

Variabilidad inter e intra específica en la morfología foliar de las especies cubanas de *Morella* (*Myricaceae*)

Majela Hernández Rodríguez¹, Banessa Falcón Hidalgo²

¹ Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 No. 455 Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

² Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Carretera El Rocío Km 3 1/2, Calabazar, La Habana, Cuba

Resumen

Las hojas de las plantas presentan gran variedad de formas, que en general dependen de las condiciones en las que se desarrollan. Estas variaciones suelen ser continuas por lo que la cuantificación de dichos caracteres al emplear la morfometría geométrica puede resultar más eficiente que morfología tradicional. Esta herramienta se utilizó para caracterizar el contorno de las hojas de *Morella cacuminis*, *M. cerifera*, *M. punctata* y *M. shaferi*, para lo que se escanearon hojas de 33 individuos. Además se analizó la variabilidad en la forma de la hoja de *M. cerifera* entre hábitats diferentes en 51 individuos. En ambos casos se describió el contorno a partir de los Coeficientes Elípticos de Fourier de los primeros 20 armónicos. Los descriptores fueron reducidos con un análisis de componentes principales y con los puntajes de los autovalores se realizaron análisis de función discriminante para analizar la posibilidad de emplear la forma de la hoja para diferenciar especies o hábitats. La reconstrucción gráfica de los contornos reveló la menor variabilidad en *M. shaferi* y la mayor en *M. cerifera*. Las hojas de *M. cerifera* más variables se encontraron en caliza y zonas inundadas y las menos variables en pinar y pinar sobre arenas blancas. Los análisis de función discriminante mostraron como promedio un 84,85% y un 58,82% de discriminación correcta entre especies y hábitats. La caracterización de la forma de la hoja mediante la morfometría geométrica resultó eficiente para la discriminación de las especies de *Morella*. La variabilidad en la forma de las hojas de *M. cerifera* no se explica solamente por los diferentes hábitats analizados.

Palabras claves: Coeficientes Elípticos de Fourier, contorno, forma de la hoja

Abstract

The leaves of plants show a wide variety of shapes, which generally depend on the conditions under they are developing. Sometimes, these variations tend to be constant so that the quantification of such characters by using geometric morphometric may be more efficient than traditional morphology. This tool was used to characterize the shape of leaves *Morella cacuminis*, *M. cerifera*, *M. punctata* and *M. shaferi*, for which leaves of 33 individuals were scanned. Furthermore was analysed the variability of leaves shapes form 51 individuals of *M. cerifera* between different habitats. In both cases the contour is described from the Elliptical Fourier coefficients of the first 20 harmonics. The descriptors were reduced with principal component analysis and the eigenvalues scores discriminant function analysis was undertaken to examine the possibility of using the leaf shape to differentiate species or habitats. The graphic reconstruction of the contours revealed less variability *M. shaferi* and higher in *M. cerifera*. The leaves of *M. cerifera* more variables were found in limestone and flooded areas and less variable in pine and pine on white sands. The discriminant function analysis showed average by 84.85% and 58.82% of correct discrimination between species and habitats. The characterization of leaf shape by geometric morphometric was efficient for the discrimination of *Morella* species. The variability in the shape of the leaves of *M. cerifera* could be explained not only by the different habitats analyzed.

Key words: Elliptic Fourier coefficients, contour, leaf shape

Introducción

La hoja, principal órgano fotosintetizador de una planta consta de dos partes fundamentales: el peciolo y una porción ensanchada y plana llamada limbo o lámina. El aspecto de la lámina foliar depende de su forma, del grado de división, del margen, de la venación, entre otros. La diversidad de formas de la lámina en las hojas de las angiospermas y su importancia funcional han sido objeto de estudio de numerosas investigaciones biológicas y se han planteado diversas teorías que explican esta variabilidad (Nicotra *et al.*, 2011). Al ser estos uno de los órganos de la planta que mayor exposición presentan a las condiciones ambientales, en ocasiones los cambios en sus caracteres han sido interpretados como adaptaciones a ambientes específicos (Fahn y Cutler, 1992; Sack y Frole, 2006; Royer *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009). Tanto la variabilidad genética como la plasticidad fenotípica contribuyen a esta variación, lo cual da lugar a una gran diversidad de formas que depende en gran medida de las condiciones en las cuales la planta se desarrolla. Esta relación fenotipo-ambiente ha sido

abordada en estudios ecológicos (Klich, 2000), taxonómicos (Westoby *et al.*, 2002) y genéticos (González-Rodríguez y Oyama, 2005).

Generalmente en la clasificación a nivel de especies, subespecies y variedades de las plantas se tiene en cuenta entre otros aspectos los caracteres cualitativos de la hoja (forma del ápice, base, margen) o cuantitativos (largo y ancho). En ocasiones, las variaciones interespecíficas en la forma de la hoja son continuas, y no pueden ser tratados cualitativamente (Krieger, 2010). Además la clasificación va a depender en gran medida de la apreciación subjetiva de los observadores, y a menudo puede causar inaceptables errores humanos (Basri *et al.*, 1998). Adicionalmente, la forma incluye toda la información referente a la organización espacial de un objeto, independientemente de su tamaño, localización y rotación (Dryden y Mardia, 1998), por lo que, a diferencia del tamaño, es difícil de medir cuantitativamente mediante medidas morfométricas lineales. En tales casos, la cuantificación de la forma puede resultar más eficiente si se

emplean otros métodos, como la morfometría geométrica, que captura con mayor eficiencia que las distancias lineales, la forma de las estructuras y analiza por separado las variaciones en tamaño y en forma. En muchos estudios de taxonomía, ecología y otros campos de la botánica y la biología, la aplicación de estos métodos contribuyen a incrementar el rigor científico en la descripción de importantes aspectos de la dimensión fenotípica de la biodiversidad (Viscosi y Cardini, 2011).

La morfometría geométrica puede definirse según Adams *et al.* (2004) como el sistema de métodos y procedimientos, con base geométrica, para el análisis de los patrones de forma, donde las mediciones usualmente derivan de contornos y puntos morfológicos claves o “landmarks”. El método de contornos describe toda la forma matemáticamente a través de la transformación de la información de las coordenadas del contorno en coeficientes de Fourier. El análisis de los componentes principales de estos coeficientes puede entonces extraer las características de forma independiente y hacer posible el análisis con el empleo de los puntajes de los componentes como caracteres cuantitativos. Mediante los descriptores elípticos de Fourier (DEFs) se puede delinear cualquier tipo de forma con un contorno bidimensional cerrado (Kuhl y Giardina, 1982) por lo que han sido aplicados eficazmente a la evaluación de varias formas biológicas en plantas (Iwata *et al.*, 1998; Camargo Neto *et al.*, 2006).

La familia *Myricaceae* en Cuba está representada por cuatro especies del género *Morella*, tres de ellas son endémicas de Cuba oriental (*M. cacuminis* (Britton y P. Wilson) Berazaín y Falcón, *M. punctata* (Griseb) J. Herbert y *M. shaferi* (Urb. y Britton) Berazaín y Falcón) y una neotropical, que tiene mayor distribución en la isla (*M. cerifera* (L.) Small) (Berazaín y Falcón, 2011). La morfología de las hojas, en especial la forma de la lámina, es uno de los caracteres que contribuyen a la delimitación de estas especies en conjunto con caracteres reproductivos como el número de flores por amentos, el número de bractéolas de las flores femeninas, la forma y tamaño de los frutos, así como, el grado de fusión de los filamentos de los estambres y el número de estambres por flor. Sin embargo, se ha registrado que en el caso de *M. cerifera* la morfología foliar como carácter diagnóstico por sí sola, puede confundir a los especialistas (Adams, 1972). Burger (1977) comenta que esta especie presenta una extraordinaria amplitud geográfica y ecológica para una leñosa y en consecuencia una extrema variabilidad. Por otro lado, González-Villarreal (2004) comentó que existe una correlación entre la morfología de la hoja de esta planta y las características de los hábitats donde viven.

No obstante, no se ha realizado ninguna evaluación de las diferencias de forma en las hojas de las especies de esta familia en Cuba a partir de caracteres cuantitativos, así como tampoco se ha profundizado en las causas de la variabilidad de las hojas de *M. cerifera*. Por lo que este estudio tiene como objetivos la caracterización del contorno de las hojas de *M. cacuminis*, *M. cerifera*, *M. punctata* y *M. shaferi*; la identificación de las diferencias en la morfología foliar de estas cuatro especies y el análisis la variabilidad en la forma de la hoja de *M. cerifera* entre hábitats diferentes.

Materiales y métodos

Material de estudio y toma de las muestras

Para el estudio se utilizaron ejemplares del Herbario Johannes Bisse del Jardín Botánico Nacional de Cuba (HAJB) de las cuatro especies cubanas de la familia *Myricaceae* (Tabla 1). En cada individuo se seleccionaron de dos a tres hojas al azar, que no presentaran daños en el margen. Para el análisis entre especies se seleccionaron 121 hojas de 33 individuos (8 de *M. cacuminis*, 9 de *M. cerifera*, 10 de *M. punctata* y 6 de *M. shaferi*). Mientras que, para el análisis entre individuos de *M. cerifera* se seleccionaron en total 51 individuos que se recolectaron en diferentes hábitats (8 de caliza, 10 de pinar, 9 de pinar sobre arenas blancas, 6 de sabana arenosa, 11 de serpentina y 7 de zona inundada).

Análisis morfométrico (Procesamiento de imágenes y caracterización de la forma de la hoja)

Las imágenes digitales de las muestras se obtuvieron con un escáner (resolución de 400 dpi) empleando un fondo blanco para aumentar el contraste de la imagen y se importaron como archivos de mapa de bits (24 bits). Para el análisis del contorno se utilizó el programa SHAPE 1.3, que cuenta con cuatro subprogramas: ChainCoder, Chc2Nef, PrinComp y PrinPrint (Iwata y Ukai, 2002). Los contornos cerrados de las hojas fueron obtenidos utilizando el ChainCoder a través de imágenes binarias y fueron descritos por código de cadena, un sistema de código que describe la información geométrica de las formas (Freeman, 1974). A partir del código de cadena se calcularon los coeficientes de los descriptores elípticos de Fourier (DEF), en el Chc2Nef, mediante el procedimiento basado en la elipse del primer armónico (Kuhl y Giardina, 1982). Estos fueron normalizados para eliminar las diferencias de tamaño, posición, rotación y punto de partida del trazado del contorno entre las diferentes hojas y analizar posteriormente solo las variaciones de forma. Este procedimiento permitió caracterizar la forma de cada hoja mediante los primeros 20 armónicos (en el caso del análisis entre especies) y los primeros 30 armónicos (en el análisis por hábitat), correspondientes a 80 y 120 coeficientes de los DEF normalizados respectivamente.

Los coeficientes normalizados de los DEF no pueden ser usados directamente como características de forma de la hoja, pues el número de coeficientes es muy grande y el significado morfológico de cada coeficiente es difícil de interpretar. Por lo que se realizó según lo propuesto por Rohlf y Archie (1984) un análisis de componentes principales en el PrinComp con el objetivo de resumir la información contenida en los coeficientes de Fourier. Este se basó en la matriz de varianza-covarianza de los coeficientes. Para cada individuo se calculó la media de los Coeficientes Elípticos de Fourier en todas las hojas empleadas.

Para visualizar la variación en forma que es explicada por cada componente principal se realizó la reconstrucción gráfica de los contornos en el PrinPrint. El contorno para cada componente (media \pm desviación estándar) fue reconstruido por transformación inversa de Fourier de los coeficientes calculados según el procedimiento de Furuta *et al.* (1998). En este procedimiento, los coeficientes de los DEF son calculados de forma tal que el puntaje para cada componente principal sea

Tabla 1. Caracteres cualitativos de la lámina y distribución geográfica de las especies cubanas de *Morella* (*Myricaceae*) empleadas en un estudio de la caracterización de la morfología foliar mediante morfometría geométrica.

Especie	Caracteres cualitativos de la lámina	Distribución
 <i>M. cacuminis</i>	Elíptica, redonda, bulladas, ápice redondeado y mucronado, el margen irregularmente dentado.	Endémica de los picos más altos de la Sierra Maestra, al sureste de la isla.
 <i>M. cerifera</i>	Obovada, oblanceolada u oblanceolada angosta, ápice mucronado, base generalmente decurrente y el margen dentado en los dos tercios de la lámina hacia el ápice, entero hacia la base.	Nativa de América del Norte, México, Centroamérica y Antillas. Habita en Cuba en hábitats diversos desde Pinar del Río hasta Camagüey, incluida la Isla de la Juventud
 <i>M. punctata</i>	Obovada, elíptica u oblanceolada, ápice mucronado generalmente, base aguda, cuneada a veces tiende a ser decurrente y el margen dentado casi de la mitad de la lámina hacia el ápice, hacia la base es entero.	Endémica de las montañas de serpentinadas del noreste de Cuba, de las montañas de la Sierra Maestra y en el macizo de Guamuhaya.
 <i>M. shaferi</i>	Obovada, base desde cuneada hasta aguda, margen revoluto y dentado en el ápice.	Endémica de las montañas de serpentinadas del noreste de Cuba.

igual a la media más menos dos veces la desviación estándar (que es la raíz cuadrada del autovalor del componente) y los puntajes de los componentes restantes sean cero.

Análisis estadístico

Los puntajes de los dos primeros componentes principales se analizaron como variables de forma en la comparación entre especies, pues estos incluyeron más del 90% de la variabilidad total. Mientras que, entre los diferentes hábitats para *M. cerifera* se necesitaron nueve componentes para que el 90% de la variabilidad quedara explicado. Se examinaron las diferencias entre especies y entre hábitats en *M. cerifera* para cada variable. Para ello se realizaron pruebas de Montecarlo para calcular los límites de confianza (LC) reales y como una manera de sustituir las pruebas de hipótesis nulas, pues este método -como parte de la estadística de modelos nulos- no tiene en cuenta las asunciones restrictivas de una distribución probabilística determinada. Se calcularon las diferencias entre las medias reales para cada especie y hábitat (tamaño de efecto) y se generó la distribución nula de estos a partir de 1000 remuestreos aleatorios con reemplazamiento de los datos originales.

Se realizaron análisis discriminantes lineales con el objetivo de detectar si los componentes principales de aporte significativo (nueve para las especies y diez para los hábitats), resultantes de la reducción dimensional de los descriptores elípticos de Fourier, son suficientes para discriminar a las especies o los hábitats.

Los datos fueron analizados utilizando los programas Past 2.14, Statistica 8.0 y la herramienta (*add-ins*) PopTools 3.23 del MSEXcel.

Resultados

Análisis entre especies

Como resultado de la transformación inversa de Fourier se pudo visualizar el aporte que realiza cada componente a la forma

de la hoja. En la **figura 1** se muestra la reconstrucción gráfica de los contornos de las hojas de las cuatro especies, donde se puede apreciar que el primer componente principal explica la variabilidad en el sentido de la inclinación de la base o asimetría de la hoja, mientras que el segundo explica la posición de la parte más ancha de la hoja. Los extremos encontrados fueron las hojas más elípticas (más anchas en el centro) o más ovadas (más anchas hacia el ápice). Si se analiza la proporción de la varianza acumulada por ambos componentes, se observa la menor variación en *M. shaferi* (54,34%), mientras que la mayor se encuentra en *M. cerifera* (76,95%).

Al analizar todas las especies de manera simultánea, se puede caracterizar la variación de la forma de la hoja en el género. En el análisis de componentes principales los dos primeros ejes explicaron el 96,54% de la varianza. El CP1 que explicó el 94,98% de la varianza total, muestra las dos formas extremas en cuanto al ancho de la hoja, que corresponden a *M. cerifera* en los valores negativos y a *M. cacuminis* en los positivos. Mientras que el CP2 que explicó solamente el 1,56%, muestra las formas extremas en cuanto a las hojas más o menos elípticas, con representantes de las cuatro especies a lo largo del componente (**Fig. 2**).

Los límites de confianza (LC) reales calculados por Montecarlo arrojaron diferencias entre *M. cacuminis* y el resto de la especie para el primer componente principal. En el segundo componente principal solamente mostraron semejanzas *M. cerifera* y *M. punctata*. Estas diferencias observadas, resultaron estadísticamente significativas al calcular las diferencias entre las medias reales para cada especie a partir de una distribución nula y 1000 remuestreos de los datos originales, con una $p < 0,0001$ en todas las comparaciones que involucraban a *M. cacuminis* en el primer componente principal. En el segundo componente, los resultados de esta prueba también apoyaron lo observado en el gráfico en cada una de las comparaciones: *M. cacuminis* y *M. cerifera* ($p = 0,0161$),

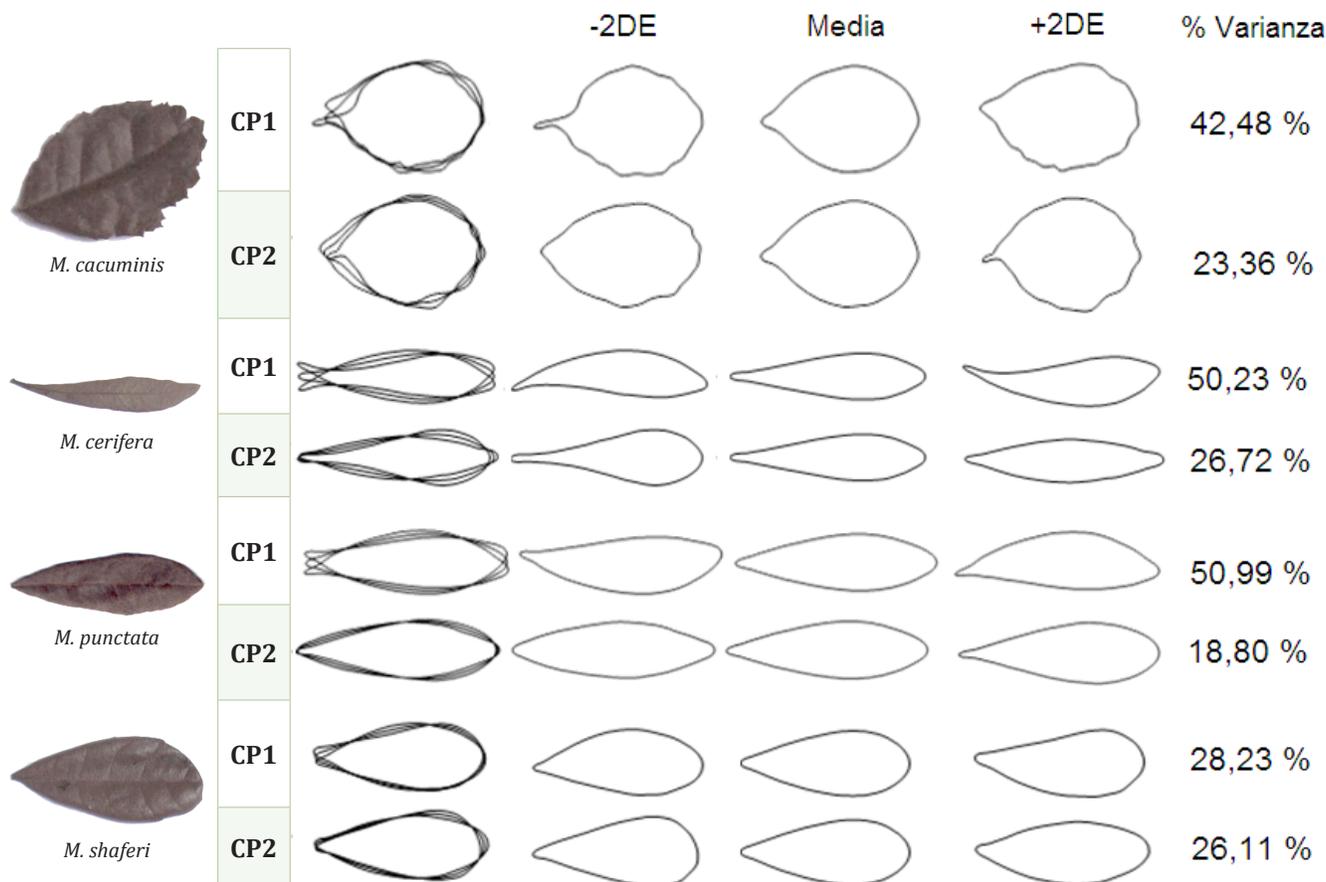


Figura 1. Reconstrucción gráfica de los contornos de las hojas de *Morella cacuminis*, *M. cerifera*, *M. punctata* y *M. shaferi*. Se muestra la forma media \pm 2DE (desviación estándar) de los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) obtenida por transformación inversa de Fourier.

M. cacuminis y *M. punctata* ($p=0,0001$), *M. cacuminis* y *M. shaferi* ($p= 0,0188$), *M. cerifera* y *M. punctata* ($p= 0,0527$), *M. cerifera* y *M. shaferi* ($p<0,0001$), *M. punctata* y *M. shaferi* ($p<0,0001$).

En el análisis discriminante que incluye como variables de forma los primeros nueve componentes principales resultantes de la reducción dimensional de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 20 armónicos, los dos primeros factores incluyeron el 99,20% del total de varianza. La matriz de clasificación mostró, como promedio, cerca de un 84,85% de discriminación correcta y solo presentó un 100% de discriminación correcta *Morella cacuminis* (Tabla 2).

Análisis de contornos de la lámina de las hojas de plantas de *M. cerifera* de hábitats diferentes

La reconstrucción de los contornos por transformación inversa de Fourier se muestra en la figura 3. Al igual que lo ocurrido en el análisis entre especies, el primer componente principal representa la variabilidad en la inclinación de la base o asimetría de la hoja, mientras que el segundo explica la posición de la parte más ancha de la hoja. De manera general, se pueden observar hojas más estrechas en serpentina y zonas inundadas y más anchas en los pinares y la sabana arenosa. Si analizamos la proporción de la varianza acumulada por los dos primeros componentes, se observa menor variación en los hábitats pinar (57,83%) y pinar

sobre arenas blancas (56,19%), mientras que caliza (79,72%) y zonas inundadas (74,72%) mostraron mayor variación. Sin embargo, el porcentaje de varianza explicado por los dos primeros componentes principales es inversamente proporcional a la cantidad de componentes que se requieren para explicar el 90% o más de la varianza total (Tabla 3).

Tabla 2. Número de individuos, porcentaje de discriminación correcta y matriz de clasificación del análisis de función discriminante, a partir de variables de forma (9 componentes principales resultantes de la reducción dimensional de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 20 armónicos), que describen el contorno de las hojas de cuatro especies de la familia *Myricaceae*.

Especie	Nº individuos	Porcentaje correcto	<i>Morella punctata</i>	<i>Morella cerifera</i>	<i>Morella shaferi</i>	<i>Morella cacuminis</i>
<i>Morella cacuminis</i>	8	100,00	0	0	0	8
<i>Morella cerifera</i>	9	66,67	2	6	1	0
<i>Morella punctata</i>	10	90,00	9	1	0	0
<i>Morella shaferi</i>	6	83,33	1	0	5	0
Total	33	84,85	12	7	6	8

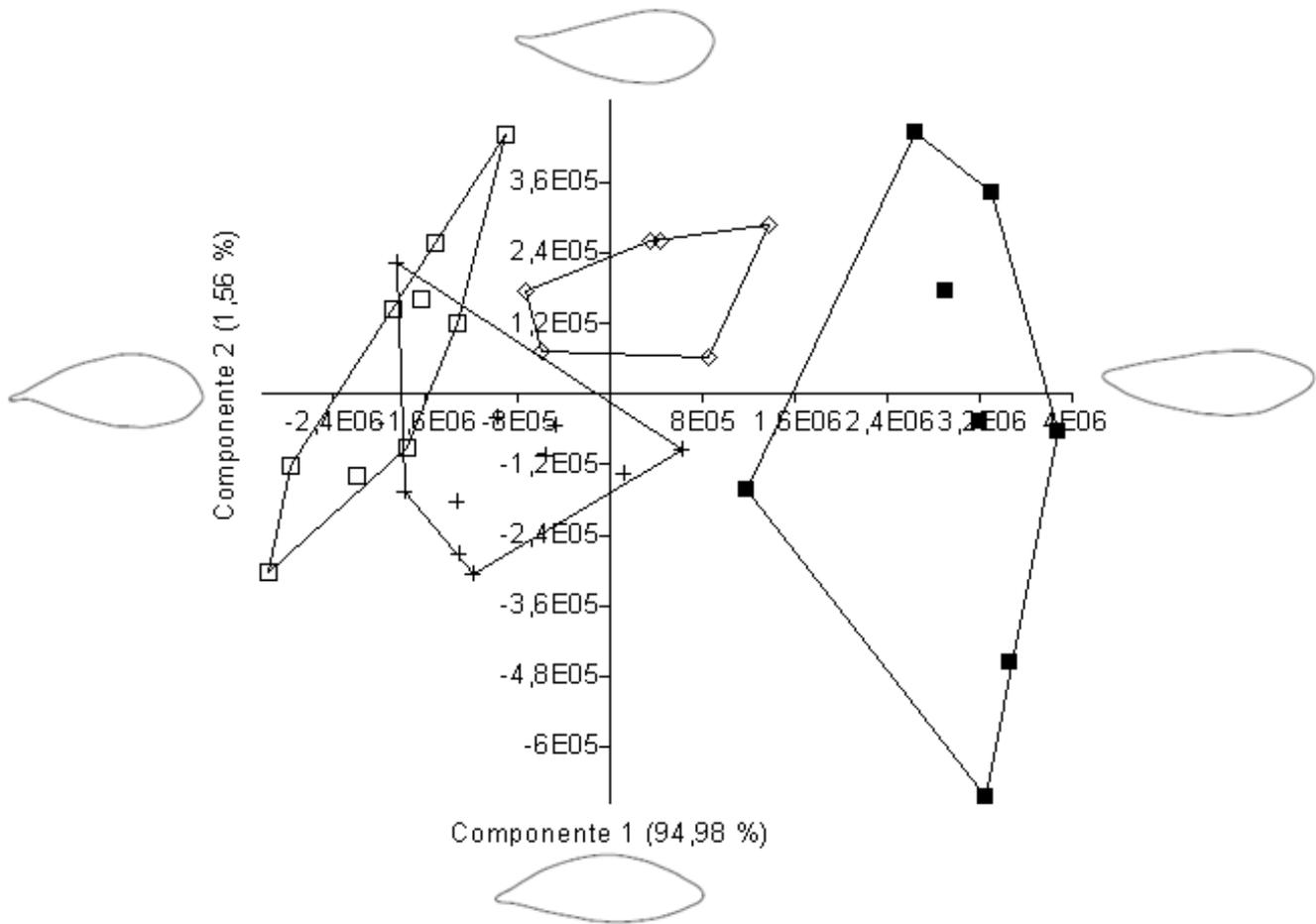


Figura 2: Análisis de componentes principales de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 20 armónicos que caracterizan la forma de la hoja de *Morella cacuminis* (■), *M. cerifera* (□), *M. punctata* (+) y *M. shaferi* (◊). Se muestra la reconstrucción del contorno (\pm 2DE) que explica cada componente principal.

Los límites de confianza (LC) reales calculados por la prueba de Montecarlo arrojaron diferencias entre casi todos los hábitats tanto en el primer componente principal como en el segundo. Estas diferencias, resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la mayoría de las comparaciones, excepto entre caliza y zona inundada ($p = 0,274$), serpentina y zona inundada ($p = 0,059$), pinar y sabana arenosa ($p = 0,391$) y pinar sobre arenas blancas y serpentina ($p = 0,296$) en el CP1. En el CP2 solo resultaron semejantes caliza y pinar sobre arenas blancas

($p = 0,467$), caliza y sabana arenosa ($p = 0,118$), pinar sobre arenas blancas y sabana arenosa ($p = 0,136$) y serpentina y zona inundada ($p = 0,041$).

Solamente el hábitat zona inundada mostró una separación casi completa en la representación gráfica del análisis discriminante en el que se emplearon como variables de forma los primeros diez componentes principales resultantes de la reducción dimensional de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 30 armónicos. El resto de los hábitats mostraron cierta superposición en la nube de puntos (Fig. 4). En este análisis, los dos primeros factores incluyeron el 73% del total de varianza. La matriz de clasificación mostró, como promedio, cerca de un 58,82% de discriminación correcta y ninguno de los hábitats presentó un 100% de discriminación correcta (Tabla 4).

Tabla 3. Comportamiento de la varianza explicada por los autovalores de los dos primeros componentes principales resultantes de la reducción dimensional de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 30 armónicos, que describen el contorno de las hojas de *Morella cerifera* en 6 hábitats diferentes.

Hábitat	CP1 (%)	CP2 (%)	Varianza acumulada (%)	CP (>90%)
Caliza	61,05	18,67	79,72	5
Pinar	42,02	15,81	57,83	9
Pinar sobre arenas blancas	36,25	19,94	56,19	8
Sabana arenosa	46,66	19,43	66,08	7
Serpentina	47,76	19,73	67,49	6
Zona inundada	60,79	13,93	74,72	5

Discusión

Análisis entre especies

La transformación inversa de Fourier permitió visualizar que para las cuatro especies analizadas, los dos primeros componentes principales incluyeron más del 50% de la varianza. Además las características de la forma de la hoja explicadas por ambos componentes fueron similares, lo que permite inferir que la variabilidad intraespecífica está dada principalmente por las

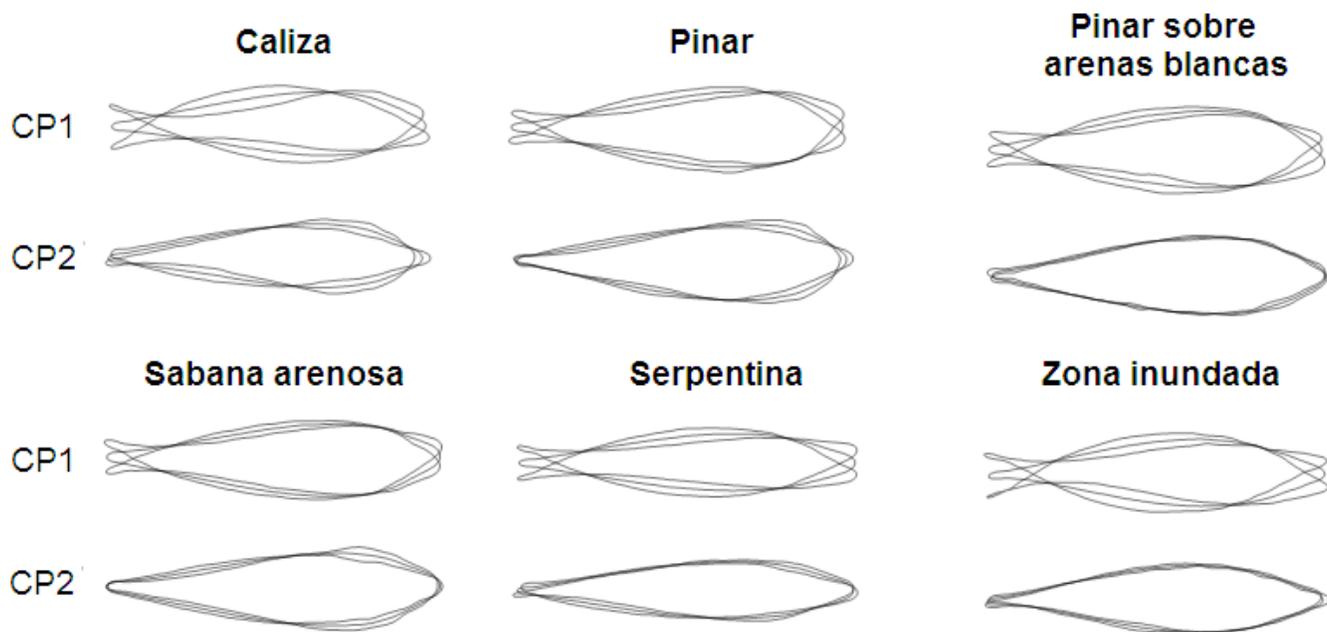


Figura 3: Reconstrucción gráfica de los contornos de las hojas de *Morella cerifera*, en seis tipos de hábitats: caliza, pinar, pinar sobre arena blanca, sabana arenosa, serpentina y zona inundada. Se muestra la forma media \pm 2DE (desviación estándar) de los dos primeros componentes principales, obtenida por transformación inversa de Fourier. CP1: Componente principal 1 y CP2 componente principal 2.

diferencias en la simetría y grado de elipsis. El grado de simetría en las hojas, ha sido relacionado con diversos factores como la hibridización e introgresión (Albarán-Lara *et al.*, 2010), posición en la planta (Cowart y Graham, 1999) o competencia, depredación y parasitismo (Cuevas-Reyes *et al.*, 2011). Las especies *M. cerifera* y *M. punctata*, así como los hábitats caliza y zonas inundadas, acumularon mayor variabilidad en el componente principal 1, esto sugiere pensar que las hojas de estas especies y/o de individuos de estos hábitats, al ser más asimétricas reflejan la incapacidad de mantener la homeostasis durante el desarrollo bajo condiciones de estrés ambiental. El comportamiento homogéneo encontrado en *Morella shaferi* puede ser resultado de que las plantas de esta especie habitan solo en las montañas del

Norte del oriente de la isla, donde las condiciones climáticas son semejantes (Borhidi, 1996). Esta especie solo se puede encontrar a una altura entre los 100-1231 msm, sobre serpentinatas en suelos fersialíticos y ferralíticos, generalmente en lugares donde corre agua y en bordes de caminos. Esta región de la isla presenta los niveles más altos de precipitaciones anuales. Por otra parte, aunque el suelo es pobre en nutrientes y drena el agua con facilidad, suele formarse una hojarasca donde se retiene mucha humedad, sitios en los que en general suele encontrarse esta planta. Aunque pudiera considerarse que el tamaño de muestra analizado para esta especie es pequeño en comparación con el resto de las especies analizadas, y puede ser un factor probable de la homogeneidad encontrada, es importante también considerar los factores climáticos y edáficos analizados anteriormente.

Morella cacuminis fue la única especie que mostró diferencias estadísticamente significativas al calcular las diferencias entre las medias reales en todas las comparaciones; así como una perfecta separación en la representación gráfica del análisis discriminante, con un 100% de discriminación correcta en la matriz de clasificación. Los individuos de esta especie se caracterizan por presentar hojas más orbiculares que *M. cerifera*, *M. punctata* y *M. shaferi*. Esto se confirma en la representación gráfica del análisis de componentes principales en el que *M. cacuminis* se localiza hacia los valores más positivos del primer componente principal, el cual precisamente explica una variación entre especies del 94,98% en cuanto al ancho de la hoja (Fig. 2). Por otra parte, esta especie solo se puede encontrar en los picos más altos de la Sierra Maestra, en estos sitios pudo haber encontrado durante su evolución un nicho no explotado por las otras especies del género. Probablemente las condiciones climáticas y de aislamiento favorecieron que estas plantas presenten hojas totalmente diferentes en cuanto a forma con respecto a las otras especies cubanas de *Morella*.

Tabla 4. Número de individuos, porcentaje de discriminación correcta y matriz de clasificación del análisis de función discriminante, a partir de variables de forma (10 componentes principales resultantes de la reducción dimensional de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 30 armónicos), que describen el contorno de las hojas de *Morella cerifera* en 6 hábitats diferentes.

Hábitat	Nº individuos	Porcentaje correcto	C	P	Pa	Sa	S	Zi
Caliza (C)	8	25,00	2	3	0	0	3	0
Pinar (P)	10	70,00	0	7	0	1	2	0
Pinar sobre arenas blancas (Pa)	9	44,44	0	3	4	1	1	0
Sabana arenosa (Sa)	6	66,67	1	1	0	4	0	0
Serpentina (S)	11	63,64	2	0	1	0	7	1
Zona inundada (Zi)	7	85,71	0	0	1	0	0	6
Total	51	58,82	5	14	6	6	13	7

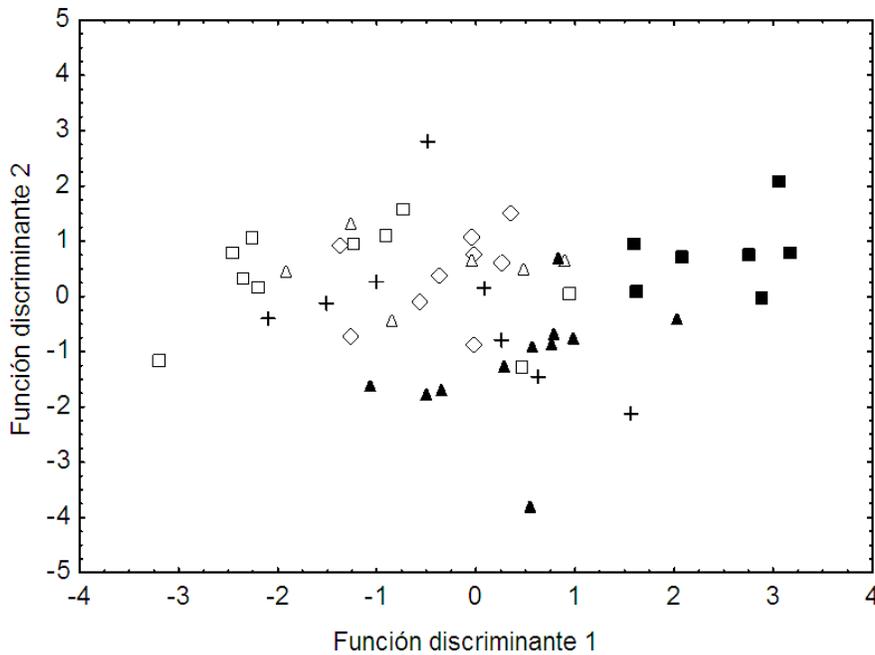


Figura 4: Representación del análisis discriminante, empleando como variables de forma los primeros 10 componentes principales resultantes de la reducción dimensional de los Coeficientes Elípticos de Fourier para 30 armónicos que describen el contorno de las hojas de *Morella cerifera* en 6 hábitats diferentes: Caliza (+), Pinar (□), Pinar sobre arenas blancas (◊), Sabana arenosa (△), Serpentina (◆) y Zona inundada (■).

Por otro lado, las hojas de *M. cacuminis* presentan un margen irregularmente dentado, que las diferencia de las hojas del resto de las especies estudiadas, que aunque pueden presentar dentado, es solo en los dos tercios superiores (*M. cerifera*) o la mitad de la lámina (*M. punctata* y *M. shaferei*) pero siempre entero hacia la base (Berazaín y Falcón, 2011). Se conoce que el clima y las características del hábitat en el cual crece una planta tienen un efecto sobre la forma de sus hojas (Nicotra *et al.*, 2011). Por ejemplo, Huff *et al.* (2003), analizaron la forma de las hojas de especies de zonas templadas y bosques tropicales (*Robinia pseudoacacia* y *Quercus rubra*) y encontraron que existía correlación con la temperatura media anual. Una extensión de este trabajo realizada por Royer *et al.* (2005) incluyó la medición de varias características (área de la lámina foliar, área del diente, número de dientes, entre otras) que se compararon con mediciones climáticas de las diferentes regiones de estudio. Los autores confirmaron en hallazgos anteriores que las plantas que crecen en ambientes más fríos tienden a presentar más y mayores dientes que las plantas similares que crecen en entornos cálidos. En *M. cacuminis* este fenómeno pudiera explicarse a partir de una posible

reducción del mesófilo para evitar pérdida de agua. Esta ocurre a mayor velocidad que la reducción de los haces vasculares de la hoja, que precisamente terminan en el margen de esta en las zonas correspondientes a cada diente.

El clima de Cuba es tropical, estacionalmente húmedo, con influencia marítima y rasgos de semicontinentalidad. Las temperaturas son generalmente altas y el elemento que más varía son las precipitaciones. Aunque en Cuba no se puede hablar de grandes diferencias de clima entre las distintas regiones del país, si está claro que existen condiciones microclimáticas que caracterizan a algunas zonas del archipiélago. En tal caso, el mayor número de dientes de las hojas de *M. cacuminis* pudiera estar relacionado, además, con un ambiente más frío, puesto que esta especie es endémica de los picos más altos de la Sierra Maestra, al sureste de la isla (Berazaín y Falcón, 2011). La flora montana y submontana de Cuba (de altitudes que van desde 400 hasta 2 000 m) está expuesta a una temperatura media anual que puede ser la de un país no tropical (menor o igual a 18,5 °C), el clima es de tipo tropical húmedo de selva, lluvioso durante todo el año (Herrera, 2007).

El caso opuesto lo constituyen *M.*

cerifera, *M. punctata* y *M. shaferei*, cuyas hojas más estrechas y con poca dentición, las ubican hacia los valores más negativos del primer componente principal. *M. punctata* y *M. shaferei* son endémicas de las montañas de serpentina del noreste de Cuba (Berazaín y Falcón, 2011) por lo que pueden compartir algunas características de especies xeromórficas. El término xeromorfo se utiliza para indicar plantas que tienen una anatomía y forma de crecimiento especialmente adaptada a condiciones desérticas, condiciones particulares en las cuales el agua es frecuentemente escasa. La reducción del área foliar y el aumento en el espesor de la lámina, son estrategias de adaptación muy difundidas en las plantas xerófitas (Andersen *et al.*, 2006).

Análisis de contornos de las láminas de las hojas de *M. cerifera* entre hábitats

Al analizar los contornos obtenidos para cada planta en los diferentes hábitats por transformación inversa de Fourier, se pueden observar hojas más estrechas en serpentina y zonas inundadas y más anchas en los pinares y la sabana arenosa. No obstante, otros autores como González-Villarreal (2004) han descrito para las poblaciones de *M. cerifera* de México, que los individuos que crecen en los bosques secos de pino-encino o encinares, presentan hojas coriáceas y relativamente angostas en las que con frecuencia al secarse, el margen es revoluto. En cambio, en los árboles que habitan en el bosque mesófilo de montaña, las hojas son de mayor tamaño, aplanadas y con los márgenes serrado-dentados, casi siempre hasta la base (González-Villarreal, 2004).

Las hojas de las plantas de pinar y pinar sobre arenas blancas mostraron menor variación al analizar el porcentaje de varianza explicado por los dos primeros componentes principales, mientras que en caliza y zonas inundadas mostraron mayor variación. Sin embargo, al encontrar una relación inversamente proporcional entre este comportamiento y la cantidad de componentes que explican más del 90% de la variabilidad total se puede inferir que en pinar y pinar sobre arenas blancas la variabilidad de la forma de la hoja se puede descomponer en múltiples elementos de forma, aunque se encuentra homogéneamente distribuida la

variabilidad en cada uno de ellos. Por otra parte, en caliza y zonas inundadas existen menos elementos que explican la variación en forma, donde son los primeros los de mayor aporte a las diferencias individuales.

Morella cerifera presenta una elevada amplitud geográfica y ecológica, en consecuencia una extrema variabilidad morfológica (Burger, 1977). Por esta razón, la caracterización e identificación de estas plantas puede verse afectada si son considerados caracteres morfológicos de las hojas entre otras estructuras, en especial el margen (Adams, 1972). Esta variabilidad, no solo se observa dentro de un mismo individuo, sino también entre poblaciones de diferentes hábitats debido, en parte, al amplio rango de distribución altitudinal que presenta en América y a su alta capacidad para colonizar diversos ambientes (Standley y Steyermark, 1952).

Asimismo, aunque esta especie presenta una alta capacidad para ocupar hábitats muy diversos a través de su extensa distribución y crecer en un gran variedad de sustratos (Huguet *et al.*, 2005), González-Villarreal (2004) plantea que los miembros de la familia crecen generalmente en sustratos pobres en nutrientes como son los suelos arenosos y arcillosos. Se ha reportado además, en los individuos de este género, la presencia de actinomicetos del género *Frankia* en las raíces como fijadores de nitrógeno (Kubitzki, 1993; Mabblerly, 2008; Torres y Murcia 2008), que según Roberts (2004) les da una ventaja de competencia en el establecimiento en suelos pobres en nutrientes como son los suelos arenosos. Incluso se ha propuesto que *Morella cerifera* se utilice en reforestación, por ser una planta fijadora de nitrógeno, sirve para la recuperación de suelos y control de erosión (González-Villarreal, 2004).

Para el único hábitat en el que los contornos de las hojas mostraron bajas tasas de errores de clasificación fue en zonas inundadas (15%). Camargo Neto *et al.* (2006) hacen referencia a que en ocasiones el bajo rendimiento de clasificación obtenido en los análisis de función discriminante puede deberse a variaciones en la orientación relativa al plano del objetivo de la cámara que causa la distorsión de la forma de la hoja. No obstante, estos posibles errores de manipulación se eliminan al escanear las muestras, y por lo tanto, no son la causa del bajo porcentaje de discriminación correcta del análisis entre hábitats. Esto, junto a los aspectos analizados anteriormente, permite inferir que la variabilidad en la forma de las hojas de *M. cerifera* no se explica solamente por los diferentes hábitats en los que esta especie se encuentra.

En el análisis de componentes principales tanto entre especies como entre hábitats, el primer componente (CP1) incluye más de la mitad de la variación, mucho más que cualquier otro CP. Esto puede indicar que la variación de la forma en cada conjunto de datos está muy concentrada en una sola dirección. Los cambios de forma asociados con los CP1s son notablemente consistentes con los tres niveles de análisis de las variaciones en forma: la divergencia evolutiva entre los taxones, la variación del componente de simetría entre las hojas dentro de un mismo taxón y la asimetría fluctuante de las hojas (diferencias de forma entre las mitades derecha e izquierda de cada hoja).

Según Klingenberg *et al.* (2012) la variación de la forma en estos tres niveles tiene orígenes diferentes: la divergencia entre los taxones puede ser resultado de la evolución por selección

natural diversificadora y deriva o procesos tales como hibridación y poliploidización. El componente simétrico de variación dentro de los taxones se debe a la variación genética y la plasticidad fenotípica, y el componente asimétrico de la variación de la forma refleja los efectos combinados de plasticidad fenotípica y la inestabilidad en el desarrollo. En este estudio, la fuerte dominancia de un solo CP, sugieren que un proceso común puede canalizar la variación en los tres niveles en una sola dirección del espacio fenotípico. La explicación a tal fenómeno puede ser diversa. Por una parte, es probable que los cambios evolutivos ocurran en esa dirección o puedan actuar mecanismos moleculares específicos que provocan estos cambios en la forma de la hoja dentro o entre especies. La variación en forma se puede originar directamente de cambios genéticos en los procesos del desarrollo de estructuras morfológicas específicas o puede estar mediada por efectos epigenéticos (interacciones entre células, tejidos y su ambiente) (Klingenberg, 2010). No obstante, para confirmar tales teorías son necesarios estudios que combinen cambios genéticos específicos con el análisis cuantitativo de la forma como los de Langlade *et al.* (2005), Bensmihen *et al.* (2008) y Klingenberg (2010).

Consideraciones generales

Aunque la cuantificación de la forma de las hojas al emplearse la descripción matemática de los contornos ha resultado eficiente, existen otros métodos de morfometría geométrica que pueden emplearse de manera alternativa cuando la caracterización del contorno no sea suficiente para la diferenciación. El análisis por puntos clave, ha demostrado ser útil, tanto en estudios taxonómicos como ecológicos en plantas (Viscosi *et al.*, 2010; Canché-Delgado *et al.*, 2011; Klingenberg *et al.*, 2012). Otra variante es el empleo de la función multiescala de la dimensión fractal de Minkowski, la cual permite generar medidas complejas tanto de la forma interna (venación) como de la externa (contorno) de las hojas y resultó muy eficiente en la diferenciación de las especies del género *Passiflora* (*Passifloraceae*) (de Oliveira Plotze *et al.*, 2005). Incluso combinar los análisis de Fourier y los análisis Procrustes (un método de registro, basado en la rotación, traslación y reescalado) (Goodall, 1991) ha mostrado resultados satisfactorios en varios estudios (Hearn, 2009; Viscosi *et al.*, 2009).

Los resultados de la presente investigación sientan las bases para posteriores estudios que vinculen la forma de la hoja con aspectos como la asimetría fluctuante, relación fenotipo-ambiente o puede servir de punto de partida en la creación de programas informáticos para la identificación automatizada de estas y otras especies de la flora cubana.

Referencias

- Adams CD. 1972. *Flowering plants of Jamaica*. University of the West Indies: Jamaica. pp. 848.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* 71: 5-16
- Albarrán-Lara AL, Mendoza-Cuenca L, Valencia-Ávalos S, González-Rodríguez A y Oyama K. 2010. Leaf fluctuating increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* y *Quercus resinosa* (*Fagaceae*) through an altitudinal gradient in

- Mexico. *Int. J. Plant Sci.* 171(3): 310–322
- Andersen A, Lucchini F, Moriconi J, Fernández EA.** 2006. Variabilidad en la morfo-anatomía foliar de *Lippia turbinata* (*Verbenaceae*) en la provincia de San Luis (Argentina). *Phyton*. 75: 1851-5657
- Basri R, Costa L, Geiger D y Jacobs D.** 1998. Determining the similarity of deformable shapes, *Vision Research*. 38(15-16): 2365-2385
- Bensmihen S, Hanna AI, Langlade NB, Micol JL, Bangham A, Coen E.** 2008. Mutational spaces for leaf shape and size. *HFSP J.* 2: 110-120
- Berazaín IR, Falcón HB.** 2011. Two new combinations in *Morella* (*Myricaceae*) for species of the Cuban flora. *Willdenowia*. 41: 113-114
- Borhidi A.** 1996. *Phytogeography and Vegetation Ecology of Cuba*. Akadémiai Kiadó. Budapest.
- Burger W.** 1977. *Myricaceae*. En: Burger WC (ed.), *Flora Costaricensis*. pp. 21–27. Fieldana: Botany 40. Field Museum of Natural History: Chicago.
- Camargo Neto J, Meyer GE, Jones DD, Samal AK.** 2006. Plant species identification using Elliptic Fourier leaf shape analysis. *Comput. Electron. Agr.* 50: 121-134
- Canché-Delgado A, García-Jain SE, Vaca-Sánchez MS, Cuevas-Reyes P.** 2011. Cambios en la morfología floral y foliar en *Crataegus tracyi*: importancia de la asimetría fluctuante como indicador de estrés ambiental. *Biológicas*. 13(1): 44–49
- Cowart NM, Graham JH.** 1999. Within- and among-individual variation in fluctuating asymmetry of leaves in the fig (*Ficus carica* L.). *Int. J. Plant Sci.* 160(1):116–121
- Cuevas-Reyes P, Wilson AF.** 2011. *Interacciones antagónicas y morfología foliar en ambientes contrastantes: importancia de la asimetría fluctuante como indicador de estrés ambiental en el bosque tropical seco de Chamela-Cuixmala, México*. X Congreso de Ecología do Brasil. (16 a 22 de septiembre de 2011, Sao Lourenzo – MG)
- de Oliveira Plotze R, Falvo M, Gomes Pádua J, Bernacci LC, Carneiro Vieira ML, Conde G, Oliveira X, Martinez Bruno O.** 2005. Leaf shape analysis using the multiscale Minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study with *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Canad. J. Bot.* 83(3): 287–301
- Dryden IL, Mardia KV.** 1998. *Statistical shape analysis*. pp 347. Wiley: New York
- Fahn A, Cutler DF.** 1992. *Xerophytes*. Gebrüder Borntraeger, pp. 180. Berlin.
- Freeman H.** 1974. Computer processing of line drawing images. *Comp. Surv.* 6: 57–97
- Furuta N, Ninomiya S, Takahashi S, Ohmori H, Ukai Y.** 1998. Quantitative evaluation of soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaflet shape by principal component scores based on elliptic Fourier descriptor. *Breeding Sci.* 45: 315–320
- González-Rodríguez A, Oyama K.** 2005. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (*Fagaceae*), two hybridizing Mexican red oaks. *Bot. J. Linn. Soc.* 147: 427–435
- González-Villarreal LM.** 2004. *La familia Myricaceae en el estado de Jalisco, México*. pp 19. Colección Flora de Jalisco. Universidad de Guadalajara: México.
- Goodall CR.** 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *JR Stat. Soc. B.* 53: 285–339
- Hearn DJ.** 2009. Shape analysis for the automated identification of plants from images of leaves. *Taxon*. 58: 934–954
- Herrera P.** 2007. Flora y Vegetación. En: González H, Larramendi JA (eds.), *Biodiversidad cubana*. pp. 142–177. Guatemala: Ediciones Polymita.
- Huff PM, Wilf P, Azumah EJ.** 2003. Digital future for paleoclimate estimation from fossil leaves? Preliminary results. *Palaios*. 18: 266-274
- Huguet V, Gouy M, Normand P, Zimpfer JF, Fernández MP.** 2005. Molecular phylogeny of *Myricaceae*: a reexamination of host-symbiont specificity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34: 557–568
- Iwata H, Niikura S, Matsuura S, Takano Y, Ukai Y.** 1998. Evaluation of variation of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on image analysis using elliptic Fourier descriptors. *Euphytica*. 102: 143–149
- Iwata H, Ukai Y.** 2002. SHAPE: A Computer Program Package for Quantitative Evaluation of Biological Shapes Based on Elliptic Fourier Descriptors. *J. Hered.* 93(5): 384–385
- Klich MG.** 2000. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. *Environ. Exp. Bot.* 44:171–183
- Klingenberg CP.** 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nat. Rev. Genet.* 11:623–635
- Klingenberg CP, Duttke S, Whelan S, Kim M.** 2012. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *J. Evol. Biol.* 25: 115–129
- Krieger JD.** 2010. Controlling for Curvature in the Quantification of Leaf Form. In Elewa AMT (ed.), *Morphometrics for Nonmorphometricians*. pp. 27-71. Berlin. Springer-Verlag.
- Kubitzki K.** 1993. *Myricaceae*. In Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants*. pp. 453–457. New York: Springer-Verlag.
- Kuhl FP, Giardina CR.** 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Comp Graphics Image Processing*. 18: 236-258
- Langlade NB, Feng X, Dransfield T, Copsey L, Hanna AI, Thébaud C et al.** 2005. Evolution through genetically controlled allometry space. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:10221–10226
- Mabberley DJ.** 2008. *Mabberley's plant-book, ed. 3*, pp. 1021. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nicotra AB, Leigh A, Boyce CK, Jones CS, Niklas KJ, Royer DL, Tsukaya H.** 2011. The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Funct. Plant. Biol.* 38: 535–552
- Roberts AS.** 2004. *Myricaceae*. In Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Helad SV (eds.), *Flowering Plants of the Neotropics*. pp. 259–261. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Rohlf FJ, Archie JW.** 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (*Ritena culicidae*). *Syst. Zool.* 33: 302–317
- Royer DL, Meyerson LA, Robertson KM, Adams JM.** 2009. Phenotypic plasticity of leaf shape along a temperature gradient in *Acer rubrum*. *PLoS ONE* 4:e7653. doi:10.1371/journal.pone.0007653
- Royer DL, Wilf P, Janesko DA, Kowalski EA, Dilcher DL.** 2005. Correlations of climate and plant ecology to leaf size and shape:

- Potential proxies for the fossil record. *Am. J. Bot.* 92: 1141–1151
- Sack L, Frole K.** 2006. Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rain forest trees. *Ecology*. 87: 483-491
- Standley PC, Steyermark JA.** 1952. *Myricaceae*. En: Flora of Guatemala, pp. 348–352. Fieldiana: Botany 24, parte 3. Field Museum of Natural History: Chicago.
- Torres GA, Murcia J.** 2008. Estudio morfológico, histológico y ultraestructural de la nodulación de *Frankia-Morella pubescens* H. & B. ex Willdenow (*Myricaceae*) "in situ". *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 6: 21–26
- Viscosi V, Cardini A.** 2011. Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners. *PLoS ONE*. 6(10): e25630. doi:10.1371/journal.pone.0025630.
- Viscosi V, Lepais O, Gerber S, Fortini P.** 2009. Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods. *Plant Biosyst.* 1-11
- Viscosi V, Loy A, Fortini P.** 2010. Geometric morphometric analysis as a tool to explore covariation between shape and other quantitative leaf traits in European white oaks. *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems*: 257–261
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ.** 2002. Plant Ecological Strategies: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 125–59
- Xu F, Guo W, Xu W, Wei Y, Wang R.** 2009. Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? *Progr. Nat. Sci.* 19: 1789-1798