com 905 espécies (BOYCE; CROAT, 2012). Distribuiu-se na América tropical, entre a Argentina e o México, e nas ilhas do Caribe (MAYO; BOGNER; BOYCE, 1997; GOVAERTS *et al.*, 2002), com maior diversidade no Panamá, Colômbia e Equador (MAYO; BOGNER; BOYCE, 1997). No Brasil, ocorrem 136 espécies, a maioria na Floresta Atlântica (COELHO; TEMPONI, 2013).

A classificação do gênero é baseada principalmente em caracteres morfológicos vegetativos, tais como, formato, cor e consistência da lâmina foliar, pontoações glandulares, tipo de nervação, formato e comprimento do pecíolo, catafilos, e comprimento do entrenó (ENGLER, 1878; CROAT SHEFFER, 1983; CROAT, 1991; COELHO, 2004; COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009, TEMPONI; COELHO, 2011).

Conforme a filogenia molecular *Anthurium* é um grupo monofilético altamente sustentado (CARLSEN, 2011). Embora este monofiletismo seja bem suportado (CARLSEN, 2011), a variação intraespecífica que é comum nas espécies do gênero, torna *Anthurium* taxonomicamente complexo (COELHO; MAYO, 2007).

No decorrer da história o gênero foi subdividido em 16 a 19 seções (ENGLER, 1878; CROAT; SHEFFER, 1983; CROAT, 1991; COELHO, 2004; CARLSEN; CROAT, 2007; COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009). As 18 seções propostas por Croat e Sheffer (1983), são atualmente aceitas por especialistas do grupo. Entretanto, a maioria destas seções é artificial e não representa a história evolutiva de *Anthurium* (CARLSEN, 2011).

Dentre as seções do gênero a *Anthurium* seção *Urospadix* Engl., é caracterizada por apresentar caule e entrenós curtos, lâminas foliares simples, geralmente lanceoladas com base geralmente aguda a cuneada, raramente subcordada ou cordada, nervação geralmente broquidódroma e raramente campilódroma, espádice geralmente vináceo, espata verde com estrias vináceas ou completamente vináceas (TEMPONI, 2006; COELHO; CATHARINO, 2008). A distribuição é considerada disjunta, por vários autores, com um centro de diversidade entre a América Central e o oeste da América do Sul, e outro no leste do Brasil (ENGLER, 1878; CROAT; SHEFFER, 1983; CROAT, 1991; COELHO, 2004).

Com base em análise filogenética através de caracteres morfológicos e moleculares, Temponi (2006) propõe que *Anthurium* seção *Urospadix* Engl. é restrita ao leste do Brasil e composta por cerca de 60 espécies. A filogenia do gênero também indica que *Anthurium* seção *Urospadix* Engl. trata-se de um grupo monofilético restrito ao leste do Brasil (CARLSEN, 2011). Recentemente foram acrescentadas à seção 32 espécies (TEMPONI; COELHO, 2011), totalizando cerca de 90 espécies, todas endêmicas do Brasil.

Nesta seção, a grande maioria das espécies foi descrita com base em poucas informações e por naturalistas do século XIX (ENGLER, 1905), o que ocasiona uma dificuldade no reconhecimento destas espécies e na formação de complexos taxonômicos. Poucos trabalhos foram realizados abordando os táxons desta seção (COELHO, 2004; TEMPONI, 2006, COELHO; MAYO, 2007; COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009) e a única revisão (COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009) resultou em quatro sinônimos para uma única espécie, evidenciando a necessidade de revisões e trabalhos populacionais para delimitação destes táxons.

Nesta seção destacando-se um grupo aqui denominado complexo *Anthurium augustinum* K.Koch & Lauche, que compreende atualmente oito táxons: *A. augustinum* K.Koch & Lauche; *A. hatschbachii* E.G.Gonç., *A. jureianum* Cath. & Olaio; *A. laucheanum* K.Koch; *A. lhotzkyanum* Schott; *A. lucidum* Kunth; *A. maximiliani* Schott e *A. parvum* N.E.Br. Este grupo de táxons é caracterizado por possuir lâmina foliar deflexa, com nervação campilódroma, base cordada e lobos posteriores arredondados ou semi-ovais (TABELA 1). Dentre as espécies brasileiras, a combinação destes caracteres vegetativos é exclusiva das espécies pertencentes ao complexo *Anthurium augustinum*. Além disso, caracteres anatômicos e moleculares utilizados na filogenia da seção apontam que há estreita relação filogenética entre estes táxons (TEMPONI, 2006). O complexo é endêmico da Floresta Atlântica (TEMPONI, 2006; STEHMANN *et al.*, 2009; COELHO; TEMPONI, 2013), mais precisamente numa faixa estreita da Floresta Atlântica entre o sul e sudeste brasileiro.

Apesar de *Anthurium jureianum* apresentar lâmina peltada (TABELA 1), esta espécie pertence ao complexo *A. augustinum* por estar estreitamente relacionada filogeneticamente com *A. lhotzkyanum*, *A. lucidum*, *A. maximiliani* e *A. parvum* (TEMPONI, 2006) e por compartilhar com as demais características do grupo.

TABELA 1. Características utilizadas para o reconhecimento dos táxons pertencentes ao Complexo *Anthurium augustinum*.

Característica/Táxon	<i>A. augustinum</i>	<i>A. hatschbachii</i>	<i>A. jureianum</i>	<i>A. laucheatum</i>	<i>A. lhotzkyanum</i>	<i>A. lucidum</i>	<i>A. maximiliani</i>	<i>A. parvum</i>
Posição do caule	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto
Catafilo/Perfil	Marcescente	Inteiro	Marcescente	Marcescente	Marcescente	Marcescente	Marcescente	Marcescente
Compr. Pecíolo (cm)	30-40	21-46	20-80	22-57	45-64	32-48	47-61	7 a 17
Compr. Lâmina (cm)	26-28	27-38	12 a 30	23-42	22-33	15 a 25	32-52	07 a 15
Posição da lâmina	Deflexa	Deflexa	Deflexa	Deflexa	Deflexa	Deflexa	Deflexa	Deflexa
Base da Lâmina	Cordada	Cordada	Arredondada	Cordada	Cordada	Cordada	Cordada	Cordada
Formato do lobos posteriores	Arredondado	Arredondado	Ausente	Arredondado	Arredondado	Arredondado	Semi-ovais	Arredondado
Formato do sino	Arcoado	Triangular	Ausente	Arcoado	Parabólico	Triangular	Triangular	Triangular
Cor da lâmina	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde-acinzentada	Verde	Verde
Pontoações glandulares na lâmina foliar	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Tipo de nervação	Campilódroma	Campilódroma	Campilódroma	Campilódroma	Campilódroma	Campilódroma	Campilódroma	Campilódroma
Núm. de nervuras Basais	3	2 -3	3	5	3	1 - 2	3	1 – 2
Compr. Pedúnculo (cm)	32-42	40-48	18-70	35-36	30-33	34-43	56-62	15-22
Cor do Pólen	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Branco	Amarelo	Amarelo

Embora sejam espécies relacionadas, *A. parvum* e *A. lucidum* distingue-se das demais por apresentar apenas 1 ou 2 nervuras basais. *A. parvum* distingue-se das demais do complexo por apresentar lâmina foliar menor, até 15cm compr., nervura insculpida na face adaxial e pecíolo totalmente vináceo, enquanto *A. lucidum* distingue-se por apresentar pólen branco e lâmina foliar verde acinzentada contra pólen amarelo e lâmina verde nítida nas demais espécies.

Já *A. hatschbachii* e *A. jureianum* podem ser reconhecidos por apresentarem algumas características diagnósticas. *A. hatschbachii* possui catafilos inteiros e pontoações na face abaxial, enquanto *A. jureianum* apresenta lâmina peltada. As demais espécies, *A. augustinum*; *A. laucheanum*; *A. Ihotzkyanum*; *A. maximiliani*, são consideradas proximamente relacionadas por apresentar de 3 a 5 nervuras basais e dificilmente reconhecidas em campo e material de herbário. De acordo com Coelho (no prelo – ou em preparação)¹, estas espécies podem ser reconhecidas pelo formato e tamanho do lobo posterior. *A. augustinum* e *A. laucheanum* apresentam sino geralmente arcoado e a proporção entre o comprimento do lobo posterior e da lâmina foliar variando de 1/11 a 1/25. Já *A. Ihotzkyanum* e *A. maximiliani* apresentam sino triangular ou parabólico e a proporção entre o comprimento do lobo posterior e da lâmina foliar variando de 1/4 a 1/15. Para identificação destas espécies Coelho (no preparo) sugere os caracteres comprimento do pecíolo, pedúnculo e estípite, tamanho da lâmina foliar e decorrência da espata, embora haja sobreposição destes caracteres.

Em complexos de espécies, em que há sobreposição de caracteres utilizados na diferenciação de táxons envolvidos, trabalhos que associam taxonomia clássica à taxonomia experimental, ou biossistemática, tem se tornado comum na botânica (KAMADA; YAMASHIRO; MAKI, 2007; GAGE; WILKIN, 2008, RIBEIRO *et al.*, 2008; BARBOSA, 2011; RANA; NARZARY; OHRI, 2012) como uma tentativa de afastar a subjetividade e compreender os padrões de variação em plantas (STACE, 1989).

Entre as ferramentas utilizadas para este fim, destacam-se os estudos envolvendo marcadores moleculares e morfométricos.

Entre os marcadores moleculares estão os de *single-locus*, utilizados em questões que avaliam espécies proximamente relacionadas

¹ COELHO, M. A. N. Flora do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Não Publicado.

(CRAWFORD; MORT, 2004). Dentre estes estão os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), abundantes em todo o genoma de eucariotos (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994), os quais são amplificados por *primers* específicos das regiões de interesse. Outro *single-locus*, o marcador ISSR (*Intersimple Sequence Repeats*) (CRAWFORD; MORT, 2004) pertence à classe dos marcadores dominantes, foi descrito por Zietkiewicz, Rafalski e Labuda (1994), e amplifica regiões entre SSRs. Podem ser listadas como principais vantagens deste marcador molecular: o alto polimorfismo, a independência de se conhecer a sequência do DNA previamente, o baixo custo, a fácil manipulação, a abundância ao longo do genoma e a evolução rápida (ESSELMAN *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2006).

Estudos com marcadores moleculares, especialmente os que envolvem o marcador ISSR têm auxiliado na delimitação de diversos táxons, demonstrando que podem ser bastante úteis (FANG; ROOSE, 1997; KRINGS; XIANG, 2005; BALASARAVANAN *et al.*, 2005; KAMADA, 2007; BARBOSA, 2011; GAIERO, *et al.* 2011).

Outra ferramenta bio sistemática frequentemente utilizada na descrição e análise estatística da variação de forma dentro e entre amostras de organismos é a morfometria (ROHLF; MARCUS, 1993).

Atualmente são reconhecidos dois tipos de morfometria, a clássica ou linear, cujas variáveis são unidimensionais e são medidas normalmente em centímetros, logaritmos ou ângulos. Resulta em medidas que não contemplam o objeto estudado como um todo (ROHLF, MARCUS, 1993), por isto a informação geométrica sobre a forma é perdida, e não é possível a reconstrução da estrutura estudada (MONTEIRO; REIS 1999).

O segundo tipo é a morfometria geométrica (BOOKSTEIN, 1984). Nesta abordagem o estudo da forma do organismo se restringe a configuração externa de uma estrutura sem considerar efeitos de tamanho, posição e orientação (BOOKSTEIN, 1991, MONTEIRO; REIS 1999). Diferentes tipos de conjuntos de dados podem ser utilizados na morfometria geométrica, dentre eles estão os marcos anatômicos que consideram o mapeamento de pontos homólogos (BOOKSTEIN, 1991; MONTEIRO; REIS, 1999). Outro tipo de conjunto de dados é o de contorno, utilizado para descrever e comparar estatisticamente diversos tipos de curva (MONTEIRO; REIS, 1999). A Análise

Elíptica de Fourier (EFA) foi desenvolvida por Kuhl e Giardina (1982) e utiliza este tipo de dado, para reconstruir o contorno conforme o número de pixels utilizados na digitalização da imagem do contorno original (ROHLF; ARCHIE, 1984). É particularmente útil para as formas que possuem marcos claramente homólogos (MONTEIRO; REIS, 1999).

A primeira abordagem morfométrica em Araceae foi realizada por Ray (1992), onde o mesmo propõe a combinação de análise de contornos e marcos anatômicos na descrição de folhas de *Syngonium podophyllum* Schott.

Recentemente a EFA (Análise Elíptica de Fourier) também foi utilizada na taxonomia de quatro espécies de *Spathicarpa* Hook. (*S. gardneri* Schott; *S. hastifolia* Hook.; *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott) (FONSÊCA; 2006) que formam um clado monofilético na filogenia molecular (GONÇALVES, 2002; 2007), mas que apresentam alto polimorfismo foliar. A partir destas análises apenas *S. lanceolata* pode ser diferenciada das demais espécies (FONSÊCA; 2006).

No gênero *Monstera* Adans. populações de três táxons próximos foram submetidas a análises morfométricas. A partir de dados da EFA, extraídos de folhas adultas e análises multivariadas foi possível verificar que as populações destes três táxons foram agrupadas de acordo com a circunscrição taxonômica aceita, demonstrando que apesar da alta variabilidade morfológica encontrada em folhas de *Monstera*, o contorno foliar em folhas adultas é um eficaz marcador taxonômico, úteis no estudo da variabilidade morfológica a nível específico, de variedade e populacional (ANDRADE *et al.*, 2008).

Em *Heteropsis* Kunth, EFA foi aplicada em folhas de sete espécies da Amazônia, objetivando testar se este método quantitativo é eficiente na discriminação de espécies do gênero em escala local, entretanto apenas uma espécie foi facilmente discriminada nas análises multivariadas (SOARES *et al.*, 2011).

Em *Anthurium*, esta ferramenta foi útil recentemente em estudos populacionais em *A. pentaphyllum* (Aubl.) G. Don e *A. sinuatum* Benth. ex Schott (ANDRADE *et al.*, 2010). A partir da EFA e análises multivariadas os autores inferiram a variabilidade morfológica intrapopulacional e interpopulacional destas espécies. Além disso, verificou-se um padrão

diferenciado do contorno foliar entre as duas espécies estudadas (ANDRADE *et al.*, 2010).

Desta forma, utilizando uma abordagem biosistemática, pretendeu-se testar quais dos oito táxons do complexo *Anthurium augustinum* se a partir de estudos morfométricos e moleculares os táxons deste complexo podem ser reconhecidos. Para tanto foi realizado um estudo morfométrico associando a morfometria com a taxonomia tradicional (Capítulo 1) e um estudo molecular utilizando o marcador ISSR (Capítulo 2), ambos com uma abordagem multipopulacional.

1.1 REFERÊNCIAS

ANDRADE, I. M.; MAYO, S. J.; KIRKUP, D.; VAN DEN BERG, C. Comparative morphology of populations of *Monstera* Adans. (Araceae) from natural forest fragments in Northeast Brazil using elliptic Fourier Analysis of leaf outlines. **Kew Bulletin**, London, v. 63, n. 2, p. 193-211, 2008.

ANDRADE, I. M.; MAYO, S. J.; KIRKUP, D.; VAN DEN BERG, C. Elliptic Fourier Analysis of leaf outline shape in forest fragment populations of *Anthurium sinuatum* and *A. pentaphyllum* (Araceae) from Northeast Brazil. **Kew Bulletin**, London, v. 65, n. 1, p. 3-20. 2010.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p.105 -121. 2009.

BALASARAVANAN T.; CHEZHIAN P.; KAMALAKANNAN R.; GHOSH M.; YASODHA R.; VARGHESE M.; GURUMURTHI K. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **Tree Physiology**, Victoria, v.25, n. 10, p.1295-1305, 2005.

BARBOSA, A. R. **Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogenética e genética de populações.** Belo Horizonte, 108 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BOOKSTEIN, F. L. A statistical method for biological shape comparisons. **Journal Theory Biology**, Michigan, v. 107, n. 3, p. 475-520, 1984.

BOOKSTEIN, F. L. **Morfometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology.** Cambridge University Press: New York. 1991.

BOYCE, P. C., CROAT, T. B. **The Überlist of Araceae, Totals for Published and Estimated Number of Species in Aroid Genera.** 2011. Disponível em: <<http://www.aroid.org/genera/120110uberlist.pdf>> Acessado em: 20/03/2013.

CABRERA, L. I., SALAZAR, G. A., CHASE, M. W., MAYO, S. J., BOGNER, J., D'AVILA, P. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae)

inferred from coding and noncoding plastid DNA. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.95, n. 9, p. 1153 - 1165. 2008.

CARLSEN, M. M. **Understanding the origin and rapid diversification of the genus *Anthurium* Schott (Araceae), integrating molecular phylogenetics, morphology and fossils**. St. Louis, 150 p. Tese (Doutorado em Filosofia em Biologia, com ênfase em Ecologia, Evolução e Sistemática) – Universidade Missouri, St. Louis, 2011.

CARLSEN, M. M.; CROAT, T. B. Taxonomic revision of *Anthurium* section *Semaeophyllum* Schott (Araceae). **Harvard Papers in Botany**, Washington, v. 12, n. 01, p. 173 - 234, 2007.

COELHO, M. A. N. **Taxonomia e biogeografia de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia***. Porto Alegre, 389 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

COELHO, M. A. N.; CATHARINO, E. L. M. Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 4, p. 829-833. 2008.

COELHO, M. A. N.; MAYO, S. J. Typifications of names of Brazilian taxa of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae). **Taxon**, Bratislava, v. 56, n. 01, p. 211-225, 2007.

COELHO, M. A. N.; TEMPONI, L. G. *Anthurium* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4912>>. Acesso em: 06/03/2013.

COELHO, M. A. N.; WAECHTER, J. L.; MAYO, S. J. Revisão Taxonômica das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 04, p.799 - 864, 2009.

CRAWFORD, D. J.; MARK, E. M. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. **Taxon**, Bratislava, v. 53. n.3. p. 631-635. 2004.

CROAT, T. B. A revision of *Anthurium* section *Pachyneurium* (Araceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.76, n.3, p.539-855. 1991.

CROAT, T. B. The distribution of Araceae. In: K. Larsen & L. B. Holm-Nielson (eds.). **Tropical Botany**. London: Academic Press, p. 291- 308, 1979.

CROAT, T. B.; SHEFFER R. B. The sectional groupings of *Anthurium* (Araceae). **Aroideana**, Miami, v. 6, n. 3, p. 85-123, 1983.

CUSIMANO, N.; BOGNER, J.; MAYO, S. J., BOYCE, P. C; WONG, S. Y.; HESSE, M.; HETTERSCHIED, W. L. A.; KEATING, R. C.; FRENCH, J. C. Relationships within the Araceae: Comparison of morphological patterns with molecular phylogenies. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 98, n. 4, p. 654-668. 2011.

ENGLER, H. G. A. Araceae. In: MARTIUS, C. F. P. (ed.). **Flora brasiliensis**. München: Wien & Leipzig, p. 25-224, 1878.

ENGLER, H. G. A. Araceae-Pothoideae. In: Engler, H.G.A. (Ed.), *Das Pflanzenreich*, v. 4, n. 23B. W. Engelmann, Leipzig, pp. 1–330. 1905.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUS, J. L.; WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 8, n.1 p. 443-451, 1999.

FANG, D. G.; ROOSE, M. L. Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 95, n. 3, p 408-417. 1997.

FONSÊCA, L. C. M. **Descrição da Arquitetura Foliar e Análise Morfométrica das Folhas de *Spathicarpa* Hook. (Araceae)**. Brasília, 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Botânica). Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

GAGE, E; WILKIN, P. A morphometric study of species delimitation in *Sternbergia lutea* (Alliaceae, Amaryllidoideae) and its allies *S. sicula* and *S. greuteriana*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.158, n. 3 p.460–469, 2008.

GAIERO, P.; MAZZELLA, C.; AGOSTINI, G.; BERTOLAZZI, S.; ROSSATO, M. Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. **Plant Systematic Evolution**, Viena, v. 292, n.1-2, p. 105-116. 2011.

GONÇALVES, E. G. **Sistemática e evolução da tribo Spathicarpeae (Araceae)**. São Paulo, 148 p Tese (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. São Paulo. 2002.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; BOGNER, J.; BOYCE, P.; COSGRIFF, B.; CROAT, T. B.; GONÇALVES E. G.; GAYUM, M.; HAY, A.; HETTERSCHIED, W.; LANDOLT E.; MAYO, S. J.; MURATA, J.; NGUYEN, V. D.; SAKURAGUI, C. M.; SINGH, Y.; THOMPSON, S.; ZHU, G. **World checklist and bibliography of Araceae (and Acoraceae)**. St. Louis: .Kew: Royal Botanic Garden, 2002.

GRAYUM, M. H. Evolution and phylogeny of the Araceae. **Annals. Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 77, p. 628–697. 1990.

KAMADA, T.; YAMASHIRO, T.; MAKI, M. Intraspecific morphological and genetic differentiation in *Scrophularia grayana* (Scrophulariaceae). **Journal of Plant Research**, Saitama, v. 120, n. 4, p. 437-443. 2007.

KRINGS, A.; XIANG, Q. Taxonomy of the Gonolobus Complex (Apocynaceae, Asclepiadoideae). In the southeastern united states: ISSR evidence and parsimony analysis. **Harvard Papers in Botany**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 147-159, 2005.

KUHL, F. P.; GIARDINA, C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour. **Computer Graphics and. Image Processing**. Livermore, v. 18, n. 3, p. 236 - 258. 1982.

MAYO S. J.; BOGNER J.; BOYCE P. C. The genera of Araceae. **Kew: Botanic Gardens**. London. 1997.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios da Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto: Holos, 1999.

RANA, T. S.; NARZARY, D.; OHRI, D. Molecular differentiation of *Chenopodium album* complex and some related species using ISSR profiles and ITS sequences. **Gene**. Rochester, v. 495, n.1, p. 29-35. 2012.

RAY, T. S. Landmark eigenshape analysis: homologous contours: leaf shape in *Syngonium* (Araceae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 1, 69 - 76, 1992.

RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L.; SMIDT, E. C.; LAMBERT, S. M.; SCHNADELBACH, A. S.; VAN DEN BERG, C. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 270, n.1-2, p. 109–137. 2008.

ROHLF, F. J.; ARCHIE, J. W. A comparison of Fourier Methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Systematic Zoology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 302–317, 1984.

ROHLF, F. J.; MARCUS L. F. A revolution in morphometrics. **Trends Ecology Evolution**, London, v. 8, p. 129-132, 1993.

SHEN, J.; DING, X.; LIU D.; DING G.; HE J.; LI X.; TANG F.; CHU B. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n.3, p. 420–422. 2006.

SOARES, M. L. C.; MAYO, S. J.; GRIBEL, R.; KIRKUP, D. Elliptic Fourier Analysis of leaf outlines in five species of *Heteropsis* (Araceae) from the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. **Kew Bulletin**, London, v. 66, n. 3, p. 463-470 2011.

STACE, C. A. **Plant taxonomy and biosystematics**. 2 ed. London: Edward Arnold, 1989.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. **Angiosperm Phylogeny Website. Version 12.** 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acesso em: 10/01/2013.

TEMPONI, L. G. **Sistemática de *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae).** São Paulo, 143p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TEMPONI, L. G.; COELHO, M. A. N. Two new species of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae) for Brazil: **Rodriguésia**. Rio de Janeiro, v.62, n. 2. p. 315-320. 2011.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, Amsterdam, v. 20, p. 176-183, 1994.

2 CAPÍTULO 1

Morfometria geométrica foliar aplicada ao complexo *Anthurium augustinum* (Araceae), grupo endêmico da Floresta Atlântica brasileira

Resumo – O complexo *Anthurium augustinum* K. Koch & Lauche (Araceae): *A. augustinum* K. Koch & Lauche, *A. hatschbachii* E.G.Gonç., *A. jureianum* Cath. & Olaio; *A. laucheanum* K.Koch; *A. lhotzkyanum* Schott; *A. lucidum* Kunth; *A. maximiliani* Schott e *A. parvum* N.E.Br. Estas espécies compartilham folha deflexa com a base da lâmina cordada ou arredondada. A delimitação taxonômica entre estes táxons é confusa devido à sobreposição dos caracteres que as definem. Com o objetivo de verificar se os táxons envolvidos neste complexo podem ser reconhecidos utilizando morfometria foliar, foram amostrados 257 indivíduos (12 populações naturais), utilizando à Análise Elíptica de Fourier (EFA). Foram conduzidas análises multivariadas. Os resultados morfométricos, associados à taxonomia clássica indicam a necessidade de revisão dos nomes aceitos atualmente. Recomenda-se que *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* e *A. maximiliani* sejam considerados sinônimos de *A. augustinum*. Portanto, são reconhecidos cinco táxons: *A. augustinum*, *A. hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* e *A. parvum*.

Palavras-Chave: Análise Elíptica de Fourier, morfologia, complexo de espécies, *Anthurium* seção *Urospadix* Engl.

Abstract – Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Anthurium augustinum* complex (Araceae), an endemic group to the Brazilian Atlantic rain forest. The *Anthurium augustinum* K. Koch & Lauche (Araceae) complex: *A. augustinum* K. Koch & Lauche, *A. hatschbachii* E.G.Gonç., *A. jureianum* Cath. & Olaio; *A. laucheanum* K.Koch; *A. lhotzkyanum* Schott; *A. lucidum* Kunth; *A. maximiliani* Schott and *A. parvum* N.E.Br. These species share a leaf morphology in which the blade is deflexed at the petiole insertion and is cordate or rounded at the base, the latter condition due to congenital fusion of the basal lobes; the taxonomic delimitation of the species is confused because of overlap in the taxonomic characters considered as diagnostic. The objective of the study was to test whether these taxa could be recognized using leaf morphometrics; Elliptic Fourier Analysis (EFA) was used on a sample of 257 individuals (12 natural populations).

The results of multivariate analysis indicated that leaf shape was not diagnostic in these cases. As a result, we propose that *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* and *A. maximiliani* should be regarded as synonyms of *A. augustinum* and thus that the following five

species be recognized in this group: *A. augustinum*, *A. hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* e *A. parvum*.

Key Words: Elliptic Fourier Analysis, morphology, species complex, *Anthurium* section *Urospadix* Engl.

2.1 Introdução

O emprego taxonômico de espécies, conforme definido por Gregg (1950), possibilita a utilização da subjetividade na delimitação de táxons, uma vez que o número reduzido de espécimes nos herbários não corresponde a toda a variação morfológica encontrada na natureza (Stace, 1989). Tentando minimizar esta subjetividade e quantificar a variação dos organismos, foram desenvolvidas duas áreas na ciência, a taxonomia experimental e a biosistemática (Sneath & Sokal 1973; Stace, 1989; Bernadello *et al.*, 1995).

A morfometria tem sido utilizada para vários fins na delimitação de espécies. A morfometria geométrica, ou biometria da forma, é o estudo de forma que se restringe a configuração externa de uma estrutura sem considerar efeitos de tamanho, posição e orientação (Book Stein, 1991; Monteiro & Reis 1999). Nesta abordagem, diferentes tipos de conjuntos de dados podem ser utilizados, tais como: os marcos anatômicos, que consideram o mapeamento de pontos homólogos (Bookstein, 1991; Monteiro & Reis, 1999) e o contorno – quando as estruturas biológicas não apresentam um número suficiente de marcos anatômicos identificáveis, a forma pode ser descrita em termos de coordenadas cartesianas em uma seqüência de pontos sem correspondência biológica (isto é, homologia) entre os espécimes, ao longo do contorno da estrutura ou organismo de interesse (Premoli, 1996; McLellan & Endler, 1998; Rumpunen & Bartish, 2002). O contorno de uma estrutura como lâmina foliar pode ser também capturada na forma de um conjunto de pontos (apesar de não ser pontos biologicamente homólogos) – geralmente são as coordenadas dos pixels que delineam o contorno em imagem digital da estrutura. Estes conjuntos de dados, cada um representando um contorno, são utilizados para descrever e comparar estatisticamente diversos tipos de curva (Monteiro & Reis, 1999), e a Análise Elíptica de Fourier (EFA) utiliza este tipo de dado para reconstruir o contorno conforme o número de pixels utilizados na digitalização da imagem do contorno original (Rohlf & Archie, 1984). A EFA foi desenvolvida por Kuhl

e Giardina (1982) e é particularmente útil no estudo de formas que possuem poucos marcos claramente homólogos (Monteiro & Reis, 1999).

O primeiro trabalho com morfometria foliar em Araceae foi realizado por Ray (1992), onde o mesmo propôs a combinação de análise de contornos e marcos anatômicos na descrição de folhas de *Syngonium podophyllum* Schott. Marcos anatômicos foram utilizados em *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott para avaliar efeitos alométricos e delinear padrões morfológicos no nível populacional e específico (Silva *et al.*, 2012). A EFA foi utilizada em quatro espécies de *Spathicarpa* Hook. (*S. gardneri* Schott; *S. hastifolia* Hook.; *S. lanceolata* Engl. e *S. sagittifolia* Schott), fornecendo características diagnósticas vegetativas. A partir da EFA, a espécie *S. lanceolata* pode ser considerada claramente distinta das outras pertencentes ao clado analisado (Fonsêca, 2006). No gênero *Monstera* Adans. populações de três táxons próximos foram submetidas a análises morfométricas. A partir de dados da EFA extraídos de folhas adultas e análises multivariadas, foi possível verificar que as populações destes três táxons foram agrupadas de acordo com a circunscrição taxonômica aceita, provando que apesar da alta variabilidade morfológica encontrada em folhas de *Monstera*, o contorno de folhas adultas é um eficaz marcador taxonômico, útil no estudo da variabilidade morfológica no nível específico, de variedade e de população (Andrade *et al.*, 2008). Em *Heteropsis* Kunth, análises morfométricas foram utilizadas na identificação de espécies da Amazônia (Soares *et al.*, 2011).

Em *Anthurium*, esta ferramenta tem sido útil em estudos populacionais em *A. pentaphyllum* (Aubl.) G. Don var. *pentaphyllum* e *A. sinuatum* Benth. ex Schott. A partir destas análises, os autores inferiram a variabilidade morfológica intrapopulacional e interpopulacional destas espécies. Além disso, verificou-se um padrão diferenciado do contorno foliar entre as duas espécies estudadas (Andrade *et al.*, 2010).

Anthurium Schott é o maior gênero de Araceae, com aproximadamente 905 espécies (Boyce & Croat 2011). Destas, aproximadamente 136 ocorrem no Brasil (Coelho & Temponi, 2013). A delimitação das espécies é baseada principalmente em caracteres morfológicos vegetativos (Mayo *et al.*, 1997), tais como, cor e consistência da lâmina foliar, pontuações glandulares, tipo de nervação, formato e comprimento do pecíolo, catafilos, e comprimento do entrenó (Croat & Sheffer, 1983; Coelho *et al.*, 2009; Temponi & Coelho, 2011). A formação dos complexos de espécies mal delimitadas, em alguns casos, pode estar relacionada ao grande número de espécies dentro de um gênero, além da ocorrência de plasticidade fenotípica. A plasticidade fenotípica

intraespecífica em *Anthurium*, combinada com a falta de informações geográficas e ecológicas de populações naturais resulta em confusões taxonômicas e nomenclaturais (Coelho & Mayo, 2007). Neste contexto, a taxonomia clássica é, muitas vezes, insuficiente para resolver alguns problemas taxonômicos.

O complexo *Anthurium augustinum*, como aqui definido, compreende atualmente oito táxons: *A. augustinum* K.Koch & Lauche; *A. hatschbachii* E.G.Gonç., *A. jureianum* Cath. & Olaio; *A. laucheanum* K.Koch; *A. lhotzkyanum* Schott; *A. lucidum* Kunth; *A. maximiliani* Schott e *A. parvum* N.E.Br. Este complexo é caracterizado pela presença de lâmina foliar deflexa, base cordada ou com base arredondada ou semi-ovais e nervação camptódroma. Dentre o clado *Anthurium* seção *Urospadix* que é exclusivamente brasileiro (Temponi, 2006; Carlsen & Croat, 2013) a combinação destes caracteres vegetativos é exclusiva das espécies pertencentes ao complexo *Anthurium augustinum*. Além disso, caracteres anatômicos e moleculares utilizados na filogenia de *Anthurium* seção *Urospadix* apontam que há estreita relação filogenética entre os mesmos (Temponi, 2006). O complexo é endêmico da Floresta Atlântica (Temponi, 2006; Stefan *et al.*, 2009; Coelho & Temponi, 2013), mais precisamente numa faixa estreita da Floresta Atlântica situada entre Santa Catarina e Rio de Janeiro.

O complexo *A. augustinum* foi investigado através da morfometria foliar numa abordagem biosistemática. As folhas foram utilizadas devido à maior disponibilidade destas e por serem os caracteres mais utilizados para a identificação das espécies de *Anthurium*. Além disso, a forma do contorno da folha é determinada geneticamente e deve ser considerada uma questão importante do ponto de vista taxonômico (Andrade *et al.*, 2008). Conforme Kessler & Sinha (2004) uma série de processos mediados geneticamente estão envolvidos no estabelecimento da forma do limbo foliar.

Neste contexto, objetivou-se com o presente estudo estimar a diversidade morfológica do complexo *A. augustinum* e verificar se os táxons em questão possam ser reconhecidos com o auxílio da morfometria do contorno foliar.

2.2 Material e Métodos

Amostragem

As coletas foram realizadas entre julho de 2011 e agosto de 2012, em quatro estados (Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo), pertencentes às regiões sul e sudeste do Brasil (Tab. 1, Fig. 1). Foram amostrados 257 espécimes provenientes de

12 populações naturais pertencentes aos oito táxons (Tab. 1, Fig. 2), *A. augustinum* (uma); *A. hatschbachii* (uma), *A. jureianum* (uma); *A. laucheanum* (uma); *A. lhotzkyanum* (duas); *A. lucidum* (uma); *A. maximiliani* (duas); *A. parvum* (duas). Além destas, foi amostrada uma população da espécie *Anthurium loefgrenii* Engl. (uma população), como parâmetro do grau de variação morfológica encontrado em uma espécie de *Anthurium* não pertencente ao complexo *A. augustinum*.

A amostragem deste estudo abrangeu toda a distribuição geográfica dos táxons estudados (Temponi, 2006; Coelho & Temponi, 2013). Estas espécies podem ser consideradas endêmicas ou micro endêmicas uma vez que *A. augustinum* ocorre apenas no município de Nova Iguaçu, na Reserva Biológica do Tinguá e *A. lucidum* no município do Rio de Janeiro, no Parque Nacional da Floresta da Tijuca, ambos no estado do Rio de Janeiro. Já as espécies *A. laucheanum*; *A. lhotzkyanum*; *A. maximiliani* e *A. parvum* ocorrem em diferentes municípios, porém todas na região serrana do Rio de Janeiro. *A. jureianum* ocorre apenas em Iguape, no estado de São Paulo, sendo uma espécie endêmica da Estação Ecológica da Juréia. Embora *A. hatschbachii* ocorra na divisa do Paraná e Santa Catarina, é encontrado apenas na Serra do Araçatuba.

Vouchers de cada população foram confeccionados e depositados nos herbários do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB) e Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) (Tab. 1).

Análise Morfométrica

Amostras foliares

Em cada população o número de indivíduos amostrados foi de acordo com a disponibilidade, evitando a coleta de um mesmo indivíduo. A face abaxial de uma folha adulta cada indivíduo foi fotografada, em um ângulo de 90 graus, usando câmera digital Sony Cybershot (14.1 megapixel).

Tab. 1. Localidade, código e *Voucher* das populações amostradas por táxons do complexo *A. augustinum*.

Táxon	População	Código	Nº indiv.	Coordenadas	Voucher
<i>Anthurium augustinum</i> K. Koch & Lauche	Nova Iguaçu –RJ	AUNI	25	22°33'41''S, 43°28'60''W	L. G. Temponi, <i>et al.</i> , 1052
<i>Anthurium hatschbachii</i> E.G.Gonç.	Joinville –SC	HAGO	20	26°12'43''S, 48°57'28''W	A. P. Cardozo <i>et al.</i> , 63
<i>Anthurium jureianum</i> Cath. & Olaio	Iguape – SP	JUIG	23	24°32'42''S, 47°13'50''W	A. P. Cardozo <i>et al.</i> , 60
<i>Anthurium laucheanum</i> K.Koch	Teresópolis – RJ	LATE	32	22°26'57''S, 42°59'22''W	L. G. Temponi, <i>et al.</i> , 1025
<i>Anthurium lhotzkyanum</i> Schott	Teresópolis – RJ	LHTE	21	26°26'54''S, 43°00'48''W	L. G. Temponi, <i>et al.</i> , 1031
	Petrópolis – RJ	LHPE	22	22°24'35''S, 43°12'35''W	A. P. Cardozo <i>et al.</i> , 33
<i>Anthurium loefgrenii</i> Engl.	Ilha do Mel – PR	LOIM	24	25°30'36''S, 48°20'19''W	A. P. Cardozo <i>et al.</i> , 31
<i>Anthurium lucidum</i> Kunth	Rio de Janeiro – RJ	LURJ	27	22°58'5,6''S, 43°15'25''W	L.G. Temponi, <i>et al.</i> , 1050
<i>Anthurium maximiliani</i> Schott	Nova Iguaçu – RJ	MANI	12	22°34'34''S, 43°27'59''W	L. G. Temponi, <i>et al.</i> , 1051
	Petrópolis – RJ	MAPE	7	22°24'35''S, 43°12'35''W	A. P. Cardozo <i>et al.</i> , 34
<i>Anthurium parvum</i> N.E.Br	Nova Friburgo – RJ	PANF	24	22°25'37''S, 42°31'48''W	A. P. Cardozo <i>et al.</i> , 43
	Teresópolis – RJ	PATE	20	22°25'37''S, 42°31'48''W	L.G. Temponi, <i>et al.</i> , 975
Total			257		



Fig. 1. Localização geográfica das populações no sul e sudeste do Brasil. Veja na Tab. 1 os códigos das populações.



Fig. 2. Espécies que compõe o complexo *A. augustinum*: a – *Anthurium augustinum*; b – *A. hatschbachii* ; c – *A. jureianum*; d – *A. laucheanum*; e – *A. lhotzkyanum*; f – *A. lucidum*; g – *A. maximiliani*; h – *A. parvum*.

Digitalização dos Contornos e Análise de Elíptica de Fourier

As imagens das lâminas foliares foram editadas e padronizadas com o auxílio do programa IMAGEJ (Rasband, 2004) e foram devidamente alinhadas para retirar efeitos indesejáveis que pudessem mascarar a variação de forma (Monteiro & Reis, 1999).

A digitalização dos contornos foi realizada no programa TpsDig (Rohlf, 2010). Para padronizar a localização, tamanho e orientação dos contornos foram utilizados dois marcos anatômicos, um na base e outro no ápice da nervura central, pontos 1 e 2, respectivamente (Bookstein, 1991). A inserção do pecíolo foi o ponto de partida para a digitalização de cada contorno. Esta digitalização consistiu em demarcar uma sequência de pontos ordenados como coordenadas x e y, que indicam a delimitação dos contornos de cada folha.

Foi aplicada a Análise Elíptica de Fourier (EFA). A EFA foi realizada utilizando o programa Morpheus (Slice, 1998) de acordo com a metodologia de Andrade *et al.* (2008). A padronização de tamanho e alinhamento dos contornos foi realizada utilizando a opção “*bookstein superimposition*”, a partir dos marcos anatômicos 1 e 2. Para a reconstrução do contorno original da folha, 20 elipses foram consideradas suficientes. Cada elipse apresenta quatro parâmetros, resultando em uma matriz de 80 coeficientes de Fourier. A partir da reconstrução dos contornos foliares de cada indivíduo foram construídas as formas médias de cada população, classificadas de acordo com Radford *et al.* (1976) e Croat & Bunting (1979). Os coeficientes gerados na EFA foram submetidos a análises multivariadas.

Análise dos Dados

As análises multivariadas foram conduzidas no programa PAST (Hammer, 2001). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi usada para gerar um número menor de novas variáveis independentes que descrevam mais de 90% da variação dos dados originais.

Análise de Variáveis Canônicas (CVA) foi realizada para quantificar a variabilidade dentro e entre as populações estudadas, a partir de autovetores e autovalores, buscando encontrar eixos que separem melhor as populações (Monteiro & Reis 1999).

As relações de similaridade das populações e dos táxons foram testadas utilizando a Análise Multivariada de Variância-Não Paramétrica (NP-MANOVA), que é análogo a MANOVA e calcula a probabilidade das populações serem semelhantes (*p-values*) (Monteiro & Reis, 1999). Esta análise foi realizada com 10000 permutações.

A média das variáveis de forma (PCA) de cada uma das 12 populações foi utilizada para calcular a distância Euclidiana entre os centróides de cada população. Isto foi realizado utilizando a análise de Coordenadas Principais (PCoA). O mesmo procedimento foi realizado para encontrar a distância Euclidiana entre os centróides de cada táxon.

A partir dos valores médios da PCA, foram realizadas as análises de agrupamento utilizando os algoritmos de *neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987) e *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetical Averages* (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973). Nestas análises o bootstrap foi calculado com 999 permutações.

2.3 Resultados e Discussão

Variação de forma

A forma média de cada população foi considerada uma tendência de forma dos indivíduos de cada população. Das populações que compõem o complexo, apenas JUIG (*Anthurium jureianum*) não apresenta lobo posterior, sendo a base obtusa e a folha peltada. Nas demais populações, os indivíduos apresentam folha ovada à largamente ovada e a base cordada, podendo ser levemente cordada a lobos posteriores bem desenvolvidos. Nestas, o sino é arcuado na maioria das populações, exceto nas populações HALO (*A. hatschbachii*), onde os indivíduos tendem ter sino triangular (Fig. 3b).

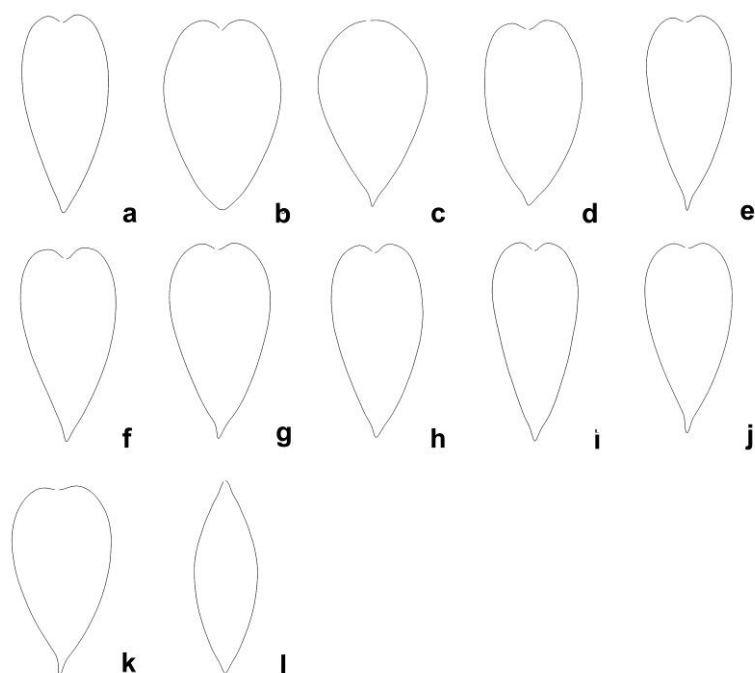


Fig. 3. Forma média das folhas de cada população, construída pela EFA: a – AUNI (*Anthurium augustinum*); b – HALO (*A. hatschbachii*); c – JUIG (*A. jureianum*); d – LATE (*A. laucheanum*); e – LHPE (*A. lhotzkyanum*); f – LHTE (*A. lhotzkyanum*); g – LURJ (*A. lucidum*); h – MANI (*A. maximiliani*); i – MAPE (*A. maximiliani*); j – PANF (*A. parvum*); k – PATE (*A. parvum*); l – LOIM (*A. loefgrenii*).

A morfometria baseada em imagem tem proporcionado estudos de larga escala para investigar as relações entre o polimorfismo fenótipo e biologia evolutiva (Lexer *et al.*, 2009). No caso de *Anthurium*, estudos abordando o formato de folha são promissores, como uma tentativa de compreender a grande plasticidade fenotípica do grupo (Coelho & Mayo, 2007), já que a maior parte dos caracteres utilizados na taxonomia do gênero são vegetativos (Temponi, 2006; Coelho *et al.*, 2009).

A forma das folhas do complexo estudado variou de ovada a largamente ovada, com base levemente cordada nas populações de *A. parvum* (PANF e PATE) a lobos bem desenvolvidos nas demais populações. A forma média mais discrepante das populações do complexo foi a de JUIG (*Anthurium jureianum*) por não apresentar lobo posterior. Nas demais as folhas tendem a ter formato foliar semelhante.

Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais mostrou que as seis primeiras variáveis geradas a partir da matriz de coeficientes de Fourier, representam 97,6% da variância total dos dados (Tab. 2). Estas “variáveis de forma”, ou seja, componentes principais (PCs), foram utilizadas nas outras análises multivariadas, conforme descrito por Yoshioka *et al.* (2004); Andrade *et al.* (2010); Soares *et AL.* (2011). A quantidade máxima da variação do conjunto de dados ocorre no eixo PC 1 (Fig. 4) e explica aproximadamente 71% da variância total do conjunto de dados. Os eixos PC 1 e PC3 separam claramente três grupos, a direita um grupo formado pela população LOIM, a esquerda um grupo formado pela população JUIG a esquerda, e um grupo ao centro composto pelas demais populações (Fig. 4b).

Tab. 2. Valores da Análise de Componentes Principais, Das populações do Complexo *A. augustinum*.

Componente Principal	Autovalores	% da Variância	% da Variância Cumulativa
PC1	0,00600439	71.67	71.67
PC 2	0,00105823	12.63	84.31
PC 3	0,000494383	5.90	90.21
PC 4	0,000309416	3.6934	93.90
PC 5	0,000240528	2.8711	96.77
PC 6	7,67421E-05	0.91605	97.69

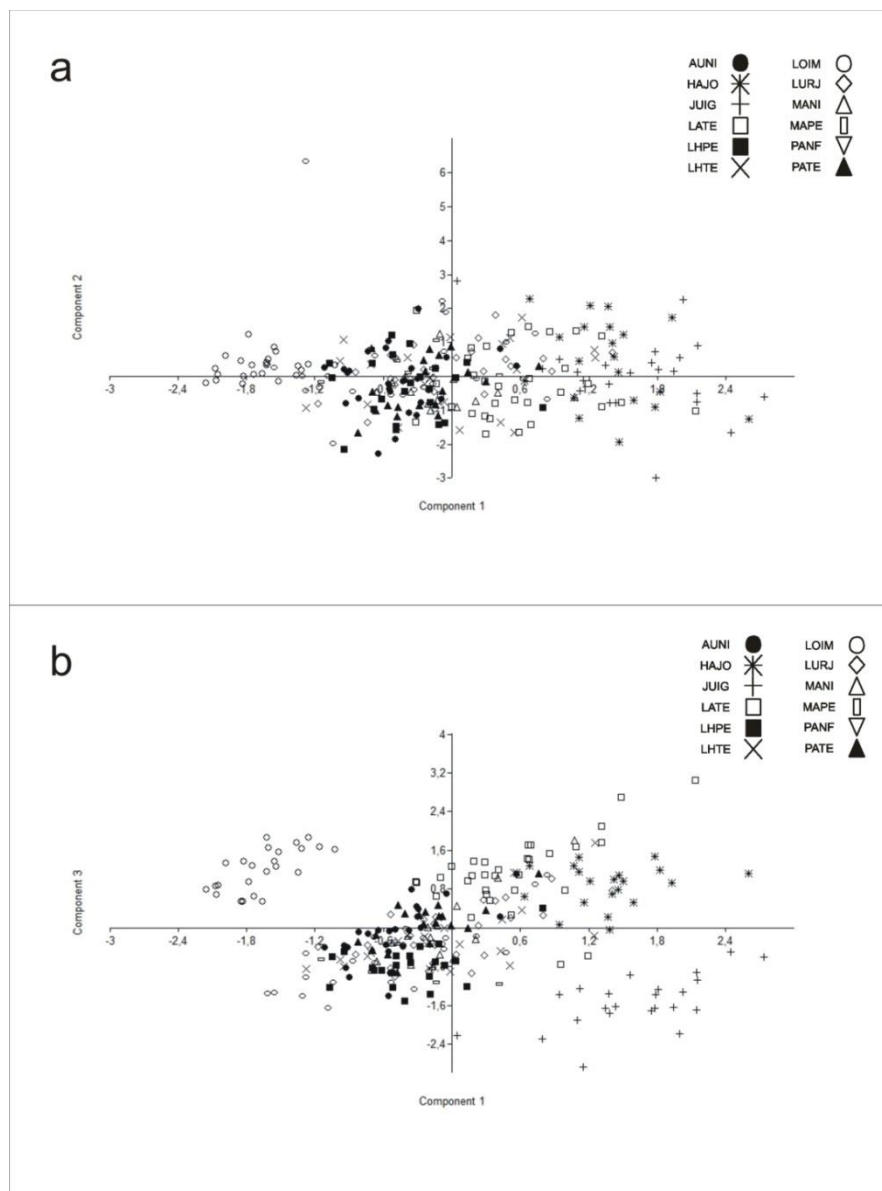


Fig. 4. Representação dos escores dos três primeiros eixos da análise de componente principal: a – distribuição da variação de forma da folha no eixo PC 1 e PC2; b – distribuição da variação de forma da folha no eixo PC1 e PC3. Veja na Tab. 1 os códigos das populações.

Diversidade interpopulacional

Na Análise de Variáveis Canônicas (CVA), os dois primeiros eixos canônicos explicam 62% e 21% da variação respectivamente. Nestes eixos, formam-se três grupos (Fig. 5), à esquerda do gráfico os indivíduos da população LOIM (*A. loefgrenii*) foram agrupados, a direita é visível um grupo composto pelos indivíduos da população JUIG (*A. jureianum*). O terceiro grupo está ao centro do gráfico e é composto pelas demais populações (Fig.5).

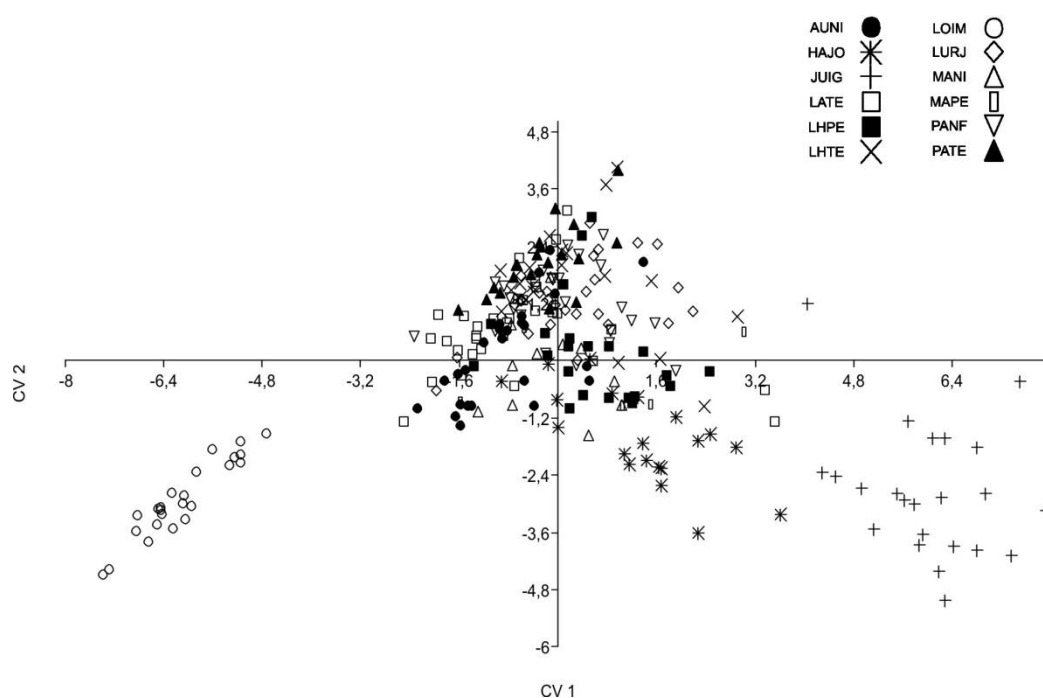


Fig. 5. Representação dos escores dos dois primeiros eixos canônicos da CVA usando seis variáveis de forma derivadas os 80 coeficientes elípticos de Fourier analisados pela Morfometria Geométrica. Veja na Tab. 1 os códigos das populações.

Uma plotagem incluindo apenas as populações pertencentes ao terceiro grupo demonstrou a separação dos indivíduos da população HAJO (*A. hatschbachii*) que formaram um grupo isolado a esquerda.

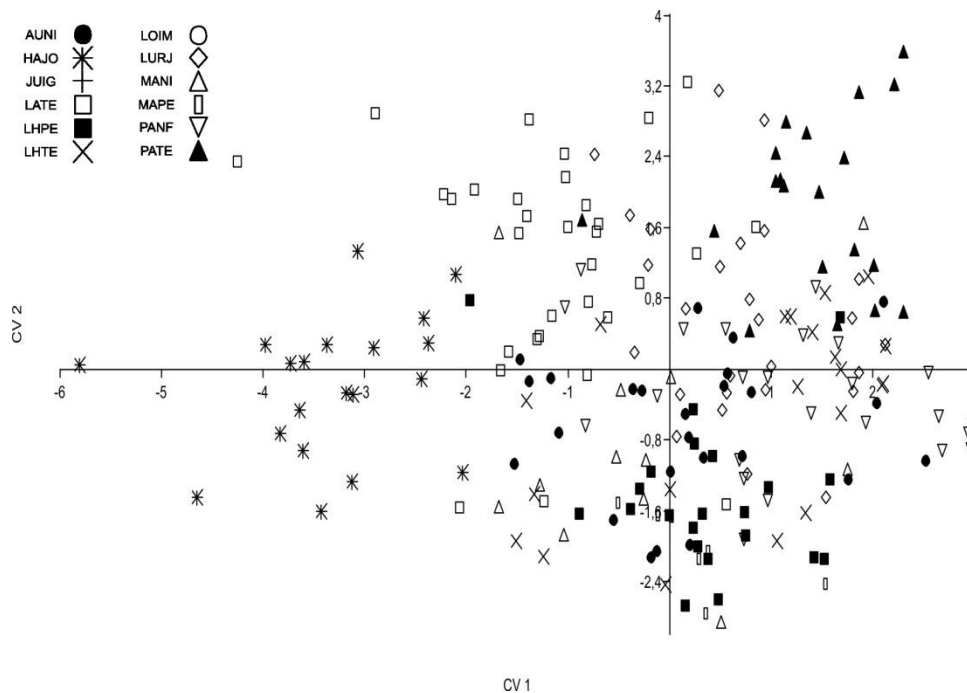


Fig. 6 Representação dos escores dos dois primeiros eixos canônicos da CVA usando seis variáveis de forma derivadas os 80 coeficientes elípticos de Fourier analisados pela Morfometria Geométrica no complexo *A. augustinum*, excluindo as populações JUIG e LOIM. Veja na Tab. 1 os códigos das populações.

A distância interpopulacional foi obtida na análise NP-MANOVA, e demonstrou que 79% dos pares de populações são significativamente diferentes com valores de p menores que 0,05 (Tab. 3). Os outros 21% não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$), sendo considerados semelhantes e envolvem populações de *A. augustinum*, *A. lhotzkyanum*, *A. lucidum*, *A. maximiliani* e *A. parvum*.

A análise NP-MANOVA revelou ainda que JUIG (*A. jureianum*), HAJO (*A. hatschbachii*), LATE (*A. laucheanum*), LOIM (*A. loefgrenii*) e PATE (*A. parvum*) são altamente diferenciadas por não apresentarem valores de $p \leq 0,0002$ quando comparadas com qualquer outra população (Tab. 3).

Tab. 3. Similaridade entre 12 populações do complexo *Anthurium augustinum* baseada na matriz de seis variáveis de forma derivadas da Análise Elíptica de Fourier. Os valores apresentados são *p* – *values* (probabilidade de dois grupos serem semelhantes) derivados da MANOVA não – paramétrica implementada no PAST ver. 1.34 (Hammer *et al.*, 2001); computada com 10000 replicações. Veja na Tab. 1 os códigos das populações.

População	AUNI	HAJO	JUIG	LATE	LHPE	LHTE	LOIM	LURJ	MANI	MAPE	PANF	PATE
AUNI	-											
HAJO	0,0000	-										
JUIG	0,0000	0,0000	-									
LATE	0,0000	0,0000	0,0000	-								
LHPE	n.s	0,0000	0,0000	0,0000	-							
LHTE	0,2772	0,0000	0,0000	0,0000	0,0396	-						
LOIM	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-					
LURJ	0,0132	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-				
MANI	n.s	0,0000	0,0000	0,0000	n.s	n.s	0,0000	0,0066	-			
MAPE	0,6996	0,0000	0,0000	0,0000	n.s	n.s	0,0000	0,0000	n.s	-		
PANF	n.s	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5016	0,0000	n.s	0,4356	n.s	-	
PATE	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0066	0,0000	0,0000	0,0000	-

Em UPGMA, as populações foram agrupadas da seguinte forma: LOIM (*A. loefgrenii*) e JUIG (*A. jureianum*) ficaram isoladas; as populações de *A. parvum* (PATE e PANF) formaram um agrupamento, e as demais populações formaram um agrupamento maior (Fig.7).

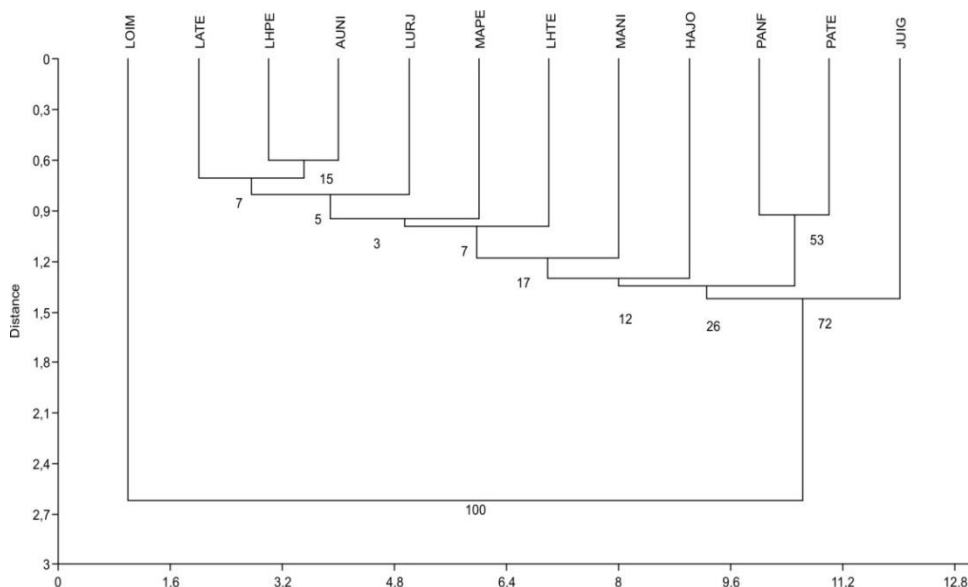


Fig. 7. Dendrograma de UPGMA mostrando as relações fenéticas entre as 12 populações analisadas, através das médias obtidas para cada população na PCA, baseada na matriz da Análise Elíptica de Fourier. O número abaixo de cada ramo é o valor de Bootstrap, do agrupamento calculado com 999 replicações. Veja na Tab. 1 os códigos das populações.

Comparação entre os Táxons

A similaridade entre os nove táxons avaliada por NP-MANOVA evidenciou que quatro apresentam diferenças significativas - *A. hatschbachii*, *A. laucheanum*, *A. jureianum* e *A. loefgrenii* - em todos os pares comparativos. Estes resultados são semelhantes aos obtidos na NP-MANOVA, feita por população.

Na PCoA foram reconhecidos cinco grupos: *A. hatschbachii*; *A. jureianum*; *A. lucidum*; *A. loefgrenii* e um agrupamento maior com as demais espécies (*A. augustinum*, *A. lhotzkyanum*, *A. laucheanum*, *A. maximiliani* e *A. parvum*) (Fig. 8).

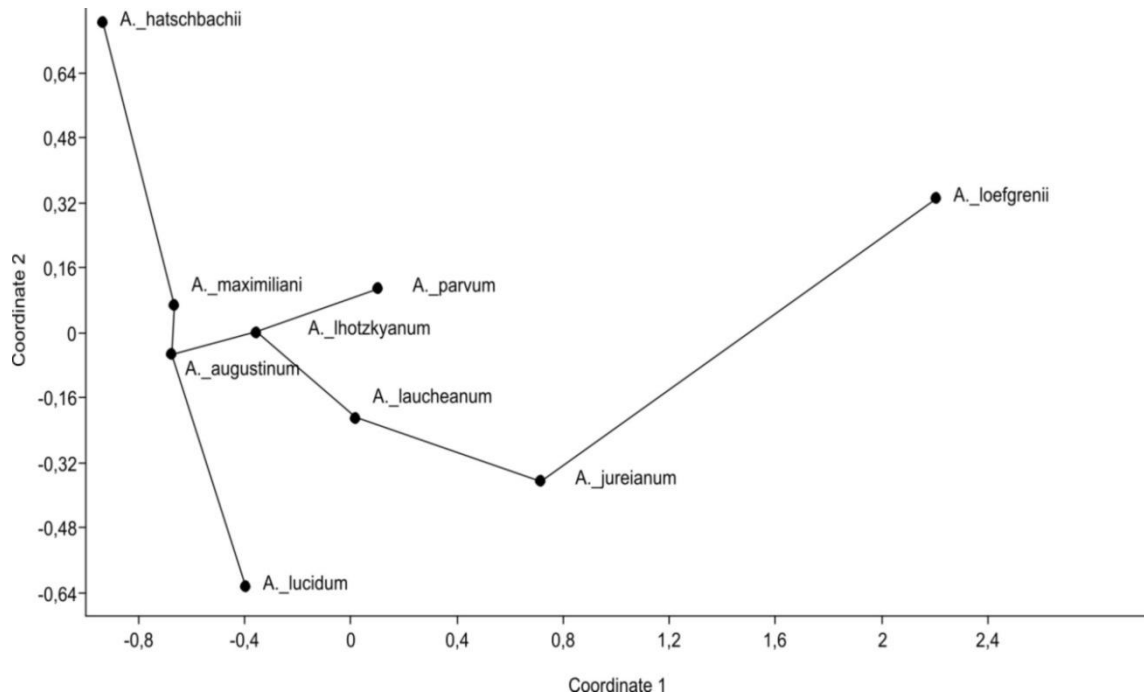


Fig. 8. Análise de Coordenadas Principais, baseada na distância euclidiana entre o centróide de cada táxon do complexo *A. augustinum*.

A análise de agrupamento, usando UPGMA dos nove táxons indicou que *A. hatschbachii*; *A. jureianum*; *A. lucidum* e *A. parvum* são distintos dos demais táxons, e *A. augustinum*, *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* e *A. maximiliani*, formam um único agrupamento, sugerindo constituir um mesmo táxon em nível específico (Fig.9).

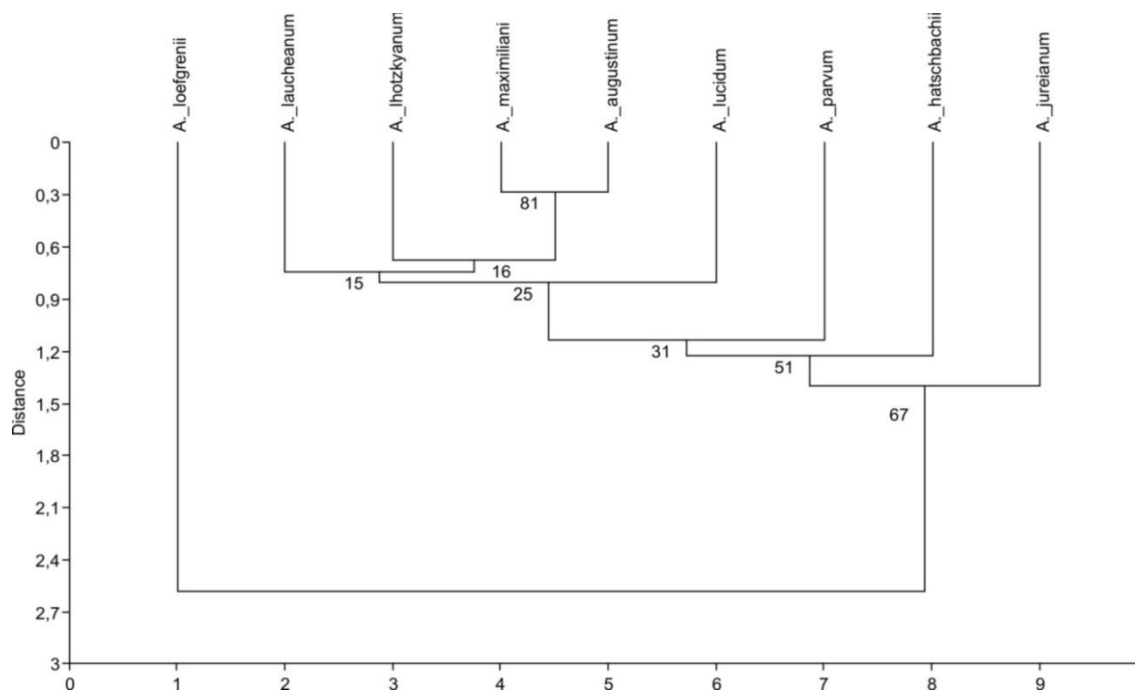


Fig. 9. Dendrograma de UPGMA mostrando as relações fenéticas entre os nove táxons analisados, através das médias de cada população, obtidas na PCA, baseada na matriz da Análise Elíptica de Fourier.

Variabilidade interpopulacional

Na análise de variáveis canônicas foi possível verificar a clara distinção de três populações (Fig. 5, Fig. 6): a população LOIM (*A. loefgrenii*) que apresenta folha lanceolada (Fig. 3 m) e não pertence ao complexo, demonstrando a eficiência do método na discriminação de táxons fora do complexo. A população JUIG (*A. jureianum*), que apresenta lâmina foliar peltada (Fig. 2 c, Fig. 3 c) e HAJO (*A. hatschbachii*) (Fig. 6), apresenta folha com base cordada. Estas populações também são significativamente diferentes de todas as outras populações conforme os resultados da NP-MANOVA. As populações LOIM (*A. loefgrenii*) e JUIG (*A. jureianum*) também ficaram isoladas nas análises de agrupamento (Fig. 6).

A alta sobreposição da forma da folha apresentada entre populações também foi observada em populações de *Anthurium pentaphyllum* e *A. sinuatum* (Andrade *et al.*, 2008), e deve estar relacionada com a alta variação fenotípica que é comum dentro do gênero *Anthurium* (Coelho & Mayo, 2007). Embora haja esta sobreposição entre a maioria das populações amostradas, a distância interpopulacional destas, obtida na NP-MANOVA, revelou que 79% dos pares de populações apresentam diferenças

significativas. Esta análise indicou que das oito populações altamente sobrepostas na CVA (AUNI, LATE, LHPE, LHTE, LURJ; MANI, MAPE, PANF, PATE), três (LATE, LURJ, PATE) apresentam diferenças significativas das demais populações.

A análise NP-MANOVA evidenciou que o contorno foliar das populações AUNI (*A. augustinum*), LHPE, LHTE (*A. lhotzkyanum*), MANI e MAPE (*A. maximiliani*) é altamente similar, a estreita relação destas populações foi confirmada nas análises de agrupamento.

As populações de *A. parvum* (PANF e PATE), aparecem como proximamente relacionadas na análise utilizando UPGMA (Fig. 7), apesar de terem sido consideradas significativamente diferentes na NP-MANOVA. Provavelmente, a utilização de outras análises morfométricas poderia auxiliar nos estudos populacionais de *A. parvum*, uma vez a combinação de caracteres permite que estas populações sejam reconhecidas quando comparadas com as demais populações do complexo.

Comparação entre táxons

As análises de morfometria foliar indicaram uma parcial separação entre táxons. A análise PCoA indica que *Anthurium hatschbachii*, *A. jureianum* e *A. lucidum*, apresentam contorno foliar distinto dos demais táxons. A análise de UPGMA (Fig. 9) confirma a distinção destes três táxons, e infere também que *A. parvum* apresenta contorno foliar distinto dos demais táxons. Este tipo de análise também foi útil na diferenciação de espécimes de *Heteropsis* (Araceae) da Amazônia (Soares *et al.*, 2011).

Considerando que uma espécie não pode ser definida apenas pela forma do contorno foliar, os resultados obtidos nas análises morfométricas, devem estar associados a características importantes na taxonomia clássica do grupo.

Neste contexto, *Anthurium hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* e *A. parvum* apresentam características exclusivas dentro do complexo. A presença de pontuações glandulares na lâmina foliar é uma característica que diferencia *Anthurium hatschbachii* (HALO) (Gonçalves 2011) das demais espécies deste complexo. Já *Anthurium lucidum* difere das demais pelo número de nervuras basais, 1-2, sendo que nas demais espécies é de 3 a 5, a lâmina foliar verde-acinzentado e o pólen branco contra pólen amarelo nas demais (Fig. 2 f), além da distribuição restrita a floresta da Tijuca, Rio de Janeiro. *Anthurium jureianum* é especialmente distinta, apresentou diferenças significativas em todas as análises morfométricas, atribuída a lâmina foliar peltada. *A. parvum* diferencia-

se das demais espécies do complexo por apresentar caule delgado com altura máxima de cinco centímetros, pedúnculo totalmente vináceo com no máximo 22 cm de comprimento e nervuras insculpidas.

Por outro lado, os táxons *A. augustinum*, *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* e *A. maximiliani* não apresentam características exclusivas e compartilham os catafilos marcescentes, ausência de pontuações glandulares na lâmina foliar, de 3 a 5 nervuras basais e pólen amarelo. Conforme a relação fenética apresentada na UPGMA, estes táxons são proximamente relacionadas. Este resultado é um indício de que há semelhança genética entre estes táxons, já que uma série de processos mediados geneticamente está envolvida no estabelecimento da forma do limbo foliar (Kessler & Sinha, 2004). A semelhança da forma foliar pode indicar que as linhagens têm uma história de vida comum ou que pode estar ocorrendo hibridação entre pares de espécies mais relacionadas, principalmente entre populações que ocorrem em simpatria. A influência genética na formação do contorno foliar foi vista por Lexer *et al.* (2009) a partir da aplicação da EFA em duas espécies de *Populus* (Salicaceae) com DNA genômico conhecido. A proximidade destes táxons é reforçada pela ausência de características diagnósticas entre eles.

2.4 Conclusões

Implicações Taxonômicas

Embora as análises morfométricas demonstrem a sobreposição do contorno foliar entre os táxons do complexo, os resultados da UPGMA e PCoA indicam a diferenciação das populações para os táxons *Anthurium jureianum*, *A. lucidum*, *A. hatschbachii* e *A. parvum*. Além disso, cada um deles apresenta outras características que os diferenciam entre si e também dos demais táxons do complexo.

Comparando as descrições dos quatro táxons restantes, *A. augustinum*, *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* e *A. maximiliani*, não foram encontradas características que os diferencie claramente (Koch & Lauche 1855; Koch, 1857; Schott, 1860; Schott, 1862). Todas as análises morfométricas realizadas sugerem uma estreita relação entre estas espécies. Portanto, é indicado que seja mantido o nome mais antigo, *A. augustinum*, o qual, como aqui proposto, passa a ter como sinônimos *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* e *A. maximiliani*.

Em suma a partir das análises realizadas é recomendável o reconhecimento de cinco táxons: *A. augustinum*, *A. lucidum*, *A. hatschbachii*, *A. jureianum*, e *A. parvum*.

Agradecimento

Agradeço aos pesquisadores Marcus A. Nadruz Coelho e Julio Antonio Lombardi pelas contribuições em campo durante a execução do trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo nº 2010/17400-3) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PROTAX Processo nº 562240/2010-1) pelo auxílio financeiro para coleta.

2.6 Referências

- Andrade I.M., Mayo S.J., Kirkup, D., Van den Berg, C. 2008. Comparative morphology of populations of *Monstera* Schott (Araceae) from natural forest fragments in Northeast Brazil using elliptic Fourier Analysis of leaf outlines. *Kew Bulletin*. 63(2):193-211.
- Andrade I.M., Mayo S.J., Kirkup, D., Van den Berg, C. 2010. Elliptic Fourier Analysis of leaf outline shape in forest fragment populations of *Anthurium sinuatum* and *A. pentaphyllum* (Araceae) from Northeast Brazil. *Kew Bulletin* 65(1):3-20.
- Bernadello L., Rodriguez, I., Stiefkens, L., Galetto, L. 1995. The hybrid nature of *Lycium ciliatum* X *cestroides* (Solanaceae): experimental, anatomical, and cytological evidence. *Canadian Journal of Botany* 73(12):1995-2005.
- Bookstein, F.L. 1984. A statistical method for biological shape comparisons. *Journal of Theoretical Biology*, 107(3):475-520.
- Bookstein, F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge. 435 p.
- Boyce P.C., Croat, T.B. 2011. The Überlist of Araceae, Totals for Published and Estimated Number of Species in Aroid Genera. Disponível em: <http://www.aroid.org/genera/120110uberlist.pdf>. Acesso em 20.03.2013.
- Carlsen, M.M., Croat, T.B. 2013. A Molecular Phylogeny of the Species-Rich Neotropical Genus *Anthurium* (Araceae) based on Combined Chloroplast and Nuclear DNA. *Systematic Botany* 38(3):576-588.

- Coelho, M.A.N., Mayo, S.J. 2007. Typifications of names of Brazilian taxa of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae). *Taxon* 56 (1):211-225.
- Coelho, M.A.N., Temponi L.G. 2013. *Anthurium In: Forzza et al...* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB004912>. Acesso em 06.03. 2013.
- Coelho, M.A.N., Waechter, J.L., Mayo, S.J. 2009. Revisão Taxonômica das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia*. *Rodriguésia* 60(4):799-864.
- Croat, T.B., Bunting, G.S. 1979. Standardization Of *Anthurium* Descriptions. *Aroideana* 2(1):15-25.
- Croat, T.B., Sheffer, R.B. 1983. The sectional groupings of *Anthurium* (Araceae). *Aroideana* 6(3):85-23.
- Fonsêca, L.C.M. 2006. Descrição da Arquitetura Foliar e Análise Morfométrica das Folhas de *Spathicarpa* Hook. (Araceae) 45 f. Dissertação, Universidade de Brasília, Brasília.
- Gonçalves, E.G. 2011. A new species of *Anthurium* (Araceae) from Paraná State, Southern Brazil. *Aroideana* 34(1):64-65.
- Gonçalves, E.G., Mayo, S.J., Sluys, M.V., Salatino, A. 2007. Combined genotypic–phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43(3): 1023-1039.
- Gregg, J.R. 1950. Taxonomy, Language and Reality. *The American Nature* 84:419-435.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Palaeontological Statistics programa package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. Disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past>. Acesso em 14.08.2012.
- Kessler, S., Sinha, N. 2004. Shaping up: the genetic control of leaf shape. *Current Opinion in Plant Biology* 7(1):65-72.
- Koch, K.H.E. 1857. *Allgemeine Gartenzeitung*. 25:191
- Koch, K.H.E., Lauche, W. 1855. *Ind Sem Hort Berol.* :7.
- Kull, F.P., Giardina, C.R. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer graphics and image processing* 18(1):236-258.
- Lexer, C., Joseph, J., Van Loo, M., Prenner, G., Heinze, B., Chase, M.W., Kirkup, D. 2009. The use of digital image-based morphometrics to study the phenotypic mosaic in taxa with porous genomes. *Taxon* 58(2):349-364.

- Mayo, S.J., Bogner, J., Boyce, P.C. 1997. The genera of Araceae. Kew: Botanic Gardens, London. 370 p.
- Monteiro, L.R., Reis, S.F. 1999. Princípios da Morfometria Geométrica. Holos, Ribeirão Preto. 189 p.
- Radford, A.E., Dickison, W.C.J., Massey, R., Bell, C.R. 1976. Vascular Plant Systematics. Harper and Row, New York. 891 p.
- Rasband, W.S. 2004. IMAGEJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Usa. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Acesso em: 12.5.2012.
- Ray, T.S. 1992. Landmark eigenshape analysis: homologous contours: leaf shape in *Syngonium* (Araceae). American Journal of Botany 79(1):69-76.
- Rohlf, F.J. 2010. TpsRelw, Relative Warps Analysis, version 1.46. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. New York. 243 p.
- Rohlf, F.J., Archie, J.W. 1984. A comparison of Fourier Methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). Systematic Zoology 33(3):302-317.
- Rohlf, F.J., Marcus, L.F. 1993. A revolution in morphometrics. Trends in Ecology and Evolution 8(4):129-132.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4):406-425.
- Schott, H.W. 1860. Prodromus Systematic Aroidearum. Horto Schoeiihriinnensi, Viena: 491
- Schott, H.W. 1862. Bonplandia 10:5.
- Silva, M.F.S., Andrade, I.M., Mayo, S.J. 2012. Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Montrichardia linifera* (Araceae) populations from the Rio Parnaíba Delta, north-east Brazil. Botany Journal of the Linnean Society 170(4):554-572.
- Slice, D. 1998. Morpheus *et. al.*, Multiplatform programa for morphometric research. Disponível em: <http://www.morphometrics.org/id6.html>. Acesso em: 14.8.2012.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman and Company, San Francisco. 573.
- Soares, M.L.C., Mayo, S.J., Gribel, R., Kirkup, D. 2011. Elliptic Fourier Analysis of leaf outlines in five species of *Heteropsis* (Araceae) from the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. Kew Bulletin 66(3):1-8.
- Stace, C.A. 1989. Plant taxonomy and biosystematics. Edward Arnold, London. 272 p.

- Stehmann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P., Kamino, L.H.Y. 2009. Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 713 p.
- Temponi, L.G. 2006. Sistemática de *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae) 143 f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Temponi, L.G., Coelho, M.A.N. 2011. Two new species of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae) for Brazil: *Rodriguésia*. 62(2):315-320.
- Yoshioka, Y., Iwata, H., Ohsama, R., Ninomya, S. 2004. Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by elliptic Fourier descriptors and principal component analysis. *Annals of Botany* 94(5):657-664.

3 CAPÍTULO 2

Estrutura e variabilidade genética do complexo *Anthurium augustinum* (Araceae), grupo endêmico da Floresta Atlântica brasileira

Resumo

O complexo *Anthurium augustinum* K. Koch & Lauche (Araceae), como aqui definido, reúne oito táxons: *A. augustinum* K. Koch & Lauche, *A. hatschbachii* E.G.Gonç., *A. jureianum* Cath. & Olai; *A. laucheanum* K.Koch; *A. lhotzkyanum* Schott; *A. lucidum* Kunth; *A. maximiliani* Schott e *A. parvum* N.E.Br. Estas espécies compartilham a base foliar cordada ou arredondada, devido à fusão dos lobos basais e apresentam delimitação taxonômica confusa devido à sobreposição dos caracteres que as definem. Utilizando marcadores ISSR, foram determinadas a variabilidade e a estruturação genética de 12 populações naturais pertencentes ao complexo, a fim de verificar a existência de relações entre os padrões genéticos e morfológicos que auxiliem na delimitação de táxons. Os valores de heterozigosidade das populações (0,203 a 0,358) foram superiores aos encontrados em populações de espécies que apresentam as mesmas características biológicas. A AMOVA apontou alta variação dentro das populações (75%) e baixa divergência entre as populações (25%). A análise Bayesiana indicou a ocorrência de oito grupos genéticos (K=8) em um gradiente geográfico. As relações genéticas entre os pares de populações indicam que tanto a circunscrição dos táxons aceitos atualmente, e os padrões morfológicos não refletem a totalidade da variação genética acessada. Entretanto, os táxons *Anthurium hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* apresentaram diferenciação genética suficiente para serem indicadas como táxons válidos. *Anthurium parvum* possui a maior variabilidade genética dentre as espécies analisadas e apesar de não ser geneticamente diferenciada, é morfológicamente distinta dos demais táxons do complexo, e por isto sugerimos que seja mantida como espécie válida. Não foi possível verificar estruturação genética para distinção genética entre *Anthurium augustinum*, *A. laucheanum* e *A. maximiliani*, corroborando com os resultados morfométricos. Desta forma sugerimos que os táxons *Anthurium laucheanum*, *A. lhotzkyanum*, *A. maximiliani*, sejam considerados como sinônimos de *A. augustinum*.

Palavras-Chave: genética de populações, ISSR, *Anthurium* seção *Urospadix* Engl.

3.2 Introdução

Estudos moleculares acessam informações genéticas de espécies que são fundamentais para o entendimento de aspectos evolutivos, ecológicos e de conservação (Nybom 2004). Em plantas vários marcadores moleculares são utilizados para esta finalidade (Hamrick e Godt 1996; Nybom e Bartish 2000; Archibald et al. 2006).

Dentre os marcadores moleculares, os marcadores dominantes apresentam evolução rápida e são hiper variáveis, por isso são frequentemente utilizados na reconstrução das relações evolutivas entre táxons proximamente relacionados (Archibald et al. 2006).

O marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é um tipo de marcador dominante, descrito por Zietkiewicz e colaboradores em 1994, e consiste na utilização de vários *primers* específicos para codificar pequenas regiões do genoma entre dois microssatélites (Guasmi et al. 2006). O ISSR amplifica um grande número de fragmentos polimórficos, útil na detecção de polimorfismos genéticos a nível específico (Zietkiewicz et al. 1994).

Análises utilizando ISSR foram bem sucedidas na identificação de plantas cultivadas (Fang e Roose 1997; Guasmi et al. 2006) está sendo uma ferramenta útil em estudos de populações naturais (Wolfe et al. 1998; Ge et al. 2005; Krings e Xiang 2005; Gaiero et al. 2011, Barbosa 2011; Rana et al. 2012).

Araceae pode ser caracterizada por sua inflorescência que compreende uma bráctea chamada espata e uma espiga denominada espádice. O espádice contém flores pequenas, actinomorfas, com gineceu sincárpico, e fruto é do tipo baga (Grayum 1990). Compreende cerca de 3800 espécies, organizadas em oito subfamílias e 113 gêneros aceitos atualmente (The Plant List 2010). Ocorrem em todos os continentes, exceto Antártida. Sua maior diversidade é verificada nas regiões tropicais em florestas úmidas (Mayo et al. 1997). O continente americano é um centro de diversidade da família (Croat 1979).

A filogenia a partir de regiões de DNA plastidial tem ajudado a compreender a relação entre as oito subfamílias e a evolução de caracteres da família (Cabrera et al. 2008; Cusimano et al. 2011).

Anthurium Schott é o maior gênero de Araceae, pertence à subfamília Photoideae (Cusimano et al. 2011), com 862 espécies neotropicais (The Plant List 2010). O gênero ocorre entre a Argentina e o México, e nas ilhas do Caribe (Mayo et al. 1997; Govaerts 2002) com maior diversidade no Panamá, Colômbia e Equador (Mayo et al. 1997) sendo que cerca de 140 espécies ocorrem no Brasil, a maioria na Floresta Atlântica (Coelho e Temponi 2013).

A classificação do gênero é baseada principalmente em caracteres morfológicos vegetativos, tais como formato, cor e consistência da lâmina foliar, pontoações glandulares, tipo de nervação, formato e comprimento do pecíolo, catafilos, e comprimento do entrenó (Engler 1878; Croat e Sheffer 1983; Croat 1991; Coelho et al. 2009; Temponi e Coelho 2011).

No decorrer do tempo *Anthurium* foi subdividido em 16 a 19 seções (Engler 1878; Croat e Sheffer 1983; Croat 1991; Carlsen e Croat 2007; Coelho et al. 2009). Uma das seções, *Anthurium* seção *Urospadix* Engl., é caracterizada por apresentar caule e entrenós curtos, lâminas foliares simples, geralmente lanceoladas com base geralmente aguda a cuneada, raramente subcordada ou cordada, nervação broquidódroma, espádice geralmente vináceo, espata verde com estrias vináceas ou completamente vináceas (Temponi 2006; Coelho e Catharino 2008). A distribuição é considerada

disjunta, por vários autores, com um centro de diversidade entre a América Central e o oeste da América do Sul, e outro no leste do Brasil (Engler 1878; Croat e Sheffer 1983; Croat 1991). Com base morfológica e molecular Temponi (2006) propõe que *Anthurium* seção *Urospadix* Engl. é restrita ao leste do Brasil e composta por 60 espécies. Segundo Temponi e Coelho (2011), foram acrescentadas a seção 32 espécies, totalizando cerca de 90 espécies, todas endêmicas do Brasil.

Nesta seção destaca-se um grupo, aqui denominado, complexo *Anthurium augustinum* K.Koch & Lauche, que compreende atualmente oito táxons: *A. augustinum* K.Koch & Lauche; *A. hatschbachii* E.G.Gonç., *A. jureianum* Cath. & Olaió; *A. laucheanum* K.Koch; *A. lhotzkyanum* Schott; *A. lucidum* Kunth; *A. maximiliani* Schott e *A. parvum* N.E.Br. (Fig. 1). Estas espécies apresentam alta variação morfológica intra e interespecífica, o que torna difícil a delimitação dos táxons. O grupo é caracterizado por possuir lâmina foliar deflexa, com nervação campilódroma, base cordada e lobos posteriores arredondados ou semi-ovais. A combinação destes caracteres vegetativos é exclusiva das espécies pertencentes ao complexo *Anthurium augustinum*, ocorrendo. Além disso, caracteres anatômicos e moleculares utilizados na filogenia da seção apontam que há estreita relação filogenética entre estes táxons (Temponi 2006).

O complexo é endêmico da Floresta Atlântica (Temponi 2006; Stehmann et al. 2009; Coelho e Temponi 2013), mais precisamente numa faixa estreita da Floresta Atlântica entre o sul e sudeste brasileiro.

A formação dos complexos de espécies mal delimitados, em alguns casos, pode estar relacionada com o grande número de espécies dentro de um gênero. No caso de *Anthurium* a variação morfológica intraespecífica e a plasticidade fenotípica, o torna taxonomicamente complexo (Coelho e Mayo 2007), isto associado à falta de informações geográficas e ecológicas de populações naturais resulta em confusões taxonômicas e nomenclaturais (Coelho e Mayo, 2007). Neste contexto, em alguns casos a taxonomia clássica é insuficiente para resolver estes problemas taxonômicos.

Em populações naturais de *Anthurium* a variabilidade e estrutura genética foram acessadas apenas em duas espécies *A. pentaphyllum* (Aubl.) G. Don e *A. sinuatum* Benth. ex Schott. (Andrade et al. 2009) utilizando o marcador molecular dominante AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al. 1995), que é similar ao marcador ISSR (Simmons et al. 2007).

Neste contexto, o complexo *A. augustinum* será investigado utilizando o marcador ISSR visando responder se os táxons em questão podem realmente ser considerados entidades taxonomicamente distintas. Como objetivos específicos pretende-se estimar a diversidade e estrutura genética populacional deste complexo; determinar as populações de menor e maior variabilidade genética; reunir informações genéticas que possam ser úteis na tomada de decisões quanto à delimitação de contingentes populacionais dos grupos tratados.

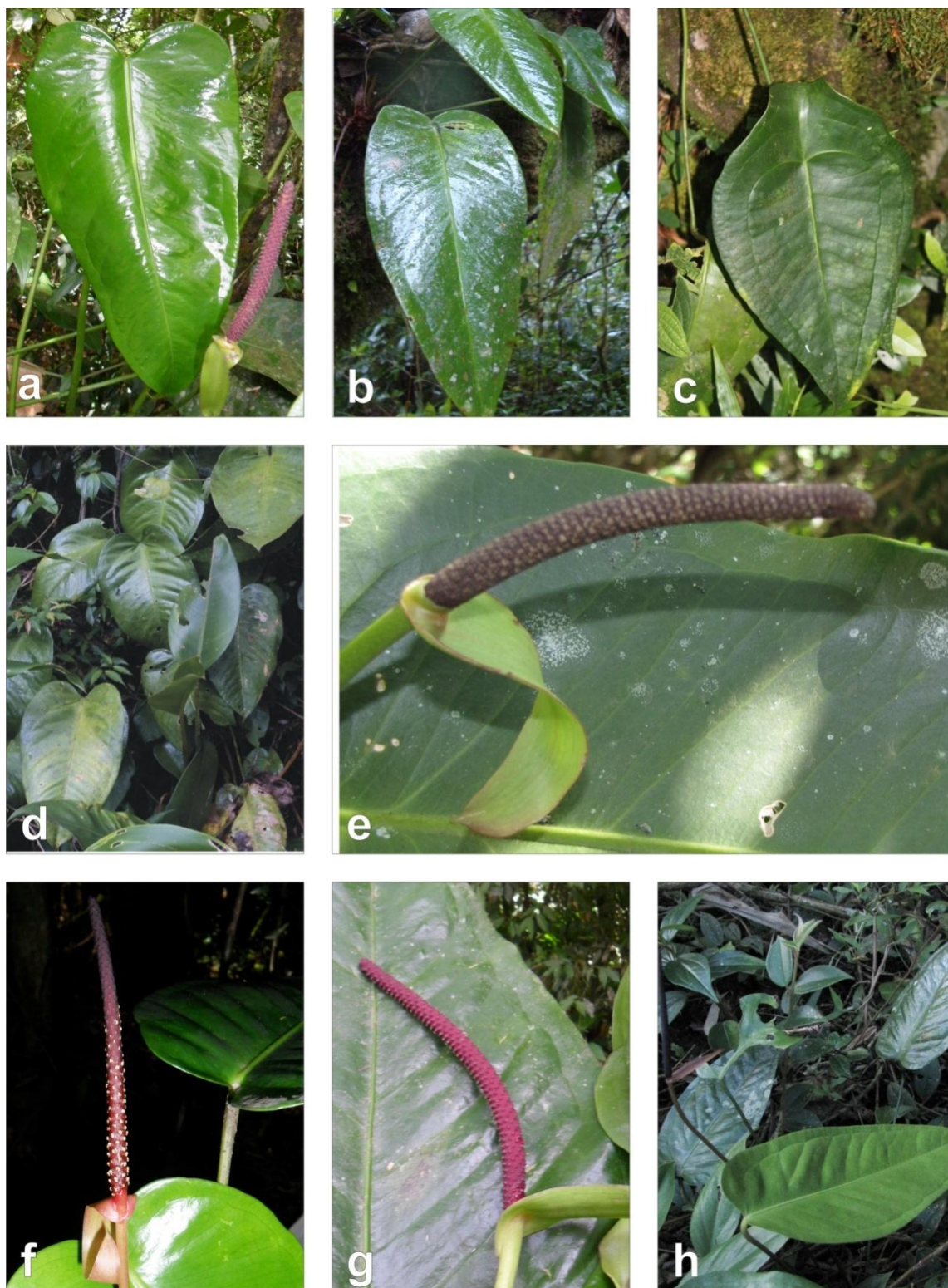


Fig. 1 Espécies que compõe o complexo *A. augustinum*: a – *Anthurium augustinum*; b – *A. hatschbachii* ; c – *A. jureianum*; d – *A. laucheanum*; e – *A. lhotzkyanum*; f – *A. lucidum*; g – *A. maximiliani*; h – *A. parvum*.

3.3 Material e Métodos

Amostragem dos táxons

As coletas foram realizadas de julho de 2011 a agosto de 2012, em quatro estados (Paraná, São Paulo, Santa Catarina, e Rio de Janeiro) pertencentes às regiões sul e sudeste do Brasil.

O trabalho de campo incluiu coleta de espécimes em populações naturais dos oito táxons que compõe o complexo *A. augustinum* (Tab. 1): *A. augustinum* (AUNI); *A. hatschbachii* (HALO), *A. jureianum* (JUIG); *A. laucheanum* (LATE); *A. lhotzkyanum* (LHTE; LHPE); *A. lucidum* (LURJ); *A. maximiliani* (MAPE; MANI); *A. parvum* (PATE, PANF). Além destas, foi amostrada uma população da espécie *Anthurium loefgrenii* Engl. (LOIM), que serviu como parâmetro do grau de variação genética e morfológica encontrado em uma espécie de *A. seção Urospadix* que não pertence ao complexo *A. augustinum*.

Vouchers de cada população foram confeccionados e depositados nos herbários do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UPCB) e Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) (Tab. 1).

Tab. 1 Localidade das populações amostradas por táxons do complexo *A. augustinum*. coordenadas geográficas, localidade, código e *voucher* correspondente a cada população.

Nº Táxon	Táxon	População	Código	Nº indiv.	Coordenadas	Voucher
1	<i>A. augustinum</i> K. Koch & Lauche	Nova Iguaçu- RJ	AUNI	25	22°33'41"S, 43°28'60"W	L. G. Temponi, et al. 1052
2	<i>A. hatschbachii</i> E.G.Gonç.	Joinville –SC	HAJO	20	26°12'43"S, 48°57'28"W	A. P. Cardozo et al. 63
3	<i>A. jureianum</i> Cath. & Olaio	Iguape-SP	JUIG	23	24°32'42"S, 47°13'50"W	A. P. Cardozo et al. 60
4	<i>A. laucheanum</i> K.Koch	Teresópolis – RJ	LATE	25	22°26'57"S, 42°59'22"W	L. G. Temponi, et al. 1025
5	<i>A. lhotzkyanum</i> Schott	Teresópolis – RJ	LHTE	21	26°26'54"S, 43°00'48"W	L. G. Temponi, et al. 1031
		Petrópolis – RJ	LHPE	22	22°24'35"S, 43°12'35"W	A. P. Cardozo et al. 33
6	<i>A. lucidum</i> Kunth	Rio de Janeiro – RJ	LURJ	27	22°58'5,6"S, 43°15'25"W	L.G. Temponi, et al. 1050
7	<i>A. maximiliani</i> Schott	Nova Iguaçu- RJ	MANI	19	22°34'34"S, 43°27'59"W	L. G. Temponi, et al. 1051
		Petrópolis – RJ	MAPE	7	22°24'35"S, 43°12'35"W	A. P. Cardozo et al. 34
8	<i>A. parvum</i> N.E.Br	Nova Friburgo – RJ	PANF	24	22°25'37"S, 42°31'48"W	A. P. Cardozo et al. 44
		Teresópolis – RJ	PATE	20	22°25'37"S, 42°31'48"W	L.G. Temponi, et al. 975
9*	<i>A. loefgrenii</i> Engl.	Ilha do Mel – PR	LOIM	24	25°30'36"S, 48°20'19"W	A. P. Cardozo et al. 31

*Grupo Externo

Extração e amplificação do DNA

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de folhas de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações. A qualidade das amostras foi verificada através de visualização em gel de agarose/brometo de etídio. O DNA total foi conservado em *ultrafreezers* (-80°C) e depositado no banco de DNA total da Universidade Federal do Paraná (DNA-UPCB). Foi testado um conjunto de 21 *primers* de ISSR para a seleção daqueles que apresentaram polimorfismo satisfatório (Tab.2).

Foram realizadas amplificações em reação de 20µl, a partir de reação de PCR, utilizando 3 µl de DNA (10 µM); 2 µl de tampão de reação 10x MgCl₂(mM); 1,2 µl de MgCl₂ (50mM); 2 µl de DNTPs (2mM), 0,4 µl de *primer* (20µM); 0,3 µl de TAQ *polymerase* (5U/µL) e 11,1 µl de H₂O (q.s.p.).

As amplificações foram realizadas em programa com pré-melting a 94° C por 1,5 minutos, 37 ciclos com etapa de denaturação a 94° C por 40 segundos, etapa de anelamento a ou 53° ou 56° C por 45 segundos e etapa de extensão a 72° C por 1,5 minutos, seguidos de uma extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os padrões de banda foram caracterizados através de eletroforeses em gel de agarose 1,5% em tampão de CTAB para gel 0,5x, correndo em voltagem de 100 V por aproximadamente 3 horas. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml. As bandas foram fotodocumentadas no transluminador UV (Sistema de Fotodocumentação L-PIX - Loccus Tecnologia). O tamanho molecular dos fragmentos foi estimado utilizando Ladder de 100 pb (Ludwig Biotechnology).

Tab. 2 Grupos morfológicos com suas respectivas populações do complexo *A. augustinum*. Veja Tab. 1 para nomes das populações.

Grupos Morfológicos	População
1	AUNI / LATE/ MANI / MAPE/LHPE/ LHTE
2	HAJO
3	JUIG
4	LURJ
5	PATE/ PANF
6*	LOIM

*Grupo externo

Análise genética das populações

Os locos de ISSRs foram codificados visualmente como presença (1) ou ausência (0) de uma banda para a construção de uma matriz binária de genótipos. Locos que apresentaram baixa resolução foram excluídos da análise. Foram consideradas homólogas todas as bandas de igual tamanho molecular em um mesmo *primer* (Williams et al. 1993; Rieseberg 1996). Essa matriz de fenótipos foi utilizada para avaliar parâmetros como a porcentagem de locos polimórficos (*P*), diversidade genética utilizando índice de Shannon (*I*) e Heterozigosidade esperada (*H_e*) usando o programa GenAlex 6.5 (Peakall e Smouse 2001).

A partir da matriz de fenótipos ISSR uma matriz de distâncias euclidianas quadradas foi construída e utilizada na análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa GenAlex 6.5. A AMOVA quantificou a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída e a diferença interpopulacional. A análise da estrutura genética, ou seja, da perda de diversidade causada pela subdivisão populacional foi feita através do Φ_{ST} (estatística análoga a F de Wright 1921) entre todos os pares de populações. Foram testados dois tipos de agrupamentos populacionais: morfológico (Tab. 2) e taxonômico (que esta de acordo com os nomes aceitos na taxonomia atual).

Foram construídas duas matrizes de distância (uma com distância de Nei e a outra com os valores de Φ_{ST} entre todos os pares de populações) utilizando o programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans 2002). Estas matrizes foram utilizadas para construir dendrogramas utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. Os dendrogramas gerados foram reunidos em um consenso estrito através do programa *Consense*, ambos implementados no programa PHYLIP versão 3.5 (Felsenstein 1993). As árvores resultantes foram visualizadas com o programa TREEVIEW (Page 1996).

Foi realizada análise Bayesiana para inferir o número de grupos genéticos nas populações amostradas utilizando o programa Geneland 4.0.3 (Guillot e Santos 2010) disponível no programa R (<http://www.r-project.org/>). O número de grupos gênicos (K) foi extraído de $K = 1-15$ e 10 corridas independentes foram feitas para cada K . Cada corrida conteve 10.000 interações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) das quais foram salvas uma a cada 1000, com o *burn-in* inicial de 200 interações. Foi realizada uma nova AMOVA para testar os grupos genéticos obtidos na análise Bayesiana utilizando o programa GenAlex 6.5.

3.4 Resultados

Diversidade genética intrapopulacional

Dentre os 21 *primers* testados seis produziram locos com boa resolução. O número de locos amplificados por *primer* variou de 10 a 14, totalizando 68 locos, com tamanho entre 500 a 2080 pb (Tab. 3). A proporção de locos polimórficos variou de 54,41% (HALO) a 95,59% (PANF), sendo 77,15% a proporção média de todas as populações. Nenhuma população apresentou fragmento exclusivo. A heterozigosidade média esperada foi de 0,291. A população PANF apresentou a maior heterozigosidade média esperada (0,358), seguida pela população de AUNI (0,333). A menor média foi encontrada na população HALO (0,203). O menor valor do Índice de diversidade de Shannon (I) foi estimado para a população HALO (0,300), enquanto o maior valor foi estimado para PANF (0,531), sendo a média das populações 0,429 (Tab. 4).

Tab. 3 Sequência, temperatura de anelamento ideal, número de fragmentos e variação de tamanho de fragmentos (em pares de bases – pb) dos *primers* utilizados na análise de variabilidade genética baseada em padrões de ISSR em populações do complexo *A. augustinum*.

<i>Primer</i>	Sequência	Temp. de anelamento	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
MANNY	5'-(CAC) ₄ RC-3'	53°	10	700 a 1500
MAO	5'-(CTC) ₄ RC-3'	53°	12	600 a 2080
UBC 813	5'-(CT) ₈ T-3'	53°	11	600 a 2080
UBC 840	5'-(GA) ₈ YT-3'	56°	12	500 a 1500
UBC 844	5'-(CA) ₆ RG-3'	53°	11	600 a 2080
UBC 899	5'-(CA) ₆ RG-3'	53°	13	500 a 2080

Tab. 4 Variabilidade genética encontrada em populações do complexo *A. augustinum* baseada em 68 locos de ISSR. *N*: total de fragmentos encontrados em cada população; *P*: percentual de locos polimórficos; *I*: Índice de Shannon; *H_E*: heterozigosidade média esperada dentro da população. Veja a Tab. 1 para nome das populações.

População	Nº de fragmentos	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	<i>H_E</i>
AUNI	68	85.29	0.485(0.030)	0.333 (0.022)
JUIG	63	61.76	0.330 (0.036)	0.223 (0.025)
HALO	57	54.41	0.300 (0.036)	0.203 (0.026)
LATE	66	70.59	0.397 (0.035)	0.271 (0.025)
LHTE	67	70.59	0.384 (0.034)	0.259 (0.024)
LHPE	62	75.00	0.405 (0.033)	0.273 (0.024)
LOIM	64	83.82	0.468 (0.030)	0.318 (0.022)
LURJ	66	88.24	0.472(0.026)	0.315 (0.19)
MANI	61	85.29	0.456 (0.030)	0.307 (0.022)
MAPE	64	69.12	0.380 (0.035)	0.257 (0.025)
PATE	63	79.41	0.469 (0.032)	0.323 (0.023)
PANF	67	95.59	0.531 (0.021)	0.358 (0.016)
Média	64	77.15	0.429 (0.009)	0.291 (0.006)
<i>A. lhotzkyanum</i>	67	95.59%	0.531 (0.023)	0.361 (0.018)
<i>A. maximiliani</i>	66	91.18%	0.543 (0.025)	0.375 (0.019)
<i>A. parvum</i>	67	95.59%	0.561 (0.020)	0.384 (0.015)

Relações populacionais e estrutura genética:

A variabilidade genética estimada a partir da análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou moderada divergência entre populações ($\Phi_{ST} = 0,266$). A variabilidade genética intrapopulacional foi estimada em 75% e a interpopulacional 25% (Tab. 5).

Para as três análises de AMOVA com grupos de populações testadas (taxonômico, morfológico e genético) (Tab. 5), foi encontrada baixa divergência entre os grupos de populações (7-11%), sendo a mais elevada nos grupos genéticos, e alta variação dentro das populações (72-73%), com o valor da estruturação genética calculada pelo Φ_{ST} variando de 0,266 a 0,280.

Tab. 5 Análise de variância molecular (AMOVA) para três diferentes agrupamentos testados para 12 populações de *do* complexo *A. augustinum* e uma população de *A. loefgrenii*: 1) Grupo nomenclatural; 2) Grupo morfológico; 3) Grupo genético. * $p < 0,001$.

Fonte de variação	Porcentagem de variação (%)		
	Grupos nomenclaturais 9 padrões	Grupos morfológicos 6 padrões	Grupos genéticos 8 padrões
Entre grupos	7	10	11
Entre populações dentro dos grupos	20	18	16
Dentro das populações	73	72	73
Φ_{st} (pop/total)	0,266*	0,280*	0,272*

Na análise Bayesiana as 12 populações formaram oito grupos genéticos ($K=8$). (Tab. 6, Fig. 2). Nenhuma população apresentou todos os indivíduos com elevada probabilidade posterior de pertencer a um único grupo. De maneira geral, as populações foram agrupadas de acordo com a localidade onde foram coletas (Fig. 3). As populações de Nova Iguaçu (AUNI e MANI) foram agrupadas. Outro agrupamento engloba as populações de Teresópolis (LATE, LHTE, PATE). E as populações de Petrópolis (LHPE, MAPE) formaram outro agrupamento. Nos três grupos genéticos citados populações com morfologia distinta e de diferentes táxons foram agrupadas.

Tab. 6. Grupos genéticos com suas respectivas populações do complexo *A. augustinum* inferidos a partir de análise Bayesiana. Veja Tabela 1 para nomes das populações.

Grupos genéticos	População
1	AUNI /MANI
2	LATE/ LHTE/ PATE
3	LHPE/ MAPE
4	HAJO
5	JUIG
6	LURJ
7	PANF
8*	LOIM

*Grupo externo

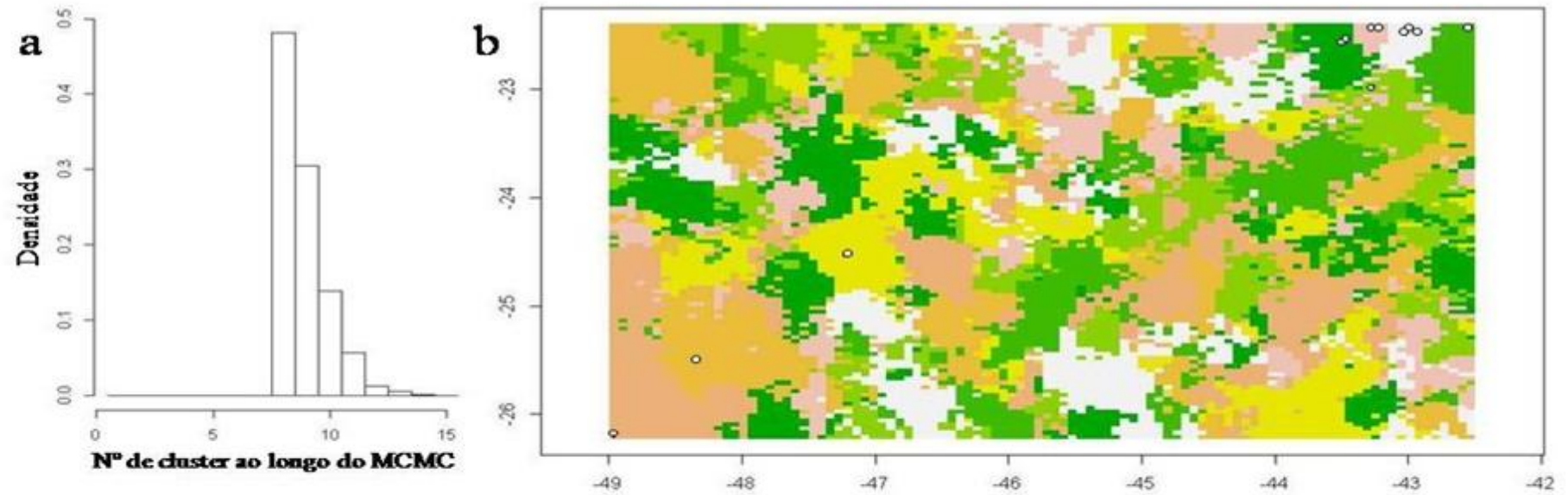


Fig. 2. Distribuição da probabilidade posterior de um número K de agrupamentos genéticos do complexo de *Anthurium augustinum*. B – Mapa das populações do complexo de *Anthurium augustinum* em cada domínio genético inferido por análise Bayesiana.



Fig 3 . Localização geográfica das populações geográficas no sul e sudeste do Brasil. Agrupamento genético a partir da análise Bayesiana. Veja na Tab. 1

Cada uma das demais populações do complexo (HALO, JUIG, LURJ e PANF) formou um grupo genético distinto. Nenhuma destas populações ocorre em simpatria com outra população pertencente ao complexo. A população controle (LOIM) também formou um grupo genético distinto.

Nas análises de agrupamento com a distância genética de Nei (1978) (Fig.4) e os valores de Φ_{ST} utilizando o algoritmo *neighbour-joining*, a maioria dos ramos obteve suporte estatístico abaixo de 50%, e topologia semelhante. O dendrograma a partir dos valores da distância de Nei apresentou três cladogramas. O primeiro deles agrupou LURJ e PATE. O segundo ramo agrupou as populações LHTE, AUNI e LATE e MANI. O terceiro ramo é subdividido em dois cladogramas: um que é composto pelas populações PANF, LHPE e MAPE, o outro formado pelas populações JUIG e HALO. Em geral os agrupamentos envolveram populações de táxons diferentes, de grupos morfológicos distintos e a maioria das populações agrupadas foi amostrada na mesma localidade.

3.5 Discussão

Diversidade genética intrapopulacional

Este é o primeiro trabalho utilizando o marcador ISSR para avaliar a diversidade e genética em populações naturais de *Anthurium*. Até então, o único trabalho em *Anthurium* utilizando ISSR teve como objetivo avaliar a variabilidade genética entre clones de *Anthurium andreaeanum* Lind. cultivados *in vitro*, sendo que o monomorfismo evidenciado com este marcador, na opinião dos autores, assegurou a identidade genética dos clones (Gantait et al. 2008). Em populações naturais a variabilidade e estrutura genética foram acessadas em duas espécies de *Anthurium* utilizando o marcador AFLP (Andrade et al. 2009).

Os seis *primers* utilizados amplificaram entre 10 e 14 locos (Tab. 3), este valor é semelhante ao encontrado em populações naturais de espécies de monocotiledôneas como as do gênero *Butia* Becc. (11 a 17) (Gaiero et al. 2011) e de *Tulipa* L. (8-15) (Kiani et al. 2012).

A proporção mínima de locos polimórficos encontrada nas populações foi de 54,41% em HALO e a maior foi 95,59% em PATE (Tab.4). Estes valores são superiores ao encontrado em populações de *Anthurium pentaphyllum* (P=51, 8%) e *Anthurium sinuatum* (P=48,88%), utilizando AFLP (Andrade et al. 2009). O polimorfismo encontrado para as populações dos táxons *Anthurium lhotzkyanum* (P=95,59%), *A. maximiliani* (91,18%) e *A. parvum* (95,59%) foi compatível com os valores encontrados em trabalhos utilizando ISSR abordando outras famílias, como *Arecaceae* (P=90,5%) (Gaiero et al. 2011) e *Amaranthaceae* (P=95%) (Rana et al. 2012).

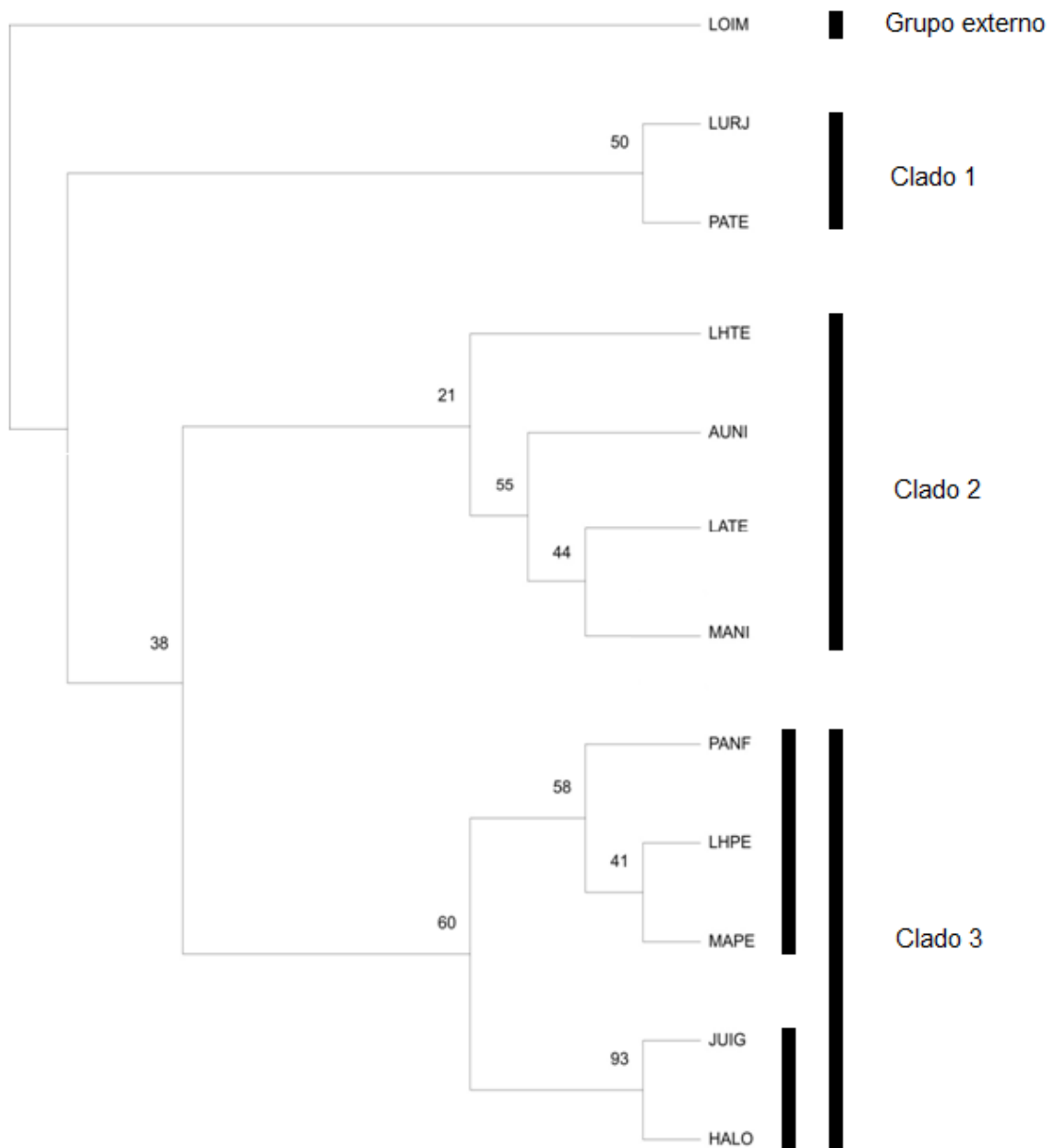


Fig 4 Dendrograma a partir dos valores da distância de Nei, mostrando as relações entre as populações, utilizando o algoritmo *neighbour-joining*. Os números ao lado dos ramos representam os resultados de bootstrap.

O valor de diversidade (H_e) das populações do complexo *A. augustinum* variou entre 0,203 e 0,358. Estes valores são superiores aos valores encontrados em populações de *A. sinuatum* (0,12 a 0,14) com populações isoladas geograficamente. Estes valores também são superiores ao encontrado para populações de *A. pentaphyllum* (0,09 a 0,15) (Andrade et al. 2009). Em geral, espécies com maior amplitude de distribuição geográfica tendem a apresentar maiores valores de heterozigosidade (Nybom e Bartish 2000; Nybom 2004), isto não foi visto aqui já que as populações do complexo *A. augustinum* apresentaram maior diversidade que as populações de *A. pentaphyllum* que apresenta distribuição mais ampla.

A maioria dos valores de diversidade obtidos para as populações do complexo também é superior ao encontrado em plantas com características semelhantes, plantas perenes (0,25), de distribuição restrita (0,20) e que apresentam fecundação cruzada (0,27), usando marcadores RAPD (Nybom 2004).

No entanto, as populações de *Anthurium hatschbachii* (HALO) e *A. jureianum* (JUIG) apresentaram H_e igual a 0,20 e 0,22, respectivamente. São as únicas populações que apresentaram valores de H_e compatíveis com o encontrado para espécies endêmicas (0,20) (Nybom 2004). Estas populações são isoladas geograficamente, até o momento apenas a população tipo de *A. jureianum* em Iguape, São Paulo e duas populações de *Anthurium hatschbachii* em Guaratuba, Paraná e em Joinville, Santa Catarina são conhecidas. Nossos resultados corroboram a afirmação de Gitzendanner e Soltis (2000) de que espécies raras e/ou endêmicas apresentam níveis menores de diversidade genética. A população de *Anthurium jureianum* formou um agrupamento genético (K) independente na análise Bayesiana assim como a população de *A. hatschbachii* (Fig. 3).

A diversidade genética de uma espécie pode estar relacionada a diversos fatores, tais como, modo de reprodução e os mecanismos de dispersão, distribuição geográfica, ciclo de vida, entre outros (Hamrick e Godt 1996, Duminil et al. 2007). Porém, dentre estes fatores o sistema reprodutivo é o que mais influencia na variabilidade dentro das populações (Hamrick e Godt 1996).

A biologia reprodutiva destas espécies não foi estudada, mas estudos com *A. scandens* (Aubl.) Engl. indicam que esta espécie é autocompatível (Valerio e Villalobos 1980). Apesar da autofecundação não ocorrer devido à protoginia que é comum na maioria das espécies de Araceae (Bröderbauer et al. 2012; Gottsberger et al. 2013) e também nas espécies de *Anthurium* (Bush 1979). A protoginia impede a autofecundação das espécies e pode estar relacionada com o aumento da diversidade genética nas populações do complexo *A. augustinum* mesmo estas sendo endêmicas. Contudo, apenas um estudo de biologia reprodutiva pode esclarecer esta relação.

Relações populacionais e estrutura genética

O valor de Φ_{ST} (0,266) demonstrado pela análise de variância (AMOVA) foi semelhante aos obtidos por RAPD para espécies com características similares à do complexo *A. augustinum*, espécies perenes, endêmicas e alógamas (Nybom e Bartish 2000). Bem como de outras espécies de *Anthurium* (Andrade et al. 2009) é similar ao encontrado no complexo *A. augustinum*.

Nenhuma população apresentou loco exclusivo. Até mesmo LOIM (*Anthurium loefgrenii*), que é a espécie controle não apresentou loco exclusivo indicando homogeneidade entre as espécies de *Anthurium*

e não só entre as populações do complexo *A. augustinum*. Em Entretanto, a ausência de loco exclusivo dentro destas populações também pode estar relacionada com a existência de fluxo gênico entre as populações, que pode levar a diminuição da diferenciação ou estruturação genética entre populações coespecíficas (Seoane et al. 2000). A variabilidade genética dentro das populações também se mostrou maior que entre as populações. A alta variação dentro das populações e a baixa diferenciação entre as populações também indicam que pode estar ocorrendo fluxo gênico entre as populações amostradas, ocasionado pelos mecanismos de polinização e de dispersão de sementes que são um dos principais fatores que influenciam a estruturação genética de populações de plantas (Hamrick e Godt 1996). Alta variabilidade dentro das populações e baixa variabilidade entre as populações também foi observada por Andrade e colaboradores (2009) e podem ser características das espécies do gênero. Na maioria das espécies de *Anthurium* a fecundação é cruzada. A polinização é comumente realizada por abelhas (Bröderbauer et al. 2012) e besouros (Croat 1980; Mayo et al. 1997) e a dispersão é feita por aves (Mayo et al. 1997). Estes mecanismos proporcionam que o fluxo gênico alcance longas distâncias (Mayo et al. 1997) o que pode estar relacionado com a homogeneidade entre as populações.

Nos três tipos de agrupamentos testados na AMOVA (morfológico, taxonômico e genético) foi encontrada baixa divergência entre os grupos de populações (7-11%), e alta variação entre as populações dentro grupos (72-73%). A variância é maior entre os grupos genéticos quando comparado com os outros tipos de agrupamentos (taxonômico e morfológico). Entretanto, a variância entre os grupos genéticos é baixa quando comparada com a alta variância nas populações dentro destes grupos. Isso também demonstra que os grupos genéticos são homogêneos.

Os grupos genéticos obtidos na análise Bayesiana agruparam as populações de acordo com a localidade amostrada, ou seja, de acordo com a distribuição geográfica das populações do complexo *A. augustinum*. Os oito agrupamentos formados não correspondem aos padrões morfológicos estabelecidos aqui (Tab. 5) e também não correspondem à circunscrição taxonômica aceita atualmente para o complexo (Tab. 6). A maior similaridade genética entre populações simpátricas de espécies diferentes do que entre populações de um mesmo táxon parápátricas também foi observada no gênero *Alcantarea* (E.Morren ex Mez) Harms (Bromeliaceae) resultado de fluxo gênico e introgressão entre espécies coexistentes (Barbará et al. 2007; Silva, et al. 2011). Segundo Silva e colaboradores (2011) estes dois processos podem contribuir favoravelmente para o aumento da diversidade de espécies coexistentes.

A maioria dos ramos formados teve baixo suporte estatístico, com exceção do ramo que une as populações de *Anthurium hatschbachii* (HALO) e *A. jureianum* (JUIG) que foi altamente sustentado com *bootstrap* de 93%. Entretanto, estas populações apresentam características morfológicas que as diferem facilmente e são isoladas geograficamente. Neste caso parece plausível que a similaridade genética entre estas populações seja resultado da retenção de polimorfismo de um ancestral comum, como observado em espécies de *Quercus* L. (Muir G e Schlötterer, 2005).

As relações fenéticas obtidas com a distância de Nei e Φ_{ST} entre as populações deste complexo, também revelam baixa relação genética com a circunscrição dos táxons aceitos atualmente, e indica também uma baixa relação genética com os grupos morfológicos (Capítulo 1).

Implicações taxonômicas

Era esperado que populações do mesmo táxon ou dos mesmos grupos morfológicos fossem agrupadas na análise Bayesiana e de distância genética, entretanto isto não ocorreu, sugerindo uma fragilidade dos nomes frente à variabilidade genética descrita, e que os padrões morfológicos não refletem a totalidade da variação genética acessada aqui.

Entretanto, a análise Bayesiana apresenta evidência de diferenciação genética de três populações isoladas geograficamente. Cada uma delas corresponde a um táxon diferente: *Anthurium hatschbachii*, *A. jureianum* e *A. lucidum*. Apesar da análise de distância genética indicar certa incongruência com este resultado. O isolamento geográfico e características morfológicas corroboram com os resultados da análise Bayesiana. *Anthurium hatschbachii* é facilmente diferenciado dos demais táxons do complexo por apresentar pontuações glandulares no limbo foliar. *A. jureianum* apresenta folha peltada, aparentemente este formato foliar é devida fusão dos lobos posteriores. Já *A. lucidum* apresenta uma ou duas nervuras basais enquanto outras espécies do complexo apresentam mais (3-5). Portanto, sugerimos que estes táxons sejam mantidos como válidos.

Anthurium parvum apresentou a maior diversidade quando comparado com outros táxons. As duas populações amostradas deste táxon (PANF e PATE) apresentam a mesma morfologia, ocorrem cerca de 50 km de distância uma da outra e demonstraram ser geneticamente distintas. Esta distância foi suficiente para ocorrer diferenciação genética, mesmo em populações que apresentam a mesma morfologia. Sugerimos que esta espécie seja *a priori* reconhecida como válida, já que morfológicamente *A. parvum* é facilmente identificado em campo por apresentar pecíolo totalmente vináceo, padrão de nervação diferenciado, folha, pecíolo, pedúnculo, espádice consideravelmente menor que os outros táxons do complexo.

Nenhuma análise demonstrou evidência genética para que os táxons *Anthurium augustinum*, *A. maximiliani*, *A. laucheanum*, *A. lhotzkyanum* sejam mantidos como entidades taxonômicas distintas. Estes táxons correspondem a um grupo morfológico e análises morfométricas não indicaram uma separação entre eles, sugerindo que os três últimos seriam sinônimos de *A. augustinum* (Cap. 1). Geneticamente esta sinonimização não é totalmente sustentada, já que as populações destes táxons não formam um único *pool* gênico, e as relações fenéticas indicam que apenas parte das populações destes táxons é estreitamente relacionada. Entretanto, como estas espécies não apresentam características diagnósticas para separação sugerimos que *A. maximiliani*, *A. laucheanum* e *A. lhotzkyanum* sejam considerados como sinônimos de *A. augustinum*.

Em resumo, os resultados sugerem o reconhecimento de cinco táxons, *Anthurium augustinum*, *A. hatschbachii*, *A. jureianum*, *A. lucidum* e *A. parvum*

Agradecimentos

Agradeço aos pesquisadores Viviane Pereira da Silva, Marcus A. Nadruz Coelho, Julio Antonio pelas valiosas contribuições durante a execução do trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo nº 2010/17400-3) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PROTAX Processo nº 562240/2010-1) pelo auxílio financeiro para coleta.

Referências

Andrade IM, Mayo SJ, Van Den Berg C, Fay MF, Chester M, Lexer C, Kirkup D. (2009) Genetic variation in natural populations of *Anthurium sinuatum* and *A. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* (Araceae) from north-east Brazil using AFLP molecular markers. *Bot. Jour. Linn. Soc.* 159: 88 – 105 doi: 10.1111/j.1095-8339.2008.00945.x

Archibald JK, Mort ME, Crawford DJ, Santos-Guerra A (2006) Evolutionary relationships within recently radiated taxa: comments on methodology and analysis of inter-simple sequence repeat data and other hypervariable, dominant markers. *Taxon.* 55: 747-756 doi: <http://www.jstor.org/stable/25065648>

Barbará T, Martinelli G, Fay MF, Mayo SJ, Lexer C (2007) Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol. Ecol.* 16: 1981–1992. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600017>

Barbosa AR (2011) Biosistemática do complex *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada na análise filogeográfica e genética de populações. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais

Bröderbauer D, Diaz, A, Weber A (2012) Reconstructing the origin and elaboration of insect-trapping inflorescences in the Araceae. *Amer. J. Bot.* 99: 1666-1679. doi: 10.3732/ajb.1200274

Bush M (1979) Hybridizing Anthuriums. *Aroideana.* 2: 122 – 125

Cabrera LI, Salazar GA, Chase MW, Mayo SJ, Bogner J, Davila P (2008) Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastidDNA. *Amer. Jour. Bot.* 95: 1153-1165. doi: 10.3732/ajb.0800073

Carlsen MM, Croat TB (2007) Taxonomic revision of *Anthurium* section *Semaeophyllum* Schott (Araceae). *Harv. Pap. Bot.* 12: 173-234. doi: [http://dx.doi.org/10.3100/1043-4534\(2007\)12\[173:TROASS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.3100/1043-4534(2007)12[173:TROASS]2.0.CO;2)

Coelho MAN, Catharino ELM (2008) Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo. *Rodriguésia*. 59: 829 – 833

Coelho MAN, Mayo SJ (2007) Typifications of names of Brazilian taxa of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae). *Taxon*. 56: 211 – 225. doi: <http://www.jstor.org/stable/25065754>

Coelho MAN, Temponi LG (2013) *Anthurium* in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/flora_dobrasil/FB4912. Acessado em 06 de março de 2013

Coelho MAN, Waechte JL, Mayo SJ (2009) Revisão Taxonômica das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia*. *Rodriguésia*. 60:799-864

Croat TB (1991) A revision of *Anthurium* section *Pachyneurium* (Araceae). *Ann. Miss. Bot. Gard.* 76: 539 – 855

Croat TB (1980) Flowering behavior of the neotropical genus *Anthurium* (Araceae). *Amer. J. Bot.* 67: 888 – 904

Croat TB. (1979) The distribution of Araceae. In: K. Larsen & L. B. Holm-Nielson (eds.). *Trop. Bot. Acad. Press. London*

Croat TB, Sheffer RB (1983) The sectional groupings of *Anthurium* (Araceae). *Aroideana*. 6: 85-23

Cusimano N, Bogner J, Mayo SJ, Boyce PC, Wong SY, Hesse M, Hetterscheid WLA, Keating RC, French J. (2011) Relationships within the Araceae: Comparison of morphological patterns with molecular phylogenies. *Amer. Jour. Bot.* 98: 654–668. doi:10.3732/ajb.1000158

Doyle JJ, Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13–15

Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Jordano P, Salvini D, Vendramin GG, Petit RJ (2007) Can Population Genetic Structure Be Predicted from Life-History Traits? *The Amer. Nat.* 169: 662–672 doi: 10.1086/513490

Engler HGA (1878) Araceae. in: Martius CFP. (ed.). *Flora brasiliensis*. Wien & Leipzig, München, pp 25 – 224

Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl. Genet.* 95: 408 – 417 doi: 10.1007/s001220050577

Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle

Gaiero P, Mazzella C, Agostini G, Bertolazzi S, Rossato M (2011) Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia* Becc. species based on ISSR. *Plant Syst. Evol.* 292: 105 – 116. doi: 10.1007/s00606-010-0412-0

Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S, Das PK (2008) *In vitro* Mass Multiplication with Pure Genetic Identity in *Anthurium andreaeanum* Lind. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 18: 113 – 122 doi: 10.3329/ptcb.v18i2.3361

Ge XJ, Zhou XL, Li ZC (2005) Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting . *J. Plant Res.* 118: 415 – 422 doi 10.1007/s10265-0235-1

Gitzendanner M, Soltis PS (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am. J Bot.* 87: 783 – 792 doi: <http://www.jstor.org/stable/2656886>

Gottsberger G, Silberbauer-Gottsberger I, Dötterl S (2013) Pollination and floral scent differentiation in species of the *Philodendron bipinnatifidum* complex (Araceae). *Plant Syst Evol.* 299:793 – 809. doi: 10.1007/s00606-013-0763-4

Govaerts R, Frodin DG, Bogner J, Boyce P, Cosgriff B, Croat TB, Gonçalves EG, Grayum MH, Hay A, Hettterscheid W, Landolt E, Mayo SJ, Murata J, Nguyen VD, Sakuragui CM, Singh Y, Thompson S., Zhu G. (2002) World checklist and bibliography of Araceae (and Acoraceae). Kew: Royal Botanic Garden. London

Grayum MH (1990) Evolution and phylogeny of the Araceae. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 77: 628 – 697.

Guasmi F, Ferchichi A, Farés K, Touil L. (2006) Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology.* 5: 1370 – 1374 doi; 10.5897/AJB06.086

Guillot G, Santos F (2010) Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. *Molec. Ecol. Res.* 10:1082 – 1084. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02864.x

Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences.* 351: 1291 – 1298 doi: 10.1098/rstb.1996.0112

Kiani M, Memariani F, Zarghami, H (2012) Molecular analysis of species of *Tulipa* L. from Iran based on ISSR markers. *Plant Syst Evol* 298:1515 – 1522. doi: 10.1007/s00606-012-0654-0

Krings A, Xiaoling JQ (2005) Taxonomy of the *Gonolobus* complex (Apocynaceae, Asclepiadoideae) in the Southeastern United States: ISSR evidence and parsimony analysis. *Harv. Pap. Bot.* 10(2):147-159. doi: [http://dx.doi.org/10.3100/1043-4534\(2005\)10\[147:TOTGCA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.3100/1043-4534(2005)10[147:TOTGCA]2.0.CO;2)

Mayo SJ, Bogner J, Boyce PC (1997) The genera of Araceae. Kew: Botanic Gardens. London

- Muir G, Schlötterer C (2005) Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). *Mol. Ecol.* 14(2):549 – 561. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02418.x
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics.* 89: 583 – 590
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13:1143 – 1155doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 3:93 – 114
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosc* 12:357 – 358. doi:10.1093/bioinformatics/12.4.357
- Peakall R, Smouse PE. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537 – 2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460
- R Development Core Team (2006) R: language and environment for statistical computing. <http://www.r-project.org/>. Acessado em 8 de novembro de 2012
- Rana TS, Narzary D, Ohri D (2012) Molecular differentiation of *Chenopodium album* complex and some related species using ISSR profilers and ITS sequences. *Gene*, 495: 29 – 35. doi:10.1016/j.gene.2011.12.031
- Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annu Rev Ecol Syst* 28:359 – 389 doi: 10.1146/annurev.ecolsys.28.1.359
- Seoane CES, Kageyama PY, Sebben AM (2000) Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). *Scientia Forestalis.* 57: 123 – 139
- Silva CP, Wendt T, Pinheiro F, Barbara T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol. Ecol.* 20:3185 – 320. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05143.x
- Simmons MP, Zhang L, Webb CT, Müller K (2007) A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference. *Mol. Phyl. Evol.* 42: 528 – 542. doi: 10.1016/j.ympev.2006.08.008

Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (2009) Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro

Temponi LG (2006) Sistemática de *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae). Tese, Universidade de São Paulo

Temponi LG, Coelho MAN (2011) Two new species of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae) for Brazil: *Rodriguésia*. 62: 315 – 320

The Plant List (2010) The plant list. Version 1. Published on the Internet. <http://www.theplantlist.org/>. Acessado em 06 de janeiro de 2013

Valerio CE, Villalobos E (1980) Polinizacion y eficiencia reproductiva en *Anthurium scandens* (Araceae). *Brenesia*. 18: 137 – 146

Vekemans X (2002) AFLP–SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van-de-Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407 – 4414

Wolfe AD, Xiang QY, Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol Ecol* 7: 1107 – 1125. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00425.x

Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzym* 218:704 – 740

Wright S (1921) Systems of mating. *Genet* 6:111 – 178

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Geno* 20: 176 – 183.

4 Considerações finais

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos de morfometria, variabilidade e estruturação genética de populações naturais de *Anthurium augustinum*; *A. hatschbachii*, *A. jureianum*; *A. laucheanum*; *A. lhotzkyanum*; *A. lucidum*; *A. maximiliani* e *A. parvum* que compõem um complexo. Abordando duas vertentes da biologia das plantas, a morfológica e a genética.

Os resultados obtidos indicam que a circunscrição dos táxons aceitos atualmente não reflete a totalidade da variação genética e morfológica acessada no complexo *A. augustinum*.

Estudos como este, que abordam o formato de folha em *Anthurium* são promissores, para tentar compreender a grande plasticidade fenotípica do grupo, já que a maior parte dos caracteres utilizados na taxonomia do gênero são caracteres vegetativos.

Este foi o primeiro trabalho realizado com o marcador ISSR para complexo de espécies em *Anthurium*. A utilização desse marcador mostrou útil na detecção de variabilidade genética em *Anthurium*, abrindo perspectivas para novos trabalhos abordando outros complexos de espécies do gênero.

Não foi visualizada estruturação genética para sustentar a distinção dos táxons *A. augustinum*, *A. maximiliani*, *A. laucheanum* e *A. lhotzkyanum*. Entendemos que este resultado corrobora com o que foi verificado na morfometria e, assim sendo sugerimos que os táxons *Anthurium laucheanum*, *A. lhotzkyanum*, *A. maximiliani*, sejam considerados como sinônimos de *A. augustinum*.

Este trabalho abre a perspectiva de novos estudos relacionados principalmente à biologia reprodutiva das espécies do complexo *A. augustinum*. Que visem o levantamento de informações precisas sobre a biologia floral, quais seus principais polinizadores e vetores de dispersão. Todos estes fatores poderiam ter implicações na delimitação taxonômica destas espécies.