
**VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DA TRISTILIA EM UMA ESPÉCIE AUTO-
INCOMPATÍVEL: IMPLICAÇÕES PARA A MANUTENÇÃO DA HETEROSTILIA**

Por

Nicolay Leme da Cunha

**Tese submetida como um dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ecologia
pelo Programa de Pós
Graduação em Ecologia e
Conservação, Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul**

2013

VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DA TRISTILIA EM UMA ESPÉCIE AUTO-
INCOMPATÍVEL: IMPLICAÇÕES PARA A MANUTENÇÃO DA HETEROSTILIA

Nicolay Leme da Cunha

Doutor em Ecologia

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Orientador: Erich Fischer

Co-orientadora: Aline Pedroso Lorenz-Lemke

NICOLAY LEME DA CUNHA

**VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO DA TRISTILIA EM UMA ESPÉCIE AUTO-INCOMPATÍVEL:
IMPLICAÇÕES PARA A MANUTENÇÃO DA HETEROSTILIA**

Banca examinadora da tese de doutorado de Nicolay Leme da Cunha, doutor em Ecologia, pelo Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação, DBI, UFMS

Dr. Erich A. Fischer (Orientador) – UFMS

Dr^a. Aline Pedroso Lorenz-Lemke (Co-orientadora) – UFMS

Dr. Clemens Peter Schlindwein – UFMG

Dr. Flavio A. M. dos Santos – UNICAMP

Dr. Hélder Nagai Consolaro - UFG

Dr. Michael John Gilbert Hopkins – INPA

Dr. Paulo Eugenio Alves Macedo de Oliveira – UFU

RESUMO GERAL

A tristilia é um polimorfismo genético pouco frequente em angiospermas, onde flores possuem três morfotipos florais que diferem quanto à altura dos estigmas em relação aos estames. Polinizações legítimas ocorrem por meio da transferência de pólen entre alturas equivalentes de antera e estigma. O sistema é acompanhado de diversas características auxiliares e incompatibilidade heteromórfica, logo qualquer outra combinação entre pólen e estigma resulta em poucas ou nenhuma semente. A tristilia é apontada como mecanismo promotor de alogamia por meio de polinização cruzada intermediada por visitantes florais especializados, além de redução da interferência intrafloral entre pólen e estigma. A ação de forças estocásticas e deterministas podem rapidamente desestabilizar a tristilia e levar à quebra do sistema favorecendo a endogamia. Neste estudo viso compreender quais fatores determinam a manutenção e quebra da tristilia em *Eichhornia azurea*, espécie neotropical auto-incompatível de ampla distribuição geográfica. Amostrei populações no Pantanal, maior planície alagável do mundo, o qual tem a paisagem determinada pelo pulso de inundação anual. O estudo esta estruturado em três capítulos; no primeiro estimo a frequência dos morfotipos florais da espécie e quais são as forças estruturadoras que determinam sua frequência em populações ao longo de um gradiente de inundação no Pantanal. No segundo capítulo investigo a variação da comunidade de visitantes florais e sua funcionalidade entre populações e relação com a reciprocidade hercogâmica entre morfotipos florais de *E. azurea*. No terceiro e último capítulo investigo os fatores que determinam a variação de tratos florais e quebra da tristilia em *E. azurea*. Discuto a importância do fator biótico visitante floral e abiótico gradiente de inundação como forças direcionadoras para a manutenção e quebra da tristilia em *E. azurea* no Pantanal.

PALAVRAS-CHAVE: água-pé, estocasticidade, Pantanal, Pontederiaceae, seleção natural, sistema reprodutivo.

GENERAL ABSTRACT

Tristyly is a rare genetic polymorphism in angiosperms, which flowers present three floral morphs that differs in height of styles and stamens. Legitimate pollination occurs via pollen transfer among equivalent anthers and stigmas. The system is accompanied by several ancillary characteristics and heteromorphic incompatibility; therefore any other pollen stigma combination results in few or no seeds. The tristyly is pointed out as a mechanism to promote allogamy by means of cross pollination mediated specialized floral visitors, besides the reduction of intrafloral interference between pollen and stigma. The action of stochastic and deterministic forces can readily destabilize the tristyly and lead to the system breakdown favoring selfing. At this study I aim to understand what are the factors that determine the maintenance and breakdown of tristyly in *Eichhornia azurea*; a Neotropical self-incompatible species with wide geographical distribution. I sampled populations of this species in the Pantanal, the World's biggest wetland, which has the landscape determined by the annual flood pulse. The study is structured in three chapters; in the first I estimated the floral morph frequency of the species and what are the structuring forces that determine the floral morph frequency in populations through an inundation gradient in Pantanal wetlands. The second chapter I investigate the assemblage of floral visitors and functionality variation in populations and its relation with reciprocal herkogamy among floral morphs. The third and last chapter, I investigate what are the factors that determines floral traits variation and tristyly breakdown in *E. azurea*. I discuss the importance of the biotic factor floral visitor and abiotic flood pulse as driving forces for the maintenance and breakdown of tristyly in *E. azurea* in the Pantanal.

KEY-WORDS: Pantanal, Pontederiaceae, natural selection, reproductive system, stochasticity, water peacock.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do desenvolvimento de minha tese de doutorado, recebi suporte científico, intelectual, técnico e logístico realmente valiosos para a composição deste estudo e minha formação acadêmica. Sem a ajuda dessas pessoas e órgãos fomentadores, este trabalho seria infactível.

Inicio agradecendo ao amigo e orientador Erich Fischer. Desde a minha graduação aceitou o desafio de me orientar com algo parcialmente fora de sua linha de pesquisa, e ao mesmo tempo me dando liberdade para traçar meu caminho. Foi grande incentivador para que fizesse o doutorado, tendo fundamental importância em minha formação acadêmica. Sempre me orientou sobre o desenvolvimento de perguntas e filosofia científica, agradeço-o pelos grandes momentos de discussões filosóficas sem aparente rumo, mas que foram extremamente valiosas para meu crescimento pessoal e acadêmico. Obrigado pela dedicação!

Agradeço ao professor Spencer C.H. Barrett por sempre ter demonstrado disposição e interesse em contribuir com meus estudos com Pontederiaceae no Pantanal. Sua atenção e solicitude são louváveis. Me recebeu de portas abertas em seu laboratório onde pude aprender muito sobre sistema reprodutivo de plantas, biologia molecular e aumentar substancialmente a qualidade deste trabalho.

À minha companheira e porto seguro Milena Delatorre, a Mi, que sempre esteve presente nos momentos difíceis e felizes me apoiando e auxiliando. Além de participar ativamente de todas as expedições de campo desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grato aos meus pais, Mauro Leme da Cunha e Lucrécia Aparecida da Cunha, e minha irmã, Nádia Leme da Cunha Holladay, que sempre me apoiaram, incentivaram, e procuraram entender o que tanto fazia indo para o “mato medir florzinha”. Aos meus segundos pais, Antônio Pereira Carille e Elenice Pereira Carille, que sempre me deram todo o suporte para que pudesse desenvolver esse estudo. A estes, meus sinceros agradecimentos.

Ao amigo Welington Fava, o “Weg”, pessoa muito dedicada em ajudar. Suas habilidades em organização foram cruciais para o bom andamento dos trabalhos de campo e laboratório. Agradeço-o por compartilhar seu tempo e experiência em massivas coletas de campo e trabalho laboratorial.

Agradeço a todos os companheiros do Laboratório de Evolução e Biodiversidade (LEBio) pelos momentos compartilhados em longos dias de árduos trabalhos laboratoriais. Em especial à minha co-orientadora e amiga Aline Lorenz-Lemke, que sempre me apoiou e ofereceu todo o auxílio possível para que pudesse desenvolver este trabalho. Agradeço ao Adriano Afonso Spielman pelas excelentes discussões filosóficas, além de permitir acesso aos seus estereomicroscópios e microscópios. À Priscilla Maria da Silva Liber Lopes, por ajudar com a demorada e não tão interessante tarefa de preparar exsiccatas.

Aos colegas do “Barrett lab” (Christopher Balogh, Jessica Schembri, Joana Costa, Josh Hough, Ramesh Arunkumar, Sahil Gupta, Shirley Qiu, Teresa Madson, Bill Cole e Spencer C.H. Barrett), por compartilhar experiências

científicas e pessoais, e incríveis momentos juntos na University of Toronto e na cidade de Toronto.

Sou realmente grato as amigos Carlos André Zucco e Luiz Gustavo de Oliveira, por disponibilizarem “shapefiles” do Pantanal e instrução para a confecção de mapas. Ao amigo Augusto Cesar Ribas, por sempre estar disposto em ajudar com as análises de meu trabalho e uso do “R”. Ao colega Benilton Carvalho, por auxílio no desenvolvimento de funções e gráficos no “R”, e ao professor Raydonal Ospina Martínez pelo auxílio na criação de modelos com distribuição Beta.

Sou grato ao Gustavo Graciolli, Renan da Silva Olivier, Rodrigo Aranda e Isabel Alves dos Santos, pelo auxílio na morfotipagem e identificação dos visitantes florais de *Eichhornia azurea*.

Especialmente grato à Isabel Alves dos Santos por sempre demonstrar interesse em meu estudo e solicitude com o processo para a bolsa sanduíche. Também agradeço profundamente ao Luiz Eduardo Roland Tavares, pela paciência e dedicação para a obtenção da bolsa sanduíche.

À Rosilene Rosilene P. Bejarano, ou simplesmente Rose, o qual prontamente me auxiliou por diversas vezes em processos burocráticos e logísticos junto ao programa, sendo uma amiga importante ao longo desses anos.

Sou grato à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pelo financiamento do projeto ao Erich Fischer (Nº FUNDECT: 017/11, Nº Siafem: 017250), e minha bolsa de

doutorado durante o período de novembro/2011 a maio/2013 (Nº Processo: 23/200.118/2011). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado no país durante o período de outubro/2009 a setembro /2011; e à bolsa institucional do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE (Nº 4915-13-5) concedida durante o período de 03 de Junho a 30 de Novembro de 2013, para realização de estágio de doutorado sanduíche com o professor Spencer C.H. Barrett, no department of Ecology and Evolutionary Biology, na University of Toronto, Toronto, Canadá.

TABELA DE CONTEÚDOS

BANCA EXAMINADORA	ii
RESUMO GERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	iv
AGRADECIMENTOS	v
TABELA DE CONTEÚDOS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	
SELEÇÃO NATURAL E ESTOCASTICIDADE COMO FATORES ESTRUTURADORES DA TRISTILIA EM EICHHORNIA AZUREA	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAIS E MÉTODOS	13
Local de estudo	13
Descrição da espécie	18
Amostragem	21
Análises	25
Proporção dos morfotipos e esforço amostral	25
Equidade x tamanho populacional	26
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	40
CAPÍTULO 2	48
COMPOSIÇÃO DE VISITANTES FLORAIS E MANUTENÇÃO DA HERCOGAMIA RECÍPROCA EM <i>EICHHORNIA AZUREA</i>	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
MATERIAIS E MÉTODOS	55
Área de estudo	55

Descrição da espécie.....	58
Amostragem.....	60
Visitantes florais.....	60
Análises de dados.....	64
Variação na composição de visitantes florais com potencial polinizador entre populações com diferentes regimes de inundação.....	64
Relação de tratos funcionais dos visitantes florais com a hercogamia recíproca	65
RESULTADOS	68
Observações de campo	68
Trato funcional entre visitantes florais e sub-regiões do pantanal	75
Variação na composição de visitantes florais entre sub-regiões do pantanal.....	76
Comprimento médio dos visitantes florais e hercogamia recíproca	82
DISCUSSÃO	87

CAPÍTULO 3

FATORES QUE DETERMINAM A VARIAÇÃO DE TRATOS FLORAIS E QUEBRA DA TRISTILIA EM *EICHHORNIA AZUREA*.....

RESUMO.....	96
ABSTRACT	97
INTRODUÇÃO	98
MATERIAIS E MÉTODOS	102
Local de estudo.....	102
Descrição da espécie.....	107
Amostragem.....	110
Morfometria floral	113
Medição e contagem dos grãos de pólen.....	115
Visitantes florais.....	118
Análises de dados.....	118
Medidas florais.....	118
Visitantes florais.....	119
Testes inferenciais.....	119
RESULTADOS	126
Análises descritivas	126
Morfometria floral	126
Medidas de pólen.....	138
Testes inferenciais.....	148

Morfometria floral	148
Medidas de pólen.....	156
Hercogamia recíproca entre morfotipos florais.....	162
DISCUSSÃO	164
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	185
Síntese	185
Pesquisas futuras.....	187
LITERATURA CITADA	190

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Frequência e estrutura de morfotipos florais em populações de aguapé <i>Eichhornia azurea</i> (Pontederiaceae) no Pantanal entre as diferentes intensidades de inundação. Tamanho populacional, esforço proporcional e valores de χ^2 e p para cada população amostrada (ver detalhes nos métodos). As populações isopléticas estão destacadas em negrito.	32
Tabela 2.1. Tamanho e estruturação morfotípica de 21 populações de <i>Eichhornia azurea</i> em seis sub-regiões do Pantanal que variam quanto à magnitude (Baixa, Média ou Alta) e duração (Curta ou Longa) do pulso de inundação.	59
Tabela 2.2. Composição de visitantes florais de <i>E. azurea</i> , ordenados pelo maior tamanho médio da probóscide, registrados nas regiões com distintas intensidades de inundação no Pantanal, com respectivos comprimentos médio da probóscide, erro padrão (EP), desvio padrão (DP) e valores máximo (Max.) e mínimo (Mín.).	75
Tabela 2.3. Resultado do modelo generalizado (GAMLSS) utilizando distribuição beta inflacionada da relação entre reciprocidade com comprimento médio da probóscide e pulso de inundação no Pantanal. As linhas em cinza apontam as relações significativas entre variáveis.	80
Tabela 3.1. Total de populações amostradas por sub-região para a realização de medidas florais, de pólen e captura de polinizadores de <i>Eichhornia azurea</i> no Pantanal.	108
Tabela 3.2. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação dos comprimentos das estruturas florais de <i>Eichhornia azurea</i> com intensidade do pulso de inundação e tamanho populacional. O modelo com melhor ajuste está com realce cinza.	119
Tabela 3.3. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação dos comprimentos das estruturas florais de <i>Eichhornia azurea</i> com a comunidade de visitantes florais, além do tamanho e comprimento médio do corpo e probóscide, respectivamente, dos visitantes florais em cada população e sub-região do Pantanal. O modelo com melhor ajuste está com realce cinza. ..	120

Tabela 3.4. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação do tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de *E. azurea* com diferentes níveis de pulso de inundação do Pantanal, tamanho populacional, composição de visitantes florais e tamanho médio do corpo e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população. O modelo com melhor ajuste esta com realce cinza. 122

Tabela 3.5. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação da quantidade de grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de *E. azurea* com diferentes níveis de pulso de inundação do Pantanal, tamanho populacional, composição de visitantes florais e tamanho médio do corpo e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população. O modelo com melhor ajuste esta com realce cinza. 122

Tabela 3.6. Comprimento médio (mm), desvio padrão (DP), mínimo (min.), máximo (max.), número de flores (n), e populações (pop (n)) dos tratos florais medidos (Morfotipo L: longo, M: Médio, C: Curto, Estil: Estilete, l: longo, m: médio, c: curto) em *Eichhornia azurea* em cada condição de inundação do Pantanal. 125

Tabela 3.7. Média, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da largura e comprimento das pétalas, e largura da base e no final da corola (ver Figura 5) entre morfotipos florais de *Eichhornia azurea* entre regiões do Pantanal com diferentes intensidades de inundação, e agrupando todos os dados (Total). 133

Tabela 3.8. Estimativa da média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (Coef. Var.), número de flores e número de populações para medidas do tamanho e quantidade de grãos de pólen entre morfotipos florais de *Eichhornia azurea* em quatro categorias de intensidade do pulso de inundação do Pantanal. 136

Tabela 3.9. Valores médios, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (Coef. Var.), mínimo (min.) e máximo (máx.) do índice de reciprocidade por intensidade do pulso de inundação e sub-região do Pantanal. Os valores totais foram calculados para todas as 31 populações agrupadas. 143

Tabela 3.10. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando os comprimentos das estruturas florais de <i>E. azurea</i> entre populações com diferentes regimes de inundação no Pantanal. L, M, C, <i>l</i> , <i>m</i> e <i>c</i> , correspondem às alturas dos estigmas longos, médios e curtos, e anteras dos filetes longos, médios e curtos, respectivamente.	147
Tabela 3.11. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando os comprimentos das estruturas florais de <i>E. azurea</i> com a comunidade de visitantes florais, comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população, além de Pulso de Inundação do Pantanal.	150
Tabela 3.12. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando o tamanho do perianto floral, representado pelo principal eixo da PCA (70% de variância explicada), entre morfotipos florais e populações com diferentes regimes de inundação.	152
Tabela 3.13. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando o tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de <i>E. azurea</i> e diferentes regimes de inundação no Pantanal.	154
Tabela 3.14. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando o tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de <i>E. azurea</i> , diferentes regimes de inundação no Pantanal, composição de visitantes florais e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população.	155
Tabela 3.15. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando a variação de tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de estames em flores de <i>E. azurea</i> com Pulso de inundação no Pantanal.	157
Tabela 3.16. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando a variação da quantidade de grãos de pólen entre as diferentes alturas de estames em flores de <i>E. azurea</i> com Pulso de inundação no Pantanal.	158

Tabela 3.17. Resultado de modelo geral linearizado com distribuição beta inflacionada testando a relação entre o índice de reciprocidade com tamanho populacional, tamanho floral e Pulso de Inundação no Pantanal.	160
---	-----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Sub-regiões do Pantanal brasileiro de acordo com Hamilton *et al.* (1996). Siglas MS e MT correspondem aos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, o qual Pantanal faz parte. 16
- Figura 1.2.** Inflorescência do morfotipo longo (A), médio (B) e curto (C) de *Eichhornia azurea*, Pantanal. As setas indicam os estiletes longo (L) e médio (M), o estilete curto não é visível por estar no fundo do tubo floral (Fotos:N.L. Cunha). (D) representação esquemática da heterostilia em *Eichhornia azurea*. (1) perianto, (2) estigma e estilete, (3) primeiro conjunto de três anteras, (4) segundo conjunto de três anteras, (5) ovário. As estruturas descritas para o morfotipo longo, ocorrem em todos os morfotipos, porém em alturas diferentes. As setas apontam a transferência de pólen em polinizações legítimas (hercogamia recíproca), outras combinações entre pólen e estigma resultarão em poucas ou nenhuma semente. 18
- Figura 1.3.** Tipos de corpos d'água (populações) e paisagem encontradas ao longo das sete sub-regiões do Pantanal amostradas. (A) pastagens alagáveis no Nabileque (inundação baixa e curta), (B - D) "caixas de empréstimo", lagoas temporárias e permanentes em Miranda e Aquidauana (inundação média e longa), (E), "baía" na Nhecolândia (inundação média e média), (F) "vazante" e pastagens alagadas na porção NE da sub-região de Aquidauana e Leque do Taquari (inundação baixa e curta), (G) delta do Rio Taquari, e (H) grandes lagos do Paraguai (inundação alta e longa). 20
- Figura 1.4.** Distribuição das 73 populações de *Eichhornia azurea* amostradas entre 2004 a 2012 no Pantanal entre as diferentes intensidades de inundação. 21
- Figura 1.5.** Proporção entre morfotipos florais encontrada em 73 populações de *Eichhornia azurea* amostradas entre 2004 e 2012 no Pantanal; gráficos foram deslocados para evitar sobreposição. Siglas MS e MT correspondem aos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, o qual Pantanal faz parte. 27

Figura 1.6. Frequência de morfotipos florais em 73 populações de *E. azurea* amostradas no Pantanal. O ponto azul central corresponde ao equilíbrio isoplético, e o triângulo vermelho à todas as populações amostradas no Pantanal. (A) populações com cor preta correspondem a populações isopléticas (com proporções equivalentes entre morfotipos florais) e as em cor cinza às populações anisopléticas (proporções desiguais entre morfotipos florais), (B) o gradiente de cores representam a diferentes magnitudes de altura e duração do pulso de inundação. Em ambos os gráficos há sobreposição nas populações monomórficas, onde no vértice superior (lados C e L) existem três populações na categoria de inundação média e longa, enquanto no vértice direito (lados M e L) existem três populações na categoria baixa e curta e uma população na média e longa. 28

Figura 1.7. Relação da equidade (*E*) entre morfotipos florais, com o tamanho das populações de *Eichhornia azurea* e intensidade de inundação (ver figura 1.6) no Pantanal. 31

Figura 2.1. Sub-regiões do Pantanal de acordo com Hamilton *et al.* 1996. 54

Figura 2.2. Representação esquemática da heterostilia em *Eichhornia azurea*. (1) perianto, (2) estigma e estilete, (3) primeiro conjunto de três anteras, (4) segundo conjunto de três anteras, (5) ovário. Notar que as estruturas foram descritas para o morfotipo longo, no entanto todas ocorrem em todos os morfotipos, porém em alturas diferentes. As setas apontam a transferência de pólen sob polinizações legítimas (hercogamia recíproca), qualquer outra combinação entre pólen e estigma resultará em poucas ou nenhuma semente. (6) Visitante floral de longa probóscide, em posição que realiza o forrageio em *E. azurea*, notar que os grãos de pólen podem ser depositados nas três alturas de anteras e estigmas ao longo do corpo e probóscide do visitante (Alves dos Santos 1999). 56

Figura 2.3. Distribuição das 21 populações de *Eichhornia azurea* amostradas quanto aos visitantes florais entre 2011 e 2012, Pantanal. 60

Figura 2.4. (A-C) Fotografias de Sirfideos visitando flores de <i>E. azurea</i> no Pantanal. Notar que sempre buscam pólen das anteras médias e curtas, podendo pousar diretamente nestas estruturas ou no perianto.	67
Figura 2.5. Sequência de visita de <i>Ancyloscelis</i> em flor do morfotipo longo de <i>E. azurea</i> .(A-B) abordagem inicial à flor, notar que a probóscide já vem projetada para a obtenção de recursos,(C-D) pouso no tubo floral, notar o contato com tórax nas anteras médias e abdômen com filete, (E) projeção do corpo no tubo floral demonstrando a movimentação para o obter néctar, (F) posição de descanso ou limpeza.	69
Figura 2.6. Fotografias de (A-B) abelhas do gênero <i>Centris</i> , e (C-G) formas de abordagem de abelhas Sphecidae em flores do <i>E. azurea</i> no Pantanal. Notar o contato do abdômen e tórax com as anteras e estigmas nas imagens A e G.	71
Figura 2.7. Comprimento médio da probóscide das diferentes espécies de visitantes florais em cada população e sub-região do Pantanal.	72
Figura 2.8. Composição de visitantes florais (PCoA) em populações de <i>E. azurea</i> entre as diferentes intensidades de pulso de inundação do Pantanal (esquerda) e tamanho médio da probóscide por população (direita).	76
Figura 2.9. Ordenação direta da comunidade de visitantes florais de <i>E. azurea</i> , capturadas nas 21 populações amostradas ao longo dos diferentes regimes de inundação no Pantanal, ponderada pelo tamanho médio da probóscide de cada população (Fotografias digitais das espécies aqui apresentadas, são encontradas nas Figuras 2.S1 e 2.S2).	77
Figura 2.10. Tamanho médio da probóscide em cada população amostrada no Pantanal. Notar que populações nas bordas, limites leste e sul, do Pantanal apresentaram tamanho médio de probóscide maior que as encontradas nas porções ccentro-sul e borda oeste, locais com maiores intensidades e duração do pulso de inundação.	78

Figura 2.11. Relação entre o comprimento médio da probóscide e índice de reciprocidade para populações de <i>Eichhornia azurea</i> no Pantanal. Os polígonos indicam grupos formados por diferentes intensidades de inundação. Cada ponto representa uma espécie de visitante floral em determinada população.	81
Figura 2.12. Distribuição de Kernel do comprimento médio da probóscide de cada espécie de visitante floral entre os diferentes regimes de pulso de inundação no Pantanal. As linhas verticais pretas e vermelhas representam, respectivamente, o comprimento médio das anteras e estigmas encontrados em cada sub-região do Pantanal (ver Capítulo 3), ordenados da esquerda para a direita (estruturas curtas, médias e longas).	83
Figura 2. S1. (figura suplementar) Espécies de visitantes florais de <i>E. azurea</i> registradas ao longo das 21 populações amostradas. As fotografias estão ordenadas (A – N) conforme 14 primeiros morfotipos da esquerda para direita na Figura 2.7. As fotos não esta na mesma escala.	89
Figura 2. S2. (figura suplementar) Espécies de visitantes florais de <i>E. azurea</i> registradas ao longo das 21 populações amostradas. As fotografias estão ordenadas (A – M) conforme décimo quinto a vigésimo terceiro morfotipo da esquerda para direita na Figura 2.7. As fotos não esta na mesma escala.	90
Figura 3.1. Sub-regiões do Pantanal de acordo com Hamilton <i>et al.</i> 1996.	103
Figura 3.2. Inflorescência do morfotipo longo (A), médio (B) e curto (C) de <i>Eichhornia azurea</i> , Pantanal. As setas indicam os estiletes longo (L) e médio (M), o estilete curto não é visível por estar no fundo do tubo floral (Fotos:N.L. Cunha).	105
Figura 3.3. Representação esquemática dos morfotipos heterostílicos em <i>Eichhornia azurea</i> . (1) pétalas, (2) estigma e estilete, (3) primeiro conjunto de três anteras, (4) segundo conjunto de três anteras, (5) ovário. Notar que as estruturas foram descritas para o morfotipo longo, no entanto todas ocorrem em todos os morfotipos, porém em alturas diferentes. As setas apontam a	

transferência de pólen sob polinizações legítimas (hercogamia recíproca), qualquer outra combinação entre pólen e estigma resultará em poucas ou nenhuma semente. 106

Figura 3.4. Distribuição das 34 populações de *Eichhornia azurea* amostradas em novembro de 2007, e entre 2011 e 2012 no Pantanal para morfometria floral. 109

Figura 3.5. Esquema das medidas florais tomadas em flores de *Eichhornia azurea* no Pantanal. (1) largura das pétalas, (2) comprimento da flor, (3) largura da abertura do tubo floral, (4) largura na base do tubo floral, (5) comprimento do pistilo do morfotipo longo, (6), (7) e (8) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *m* do morfotipo longo; (9), (10) e (11) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *c* do morfotipo longo, (12), (13) e (14) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *l* do morfotipo médio, (15) comprimento do pistilo do morfotipo médio, (16), (17) e (18) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *c* do morfotipo médio, (19), (20) e (21) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *l* do morfotipo curto, (22), (23) e (24) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *m* do morfotipo curto, (25) comprimento do pistilo do morfotipo curto. 111

Figura 3.6. Distribuição das 24 populações de *E. azurea* amostradas entre 2011 e 2012 no Pantanal para medição e contagem dos grãos de pólen. 114

Figura 3.7. Variação na altura dos estigmas e anteras entre os morfotipos florais da espécie tristílica *Eichhornia azurea* no Pantanal. Os símbolos quadrados correspondem às alturas dos estigmas, os em forma de “sinal positivo” ao conjunto de anteras longas, losangos indicam as alturas das anteras médias, e círculos às anteras curtas. Notar gradiente de cor dentro do mesmo nível de altura da antera, o qual corresponde às medidas das alturas das três anteras dentro de um mesmo conjunto (e.g. Morfotipo Longo, antera curta1, curta2 e curta3, ver figura 3.3 e 3.5). As flores estão ranqueadas pela altura do estigma (maior para menor) dentro de cada morfotipo floral. Importante notar a sobreposição das anteras e estigmas em várias flores em todos os morfotipos florais. 126

Figura 3.8. Flores semi-homostílicas registradas nas sub-regiões de Miranda, Aquidauana e Nabileque. É possível determinar de qual morfotipo floral a semi-homostilia derivou, a partir da inserção dos filetes no tubo floral. (A) linha de flores semi-homostílicas derivadas do morfotipo longo, (B) derivadas do morfotipo médio, e (C) derivadas do morfotipo curto. Notar que a altura do estigma em cada tipo semi-homostílico, pode ficar correspondente aos dois níveis de altura das anteras (e.g. B flor 1 e flor 3). Setas brancas apontam a localização do estigma e colchetes o conjunto de anteras o qual é sobreposto. As flores não estão na mesma escala. (Fotos N.L. Cunha)..... 128

Figura 3.9. Variação da altura dos estigmas e anteras de morfotipos florais de *Eichhornia azurea* entre regiões do Pantanal com diferentes intensidades do e pulso de inundação. L, M e C correspondem aos morfotipos Longo, Médio e Curto, respectivamente. Notar a sobreposição das anteras e estigmas em várias flores (círculos vermelhos e seta), principalmente nas flores de populações em área com intensidade de Inundação de média magnitude e longa duração (sub-regiões de Aquidauana e Miranda), e casos isolados somente para o morfotipo longo na região do Nabileque e Nhecolândia (pulso de inundação baixa e curta, e média e média)..... 130

Figura 3.10. Variação na altura dos estigmas e anteras entre morfotipos florais e populações de *Eichhornia azurea* em regiões do Pantanal com diferentes magnitudes de Pulso de Inundação. As linhas pontilhadas correspondem às médias do comprimento do estilete para cada condição de Pulso de Inundação. Notar a maior variação das médias encontrada no morfotipo Longo e menor no morfotipo Curto, além de menores valores registrados para populações em regiões de Pulso de Inundação de médio intensidade e longa duração. 131

Figura 3.11. Relação do tamanho e forma floral representado pelo componente principal das variáveis: comprimento e largura das pétalas, e largura na base e abertura da corola (70% variância explicada). Todas as variáveis apresentam relação negativa com o eixo principal, porém o eixo foi invertido para auxiliar a interpretação, logo valores positivos correspondem a flores maiores. As linhas pontilhadas representam o valor médio do scores da PCA para cada categoria

de pulso de inundação (em regiões com intensidades baixa e curta e alta e longa estão sobrepostas), independente do morfotipo floral.	134
Figura 3.12. Tamanho médio (A) e quantidade média estimada de grãos de pólen (B) entre as diferentes alturas de anteras e morfotipos florais de <i>Eichhornia azurea</i> no Pantanal. As linhas pontilhadas representam as médias encontradas para cada altura de antera independente do morfotipo floral.	137
Figura 3.13. Tamanho médio (A) e quantidade média estimada de grãos de pólen (B) entre as diferentes alturas de anteras e morfotipos florais de <i>Eichhornia azurea</i> nas 24 populações localizadas em regiões com três distintas intensidades e duração do pulso de inundação no Pantanal. As linhas pontilhadas representam as médias encontradas para cada altura de antera em cada condição de inundação, independente do morfotipo floral.	140
Figura 3.14. Densidade Kernel do tamanho médio (A) e quantidade média estimada (B) de grãos de pólen de <i>Eichhornia azurea</i> entre as diferentes alturas de anteras, morfotipos florais e intensidade do Pulso de Inundação no Pantanal. As linhas tracejadas perpendiculares correspondem às médias do tamanho do grão de pólen para cada altura de antera, no caso da quantidade de pólen as linhas verde, azul e vermelha para as anteras <i>c</i> , <i>m</i> e <i>l</i>	141
Figura 3.15. Distribuição do índice de reciprocidade (Sanchez <i>et al.</i> 2013) entre 31 populações de <i>Eichhornia azurea</i> de oito sub-regiões do Pantanal. Valores próximos a 1 indicam perfeita reciprocidade entre estigmas e anteras de alturas equivalentes, e valores próximos a 0 o contrário.	
Figura 3.16. Relação do índice de reciprocidade entre os três morfotipos florais de <i>E. azurea</i> , com o tamanho floral (PCA 1, 70%), tamanho populacional e Pulso de Inundação.	159
Figura 3.S1. (figura suplementar). Tamanho do grão de pólen encontrado em cada antera (total seis anteras por flor) entre os três morfotipos florais de <i>Eichhornia azurea</i> em duas populações no Pantanal Sul (EAZU 17 e EAZU 23). O morfotipo curto da população 23 tiveram poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel.	177

Figura 3.S2. (figura suplementar). Quantidade de grãos de pólen encontrados em cada antera (total seis anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* em duas populações no Pantanal Sul (EAZU 17 e EAZU 23). O morfotipo curto da população 23 tiveram poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel. 178

Figura 3.S3. (figura suplementar). Fotografias de flores pequenas do morfotipo longo encontradas na sub-região de Miranda, Pantanal. As setas apontam a localização do estigma e as elipses amarelas cada conjunto de anteras. 179

Figura 3.S4. (figura suplementar). Densidade de Kernel do tamanho médio dos grãos de pólen encontrados em cada antera (total duas anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* nas 24 populações amostradas em cinco sub-regiões do Pantanal Sul. A última população, Leque Taquari 62 teve poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel. 179

Figura 3.S5. (figura suplementar). Densidade de Kernel da quantidade média de grãos de pólen encontrados em cada antera (total duas anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* nas 24 populações amostradas em cinco sub-regiões do Pantanal Sul. A última população, Leque Taquari 62 teve poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel. 180

INTRODUÇÃO GERAL

A heterostilia é um polimorfismo genético de origem polifilética onde espécies de plantas podem apresentar dois (distilia) ou três (tristilia) morfotipos florais que diferem quanto à altura dos estigmas em relação aos estames (Darwin 1877, Barrett 1993). O polimorfismo é geralmente acompanhado de características auxiliares como tamanho dos grãos de pólen e das papilas estigmáticas proporcionais ao nível das estruturas (filetes e estiletes respectivamente), quantidade de grãos de pólen inversamente proporcional à altura das estruturas e sistema de incompatibilidade heteromórfica (Gander 1979, Barrett 1992). Polinizações legítimas ocorrem entre anteras e estigmas de alturas equivalentes, qualquer outra combinação entre pólen e estigma formará menor quantidade de sementes (Darwin 1877, Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). A heterostilia é apontada como mecanismos para promover polinização cruzada entre morfotipos florais e reduzir a interferência intrafloral entre pólen e estigma (Charlesworth 1979, Lloyd & Webb 1992).

Apesar de a heterostilia ser descrita para 28 famílias de angiospermas, a tristilia somente é conhecida para quatro famílias não relacionadas filogeneticamente: Amaryllidaceae, Lythraceae, Oxalidaceae e Pontederiaceae (Barrett & Shore 2008). Em Pontederiaceae, pequena família monocotiledônea, a tristilia ocorre em três espécies do gênero *Eichhornia* e quatro espécies do gênero *Pontederia* (Barrett 1993). As três espécies tristílicas de *Eichhornia*, apresentam diferenças na forma de vida e sistema de incompatibilidade. *Eichhornia crassipes* possui fraco sistema de incompatibilidade, é aquática flutuante livre com

reprodução clonal pronunciada, podendo espalhar-se rapidamente quando introduzida em lagos, rios e represas (Barrett 1977, Barrett & Forno 1982). Por outro lado, *E. paniculata* é perene de vida curta ou aquática anual emergente, auto-compatível, e não apresenta reprodução clonal (Barrett 1985). *Eichhornia azurea* é clonal de vida longa, flutuante fixa no substrato e auto-incompatível (Barrett 1978, Bianchini *et al.* 2000, Cunha & Fischer 2009). A quebra da tristília e fixação de variante auto-compatível já foi reportada para as três espécies, sendo melhor compreendida em *E. paniculata*.

Neste estudo opto por utilizar *E. azurea* como modelo para entender processos ecológicos e evolutivos determinantes na variação da expressão da heterostília. A escolha de *E. azurea* se deve a: (i) grande abundância da espécie na área de estudo, (ii) pode ser encontrada sob diferentes condições ambientais, (iii) a determinação dos morfotipos florais é facilmente acessada, (iv) pode apresentar flores o ano todo no Pantanal.

A área de estudo proposta, o Pantanal, é um grande centro de ocorrência de espécies de Pontederiaceae. No Pantanal ocorrem três gêneros (*Eichhornia*, *Heteranthera* e *Pontederia*) e 12 espécies de Pontederiaceae. Dentre as espécies de *Eichhornia* reportadas para o Pantanal estão as tristílicas *E. azurea* (Sw.) Kunth e *E. crassipes* (Mart.) Solms-Laubach, e as monomórficas *E. diversifolia* (Vahl) Urban e *E. meyeri* A.G.Schultz; ao passo que do gênero *Heteranthera* são reportadas *H. limosa* (Sw.) Willd e *H. multiflora* (Griseb.) Horn. Por outro lado, dentre as espécies do gênero *Pontederia*, é encontrado *P. cordata* L. *cordata*, *P. cordata* var. *lancifolia* (Muhl.) Torrey, *P. parviflora* Alexander, *P.*

subovata (Seubert) Lowden, *P. rotundifolia* L.f, *P. triflora* (Seubert) Agostini, D. Velásquez e J. Velásquez (Pott & Pott 2000).

O Pantanal é a maior planície de inundação da Terra (160.000 km²), localizado no centro da América do Sul, foi declarado como Reserva Mundial da Biosfera e Patrimônio Natural Mundial pela UNESCO em 2000, na Convenção de Ramsar. Compreende extensa planície de alagação, localizada no centro da América do Sul. O clima é caracterizado por estações secas e úmidas bem definidas. Possui história geológica recente (~5000 anos), e tem o ciclo das águas ou pulso de inundação anual como principal força estruturadora da paisagem (mais informações na descrição de área de estudo do capítulo 1) (Assine 2003). Com variação espacial e temporal, o pulso de inundação apresenta diferentes intensidades e durações entre regiões do Pantanal, promovendo um mosaico natural de paisagens ao longo desse domínio (Figura I). Essa variação provavelmente é refletida nos organismos que ocorrem ao longo desse gradiente de inundação no Pantanal. Durante este estudo, uso a classificação para suscetibilidade à inundação proposta por Gonçalves *et al.* (2008) como uma variável explanatória para variações na expressão heterostilia em *E. azurea*.

O objetivo de minha tese foi descobrir os processos ecológicos evolutivos responsáveis pela manutenção e quebra da tristilia, usando como modelo *E. azurea*, uma espécie auto-incompatível, clonal e de ampla distribuição geográfica. Grande parte das investigações sobre a quebra da heterostilia em Pontederiaceae é com *E. paniculata*, o qual difere quanto à forma de vida e sistema de compatibilidade. Ademais, investigo a contribuição do pulso de inundação anual

existente no Pantanal na variação intraespecífica desta espécie aquática e de interações com polinizadores ao longo deste gradiente de inundação. A tese esta estruturada em três capítulos com distintas perguntas. Entretanto, é inevitável que vários trechos técnicos como descrição do local de estudo e espécie se repitam entre eles. As citações bibliográficas são apresentadas ao final do trabalho.

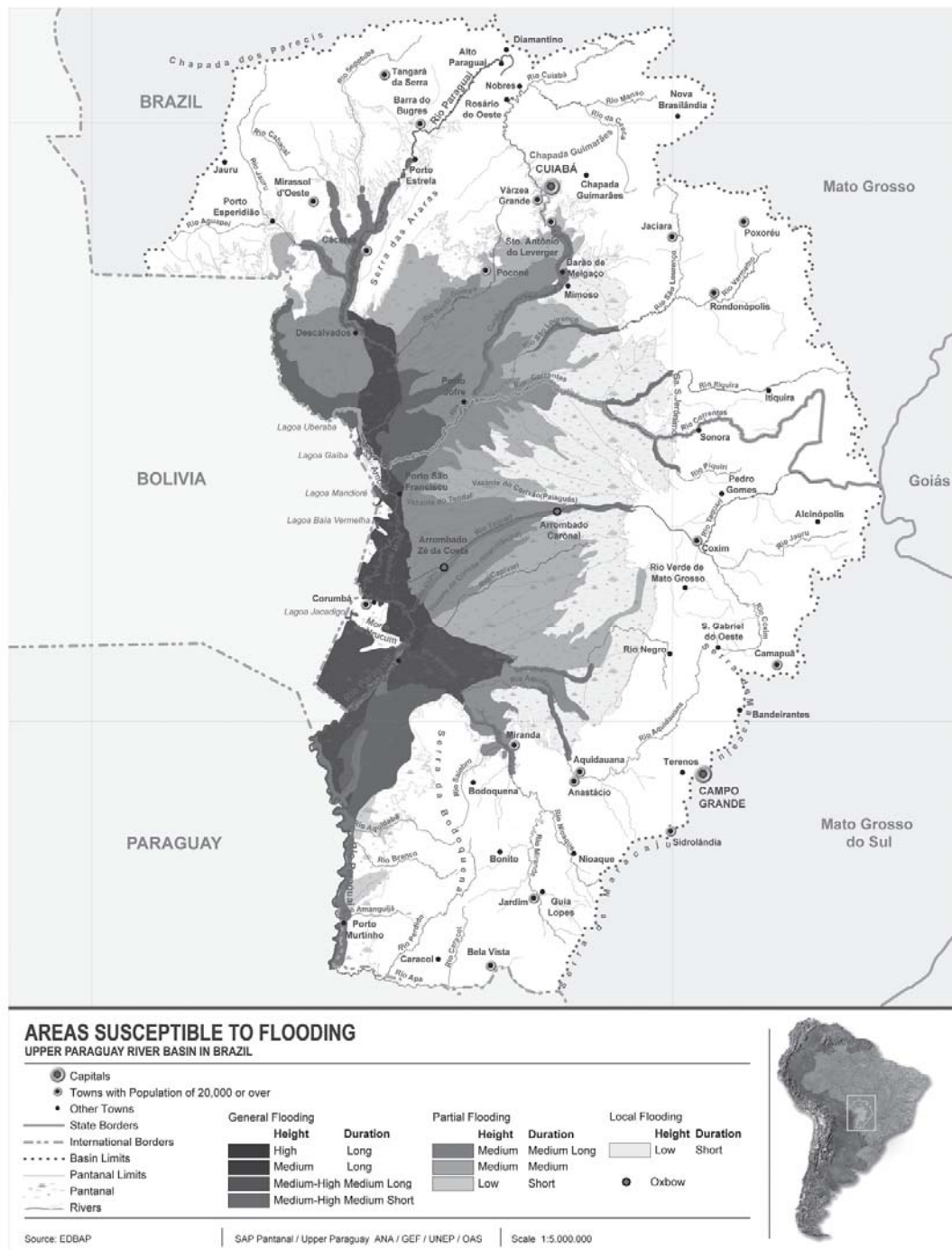


Figura I. Suscetibilidade ao alagamento pelo pulso de inundação no Pantanal. Os tons de cinza claro a escuro correspondem, em escala do menor para o maior, à intensidade e duração da inundação anual no Pantanal (figura extraída de Gonçalves *et al.* 2008).

Página intencionalmente deixada em branco

CAPÍTULO 1

**SELEÇÃO NATURAL E ESTOCASTICIDADE COMO FATORES
ESTRUTURADORES DA TRISTILIA EM *EICHHORNIA AZUREA***

RESUMO

A tristilia é um polimorfismo genético onde populações apresentam três morfotipos florais (longo (L), médio (M) e curto (C)) que diferem reciprocamente quanto à altura dos estigmas em relação aos estames. Assumindo igual desempenho e cruzamentos aleatórios entre os três fenótipos florais, o único equilíbrio possível é atingido sob proporções equivalentes entre eles. Entretanto, fatores demográficos, históricos, estocásticos dentre outros, podem determinar desvios na frequência dos morfotipos florais em populações naturais de espécies tristílicas. No presente trabalho, investigo padrões de estruturação de morfotipos florais em *Eichhornia azurea*, espécie auto-incompatível com reprodução clonal, e sua relação com tamanho populacional e intensidades de inundação na maior planície de inundação do mundo, o Pantanal. Populações de *E. azurea* foram amostradas entre 2004 a 2012 em oito sub-regiões do Pantanal para determinação dos morfotipos florais. Posteriormente, foram classificadas conforme o tamanho populacional e nível de inundação. Ao todo foram verificadas 10.008 inflorescências em 73 populações de *E. azurea* no Pantanal. Cerca de 80 % das populações foram trimórficas ($n = 57$), ao passo que somente 10 % das populações foram dimórficas ou monomórficas ($n = 8$ cada). Embora a maior parte das populações amostradas seja trimórfica, em geral elas apresentam desvios da proporção isoplética (1:1:1). Em média, a frequência do morfotipo floral longo foi $0,35 (\pm 0,21)$, do médio foi $0,32 (\pm 0,23)$ e do curto, $0,37 (\pm 0,24)$. Dezenove populações apresentaram ao menos um morfotipo raro (frequência menor ou igual a 15%), sendo o morfotipo M mais frequentemente encontrado sob essa condição ($n = 11$). A equidade entre os morfotipos florais variou de 0 a 0,997 ($\mu = 0,76$, $c_v = 0,41$), e esteve relacionada ao tamanho populacional, mas não à intensidade de inundação. *Eichhornia azurea* apresenta enorme heterogeneidade na estrutura de morfotipos florais entre populações. Seleção natural (depressão endogâmica e menor aptidão do morfotipo médio), fatores estocásticos (imprevisibilidade do pulso de inundação no Pantanal), e fatores históricos (alta frequência do morfotipo curto) são discutidos como principais fatores estruturadores da variação dos morfotipos florais de *E. azurea*.

PALAVRAS-CHAVE: agua-pé, camalote, distribuição beta, isopleia, planície inundável, polimorfismo genético, pulso de inundação, sistema reprodutivo.

ABSTRACT

Tristyly is a genetic polymorphism which populations are composed by three floral morphs ((L) Long, (M) Middle, (S) Short) that differ reciprocally in the heights of anthers and stigmas. Assuming equal fitness and disassortative mating among the three floral phenotypes, the only possible equilibrium is reached with equal proportions among them. However, demographic, historical and stochastic factors can determine bias in floral morph frequencies in natural populations of tristylous species. The present study aimed to understand patterns of floral morph structuring in *Eichhornia azurea*, self-incompatible and clonal species, and its relation with population size and flood intensity in the largest floodplain of the world, the Pantanal. Populations of *E. azurea*, were sampled between 2004 and 2012 in eight sub-regions of Pantanal for floral morph determination. Posteriorly, were classified accordingly the population size and flood pulse intensity. Overall, 10,008 inflorescences in 73 populations of *E. azurea* were verified in the Pantanal. About 80% of sampled populations were trimorphic ($n = 57$), and only 10% were dimorphic or monomorphic ($n = 8$ each). Although the majority of the sampled populations were trimorphic, they generally they show deviations from isoplethy (1:1:1). In average, the L- morph was 0.35 (± 0.21), the M-morph 0.32 (± 0.23), and S-morph 0.37 (± 0.24). Nineteen populations presented at least on rare floral morph (frequency equal or less 15%), being the M-morph the most common under this condition ($n = 11$). The morph evenness among floral morphs varied from 0 to 0.997 ($\mu = 0.76$, $c_v = 0.41$), and was related to population size, but not with flood pulse intensity. *Eichhornia azurea* presented enormous heterogeneity on floral morph structure among populations. Natural selection (inbreeding depression and minor fitness in M-morph), stochastic forces (Pantanal's flood pulse unpredictability), and historical factors (higher frequency of S-morph) are discussed as the main structuring factors for the evenness variation of floral morphs in *E. azurea*.

KEY-WORDS: agua-pé, camalote, beta distribution, isopleth, floodplain, genetic polymorphism, flood pulse, breeding system.

INTRODUÇÃO

A tristilia é um polimorfismo genético onde populações apresentam três morfotipos florais (aqui chamados de longo (L), médio (M) e curto (C)) que diferem reciprocamente quanto à altura dos estigmas em relação aos estames (Darwin 1877). Assim como em distilia, esse polimorfismo é frequentemente acompanhado de incompatibilidade esporofítica dialélica, o que ajuda a promover polinizações cruzadas legítimas (transferência de pólen para o estigma de altura correspondente – cruzamentos não associativos entre morfos de mesma altura de estigma) mediadas por polinizadores especializados (Darwin 1877, Barrett 1992, Baena-Díaz *et al.* 2012). Além de promover a alogamia, a tristilia pode auxiliar na prevenção de auto-polinização devido à hercogamia recíproca (Lloyd & Webb 1992).

A expressão fenotípica dos morfotipos florais é governada por dois *loci* dialélicos (*S*, *M*), com ação epistática do *locus S* em relação ao *locus M* (Fisher & Mather 1943, Weller 1976a). Portanto, plantas com herança recessiva (*ssmm*) serão expressas fenotipicamente pelo morfotipo longo, plantas *ss* e ao menos um alelo *M* pertencerão ao morfotipo médio (*ssMm*, *ssMM*), e indivíduos que tiverem um alelo *S* serão obrigatoriamente do morfotipo curto, independente dos alelos subsequentes (*Ssmm*, *SsMm*, *SsMM*). Ainda, em populações de espécies tristílicas auto-compatíveis, o morfotipo curto pode carregar três genótipos adicionais: *SSmm*, *SSMm*, *SSMM* (Fisher 1941, Heuch & Lie 1985).

Assumindo igual desempenho e cruzamentos aleatórios entre os três fenótipos florais, o único equilíbrio possível é atingido sob proporções

equivalentes entre eles (equilíbrio isoplético - Fisher 1941, 1944, Heuch 1979, Heuch & Lie 1985, Finney 1983). A frequência equivalente entre esses três morfotipos florais é mantida em populações por seleção de frequência-dependência negativa (Barrett *et al.* 2004, Pannell *et al.* 2005), pois para a realização de polinizações cruzadas legítimas, é necessário que o pólen venha de altura equivalente ao estigma onde será depositado (hercogamia recíproca). Portanto, proporções equivalentes entre os morfotipos florais maximizam as chances de polinizações legítimas na população.

Entretanto, amostragens em larga escala de espécies tristílicas indicam que muitas populações apresentam desvios do equilíbrio teórico esperado (anisopleitia - Haldane 1936; Schoch-Bodmer 1938; Halkka & Halkka 1974; Heuch 1979; Barrett & Forno 1982; Barrett *et al.* 1983; Barrett 1985; Weller 1986, Andersson 1994, Eckert & Mavraganis 1996, Ness *et al.* 2010; Sosenski *et al.* 2010; Barrett & Arroyo 2012). Pesquisadores buscam entender esses desvios seguindo dois principais processos evolutivos. O primeiro aborda diferenças de desempenho entre morfotipos florais, como diferenças específicas nas taxas de endogamia, variação na produção de pólen e fertilidade masculina, assimetria na transferência de pólen e cruzamentos (Barrett *et al.* 1983, Barrett *et al.* 1989, Barrett *et al.* 2004). Por outro lado, a segunda forma de entender a anisopleitia envolve o estudo de fatores históricos, como flutuações estocásticas no tamanho populacional, deriva genética, gargalo populacional e efeito fundador (Lewis 1975, Weller 1976a, b, Morgan & Barrett 1988, Barrett *et al.* 1989, Barrett & Husband 1992a, Eckert *et al.* 1996, Ness *et al.* 2010). Estudos com essa abordagem visam compreender a

importância relativa da seleção natural e deriva genética para a manutenção da heterostilia.

A tristilia é conspícua em Pontederiaceae, família das monocotiledôneas, ocorrendo em três de oito espécies de *Eichhornia* e quatro de cinco espécies de *Pontederia* (Graham *et al.* 1998). Alguns estudos em larga escala geográfica com as espécies *P. cordata*, *E. crassipes* e *E. paniculata*, demonstraram que a sinergia entre fatores históricos e diferenças no desempenho entre morfotipos florais são determinantes para a estruturação dos morfotipos em populações naturais (Barrett & Forno 1982, Barrett *et al.* 1983, Morgan & Barrett 1988, Husband & Barrett 1992b, Manicacci & Barrett 1996).

Neste capítulo investiguei a variação da frequência de morfotipos florais na espécie tristílica *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth no Pantanal, uma região de formação geológica recente com pulso de inundação unimodal como principal força estruturadora da paisagem. Essa espécie de macrófita aquática foi escolhida por: (i) ser muito abundante na região; (ii) ser possível estimar a frequência dos morfotipos florais em populações naturais com relativa acuidade; (iii) florescer o ano inteiro em diferentes regiões do Pantanal permitindo estimativas confiáveis das frequências florais. É esperado que a alta capacidade de colonização de novas manchas via sementes (reprodução sexuada) ou estolões (reprodução assexuada), aliados às fortes variações sazonais impostas pelo pulso de inundação e história geológica recente do Pantanal, podem determinar a frequência de morfotipos florais por meio de eventos estocásticos.

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo responder:

(i) Existem evidências de desvios da proporção esperada ao acaso para os três morfotipos florais? Espero encontrar populações com proporções variadas entre morfotipos florais devido às variações extremas da paisagem em decorrência da inundação. (ii) Existe algum morfotipo mais raro? Devido à estocasticidade promovida pelo pulso de inundação, não é esperado a menor frequência de determinado morfotipo floral (iii) O tamanho populacional e regiões com diferentes intensidades de inundação determinam a equabilidade dos morfotipos florais? Espera-se que populações menores e regiões com maiores variações no nível de inundação terão menor equivalência na proporção de morfotipos florais (iv) A distância geográfica entre populações explica a equabilidade de morfotipos florais em populações no Pantanal? Espera-se que populações mais distantes e isoladas tenham maior discrepância na proporção de morfotipos florais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de estudo

O Pantanal, localizado no centro da América do Sul (15 – 20° sul), é caracterizado pela depressão geológica Rio Paraguai; é circundado pelos planaltos de Maracaju-Campo Grande e Taquari-Itiquira a leste, Guimarães e Parecis a norte, Urucum-Amolar a oeste e Bodoquena a sul (Assine 2003). Representa a maior planície alagável da Terra com cerca de 135.000 km² constituído de área inundável (Assine 2003, Silva & Abdon 1998) e 160.000 km² ao todo (Junk & Nunes da Cunha 2005), com altitude entre 80 e 190 m.

A origem das terras úmidas e sistema lacustre do Pantanal ocorreram na transição entre o Pleistoceno e Holoceno, onde o Pantanal passou por diversas mudanças climáticas: 40.000 – 8000 anos atrás frio e seco, 8000 – 3500 anos atrás quente e úmido, 3500 – 1500 anos atrás quente e seco, e 1500 – Presente quente e úmido (Ab'Saber 1988; Iriondo & Garcia 1993; Stevaux, 2000). A alternância entre períodos secos e úmidos levou a diferentes padrões de deposição de sedimento no Rio Paraguai e seus tributários, resultando em um mosaico de distintas formações geomorfológicas atualmente cobertas por vários tipos vegetacionais (Short & Blair, 1986; Jimenez-Rueda *et al.*, 1998). A formação do Pantanal foi marcada por altas taxas de extinção de organismos aquáticos decorrentes dos extremos períodos secos, havendo vários eventos de re-colonização destes organismos provindos da região baixa do Rio Paraguai, Cerrado ao entorno, bacia Amazônica e Chaco (Junk & Nunes da Cunha 2005). É provável que o pequeno intervalo de tempo desde o último período de extrema seca tenha sido insuficiente para o desenvolvimento de espécies endêmicas. Além do mais, é possível presumir que o papel da inundação na imigração e transporte passivo dos organismos tenha limitado processos de especiação por segregação espacial de populações.

A maior força estruturadora da paisagem pantaneira é, atualmente, o pulso de inundação anual, geralmente unimodal, que apresenta considerável variação espacial e temporal na planície alagável (Hamilton *et al.* 1996, Silva & Abdon 1998, Junk & Da Silva 1999, Junk 2000, Hamilton 2002, Gonçalves *et al.* 2011). A água pluvial é retida na planície durante os períodos chuvosos causando o alagamento de extensas áreas, e escoar vagarosamente no sentido leste-oeste em direção ao rio Paraguai através de riachos permanentes e

temporários, regionalmente conhecidos como *corixos* e *vazantes*, respectivamente. Por outro lado, o rio Paraguai, o qual também recebe água de diversos rios tributários em seu curso, escoar a água no sentido norte-sul. A flutuação sazonal dos níveis da água é de 2 a 5 m no rio Paraguai, entretanto, as demais regiões do Pantanal geralmente apresentam valores menores. Estima-se que 90% das águas que passam pelo Pantanal retornam à atmosfera, contribuindo significativamente para o equilíbrio regional das águas e temperatura (Ponce 1995, Hamilton *et al.* 1996, Hamilton 2002).

O clima da região é Tropical (Aw de Köppen) com estações secas e úmidas bem definidas (maio-outubro e novembro-abril, respectivamente). A precipitação anual varia de 1.000-1.500 mm, com maior parte das chuvas ocorrendo entre novembro e março. Devido à baixa elevação e localização no continente, a região está sujeita à penetração de massas de ar polares durante o inverno, podendo reduzir drasticamente as temperaturas e causar pequenas geadas (Hamilton *et al.* 1996, Hamilton 2002).

O Pantanal apresenta grande variedade de sub-regiões com distintas características geomorfológicas, hidrológicas e ecológicas. O número de sub-regiões e os critérios para sua classificação são diferentes entre autores, que levam em consideração percepções tradicionais, limites políticos, características geomorfológicas e hidrológicas (EDIBAP 1979, Adámoli 1982, RADAMBRASIL 1982). Neste trabalho seguirei a nomenclatura proposta por Hamilton *et al.* (1996), que divide o Pantanal em 10 sub-regiões. As sub-regiões são classificadas de acordo com os maiores rios que fluem através delas, e o limite determinado por esses, refletem diferenças hidrológicas e geomorfológicas entre sub-regiões (Figura 1.1), o que é de particular

importância para este estudo. Além do mais, também será usada a classificação proposta por Gonçalves *et al.* (2011) para as diferentes durações e magnitudes do pulso de inundação no Pantanal.

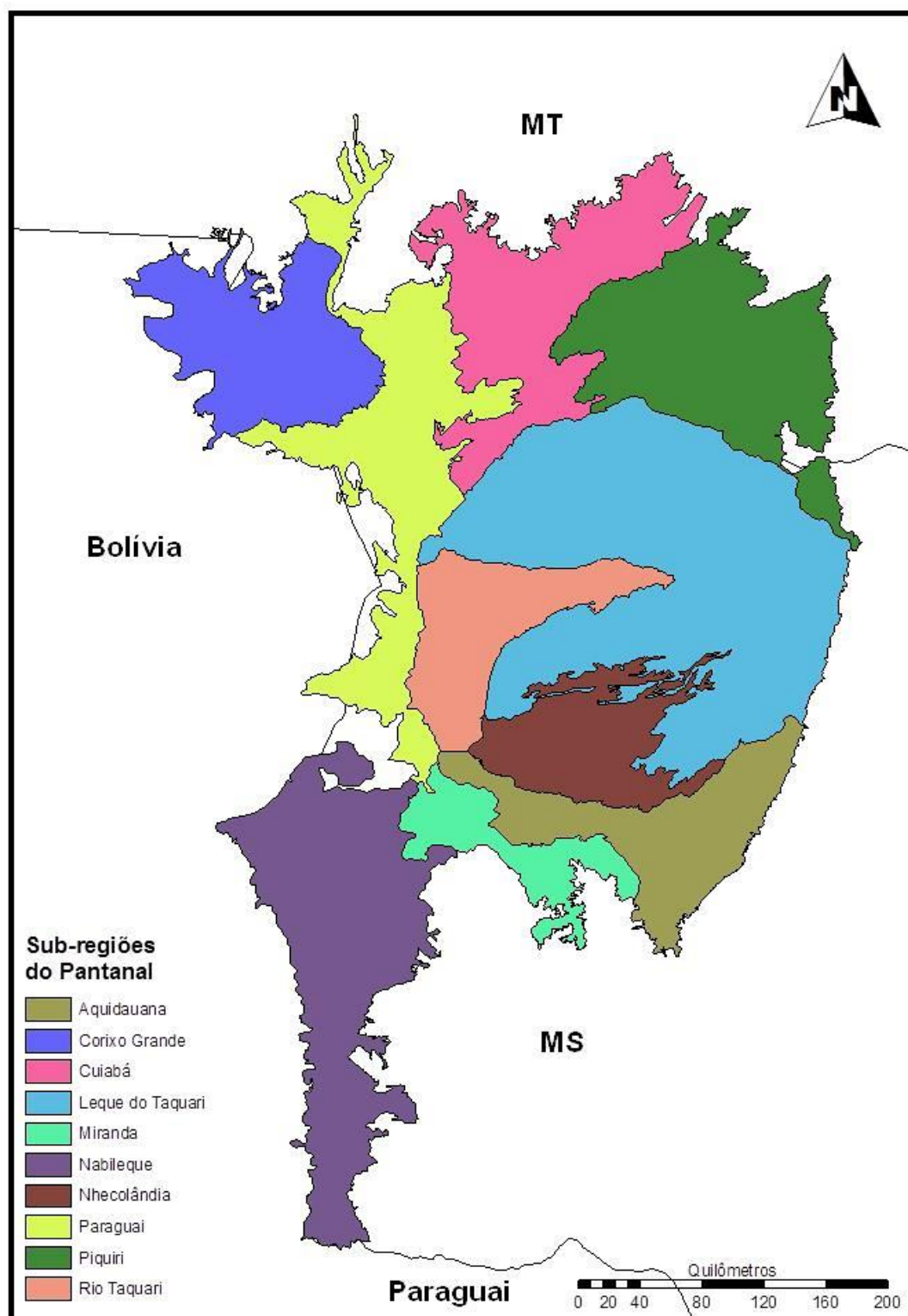


Figura 1.1. Sub-regiões do Pantanal brasileiro de acordo com Hamilton *et al.* (1996). Siglas MS e MT correspondem aos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, o qual Pantanal faz parte.

Descrição da espécie

Eichhornia azurea é macrófita aquática perene, rizomatosa, flutuante fixa no substrato. Entretanto, é comum a dispersão de clones em bancos flutuantes ao longo dos rios do Pantanal (Pott & Pott 2000). Pode ser encontrada em ambientes aquáticos das bacias hidrográficas da Amazônia, Paraguai e Paraná (Barrett 1978; Bianchi *et al.* 2000; Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009, Cunha *et al.* 2012). As flores variam de azul a roxa com seis pétalas de bordo fimbriado e guia de néctar (Figura 1.2). Cada flor possui três estames longos e três curtos conectados à parte interna do tubo floral e a altura do estigma variando conforme o comprimento do estilete, o que caracteriza o morfotipo floral (Figura 1.2). O número de flores por inflorescência (30-120) pode variar com as características físico-químicas da água e nutrientes (Bueno 2003, Cunha N.L. observação pessoal). Ao final da floração, a inflorescência prostra na água para o desenvolvimento dos frutos (Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). No Pantanal, *E. azurea* pode apresentar flores ao longo do ano inteiro em corpos de água permanente, enquanto em lagoas efêmeras a floração ocorre a partir da metade do período das chuvas (fevereiro) (Cunha N.L. observação pessoal). Os frutos são cápsulas que podem conter mais de 100 sementes (~1-2 mm de comprimento). As flores são visitadas por diversa gama de moscas, borboletas e abelhas, no entanto os cruzamentos legítimos são realizados por abelhas solitárias de probóscide longa, (Barrett 1978, Alves dos Santos & Wittmann 2000, Alves dos Santos 2002). A espécie apresenta pronunciada reprodução clonal, e os níveis de incompatibilidade heteromórfica variam de compatível (quebra da tristilia,

Barrett 1978, Alves dos Santos 2002), a moderada (Cunha & Fischer 2009) e forte (Bianchi *et al.* 2000).

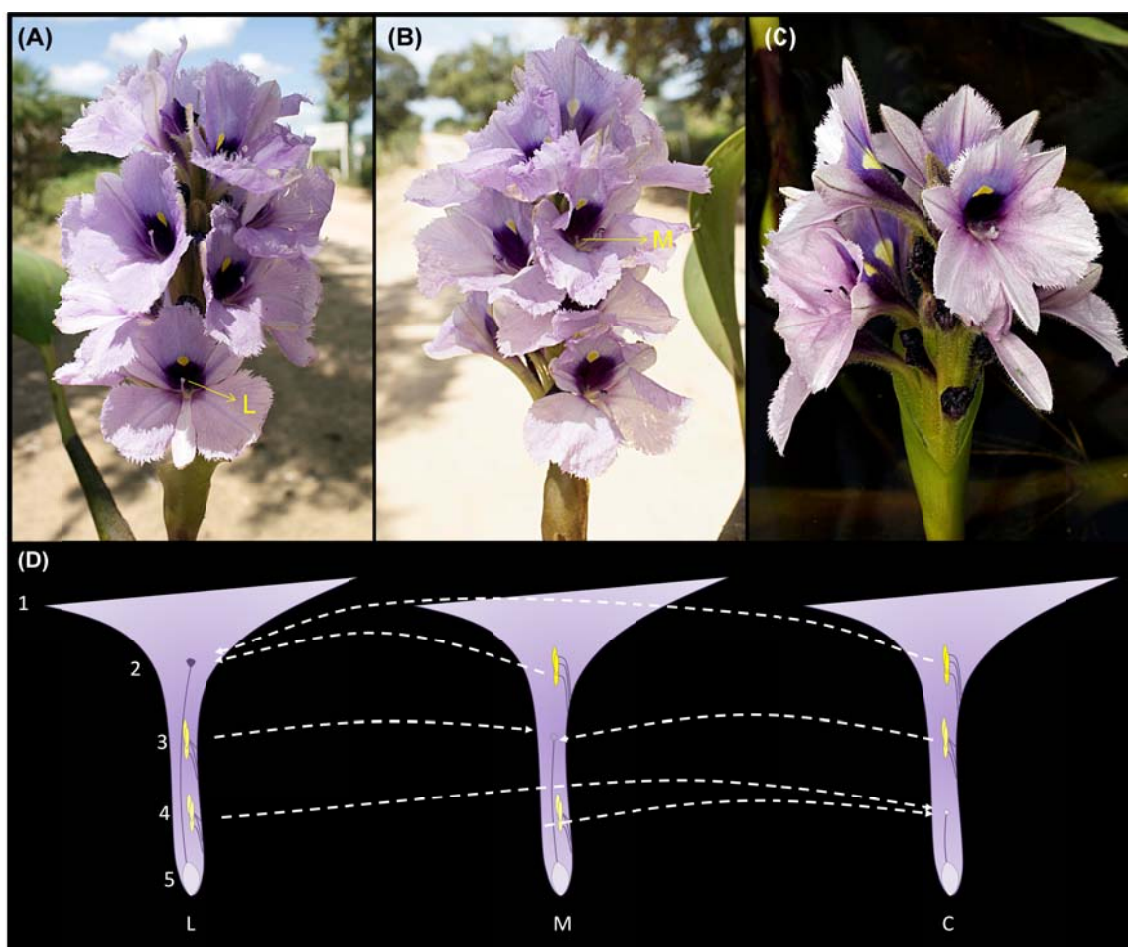


Figura 1.2. Inflorescência do morfotipo longo (A), médio (B) e curto (C) de *Eichhornia azurea*, Pantanal. As setas indicam os estiletes longo (L) e médio (M), o estilete curto não é visível por estar no fundo do tubo floral (Fotos:N.L. Cunha). (D) representação esquemática da heterostilia em *Eichhornia azurea*. (1) perianto, (2) estigma e estilete, (3) primeiro conjunto de três anteras, (4) segundo conjunto de três anteras, (5) ovário. As estruturas descritas para o morfotipo longo, ocorrem em todos os morfotipos, porém em alturas diferentes. As setas apontam a transferência de pólen em polinizações legítimas (hercogamia recíproca), outras combinações entre pólen e estigma resultam em poucas ou nenhuma semente.

Amostragem

Populações de *Eichhornia azurea* foram amostradas no período de 2004 a 2012. Algumas populações foram adicionadas a partir de dados disponíveis em monografias, dissertações de mestrado e artigos científicos (Souza, 2006, Bueno 2003, Cunha & Fischer 2009) (Tabela 1.1). Foram amostradas lagoas permanentes, temporárias, lagoas formadas ao longo de estradas devido à escavação e uso da terra para construção da estrada (aterro), “corixos”, “vazantes”, e canais que conectam grandes lagos aos rios (Figura 1.3). A distância entre populações variou de 1 a 670 km (Figura 1.4). As populações foram classificadas quanto ao número de rametos com inflorescências, por meio de estimativa visual, em sete categorias: 1-25; 26-50; 51-100; 101-200; 201-500; 501-1000 e >1000. Morfotipos florais foram identificados em campo. Em populações com até 200 ou menos rametos em floração, os morfotipos florais de todas as inflorescências foram verificados. Em populações maiores, amostramos em intervalos de 1.5 - 2 m ao longo de transectos distanciados cerca de 2-3 m entre si. Populações flutuantes nos grandes lagos da porção oeste do Pantanal, usei barco para amostragem dos rametos em floração. Devido o crescimento clonal, a individualização de genets não pode ser determinada, e as estimativas dos morfotipos florais aqui descritas representam estimativas fenotípicas.

As populações também foram classificadas de acordo com a intensidade da inundação. Foram criadas quatro grandes categorias baseadas em conhecimento prévio da região e informações disponíveis na literatura em relação à magnitude e duração da inundação em cada região (Gonçalves *et al.* 2011): inundação baixa de curta duração (baixa e curta), inundação média e de

média duração (média e média), inundação média e de longa duração (média e longa), e inundação alta de longa duração (alta e longa).

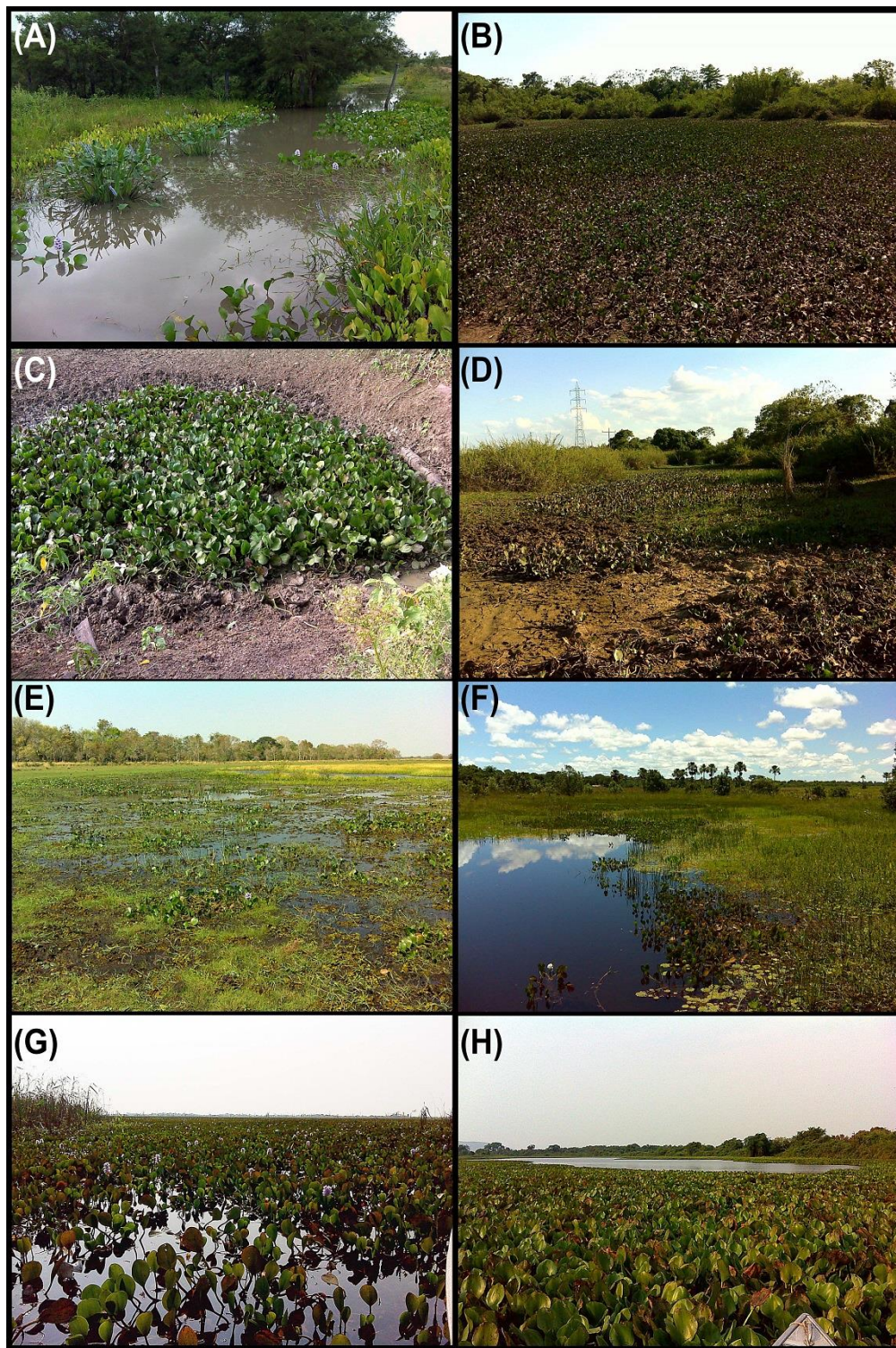


Figura 1.3. Tipos de corpos d'água (populações) e paisagem encontradas ao longo das sete sub-regiões do Pantanal amostradas. (A) pastagens alagáveis no Nabileque (inundação baixa e curta), (B - D) “caixas de empréstimo”, lagoas temporárias e permanentes em Miranda e Aquidauana (inundação média e longa), (E), “baía” na Nhecolândia (inundação média e média), (F) “vazante” e pastagens alagadas na porção NE da sub-região de Aquidauana e Leque do Taquari (inundação baixa e curta), (G) delta do Rio Taquari, e (H) grandes lagos do Paraguai (inundação alta e longa).

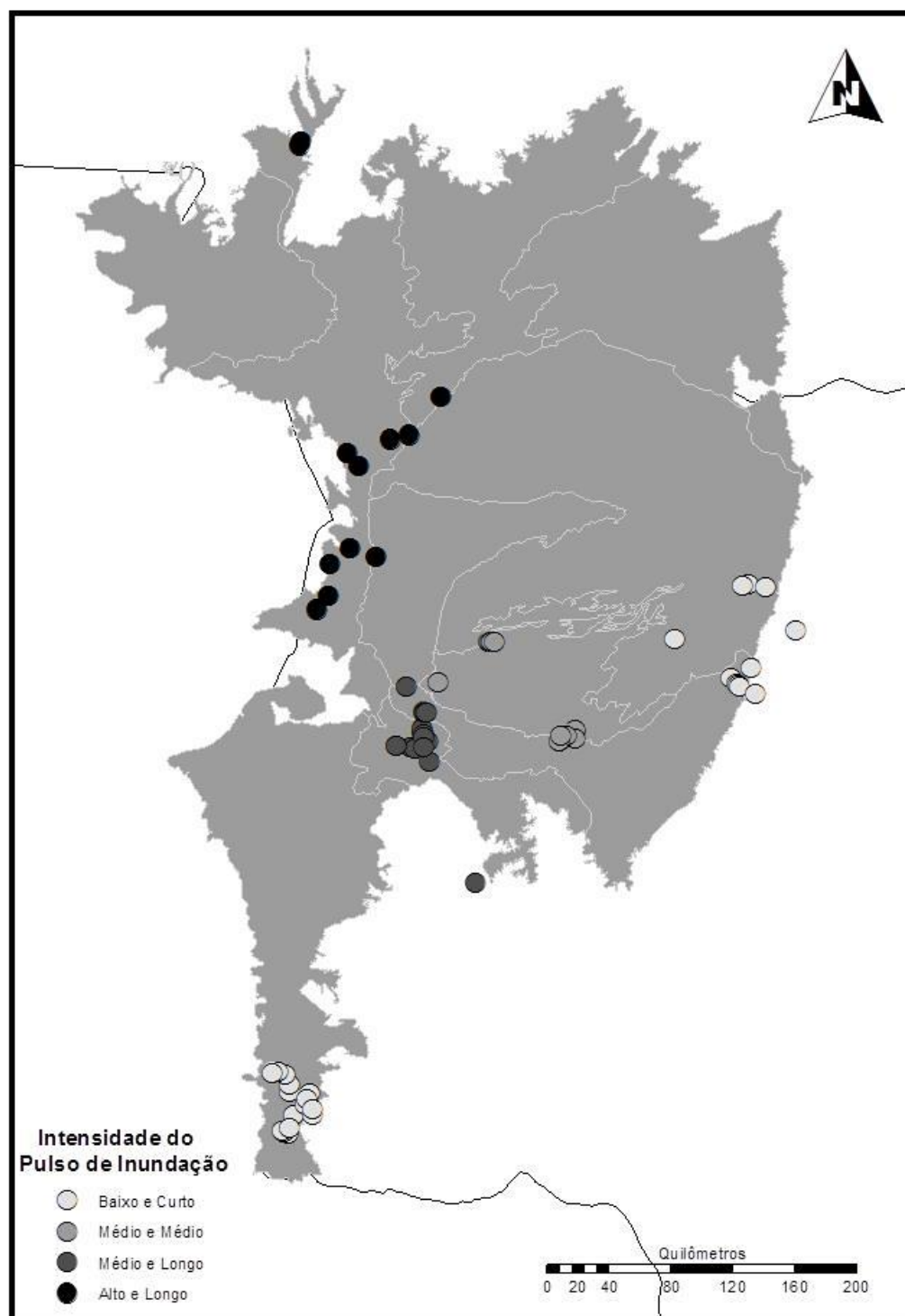


Figura 1.4. Distribuição das 73 populações de *Eichhornia azurea* amostradas de 2004 a 2012 no Pantanal entre as diferentes intensidades de inundação.

Análises

Proporção dos morfotipos e esforço amostral

Foram calculadas frequências médias de cada morfotipo para todo o Pantanal (média da proporção de cada morfo encontrada entre as 73 populações), bem como a frequência total (frequência por morfotipo floral obtida pela soma de todos os indivíduos amostrados nas 73 populações). Os valores de frequência dos morfotipos florais foram comparados com modelos gerais lineares mistos (GLMM) com erros binomiais, ponderados pelo número absoluto de flores amostradas por morfo em cada população, e tendo populações e pulso de inundação como efeito aleatório. A frequência em cada população e total foi analisada com teste G para qualidade de ajuste com proporções esperadas iguais entre morfotipos florais (Sokal & Rohlf 2011).

Utilizei diagramas De Finetti para a representação gráfica da variação das proporções de cada morfotipo floral das populações de *E. azurea*. Neste tipo de gráfico, cada lado do triângulo representa um morfotipo floral e o ponto central equidistante a todos os lados corresponde ao perfeito equilíbrio isoplético. A distância de um ponto (população) em relação a um dos lados do triângulo é proporcional à quantidade daquele morfo na população. Populações sobre um dos lados do triângulo correspondem a populações dimórficas que não possuem o morfo do lado onde estão representados, e pontos sobre um vértice representam populações monomórficas do morfotipo representado na face oposta.

A variação na proporção dos morfotipos florais por população foi calculada por meio do índice de equabilidade (E) proposto por Barrett *et al.* (1989), como segue:

$$E = \frac{1 - (f(L)^2 + f(M)^2 + f(C)^2)}{0.6667}$$

Onde $f(X)$ = frequência do morfo- X (L = longo; M = médio, C = curto)

O índice varia de 0 (populações monomórficas) a 1 (completa equidade). Como a equidade entre morfotipos florais é um parâmetro sujeito a desvios relacionados ao esforço amostral, utilizei correlação (Pearson) entre o índice E e o esforço amostral proporcional ao tamanho da população, obtido pela divisão do tamanho máximo populacional (e.g. se a população foi classificada no intervalo de 26-50 indivíduos, usa-se o valor 50) pelo número de flores amostradas para verificar se populações melhores amostradas também seriam mais equivalentes (Tabela 1.1). Para testar hipótese de que populações isopléticas foram proporcionalmente mais bem amostradas, foi utilizado teste-t comparando o esforço amostral proporcional entre as populações isopléticas com as anisopléticas (determinadas a partir do teste de qui-quadrado).

Equidade x tamanho populacional

A relação entre equidade entre os morfotipos florais (E) com o tamanho populacional foi testada por meio de Modelos Generalizados Aditivos para Localização de Escala e Forma (“GAMLSS - Generalized Additive Models for Location Scale and Shape”) utilizando distribuição beta-inflacionada (Rigby &

Stasinopoulos 2005). Nestes modelos utilizei as diferentes categorias de inundação como covariável e efeito aleatório no modelo. Os valores de E obtidos para cada população foram usados como variável dependente em modelo de regressão beta inflacionada com 0s (zeros). Modelos de regressão beta são robustos para modelagem de dados com limites de amplitude, pois apresentam diversos formatos de distribuição de densidade que variam com os parâmetros da distribuição, permitindo a visualização de relações que seriam obscuras em modelos lineares (Rigby & Stasinopoulos 2005, Ospina & Ferrari 2012). No entanto, dados de proporção, taxas e índices incluem valores de 0s e 1s que não podem ser simplesmente descartados. Neste caso a distribuição beta não permite inferências probabilísticas, e inclusão de modelos com 0 e 1 inflacionados aparentam ser ideais para situações que a variável de interesse é contínua e restrita aos intervalos de $[0,1)$, $(0,1]$ ou $[0,1]$ e está relacionada a outras variáveis em uma estrutura de regressão (Ferrari & Cribari-Neto 2004). Os 0s gerados pelos valores de índices podem ser ocasionados pela ausência de algum morfotipo floral na população (0 verdadeiro) ou pelo fato de não ter sido encontrado o morfo durante as amostragens, seja por não ocorrer durante o período amostrado ou por não detecção (0 falso) (Martin *et al.* 2005).

Foi criado um vetor numérico para cada categoria de tamanho populacional a partir do maior número encontrado em cada intervalo de tamanho (*'dummy variable'*), esse procedimento foi adotado visando ganhar graus de liberdade para as análises (e.g.: 1-25 = 25, 26-50 = 50, ..., 501-1000 = 1000, as populações classificadas como maiores que 1000 receberam o valor arbitrário de 10.000).

Testes de Mantel foram utilizados para avaliar se existe relação espacial entre a equidade (E) dos morfotipos florais e tamanho populacional. Para a realização desta análise foi calculada a distância euclidiana do índice E , tamanho populacional (logaritmo natural do vetor numérico criado para tamanho populacional) e distância geográfica entre todos os pares de populações. A correlação de Pearson entre esses vetores foi calculada por meio de 2000 permutações.

As análises e gráficos foram realizados com programa “R: A Language and Environment for Statistical Computing” (R Core Team 2012), com auxílio de pacotes específicos. A análise de regressão beta inflacionada foi realizada com auxílio do pacote “gamlss” (Rigby & Stasinopoulos 2005), e o teste de Mantel com o pacote “vegan” (Oksanen *et al.* 2012). Os gráficos ternários e os boxplots foram gerados nos pacotes “vcd” (Meyer *et al.* 2012) e “ggplot2” (Wickham 2009), respectivamente.

RESULTADOS

Ao todo foram verificadas 10.008 inflorescências em 73 populações de *Eichhornia azurea* no Pantanal. As populações variaram de 1 a 1000 indivíduos amostrados, com média e mediana de 137,1 e 66,0 respectivamente. Populações com mais de 1000 plantas foram mais comuns ($n = 18$), que populações com 101-200 ($n = 14$) plantas; 51-100 e 201-500 tiveram 12 populações cada, as demais categorias tiveram menos que 10 populações amostradas (1-25 = 8; 26-50 = 6; 501-1000 = 3). Cerca de 80 % das populações foram trimórficas ($n = 57$), ao passo que somente 10 % das

populações foram dimórficas ou monomórficas ($n = 8$ cada) (Figura 1.5). Vinte e sete populações encontravam-se em área de baixa magnitude e curta duração da cheia, 16 em regiões com média magnitude e média duração, 18 de média e longa e 12 de alta e longa (Tabela 1.1).

Em média, a frequência do morfotipo floral longo foi $0,35 (\pm 0,21)$, do médio foi $0,32 (\pm 0,23)$ e do curto, $0,37 (\pm 0,24)$ (medianas 0,365; 0,259; 0,363; respectivamente). O morfotipo curto foi mais frequente que o médio (ANOVA, $gl = 2$, $F = 4,411$, $p = 0,013$; Tukey post-hoc, $M \times C$, $p = 0,048$), e todas as demais combinações não diferiram (Tukey post-hoc, $L \times C$, $p = 0,614$; $L \times M$, $p = 0,325$). Quando analisada a proporção dos morfotipos florais individualmente nas 73 populações amostradas, 49 apresentaram desvio do equilíbrio esperado para proporções iguais, e 24 populações foram isopléticas (Tabela 1.1, Figura 1.5, Figura 1.6). Quando analisados em conjunto os dados de todas as 73 populações, o que pode ser extrapolado como um valor global para todo o Pantanal, há desvios da frequência esperada ao acaso ($G_{total} = 1971,82$, $p < 0,0001$) (Tabela 1.1), sendo o morfotipo curto mais frequente e o médio menos representado.

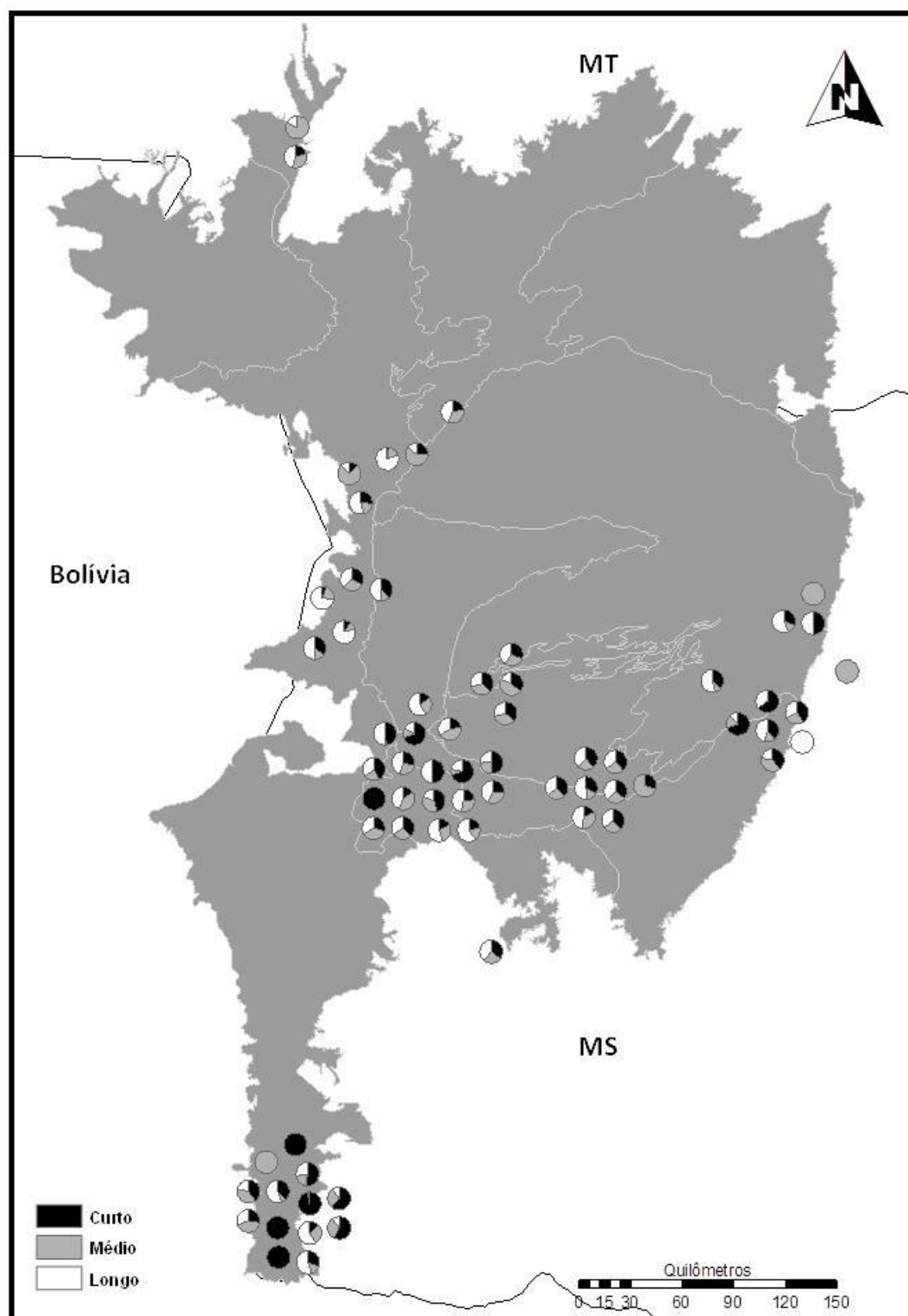


Figura 1.5. Proporção entre morfotipos florais encontrada em 73 populações de *Eichhornia azurea* amostradas entre 2004 e 2012 no Pantanal; gráficos foram deslocados para evitar sobreposição. Siglas MS e MT correspondem aos estados brasileiros de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, o qual Pantanal faz parte.

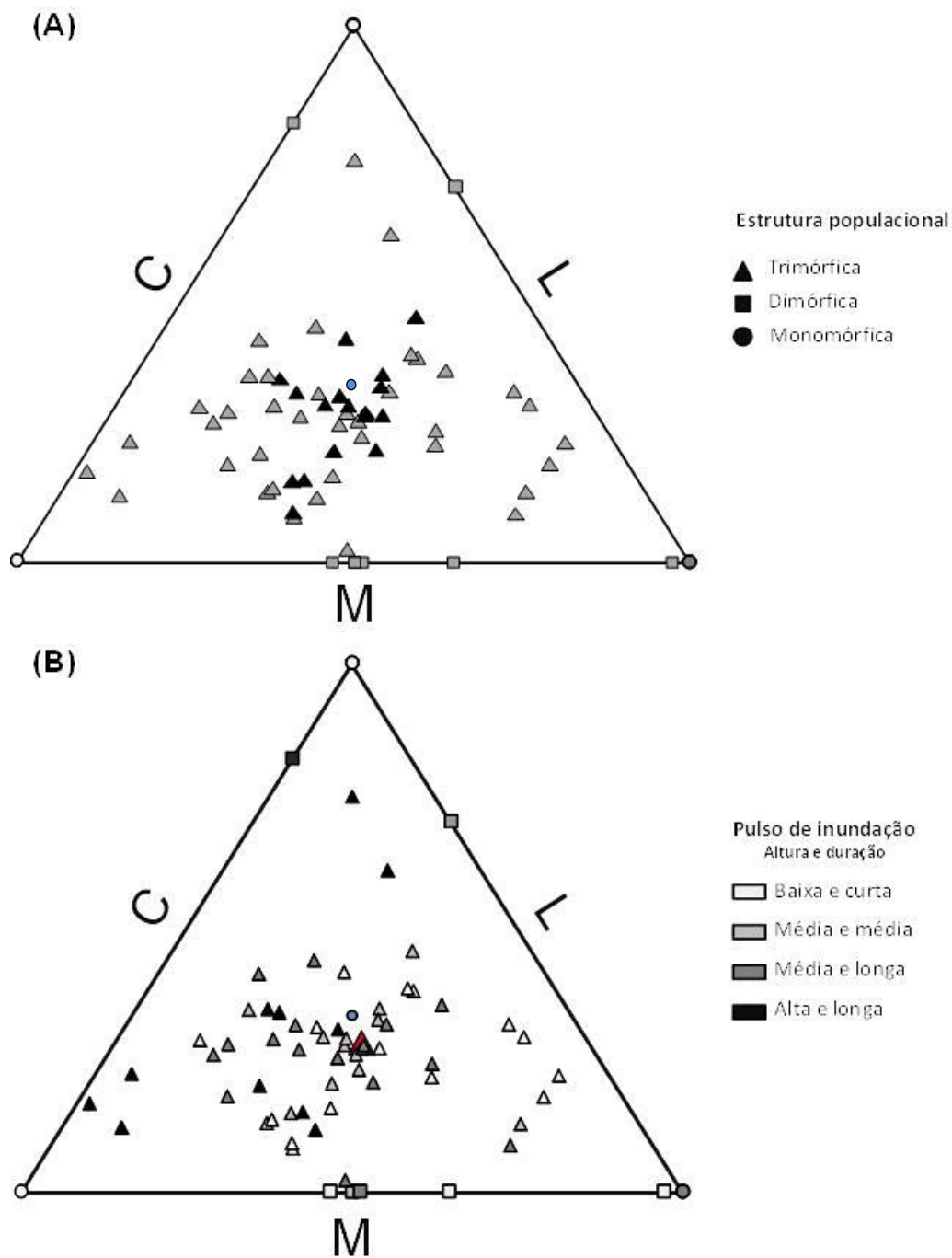


Figura 1.6. Frequência de morfotipos florais em 73 populações de *E. azurea* amostradas no Pantanal. O ponto azul central corresponde ao equilíbrio isoplético, e o triângulo vermelho à todas as populações amostradas no Pantanal. (A) populações com cor preta correspondem a populações isopléticas (com proporções equivalentes entre morfotipos florais) e as em cor cinza às populações anisopléticas (proporções desiguais entre morfotipos florais), (B) o gradiente de cores representa as diferentes magnitudes de altura e duração do pulso de inundação. Em ambos os gráficos há sobreposição nas populações monomórficas, onde no vértice superior (lados C e L) há três populações na categoria de inundação média e longa, enquanto no vértice direito (lados M e L) três populações na categoria baixa e curta e uma população na média e longa.

Dentre as populações monomórficas, o morfotipo curto foi encontrado em quatro populações, enquanto o médio e longo em apenas três e uma populações, respectivamente (Tabela 1.1). Por outro lado, das oito populações dimórficas reportadas, seis apresentaram somente o morfotipo curto e longo, e no geral com proporções equivalentes (Tabela 1.1). Dentre as populações trimórficas anisopléticas, a proporção média dos morfotipos longo, médio e curto, foram respectivamente, 0,34, 0,27 e 0,39. Por outro lado, nas populações dimórficas que apresentaram somente os morfotipos curto e longo, a frequência média foi de 0,60 e 0,40, respectivamente. Os desvios encontrados no geral foram, portanto, causados pela maior proporção de morfotipos curtos e longos em relação ao médio (Figura 1.6). Dezenove populações apresentaram ao menos um morfotipo raro (frequência menor ou igual a 15%), dentre essas o morfotipo C foi mais raramente encontrado nessa condição (~15,8%, $n = 3$), seguido pelo morfotipo L (31,6 %, $n = 6$), e morfotipo M o qual apresentou mais da metade dos casos (57,9 %, $n = 11$). (Tabela 1).

Das 73 populações amostradas, 17 apresentaram ao menos uma inflorescência com flores com variações fenotípicas favorecendo a endogamia, condição conhecida como semi-homostilia. A maioria dessas populações encontra-se na região do Pantanal de Miranda, Aquidauana e sul da Nhecolândia, regiões que apresentam inundação de média magnitude e de média a longa duração. Somente em três populações (EAZU 24, 46, 47AB, Tabela 1.1) o número de semi-homostílicos ficou entre 15 e 20 %, em todas as demais ocorrências esta proporção não ultrapassou 5 %. Esses resultados aparentam não ter relação com a equidade dos morfotipos florais em cada

população e devido à baixa frequência de ocorrência, inferências mais robustas são limitadas.

O índice E apresentou valor médio de 0,76 e mediana de 0,887 (amplitude de 0 a 0,997), com coeficiente de variação de 0,41. Não houve correlação do esforço amostral proporcional aplicado com a equabilidade E dos morfotipos florais (correlação de Pearson, $r = -0,15$, $p = 0,18$), assim como não houve diferença no esforço amostral proporcional entre populações isopléticas e anisopléticas ($t = -0,77$, $gl = 27,09$, $p = 0,44$). Esse resultado permite inferir que as conclusões são dissociadas de artefato relacionado à insuficiência amostral. Por outro lado, houve relação positiva do tamanho populacional com E (GAMLSS – beta inflacionada, Desvio Global = -83,668, AIC = -57,668, estimativa = 0,299, erro padrão = 0,140, valor – $t = 2,1247$, $p = 0,037$), porém, esta relação não co-varia entre os diferentes níveis de inundação (inundação baixa e curta - estimativa = 0,270, erro padrão = 0,567, valor – $t = 0,476$, $p = 0,635$, média e média - estimativa = 1,364, erro padrão = 0,741, valor – $t = 1,840$, $p = 0,070$, média e longa - estimativa = 1,179, erro padrão = 0,678, valor – $t = 1,739$, $p = 0,087$, alta e longa - estimativa = -0,757, erro padrão = 1,018, valor – $t = -0,7437$, $p = 0,459$) (Figura 1.7).

Existe relação positiva da equidade entre morfotipos florais com a distância geográfica (Mantel, $r = 0,176$, $p = 0,0063$). Populações mais próximas tendem a ter proporções entre morfos menos equivalentes, e à medida que aumenta a distância geográfica entre populações as proporções entre morfotipos florais ficam mais equivalentes. Também houve relação espacial com o tamanho das populações (Mantel, $r = 0,174$, $p = 0,002$), onde

populações amostradas geograficamente mais próximas foram geralmente menores.

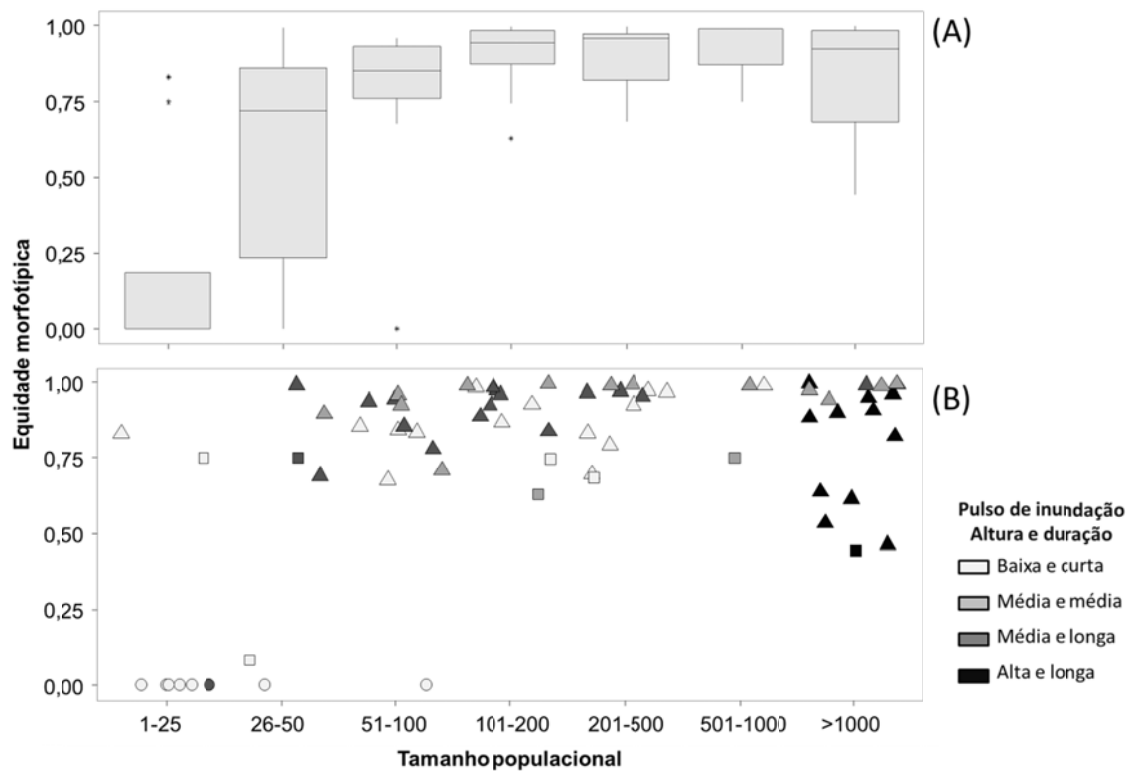


Figura 1.7. Relação da equidade (E) entre morfotipos florais, com o tamanho das populações de *Eichhornia azurea* e intensidade de inundação no Pantanal. (A) representação gráfica por meio de “boxplots” evidenciando a relação positiva entre E e tamanho populacional; (B) gráfico de dispersão das populações amostradas, triângulos correspondem à populações trimórficas, quadrados a populações dimórficas e círculos a populações monomórficas.

Tabela 1.1. Frequência e estrutura de morfotipos florais em populações de agua-pé *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) no Pantanal entre as diferentes intensidades de inundação. Número de inflorescências amostradas (N), tamanho populacional, esforço proporcional e valores de χ^2 e p para cada população amostrada (ver detalhes nos métodos). As populações isopléticas estão destacadas em negrito.

Intensidade de inundação	Região do Pantanal	% Morfotipo floral			Morfotipo raro ($\leq 15\%$)	N	Tamanho Populacional	Esforço proporcional	χ^2	p	isopleτία
		Longo	Médio	Curto							
Estrutura	População										
Baixa e curta											
<i>monomórfica</i>											
EAZU66A	Nabileque	-	-	1,000		2	01-25	0,08	-	-	anisopleτία
EAZU66B	Nabileque	-	-	1,000		1	01-25	0,04	-	-	anisopleτία
EAZU54	Aquidauana	1,000	-	-		1	01-25	0,04	-	-	anisopleτία
EAZU58	Leque do Taquari	-	1,000	-		19	01-25	0,76	-	-	anisopleτία
EAZU60	Leque do Taquari	-	1,000	-		34	51-100	0,34	-	-	anisopleτία
<i>dimórfica</i>											
EAZU67	Nabileque	0,533	-	0,467		135	101-200	0,675	-	-	anisopleτία
EAZU52	Aquidauana	0,353	-	0,647		17	201-500	0,034	-	-	anisopleτία
EAZU77	Nhecolândia	0,029	-	0,971	L	35	26-50	0,7	-	-	anisopleτία
EAZU62	Leque do Taquari	0,500	-	0,500		2	01-25	0,08	-	-	anisopleτία
<i>trimórfica</i>											
EAZU64	Nabileque	0,105	0,316	0,579	L	19	01-25	0,76	6.42	0.03848	* anisopleτία
EAZU71	Nabileque	-	-	1,000		2	01-25	0,08	-	-	anisopleτία
EAZU72	Nabileque	-	1,000	-		36	26-50	0,72	-	-	anisopleτία
EAZU66C	Nabileque	0,081	0,226	0,694	L	62	051-100	0,62	38.16	0.00050	*** anisopleτία
EAZU65	Nabileque	0,553	0,136	0,311	M	103	101-200	0,515	27.17	0.00050	*** anisopleτία

EAZU68	Nabileque	0,305	0,415	0,280		82	101-200	0,41	2.51	0.26990		isopleitia
EAZU69	Nabileque	0,218	0,379	0,403		248	201-500	0,496	15.13	0.00100	**	anisopleitia
EAZU73	Nabileque	0,094	0,292	0,614	L	233	201-500	0,466	96.06	0.00050	***	anisopleitia
EAZU74	Nabileque	0,272	0,216	0,512		250	201-500	0,5	37.09	0.00050	***	anisopleitia
EAZU75	Nabileque	0,549	0,081	0,369	M	295	201-500	0,59	98.57	0.00050	***	anisopleitia
EAZU70	Nabileque	0,398	0,311	0,292		367	501-1000	0,367	7.07	0.02699	*	anisopleitia
EAZU76	Nabileque	0,587	0,286	0,127	S	63	51-100	0,63	20.67	0.00050	***	anisopleitia
EAZU51	Aquidauana	0,454	0,157	0,389	M [†]	108	101-200	0,54	15.72	0.00050	***	anisopleitia
EAZU57	Aquidauana	0,323	0,271	0,406		133	101-200	0,665	3.71	0.15840		isopleitia
EAZU50	Aquidauana	0,121	0,179	0,700	L	140	201-500	0,28	85.39	0.00050	***	anisopleitia
EAZU53	Aquidauana	0,224	0,384	0,392		125	201-500	0,25	6.74	0.03648	*	anisopleitia
EAZU59	Leque do Taquari	0,565	0,129	0,306	M	62	051-100	0,62	17.84	0.00050	***	anisopleitia
EAZU48	Leque do Taquari	0,545	0,091	0,364		11	051-100	0,11	3.45	0.20340		isopleitia
Média e Média												
<i>dimórfica</i>												
EAZU07	Nhecolândia	-	0,700	0,300		10	101-200	0,05	-	-		anisopleitia
EAZU05	Nhecolândia	0,500	-	0,500		50	501-1000	0,05	-	-		anisopleitia
<i>trimórfica</i>												
FRN4	Nhecolândia	0,519	0,148	0,333	M	27	26-50	0,54	5.56	0.06697		isopleitia
EAZU08	Nhecolândia	0,351	0,270	0,378		37	101-200	0,185	0.70	0.72960		isopleitia
NHU4	Nhecolândia	0,299	0,325	0,377		77	101-200	0,385	0.73	0.69320		isopleitia
EAZU32	Nhecolândia	0,339	0,437	0,224		286	201-500	0,572	19.56	0.00050	***	anisopleitia
FNR2	Nhecolândia	0,349	0,271	0,380		129	201-500	0,258	2.42	0.29590		isopleitia
NHU1	Nhecolândia	0,286	0,346	0,368		133	201-500	0,266	1.46	0.47280		isopleitia
NHU2	Nhecolândia	0,398	0,292	0,310		274	501-1000	0,274	5.26	0.07996		isopleitia
EAZU15	Nhecolândia	0,375	0,230	0,395		387	>1000	0,387	18.85	0.00050	***	anisopleitia

EAZU19	Nhecolândia	0,373	0,276	0,350	648	>1000	0,648	10.03	0.00400	**	anisopletia
FRN1	Nhecolândia	0,365	0,259	0,376	1000	>1000	1	25.05	0.00050	***	anisopletia
NHU3	Nhecolândia	0,364	0,289	0,346	280	>1000	0,28	2.58	0.28190		isopletia
NHU5	Nhecolândia	0,182	0,455	0,364	22	>1000	0,022	2.55	0.27240		isopletia
EAZU17	Nhecolândia	0,429	0,204	0,367	49	51-100	0,49	3.96	0.13840		isopletia
FRN3	Nhecolândia	0,484	0,344	0,172	64	51-100	0,64	9.41	0.01000	*	anisopletia

Média e Longa*monomórfica*

EAZU41	Miranda	-	-	1,000	1	01-25	0,04	-	-		anisopletia
--------	---------	---	---	-------	---	-------	------	---	---	--	-------------

dimórfica

corpo1	Miranda	0,488	-	0,512	41	26-50	0,82	-	-		anisopletia
--------	---------	-------	---	-------	----	-------	------	---	---	--	-------------

trimórfica

EAZU35	Aquidauana	0,182	0,127	0,691	M	55	51-100	0,55	31.89	0.00050	***	anisopletia
EAZU46	Aquidauana	0,581	0,258	0,161		62	51-100	0,62	17.94	0.00050	***	anisopletia
EAZU47AB	Aquidauana	0,259	0,241	0,500		58	51-100	0,58	7.28	0.02499	*	anisopletia
EAZU47C	Aquidauana	0,500	0,021	0,479	M	48	51-100	0,48	21.13	0.00050	***	anisopletia
EAZU44	Miranda	0,345	0,276	0,379		29	26-50	0,58	0.48	0.80710		isopletia
corpo34	Miranda	0,217	0,087	0,696	M	46	26-50	0,92	28.35	0.00050	***	anisopletia
corpo54	Miranda	0,188	0,353	0,459		85	051-100	0,85	9.48	0.00950	**	anisopletia
Corr_azul	Miranda	0,396	0,253	0,352		182	101-200	0,91	5.85	0.06397		isopletia
EAZU24	Miranda	0,429	0,314	0,257		105	101-200	0,525	4.80	0.08996		isopletia
EAZU25	Miranda	0,365	0,206	0,429		63	101-200	0,315	4.95	0.84960		isopletia
EAZU40	Miranda	0,548	0,278	0,173		248	101-200	1,24	55.70	0.00050	***	anisopletia
EAZU42	Miranda	0,599	0,180	0,222		167	101-200	0,835	53.40	0.00050	***	anisopletia
EAZU45	Miranda	0,435	0,411	0,153	S [†]	124	101-200	0,62	18.21	0.00050	***	anisopletia
EAZU47D	Miranda	0,446	0,268	0,286		343	201-500	0,686	19.77	0.00100	**	anisopletia
Medalha	Miranda	0,475	0,288	0,237		427	201-500	0,854	40.49	0.00050	***	anisopletia

EAZU23	Miranda	0,290	0,316	0,394		792	>1000	0,792	13.85	0.00200	**	anisopleitia
<i>Alta e longa</i>												
<i>dimórfica</i>												
BCS	Paraguai	0,181	0,819	-		155	>1000	0,155	-	-		anisopleitia
<i>trimórfica</i>												
BCI	Paraguai	0,455	0,345	0,200		145	>1000	0,145	14.25	0.00015	****	anisopleitia
EAZU78	Paraguai	0,788	0,121	0,091	M	66	>1000	0,066	61.45	0.00050	****	anisopleitia
EAZU79	Paraguai	0,722	0,222	0,056		18	>1000	0,018	13.00	0.00150	**	anisopleitia
EAZU80	Paraguai	0,368	0,307	0,325		163	>1000	0,163	0.97	0.62870		isopleitia
EAZU81	Paraguai	0,540	0,200	0,260		50	>1000	0,05	9.88	0.00800	**	anisopleitia
EAZU82	Paraguai	0,814	0,167	0,020		102	>1000	0,102	109.24	0.00050	***	anisopleitia
EAZU83	Paraguai	0,143	0,607	0,250		28	>1000	0,028	9.93	0.00450	**	anisopleitia
EAZU85	Paraguai	0,127	0,747	0,127	S,L	79	>1000	0,079	60.78	0.00050	***	anisopleitia
EAZU87	Paraguai	0,500	0,150	0,350	M	20	>1000	0,02	3.70	0.17890		isopleitia
EAZU86	Rio Taquari	0,497	0,116	0,386	M	189	>1000	0,189	43.52	0.00050	***	anisopleitia
EAZU84	Cuiabá	0,441	0,339	0,220		59	>1000	0,059	4.31	0.12490		isopleitia
Total		0.353	0.270	0.377	19	10008			1971,82	< 0,0001	***	anisopleitia

[†] Morfotipos marginalmente próximos a 15 %

* p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001, **** p < 0.00001

DISCUSSÃO

Eichhornia azurea apresenta enorme heterogeneidade na estrutura de morfotipos florais entre populações. Embora a maior parte das populações amostradas seja trimórfica, em geral elas apresentam desvios da proporção isoplética (1:1:1), e o morfotipo médio significativamente menos representado. Diferenças de *fitness* (ou aptidão) entre morfotipos e fatores históricos aparentam contribuir para este resultado. Estudos sobre a reprodução de *E. azurea* apontam que o morfotipo médio apresenta maior capacidade de formação de sementes via polinizações ilegítimas e auto-polinização que os demais morfotipos (Barrett 1978, Bianchi *et al.* 2000, Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). Por outro lado, medidas de caracteres vegetativos como área foliar, pecíolo e número de flores não são diferentes entre morfotipos florais de *E. azurea*, estando possivelmente relacionadas à diferentes pressões ecológicas entre populações (Bueno 2003).

Diferenças no desempenho de cada morfotipo floral podem levar a desvios do esperado em populações de espécies tristílicas, como já reportado para espécies do gênero *Oxalis*, *Lythrum*, *Pontederia* e *Eichhornia* (Andersson 1994, Manicacci & Barrett 1996, Agren & Ericson 1996, Anderson & Ascher 1995). Entretanto, é provável que essa não seja a única força estruturadora da frequência relativa de morfotipos florais de *Eichhornia azurea* no Pantanal, uma vez que houve grande heterogeneidade entre as populações amostradas. Na ausência de efeito de fatores históricos sobre a formação e manutenção das populações a seleção deve favorecer os morfotipos com melhor desempenho. Assim, em situação de baixa eficiência de polinização cruzada, é esperado aumento relativo da frequência do

morfotipo médio, que apresenta maior flexibilidade para reprodução sob polinizações ilegítimas e auto-polinização (Barrett 1978, Bianchi *et al.* 2000, Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). Além do mais, modelos teóricos predizem que populações que sofrem com endogamia e apresentam flexibilidade reprodutiva, genótipos recessivos se tornem mais frequentes por segregação (Morgan & Barrett 1988), o que proporcionaria maior frequência dos genótipos para morfotipos longo (*ssmm*) e médio (*ssMm*, *ssMM*). Todavia, apesar de haver favorecimento do morfotipo auto-compatível (médio, por exemplo) em situação de estresse, e este potencialmente aumentar sua frequência relativa sob essas condições, os malefícios da endogamia poderão ser percebidos por meio de menor aptidão frente às adversidades encontradas para o desenvolvimento deste morfotipo. Dentre as populações que apresentaram um morfo mais raro (frequência menor ou igual a 15%), o morfotipo médio foi mais raro em cerca de 60% dessas populações, além de, globalmente ser menos representado no Pantanal. A menor frequência pode ser indicativo de contra seleção a este morfotipo floral em decorrência da endogamia (Eckert & Barrett 1995). Estudos comparando o sucesso reprodutivo em polinização aberta e desenvolvimento de plântulas entre morfotipos florais são necessários para confirmar a existência de menor aptidão para este morfotipo floral em *E. azurea*.

No entanto, ainda não está claro quais forças determinam a ocorrência de morfotipos florais semi-homostílicos em baixas frequências em algumas populações do Pantanal. Os dados disponíveis não permitem inferir relações com a desigualdade de morfotipos florais ou espaço. A maioria das populações com essas variantes estão em regiões com inundação de média magnitude e longa

duração (sub-regiões de Miranda e oeste de Aquidauana), locais onde muitas populações são anuais e florescem o ano inteiro. Durante o período seco, é provável que estas populações apresentem aumento na frequência de endogamia por ficarem mais isoladas, aumentando as chances de desenvolvimento e fixação de fenótipos semi-homostílicos. Morfotipos semi-homostílicos para *E. azurea* já foram reportados em Guanacaste, Costa Rica e região da Juréia, São Paulo, Brasil. A ausência de polinizadores oligoléticos e processo de colonização a longa distância são apontados como o principal fator para a fixação desse fenótipo em populações de *E. azurea* (Barrett 1978, Alves dos Santos 2002).

Fatores históricos aparentam ter maior contribuição para o cenário encontrado nas populações de *E. azurea* no Pantanal. É provável que a história geológica recente do Pantanal, aliada à interação do pulso de inundação e hábito de vida de *E. azurea*, que potencialmente promovem grande fluxo gênico entre populações por meio de sementes (sexuada) e estolões (assexuada), determinem a presença majoritária de populações trimórficas com marcantes desvios da isopletia (dispersão de pontos no gráfico triangular). Para o três morfotipos florais ocorrerem em uma população, é necessário que os quatro alelos responsáveis pela expressão dos três morfotipos estejam presentes ('S', 'M', 'm'). Populações iniciadas sob essas condições poderão segregar genótipos para os três morfotipos florais, caso ocorram os vetores necessários para polinização cruzada legítima. O pulso de inundação anual unimodal do Pantanal, com diferentes magnitudes entre anos (Junk & Da Silva 2000, Hamilton 2002), pode promover tanto a deriva genética como a extinção e recolonização de genótipos entre metapopulações. A ação do pulso de inundação em conjunto com a atividade de polinizadores pode

promover o fluxo gênico no Pantanal, possibilitando a ocorrência dos genótipos necessários para a formação de populações tristílicas. As raras populações dimórficas e monomórficas encontradas são provavelmente resultado de deriva genética promovida pelo pulso de inundação. A maior frequência de morfotipos curto e longo em populações dimórficas pode ser por acaso, não havendo nenhuma força seletiva atuando para este resultado. Grandes bancos de *E. azurea* são deslocados com as águas e ventos durante as cheias de forma imprevisível, e muitas vezes se fixam em regiões rasas que secam rapidamente durante a vazão das águas, ocasionando a morte de grande quantidade de plantas, situação bastante comum em lagoas do Pantanal. Modelos teóricos apontam que populações iniciadas com quatro indivíduos que tenham tanto polinização legítima quanto ao acaso, apresentam somente 5,5% de chance de serem estruturadas como dimórficas com os morfotipos longo e curto (Morgan & Barrett 1988), o que sustenta a possibilidade das populações dimórficas no Pantanal serem determinadas ao acaso. Modelos teóricos que incluem história de vida, estratégia de regeneração e padrões de cruzamento revelam que a perda de algum morfotipo floral é fortemente influenciada pela sobrevivência ano a ano, propagação clonal, auto-fertilização e ausência de polinizações (cruzamentos não associativos) (Eckert & Barrett 1992). O padrão de distribuição de frequência dos morfotipos florais de *E. azurea*, apresenta similaridades ao encontrado tanto em *Lythrum salicaria*, espécie auto incompatível que se reproduz por sementes, quanto *Decodon verticillatus*, espécie clonal auto compatível (Eckert & Barrett 1992). *Eichhornia azurea* é auto-incompatível no Pantanal (Cunha & Fischer

2009), porém também apresenta reprodução clonal pronunciada, o que torna aceitável o padrão intermediário de dispersão da frequência dos morfotipos florais.

Por outro lado, o resultado global encontrado para o Pantanal, mostra maior frequência do morfotipo curto. Esse resultado pode estar relacionado com a história recente do Pantanal, cuja formação iniciou a cerca de 10.000 anos atrás, e a paisagem atual das lagoas há 5.000 anos (Assine 2003). O número de gerações necessárias para uma população atingir a isopleia é diretamente relacionado ao número de genótipos fundadores da população (Heuch 1979). Para populações trimórficas, modelos computacionais apontam que qualquer combinação de genótipos fundadores resulta em maior proporção ($> 33\%$) do morfotipo curto que dos demais durante as primeiras gerações (Morgan & Barrett 1988). Para uma população ser trimórfica, é necessário que o morfotipo curto faça parte do processo inicial, pois é o único morfotipo que carrega o alelo *S*. Se a população fonte deste genótipo é mantida unicamente por polinizações legítimas, o morfotipo curto fundador será heterozigoto para este *locus*. Nesse caso, há 50% de chance da progênie ser do morfotipo curto e 50% de pertencer aos morfotipos médio e longo, sob reprodução legítima. Porém, se há endogamia, a chance de um alelo dominante estar presente neste *locus* aumenta, por segregação, para 3:1 (morfotipo curto: morfotipos médio/longo – $SS, Ss, sS : ss$) (Morgan & Barrett 1988). Isso explica a maior frequência do morfotipo curto em populações jovens com poucas gerações, como pode ser o caso de populações efêmeras no Pantanal; e o conjunto de populações efêmeras que estão continuamente em formação, ocasionando o aumento na frequência global do morfotipo curto no Pantanal. Além do mais, altos níveis de autopolinização e polinizações ilegítimas,

e sobrevivência de indivíduos entre gerações, tendem a aumentar o tempo necessário para atingir a isopletia. Estas previsões teóricas estabelecidas pelo modelo são coerentes com o resultado encontrado para *E. azurea* no Pantanal, onde a espécie apresenta relaxamento da auto-incompatibilidade e da incompatibilidade heteromórfica (Cunha & Fischer 2009), e grande porcentagem de populações permanentes. Modelos matemáticos preditivos que considerem o pulso de inundação, periodicidade da população, reprodução clonal e ausência de polinizadores oligoléticos poderão elucidar se o equilíbrio isoplético é possível de ser atingido sob as condições encontradas no Pantanal e quantas gerações são necessárias para atingi-lo.

Existe forte relação positiva da equidade dos morfotipos florais com o tamanho populacional, como reportado para outras espécies tristílicas (Ornduff 1966, Barrett & Forno 1982, Barrett et al 1983, Anderson 1997, Barrett & Arroyo 2012). Os resultados encontrados no Pantanal estão relacionados à grande probabilidade de perda de morfotipos florais por deriva genética mediada pelos efeitos de extremos dos extremos hídricos sobre populações pequenas de *E. azurea* no Pantanal. A maior variabilidade do índice de equidade (E) encontrada nas populações maiores também pode ser explicada pela flutuação sazonal do nível da água. Nas regiões adjacentes ao rio Paraguai estas variações podem chegar a 5 m (Hamilton 1996), além do mais, essas regiões são fortemente influenciadas pelas plantas que são carregadas das cabeceiras dos rios de entorno e planície alagável (ver métodos). Nessas regiões (sub-região do Paraguai, borda oeste do Pantanal), devido à constante movimentação de plantas deslocadas em bancos de macrófitas (regionalmente chamados camalotes), é esperada maior

variabilidade nas proporções dos morfotipos florais. Também é provável que a reprodução sexuada tenha pouca ou nenhuma relevância sob essas condições de instabilidade em decorrência das variações hídricas (Morgan & Barrett 1988, Barrett & Husband 1997). Estudos com genética de populações para testar hipóteses sobre a estruturação genética de populações de *E. azurea* no Pantanal e a relação da diversidade genética com o tamanho populacional, periodicidade e variação espaço-temporal são necessários para elucidar estas questões.

Populações mais próximas tendem a ser menores e com proporções mais variáveis entre morfotipos florais que populações geograficamente mais distantes. Este resultado pode estar relacionado como as diferentes paisagens amostradas e dinâmica populacional de *E. azurea* no Pantanal. Em muitos casos, foram amostradas pequenas lagoas relativamente próximas entre si (~ 1000 m). É provável que o que foi chamado de populações, seja subunidades de um complexo populacional maior, onde eventos de imigração e fluxo gênico entre elas e demais áreas com potencial para colonização, sejam ocasionados pelo processo de inundação – sementes e estolões, ou via pólen - visitantes florais sejam comuns. Dessa forma, é aceitável que essas subpopulações com proporções desiguais de morfotipos florais estejam estruturadas em dinâmica metapopulacional. A ausência ou baixa frequência de um morfotipo floral em determinada população, é compensada em uma localidade vizinha, promovendo o equilíbrio isoplético de alguma maneira. Estudos com genética de populações de *E. azurea* permitirão testar essas hipóteses da relação do tamanho e isolamento populacional e se o pulso de inundação potencialmente promove a homogeneização genética entre populações no Pantanal.

Página intencionalmente deixada em branco

CAPÍTULO 2

COMPOSIÇÃO DE VISITANTES FLORAIS E MANUTENÇÃO DA HERCOGAMIA RECÍPROCA EM *EICHHORNIA AZUREA*

RESUMO

Espécies com ampla distribuição estão sujeitas a diferentes pressões ambientais abióticas (e.g. temperatura, pluviosidade, relevo, umidade) e bióticas (e.g. predação, herbivoria, dispersão, polinização), as quais podem conduzir mudanças na forma de vida, reprodução e demografia. Polimorfismos florais como a heterostilia são importantes ferramentas para a investigação de processos direcionadores de variações em tratos florais ao longo de gradientes espaciais. Neste estudo visei entender quais os efeitos da variação na composição e tratos funcionais de visitantes florais na hercogamia recíproca da espécie tristílica *Eichhornia azurea* num gradiente de inundação no Pantanal. Visitantes florais de 21 populações de *Eichhornia azurea* de três categorias de inundação foram amostradas entre o período de dezembro de 2011 a setembro de 2012. Os visitantes florais foram morfotipados e tiveram os tratos funcionais comprimento e largura do corpo, e comprimento da probóscide tomados. A comunidade de potenciais polinizadores de *E. azurea* foi composta por 27 morfotipos de abelhas e moscas. A maior riqueza foi encontrada nas regiões com inundação de baixa magnitude e curta duração (19 espécies), seguido pelas populações com média e magnitude e longa duração (13 espécies), e alto magnitude e longo duração (6 spp.). Populações com maior reciprocidade entre morfotipos florais também apresentaram maiores comprimentos médios de probóscide, que por sua vez ocorreram nas regiões do Pantanal com menor intensidade de inundação. Por outro lado, em populações com menor reciprocidade hercogâmica, a comunidade de visitantes florais foi composta majoritariamente por abelhas de probóscide curta e em regiões com maiores variações e intensidades de inundação. A maior intensidade de inundação aparenta ser importante força seletiva limitadora para a ocorrência de espécies de probóscide longa, capazes de transportar o pólen de forma legítima entre flores de *E. azurea* no Pantanal.

PALAVRAS-CHAVE: abelhas solitárias, abelhas oligoléticas, co-evolução, comunidades de polinizadores, interação animal-planta, trato funcional, polinização, variação espacial.

ABSTRACT

Species with wide distribution are exposed to different abiotic (e.g. temperature, rainfall, topography, humidity) and biotic (e.g. predation, herbivory, dispersion, pollination) environmental pressures, which may lead to changes in life form, reproduction and demography. Floral polymorphisms such as heterostyly can be used to understand processes that drive floral variation in spatial scale. In this study I aim to understand what are the effects of floral visitors composition and their functional traits on reciprocal herkogamy of the tristylous *Eichhornia azurea* in a flood gradient in the Pantanal wetland. Floral visitors of 21 populations of *E. azurea* of three discrete inundation patterns were sampled between December 2011 and September 2012. Floral visitors were morphotyped and their body length and width, and proboscides length were measured. The community of potential pollinators of *E. azurea* was composed by 27 morphotypes of bees and flies. Higher richness was found in regions with flood pulse of short intensity and short duration (19 spp.), followed by regions with Middle and Long (13 spp.) and High and Long (6 spp.) flood pulse. Populations with higher reciprocity between floral morphs, also had higher mean proboscides length, which occurred in regions with low intensity and duration of flood. In turn, in populations with lower herkogamic reciprocity, the floral visitors assemblage was majorly composed by short-tongued bees and flies, and in regions with higher intensity and duration of flood. Higher flood intensity seems to be a strong selective force limiting the occurrence of long proboscides bee species, which are able to realize legitimate pollinations among flowers of *E. azurea* in the Pantanal.

KEY-WORDS: solitary bees, oligolectic bees, co-evolution, pollinator's communities, animal-plant interaction, functional trait, pollination, spatial variation.

INTRODUÇÃO

Investigações sobre as variações nas interações entre animais e plantas (e.g. herbivoria, polinização e parasitismo) em ampla escala espaço-temporal permitem compreender processos ecológicos-evolutivos que moldam a expressão de tratos funcionais e história de vida dos organismos (Linhart & Grant 1996, Thompson 2005, Mitchell *et al.* 2009). No caso de polinização, uma planta com grande gama de visitantes florais com similar qualidade do serviço de polinização e custos equivalentes nas interações terá retorno semelhante independentemente do visitante floral, não havendo pressão seletiva para especialização da planta em determinado visitante ou grupo de polinizadores e vice-versa. Por outro lado, caso algum visitante floral apresente maior eficiência na transferência de pólen, tratos florais estarão sujeitos à pressão seletiva para co-evoluírem com esses visitantes efetivos (Aigner 2001; Thompson 2005, Whittall & Hodges 2007; Brunet 2009, Mitchell *et al.* 2009, Muchhala *et al.* 2009).

Espécies com ampla distribuição estão sujeitas a diferentes pressões ambientais abióticas (e.g. temperatura, pluviosidade, relevo, umidade) e bióticas (e.g. predação, herbivoria, dispersão e polinização), as quais podem conduzir mudanças na forma de vida, reprodução e demografia (e.g., Costich, 1995, Linhart & Grant 1996, Dorken & Eckert, 2001, Suttle 2003, Case & Barrett, 2004 ; Weller *et al.*, 2007). Variação intraespecífica em tratos florais e sistema reprodutivo de plantas são bons modelos para compreender processos microevolutivos em escala geográfica (Linhart & Grant 1996, Conner 2006, Hodgins & Barrett 2008). Apesar de teoricamente fundamentado, poucos são os estudos que procuram

compreender os efeitos da variação geográfica e condições ambientais na reprodução e polinização de espécies com ampla distribuição (Conner 2006, Herrera *et al.*, 2006, Moeller 2006, Hodgins & Barrett 2008).

Polimorfismos florais como a heterostilia podem ser utilizados para entender processos direcionadores de alterações florais em escala espacial (Barrett 1992). A heterostilia é um polimorfismo genético onde espécies de plantas podem apresentar duas (distilia) ou três (tristilia) formas florais que diferem quanto às alturas dos estigmas em relação aos estames (Darwin 1877, Charlesworth 1979, Barrett 1992). O sistema é acompanhado de diversas características auxiliares que distinguem morfotipos florais, como tamanho do grão de pólen e do estigma diretamente proporcional à altura da estrutura, quantidade de grãos de pólen inversamente proporcional ao nível das anteras, diferenças no tecido do estilete entre morfotipos, além de geralmente ser acompanhado de incompatibilidade esporofítica (Barrett 1992). Quando pólen de uma antera é transferido para altura equivalente de estigma, ocorre polinização legítima (cruzamento não associativo), toda e qualquer outra interação entre pólen e estigmas configura polinização ilegítima (auto-polinização, geitonogamia, polinização intra-morfo), o qual resulta na formação de pouca ou nenhuma semente (Darwin 1877, Barrett 1992). Esta equivalência na altura de estigmas e anteras é conhecida como reciprocidade hercogâmica. A heterostilia é apontada como um mecanismo responsável para promover exocruzamento mediante polinizadores especializados em transferir grãos de pólen dos três níveis de antera para equivalentes níveis de estigma (Darwin 1877, Barrett 1992, Baena-Díaz *et al.* 2012).

No entanto, em algumas espécies heterostílicas visitantes florais generalistas são capazes de transferir pólen de forma legítima e manter níveis razoáveis de alogamia (Wolfe & Barrett 1987, Harder & Barrett 1992, 1993, Husband & Barrett 1992c, Schlindwein & Medeiros 2006, Liu *et al.* 2013). Muitas vezes não há pressão para especialização, pois apesar do polinizador especialista conseguir remover pólen com mais eficiência, não obrigatoriamente terá melhor desempenho no transporte do pólen que polinizadores generalistas (Harder & Barrett 1993, Aigner 2001). Além do mais, para que ocorra especialização floral em determinado grupo de polinizadores, é necessário que haja grande abundância desses visitantes no período de floração, o que raramente é atingido (Harder & Barrett 1993, Aigner 2001). Entretanto, para a maioria das espécies heterostílicas, a ausência de visitantes florais especialistas é importante fator para aumento da endogamia e consequente quebra do polimorfismo (Barrett 1989, Barrett *et al.* 1989, Alves dos Santos 2002, Pérez-Barrales *et al.* 2006, Hodgins & Barrett 2008, Kissling & Barrett 2013, Santos-Gally *et al.* 2013).

A espécie tristílica *Eichhornia azurea* é um bom modelo para entender variações em tratos florais ao longo de um gradiente geográfico. Suas flores são tubulares e visitadas por diversos insetos (Barrett 1978, Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). No entanto, somente abelhas especializadas são capazes de coletar pólen das anteras curtas, as quais ficam escondidas no tubo floral, e realizar polinização entre esses níveis de estruturas (Alves dos Santos & Wittmann 1999, 2000, Alves dos Santos 2002, Alves dos Santos 2003). As abelhas especialistas em visitar flores de *E. azurea* pertencem às tribos Emphorini, Eucerini e Tapinotaspidini, sendo as abelhas do gênero *Ancyloscelis* apontadas

como principais polinizadores (Barrett 1978, Alves dos Santos & Wittmann 1999, 2000, Alves dos Santos 2002). Essas abelhas, em especial *A. gigas*, possuem probóscide longa suficiente para recolher néctar e pólen das anteras curtas. Além disso, sua probóscide é repleta de cerdas que auxiliam na retenção de grãos de pólen durante o forrageio. O comportamento especializado maximiza as polinizações por meio do depósito de pólen dos três níveis de anteras ao longo da probóscide e corpo (Alves dos Santos & Wittmann 1999, 2000, Alves dos Santos 2002). A ausência dessas abelhas em populações de *E. azurea* é apontada como importante fator para quebra do sistema da tristilia. Entretanto, são desconhecidos os fatores que levam à alteração da comunidade de visitantes florais e exclusão dessas abelhas em populações de *E. azurea*.

Neste estudo visei entender as variações na hercogamia recíproca das flores de *E. azurea* com base na composição e tratos funcionais dos visitantes florais. Especificamente este estudo tem como objetivo responder as seguintes questões: (i) Como é o comportamento de forrageio dos visitantes florais de *E. azurea* no Pantanal? (ii) A composição de visitantes florais de *E. azurea* com potencial polinizador varia conforme mosaico de umidade encontrado no Pantanal? (iii) existe variação dos tratos funcionais dos visitantes florais ao longo do mosaico? (iv) a hercogamia recíproca de *E. azurea* varia conforme as diferenças de tratos funcionais e composição de visitantes florais ao longo do gradiente de umidade?

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O Pantanal, localizado no centro da América do Sul (15 – 20 ° sul), é caracterizado pela depressão geológica Rio Paraguai; é circundado pelos planaltos de Maracaju-Campo Grande e Taquari-Itiquira a leste, Guimarães e Parecis a norte, Urucum-Amolar a oeste e Bodoquena a sul (Assine 2003). Representa a maior planície alagável da Terra com cerca de 135.000 km² constituído de área úmida (Assine 2003, Silva & Abdon 1998) e 160.000 km² ao todo (Junk & Nunes da Cunha 2005), com altitude variável entre 80 e 190 m acima do nível do mar.

A maior força estruturadora da paisagem pantaneira é o pulso de inundação anual, apresenta considerável variação espacial e temporal na planície alagável (Silva & Abdon 1998, Junk & da Silva 1999, Junk 2000, Hammilton 2002). A água pluvial é retida na planície durante os períodos chuvosos causando o alagamento de extensas áreas, e escoar vagarosamente no sentido leste-oeste em direção ao Rio Paraguai através de riachos permanentes e temporários regionalmente conhecidos como *corixos* e *vazantes*, respectivamente. Por outro lado, o rio Paraguai, o qual também recebe água de diversos rios tributários em seu curso, escoar a água no sentido norte-sul. A flutuação sazonal dos níveis da água é de 2 a 5 m no rio Paraguai, no entanto, as demais regiões do Pantanal geralmente apresentam menores valores. Estima-se que 90% das águas que passam pelo Pantanal retornam à atmosfera, contribuindo significativamente para o equilíbrio regional das águas e temperatura (Ponce 1995, Hamilton 2002).

O clima da região é Tropical (Aw Koppen) com estações secas e húmidas bem definidas (maio-outubro e novembro-abril, respectivamente). A precipitação

anual varia de 1000-1500 mm, com maior parte das chuvas ocorrendo entre novembro e março. Devido à baixa elevação e localização no continente a região esta sujeita à penetração de massas de ar polares durante o inverno, podendo reduzir drasticamente as temperaturas e causar pequenas geadas (Hamilton 2002).

O Pantanal apresenta grande variedade de sub-regiões com distintas características geomorfológicas, hidrológicas e ecológicas. O número de sub-regiões e os critérios para sua classificação são diferentes entre autores, podendo levar em consideração percepções tradicionais, limites políticos, características geomorfológicas e hidrológicas (EDIBAP 1979, Adámoli 1982, RADAMBRASIL 1982). Neste trabalho seguiremos a nomenclatura proposta por Hamilton *et al.* 1996 que divide o Pantanal em 10 sub-regiões. As sub-regiões são classificadas de acordo com os maiores rios que fluem através delas, e esses limites refletem diferenças hidrológicas e geomorfológicas entre sub-regiões (Figura 2.1), o que é de particular importância para este estudo. Além do mais, as populações amostradas foram classificadas conforme diferentes durações e magnitudes do pulso de inundação no Pantanal seguindo a classificação proposta por Gonçalves *et al.* (2011). Quatro categorias de inundação foram adotadas: baixa magnitude e curta duração (baixa e curta), média magnitude e média duração (média e média), média magnitude e longa duração (média e longa), e alta magnitude e longa duração (alta e longa).

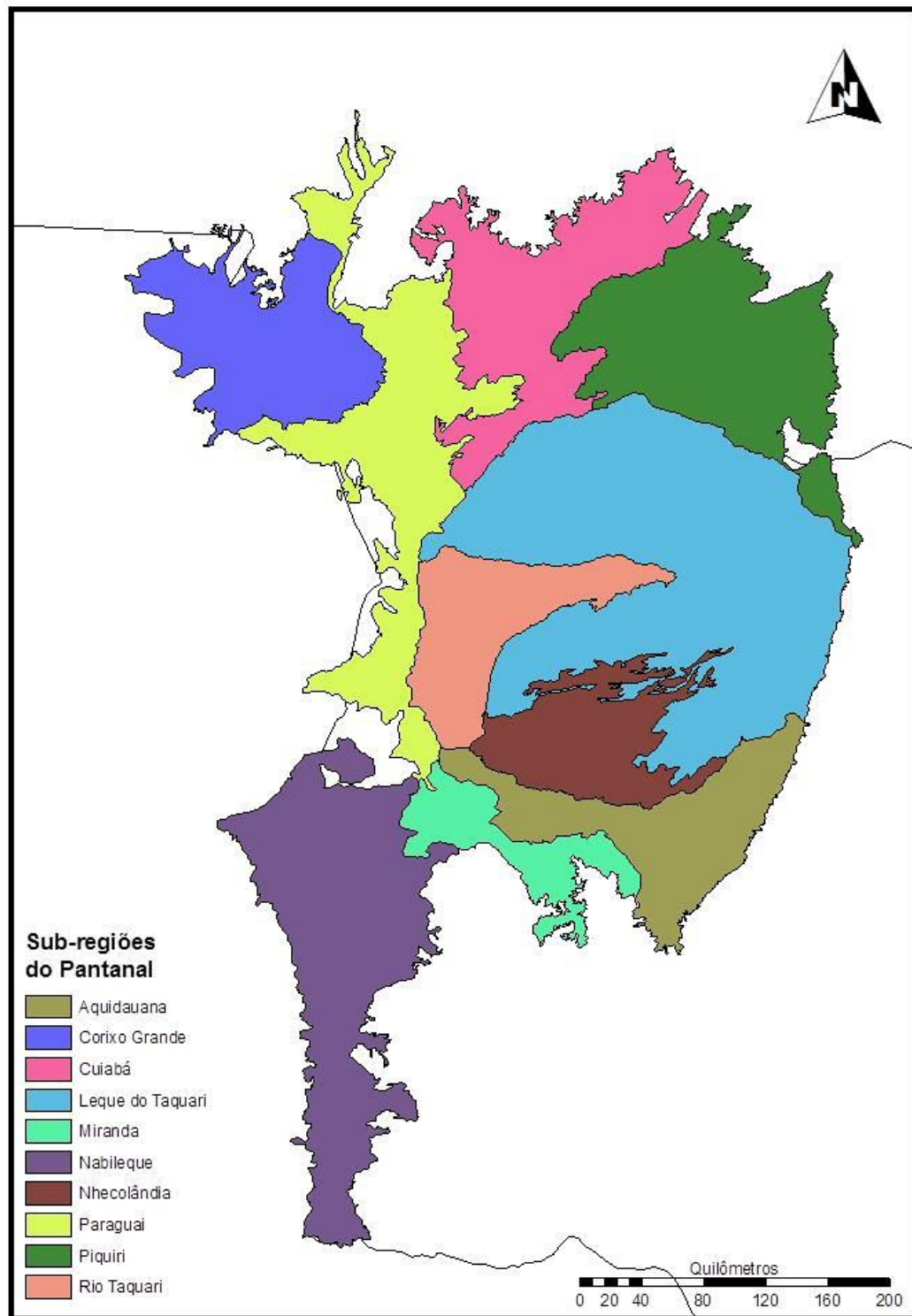


Figura 2.1. Sub-regiões do Pantanal de acordo com Hamilton *et al.* 1996.

Descrição da espécie

Eichhornia azurea é uma espécie de macrófita aquática perene, rizomatosa, flutuante fixa no substrato (Pott & Pott 2000). Pode ser encontrada em ambientes aquáticos das bacias hidrográficas da Amazônia, Paraguai e Paraná. (Barrett 1978; Bianchi *et al.* 2000; Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009, Cunha *et al.* 2012). As flores variam de azul a roxa com seis pétalas de bordo fimbriado e guia de néctar. Visivelmente tristílicas, cada flor possui três estames longos e três curtos conectados à parte interna do tubo floral e altura do estigma variando conforme morfotipo floral (Figura 2.2). O número de flores por inflorescência pode variar (30-120) com as características físico-químicas da água e nutrientes (Bueno 2003, Cunha N.L. observação pessoal). Ao final da floração, a inflorescência prostra na água para o desenvolvimento dos frutos (Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). No Pantanal *E. azurea* pode apresentar flores o ano inteiro em regiões com corpos de água permanente, enquanto em lagoas efêmeras a floração coincide com aproximadamente a metade do período das chuvas em diante (Cunha N.L. observação pessoal). Os frutos são cápsulas que podem conter mais de 100 sementes (~1-2 mm). As flores são visitadas por abelhas solitárias de probóscide longa, moscas e borboletas (Barrett 1978, Alves dos Santos & Wittmann 2000, Alves dos Santos 2002). Apresenta pronunciada reprodução clonal, e os níveis de incompatibilidade heteromórfica variam de compatível (quebra da tristilia, Barrett 1978, Alves dos Santos 2002), a moderada (Cunha & Fischer 2009) e forte (Bianchi *et al.* 2000).

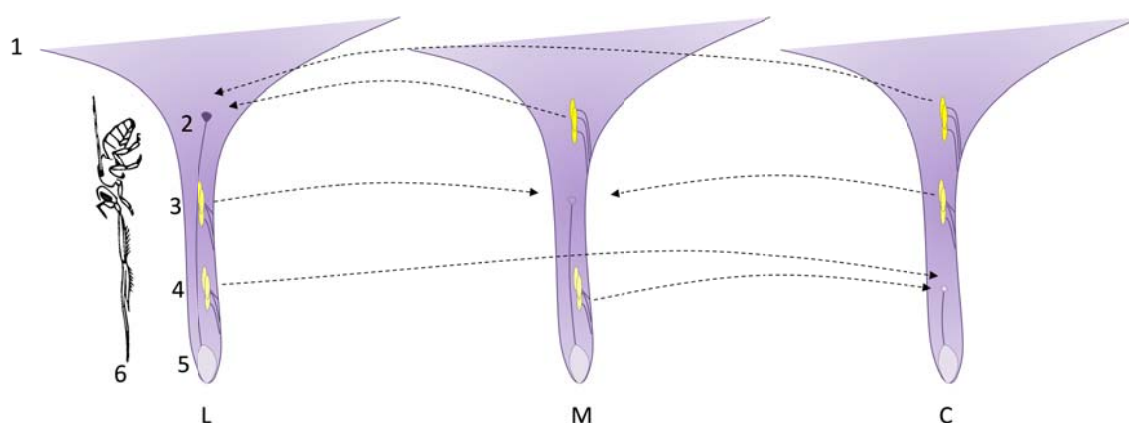


Figura 2.2. Representação esquemática da heterostilia em *Eichhornia azurea*. (1) perianto, (2) estigma e estilo, (3) primeiro conjunto de três anteras, (4) segundo conjunto de três anteras, (5) ovário. Notar que as estruturas foram descritas para o morfotipo longo, no entanto todas ocorrem em todos os morfotipos, porém em alturas diferentes. As setas apontam a transferência de pólen sob polinizações legítimas (hercogamia recíproca), qualquer outra combinação entre pólen e estigma resultará em poucas ou nenhuma semente. (6) Visitante floral de longa probóscide, em posição que realiza o forrageio em *E. azurea*. Notar que os grãos de pólen podem ser depositados nas três alturas de anteras e estigmas ao longo do corpo e probóscide do visitante (Alves dos Santos 1999).

Amostragem

Vinte e uma populações de *Eichhornia azurea* de seis sub-regiões do Pantanal foram amostradas entre o dezembro de 2011 e setembro de 2012 (Figura 2.3). Dentre estas, 14 populações encontravam-se em regiões com pulso de inundação baixo e curto, três em médio e longo, e quatro em região alto e longo (Tabela 2.1). Foram amostrados lagoas permanentes, temporárias, “caixas de empréstimo” ao lado de estradas, “corixos”, “vazantes”, e canais que conectam grandes lagos aos rios. A distância entre populações variou entre 1 a 450 km (Figura 2.3).

Visitantes florais

Para descrever o comportamento de forrageio dos visitantes florais foram feitas observações em campo para todas as populações em flores de todos os morfotipos florais, complementadas com fotografias. Considerei os visitantes florais como polinizadores, quando estes eram guiados pelo guia de néctar para pousarem nas flores e realizavam contato com as anteras e estigmas durante forrageio. Visitantes florais que pousavam diretamente nas anteras ou lateral da flora e caminhavam em direção ao recurso, foram considerados pilhadores. O esforço médio foi de três horas por população, no entanto algumas populações na região do rio Paraguai foram amostradas por apenas uma hora, e uma população na região de Miranda por 12 horas. A captura de visitantes florais de *E. azurea* foi realizada de forma qualitativa pelo método de busca ativa utilizando redes entomológicas. O esforço aplicado foi proporcional à quantidade de visitantes na

população e número de morfotipos identificados em campo. Os animais foram mortos com Acetato de Etila, que promove a projeção da probóscide dos invertebrados mortos, armazenados individualmente em microtubos, e congelados. Em laboratório foram alfinetados, etiquetados e identificados por especialistas até o menor nível taxonômico possível (G. Graciolli, R. Olivier, R. Aranda – UFMS, I. Alves-dos-Santos - USP). As medidas de comprimento da probóscide, largura e comprimento do corpo dos visitantes florais tomadas com auxílio de estereomicroscópio óptico e objetiva milimetrada calibrada.

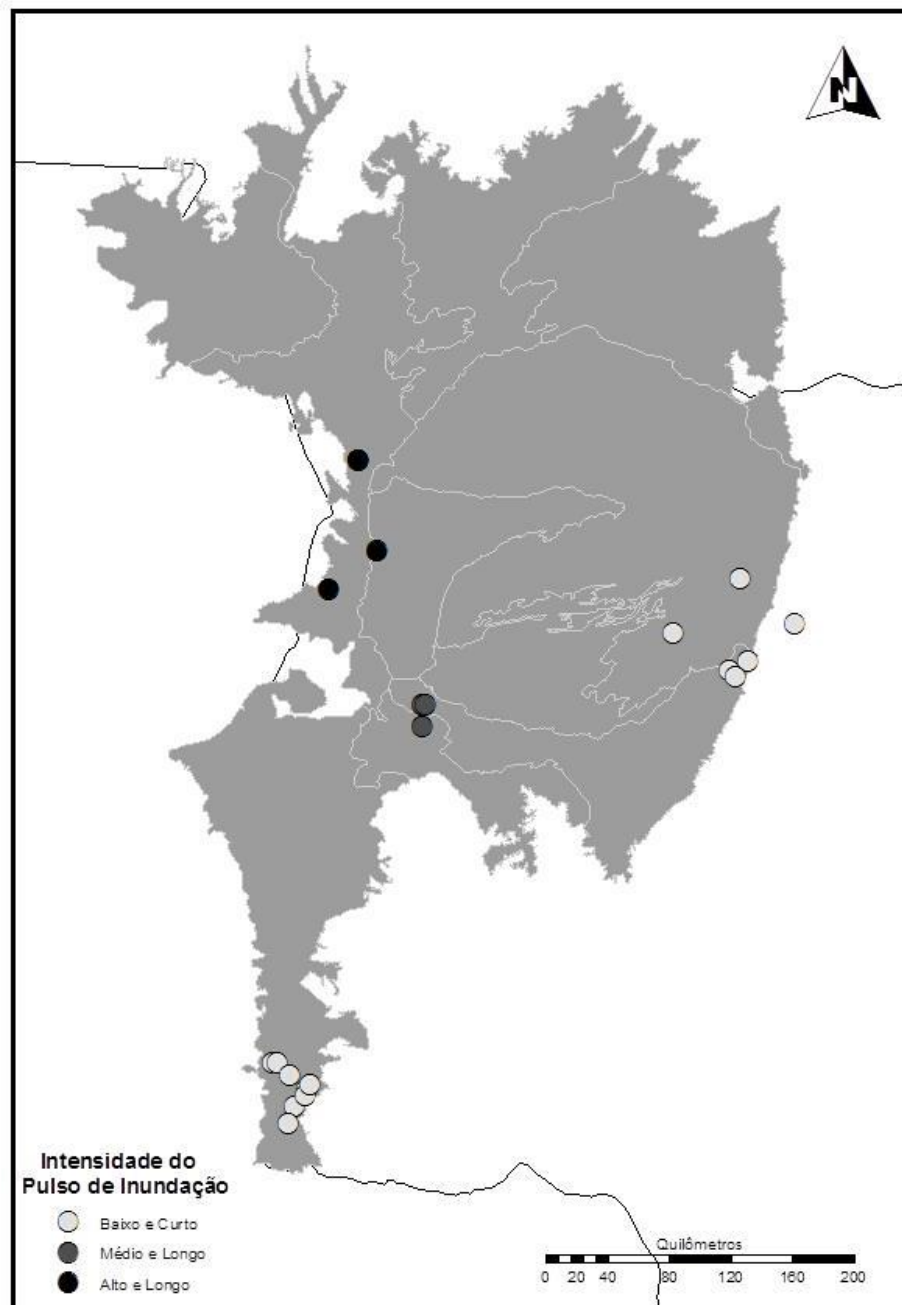


Figura 2.3. Distribuição das 21 populações de *Eichhornia azurea* amostradas quanto aos visitantes florais entre 2011 e 2012, Pantanal.

Tabela 2.1. Tamanho e estruturação morfológica de 21 populações de *Eichhornia azurea* em seis sub-regiões do Pantanal, que variam quanto à magnitude (Baixa, Média ou Alta) e duração (Curta ou Longa) do pulso de inundação.

Pulso de Inundação			Tamanho	Estrutura morfolópica
Sub-região	População			
Baixo e Curta				
Nabileque				
	EAZU64	01-25	Trimórfica	
	EAZU65	101-200	Trimórfica	
	EAZU69	201-500	Trimórfica	
	EAZU71	26-50	Monomórfica	
	EAZU72	26-50	Monomórfica	
	EAZU73	201-500	Trimórfica	
	EAZU74	201-500	Trimórfica	
	EAZU75	201-500	Trimórfica	
Aquidauana				
	EAZU50	201-500	Trimórfica	
	EAZU51	101-200	Trimórfica	
	EAZU57	101-200	Trimórfica	
Leque Taquari				
	EAZU48	51-100	Trimórfica	
	EAZU59	51-100	Trimórfica	
	EAZU60	51-100	Monomórfica	
Médío e Longo				
Aquidauana				
	EAZU46	51-100	Trimórfica	
	EAZU47	51-100	Trimórfica	
Miranda				
	EAZU23	1000-10000	Trimórfica	
Alto e Longo				
Paraguai				
	EAZU78	1000-10000	Trimórfica	
	EAZU81	1000-10000	Trimórfica	
	EAZU83	1000-10000	Trimórfica	
Rio Taquari				
	EAZU86	1000-10000	Trimórfica	
3	6	21	-	-

Análises de dados

Composição de visitantes florais x pulso de inundação

A dimensionalidade da comunidade de visitantes florais foi reduzida por meio de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Foi criada matriz de associação, utilizando o índice de Sorensen, a partir da matriz de presença e ausência dos visitantes florais registrados em cada população (unidade amostral), sendo unicamente utilizados os visitantes potencialmente polinizadores (legítimos ou ilegítimos), e estes dados submetidos à PCoA. Regressão linear entre as distâncias originais da matriz (matriz de associação de Sorensen) e as distâncias finais obtidas pelos “scores” da ordenação (matriz de associação Euclidiana) foi utilizada para determinar a porcentagem de variância recuperada pela ordenação e então determinado quantos eixos foram utilizados para representar a composição de espécies.

Calculei valor médio da probóscide para cada população (somando o comprimento médio da probóscide de cada espécie em determinada população e dividindo pelo número de espécies de visitantes na população) (Hurlbert, 1984). Para testar se a composição de visitantes florais, representada pelos eixos da PCoA, é explicada pelos diferentes níveis de inundação no Pantanal e se difere quanto ao comprimento da probóscide, utilizei análise de covariância multivariada (MANCOVA), adotando a estatística Pillai-Trace. Gráfico de ordenação direta da comunidade de visitantes florais ponderada pelo comprimento médio da probóscide de cada população foi feito para visualização da substituição de espécies entre diferentes pulsos de inundação.

Para avaliar se existe relação da distância geográfica entre populações com a composição de visitantes florais e o comprimento médio da probóscide utilizei teste de Mantel. Para isso foram gerados vetores de distância geográfica euclidiana par a par entre populações, de distância Sorensen da composição de espécies entre populações, e de distância euclidiana do comprimento médio da probóscide entre cada combinação par a par de populações. A correlação de Pearson entre esses vetores foi calculada por meio de 2000 iterações, sendo duas análises distintas: distância geográfica x composição e distância geográfica x comprimento médio da probóscide.

Tratos funcionais dos visitantes florais x hercogamia recíproca

Após a identificação e medidas dos insetos, cada visitante floral teve o valor médio dos tratos funcionais estimados independente da população, sub-região ou intensidade do pulso de inundação. Este valor médio foi utilizado para representar o tamanho dos tratos da respectiva espécie, adotando, dessa forma, um valor global de trato funcional para o Pantanal. Algumas espécies tiveram indivíduos que não projetaram a probóscide, estes não foram utilizados para calcular a média deste trato, evitando assim desvios artificiais da média. Devido à multicolinearidade entre os tratos tomados (tórax x corpo, $r = 0,75$; tórax x probóscide, $r = 0,43$, corpo x probóscide, $r = 0,82$), optei por usar somente o comprimento médio da probóscide como variável independente nos modelos, por esta ter maior relação funcional com a tristilia.

A reciprocidade hercogâmica foi calculada com o programa RECIPRO (Sanchez *et al.* 2013), o qual é uma versão atualizada do programa macro RECIPROCITY (Sanchez *et al.* 2008) para espécies distílicas. Nesta nova versão é possível calcular a reciprocidade quanto à altura de anteras e estigmas equivalentes em populações de espécies tristílicas. O resultado gerado é um índice que pode variar de 0 a 1, onde 0 representa populações que apresentam o valor mínimo de reciprocidade entre indivíduos e 1 valor máximo.

A relação da reciprocidade com o comprimento médio da probóscide dos visitantes por população entre regiões com diferentes intensidades de inundação foi analisada com Modelos Generalizados Aditivos para Localização de Escala e Forma (“GAMLSS - Generalized Additive Models for Location Scale and Shape”) utilizando distribuição beta-inflacionada (Rigby & Stasinopoulos 2005). Modelos de regressão beta são bastante robustos para modelar dados com limites de amplitude, pois apresentam diversos formatos de distribuição de densidade que variam com os parâmetros da distribuição, permitindo a visualização de relações que seriam obscuras em modelos lineares e correlações (Rigby & Stasinopoulos 2005, Ospina & Ferrari 2012). No entanto, dados de proporção, taxas e índices incluem valores de 0s e 1s que não podem ser simplesmente descartados. Neste caso a distribuição beta não permite inferências probabilísticas, e inclusão de modelos com 0 e 1 inflacionados aparentam ser ideais para situações que a variável de interesse é contínua e restrita aos intervalos de $[0,1)$, $(0,1]$ ou $[0,1]$ e esta relacionada a outras variáveis através de uma estrutura de regressão (Ferrari & Cribari-Neto 2004). Os 0s gerados pelos valores de índices podem ser ocasionados por grandes desvios na proporção de cada morfotipo mensurado

para o cálculo do índice, ou pelo fato de a população realmente apresentar baixo valor de reciprocidade. Nesses modelos a unidade amostral foi a espécie de visitante floral em cada população (e.g. uma população com cinco espécies terão cinco unidades amostrais com diferentes valores médios de probóscide e único valor de reciprocidade).

A comparação do comprimento médio da probóscide entre categorias de pulso de inundação foi realizada por meio de análise de variância de um fator (ANOVA), e teste a posteriori de Tukey. Novamente, a unidade amostral foi a espécie de visitante floral em cada população.

Para auxiliar a compreensão da funcionalidade da comunidade de visitantes florais, foram feitos gráficos de densidade de Kernel para o comprimento da probóscide entre categorias de pulso de inundação. Foram utilizados como unidades amostrais cada espécie de visitante floral em cada categoria de intensidade de inundação. Para plotar o gráfico esse valor médio de probóscide foi subtraído do comprimento médio do tubo floral das flores de *E. azurea* no Pantanal (~ 25 mm), e juntamente foram plotadas linhas verticais correspondentes aos comprimentos médios dos estigmas e anteras das três alturas para cada região (ver capítulo 3). Esse procedimento teve intuito de simular como seriam as visitas desses insetos nas flores de *E. azurea* no Pantanal.

Todas as análises e gráficos foram realizados com a “Unidade de Interface Gráfica R” (R Core Team, 2013), com auxílio dos pacotes “vegan” (Oksanen *et al.* 2012), “gamlss” (Rigby & Stasinopoulos, 2005), “reshape” (Wickham, 2007), “plyr”

(Wickham, 2011), “doBy” (Højsgaard *et al.* 2012), “lattice” (Sarkar, 2008) e “ggplot2” (Wickham, 2009).

RESULTADOS

Observações de campo

Muitas espécies de abelhas, moscas, além de algumas vespas visitaram *E. azurea* no Pantanal. As visitas foram mais frequentes durante o período da manhã, quando as anteras (principalmente as médias e longas) estavam abertas e bastante atrativas. Entretanto, em diversas regiões foram observadas visitas ao longo de todo o dia.

No geral, os visitantes florais de *E. azurea* podem ser divididos em três grupos: pilhadores, polinizadores ilegítimos e polinizadores legítimos. Dentre os pilhadores estão moscas sirfídeos, abelhas trigonídeas, besouros e gafanhotos encontrados em todas as populações observadas (Figura 2.4). Os primeiros, sirfídeos, pousavam lentamente nas flores, muitas vezes diretamente nas anteras, e quase sempre atraídos pelo pólen ofertado pelas anteras médias e longas, onde passavam longos períodos caso não fossem perturbados por outros visitantes florais (Figura 2.4 A-C). Também utilizavam as pétalas como área de repouso, corte e limpeza; apresentaram atividade durante todo o dia. Abelhas do gênero *Trigona* (Figura S1 K, morfotipo 8) visitaram as flores ao longo de todo o dia, geralmente pousavam nas pétalas, tanto dentro quanto fora, e caminhavam até os recursos (pólen e néctar). Besouros e gafanhotos foram unicamente encontrados

como herbívoros florais, se alimentando de praticamente todas as partes das flores. Anteras e estigmas comidos foram muito comuns, especialmente nas sub-regiões de Miranda e Aquidauana (intensidade de inundação de média intensidade e longa duração). Em nenhum momento foi observado algum pilhador entrando em contato com as estruturas de forma a promover a polinização em *E. azurea*.



Figura 2.4. (A-C) Fotografias de Sirfídeos visitando flores de *E. azurea* no Pantanal. Notar que sempre buscam pólen das anteras médias e curtas, podendo pousar diretamente nestas estruturas ou no perianto (Fotos: N.L. Cunha).

Diversas abelhas de probóscide curta e comportamento agressivo foram classificadas como visitantes ilegítimos. Dentre elas a exótica *Apis mellifera* (Figura S1 J, morfotipo 20), além de espécies do gênero *Trigona*. Estas abelhas faziam visitas demoradas, podendo chegar a cerca de 20 segundos em uma única flor, além de visitar várias flores dentro da mesma inflorescência, potencialmente promovendo geitonogamia. Quase sempre em busca de pólen das anteras longas e médias, e eventualmente transferindo pólen provindo das anteras médias e longas com estigmas do mesmo nível, respectivamente. Em todos os locais que *A. mellifera* foi registrada houve redução ou completa ausência de abelhas oligoléticas de *E. azurea*. Os visitantes legítimos de *E. azurea* no Pantanal foram encontrados principalmente nas sub-regiões de Nabileque, NE de Aquidauana e Leque do Taquari, unicamente em populações com intensidade de inundação de baixa magnitude e curta duração. Ademais, a ocorrência dessas abelhas especialistas foi sincrônica ao período de floração da espécie nessas populações; em outras regiões com inundação de maior magnitude e duração, *E. azurea* apresentou flores ininterruptamente.

As abelhas especialistas foram principalmente compostas por espécies do gênero *Ancyloscelis* (Figura S2 B, G e I, morfotipos 8, 28, 26, respectivamente), *Centris* (Figura S2 F, morfotipo 21), além de vespas Sphecidae (Figura 2.5 e 2.6, Figura S2 J, K e M, morfotipos 32, 33, 35). As *Ancyloscelis* podem ser polinizadores efetivos de *E. azurea*, realizando a transferência de pólen entre alturas equivalentes de antera e estigma em todas as populações observadas. São atraídas pelo guia de néctar, realizando pouso extremamente rápido (< 1 segundo), assim como duração da visita por flor (1 a 5 segundos). Visitam poucas

flores por inflorescência, dificilmente mais que quatro, em voos precisos entre flores e inflorescências, pousando diretamente na abertura da corola (Figura 2.5). Devido a esta enorme agilidade, estas abelhas projetam a probóscide pouco antes de pousar na flor, ao pousarem ficam na abertura final do tubo floral de *E. azurea*, entrando em contato com as anteras e estigmas (Figura 2.5). Comportamentos antagonísticos foram observados, sendo comuns investidas enérgicas em outros visitantes florais, muitas vezes coespecíficos, de *E. azurea*. Visitas periódicas à mesma sequência de flores foram registradas. Não co-ocorreram com *A. mellifera*.



Figura 2.5. Sequência de visita de *Ancyloscelis* em flor do morfotipo longo de *E. azurea*. (A-B) abordagem inicial à flor, notar que a probóscide já vem projetada para a obtenção de recursos, (C-D) pouso no tubo floral, notar o contato com tórax nas anteras médias e abdômen com filete, (E) projeção do corpo no tubo floral demonstrando a movimentação para o obter néctar, (F) posição de descanso ou limpeza.

Outras espécies que realizam a transferência legítima de pólen entre morfotipos florais de *E. azurea* são as abelhas do gênero *Centris* e da família Sphecidae (Figura 2.6). As abelhas *Centris* apresentam comportamento muito similar ao encontrado para *Ancyloscelis*, com visitas rápidas em poucas flores por inflorescência. Realizavam visitas às mesmas flores em cada turno de visitação, sendo mais comuns durante as manhãs. Abelhas Sphecidae foram encontradas principalmente na região do Nabileque e Leque do Taquari. Comportamento menos agressivo que as *Ancyloscelis* e *Centris*, apresentaram voos lentos ao se aproximarem das flores, momento antes de pousarem já estão com a probóscide projetada posicionada em direção do tubo floral (Figura 2.6). Visitavam no máximo duas flores por inflorescência, em visitas mais demoradas (2 a 10 segundos) que as registradas para *Ancyloscelis* e *Centris*. Ambos os grupos contactavam as anteras e estigmas das flores de *E. azurea* durante as visitas promovendo a polinização legítima.

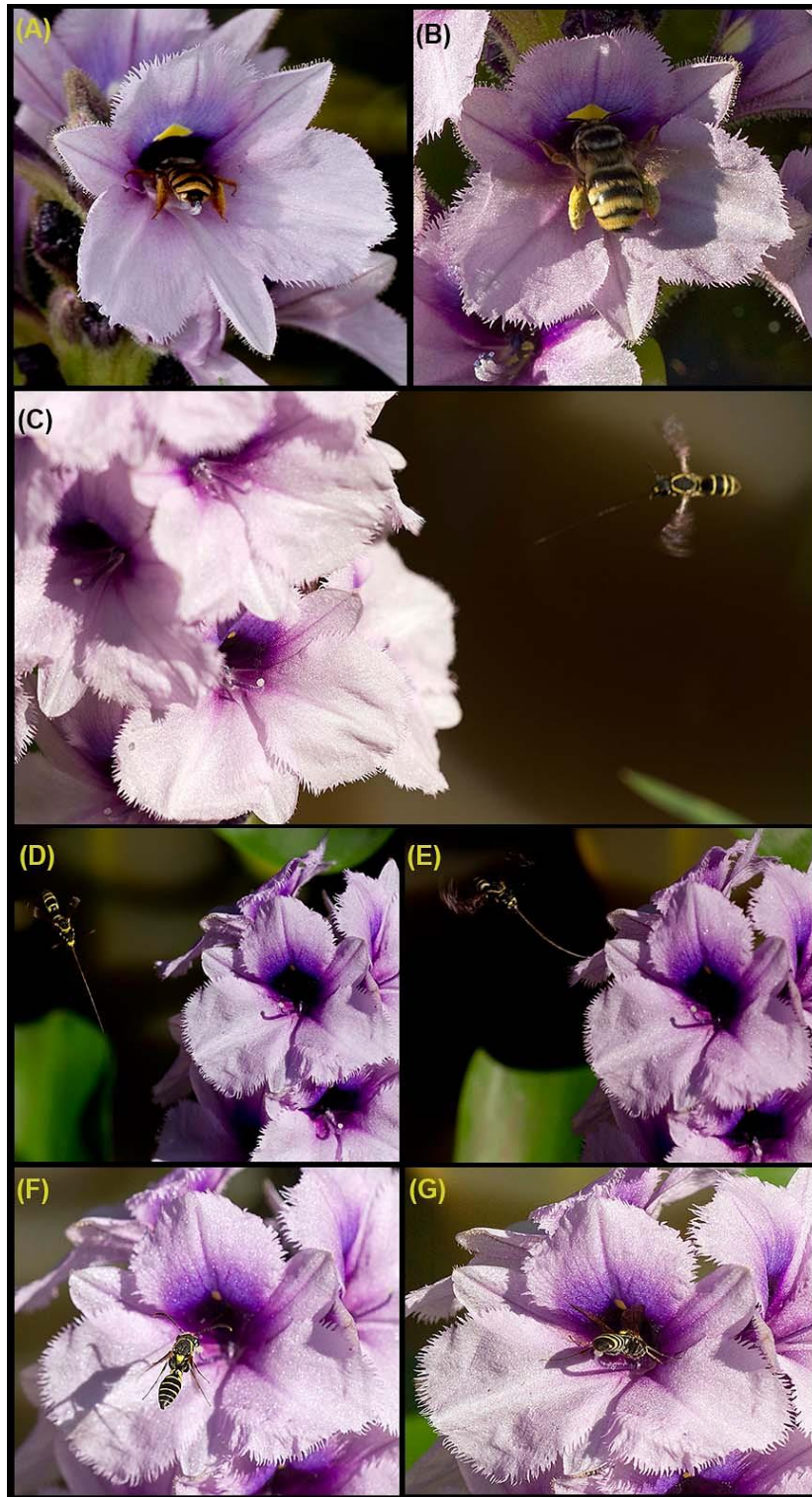


Figura 2.6. Fotografias digitais de (A-B) abelhas do gênero *Centris*, e (C-G) formas de abordagem de abelhas Sphecidae em flores do *E. azurea* no Pantanal. Notar o contato do abdômen e tórax com as anteras e estigmas nas imagens A e G (Fotos: N.L. Cunha).

Trato funcional entre visitantes florais e pulso de inundação

O comprimento médio da probóscide foi muito variado entre visitantes florais e populações amostradas. Os visitantes com maiores comprimento de probóscide foram respectivamente os MORFOTIPOS 26, 33 e 35 (vespas Sphecidae), enquanto vários não tiveram a probóscide projetada (Tabela 2.2). O tamanho médio do comprimento da probóscide por população variou de 19,86 a 225,0, sendo maior nas regiões com inundação Baixa e Curta (sub-regiões do Nabileque, porção nordeste de Aquidauana e Leque do Taquari) (Figura 2.7).

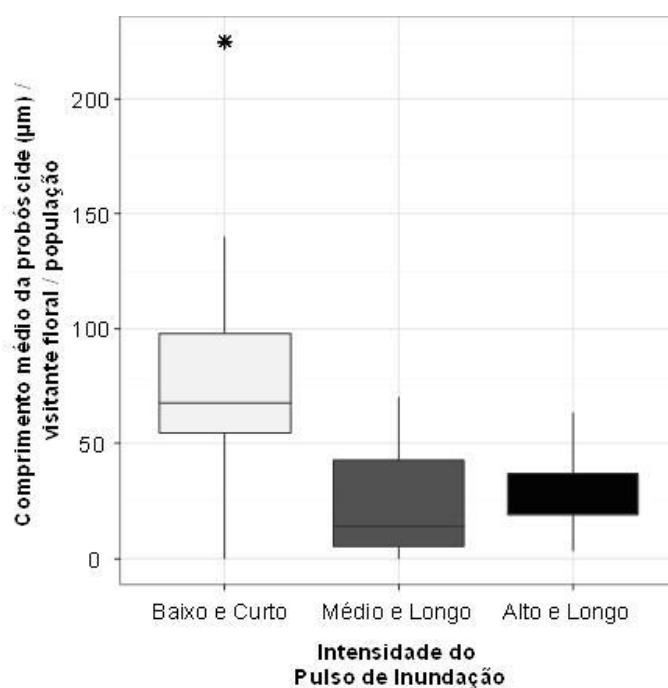


Figura 2.7. Comprimento médio da probóscide das diferentes espécies de visitantes florais em cada população e sub-região do Pantanal.

Variação na composição de visitantes florais

A comunidade de visitantes florais de *E. azurea* foi composta de 27 morfotipos de abelhas e moscas, para estas análises foram removidos herbívoros florais e visitantes esporádicos. As sub-regiões mais ricas foram Nabileque e Aquidauana, com 11 e 10 espécies registradas, respectivamente. Por outro lado, a região do Rio Taquari foi a mais pobre com apenas duas espécies registradas (Tabela 2.2). As demais regiões tiveram riqueza entre 6 e 7 espécies. Quando comparado por categoria de pulso de inundação, a maior riqueza de espécies foi encontrada nas regiões com inundação de magnitude baixa e duração curta (19 espécies), enquanto as populações com pulso de inundação médio e longo (13 espécies), e alto e longo (6 spp.) tiveram menores riquezas de visitantes florais.

A análise de coordenadas principais (PCoA) da comunidade de visitantes florais de *E. azurea* no Pantanal recuperou 39,8 % da variância original dos dados em duas dimensões. A enorme variação dos dados se deve à grande diferença na composição entre populações e baixo número de populações amostradas. Optou-se por usar somente dois eixos, pois apesar do baixo valor de variância recuperada, a adição de mais um eixo na análise não contribuiu significativamente com o ganho de informação (~ 50 %), porém reduziria o poder de visualização e utilização dos eixos em testes inferenciais. A comunidade de visitantes florais de *E. azurea* foi explicada pelas categorias de inundação do Pantanal que por sua vez esta associada ao comprimento médio da probóscide em cada população (MANCOVA_{probóscide}, $F = 10,92$, $gl = 2$, $Pillai = 0,577$, $p = 0,001$, MANCOVA_{pulso de inundação}, $F = 4,661$, $gl = 6$, $Pillai = 0,90$, $p < 0,001$) (Figura 2.8). Quando a

comunidade é ordenada diretamente, ponderada pelo tamanho médio da probóscide em cada população, é nítido o padrão de substituição de espécies entre diferentes regimes de inundação do Pantanal (Figura 2.9).

Tabela 2.2. Composição de visitantes florais de *E. azurea*, ordenados pelo maior tamanho médio da probóscide, registrados nas regiões com distintas intensidades de inundação no Pantanal, com respectivos comprimentos médio da probóscide, erro padrão (EP), desvio padrão (DP) e valores máximo (Max.) e mínimo (Mín.).

Visitante floral	Intensidade do Pulso de Inundação			Comprimento médio da probóscide (µm)	EP	DP	Max.	Mín.	n
	Baixo e Curto	Médio e Longo	Alto e Longo						
morph35	6			225.00	37.50	91.86	225	0	6
morph33	3			140.00	17.32	30.00	170	110	3
morph26	7			98.14	11.04	29.20	140	65	7
morph28	3			91.67	14.81	25.66	120	70	3
morph19		1		70.00	-	-	70	70	1
morph29	4			67.50	5.20	10.41	80	55	4
morph32	2			64.00	4.00	5.66	68	60	2
morph01	3	14	4	63.14	3.50	16.06	95	40	21
morph21	2	2		60.00	5.40	10.80	75	50	4
morph18	2			55.00	5.00	7.07	60	50	2
morph24	1			55.00	-	-	55	55	1
morph17	3			54.00	9.71	16.82	67	35	3
morph23	2			45.50	8.50	12.02	54	37	2
morph20		3	5	36.88	1.36	3.83	45	32	8
morph5			3	20.00	5.00	8.66	25	10	3
morph08	6	5	7	18.60	0.87	3.67	28	10	18
morph30		3		15.00	0.00	0.00	15	15	3
morph06	1	1		12.50	2.50	3.54	15	10	2
morph03	2	11	1	5.71	0.27	0.99	7	5	14
morph13		4	4	3.00	0.49	1.39	3	0	8
morph04		5		0.00	0.00	0.00	0	0	5
morph07		1		0.00	-	-	0	0	1
morph15	5			0.00	0.00	0.00	0	0	5
morph16	1	2		0.00	0.00	0.00	0	0	3
morph27	1			0.00	-	-	0	0	1
morph31		1		0.00	-	-	0	0	1
morph52	1			0.00	-	-	0	0	1
Riqueza	19	13	6						

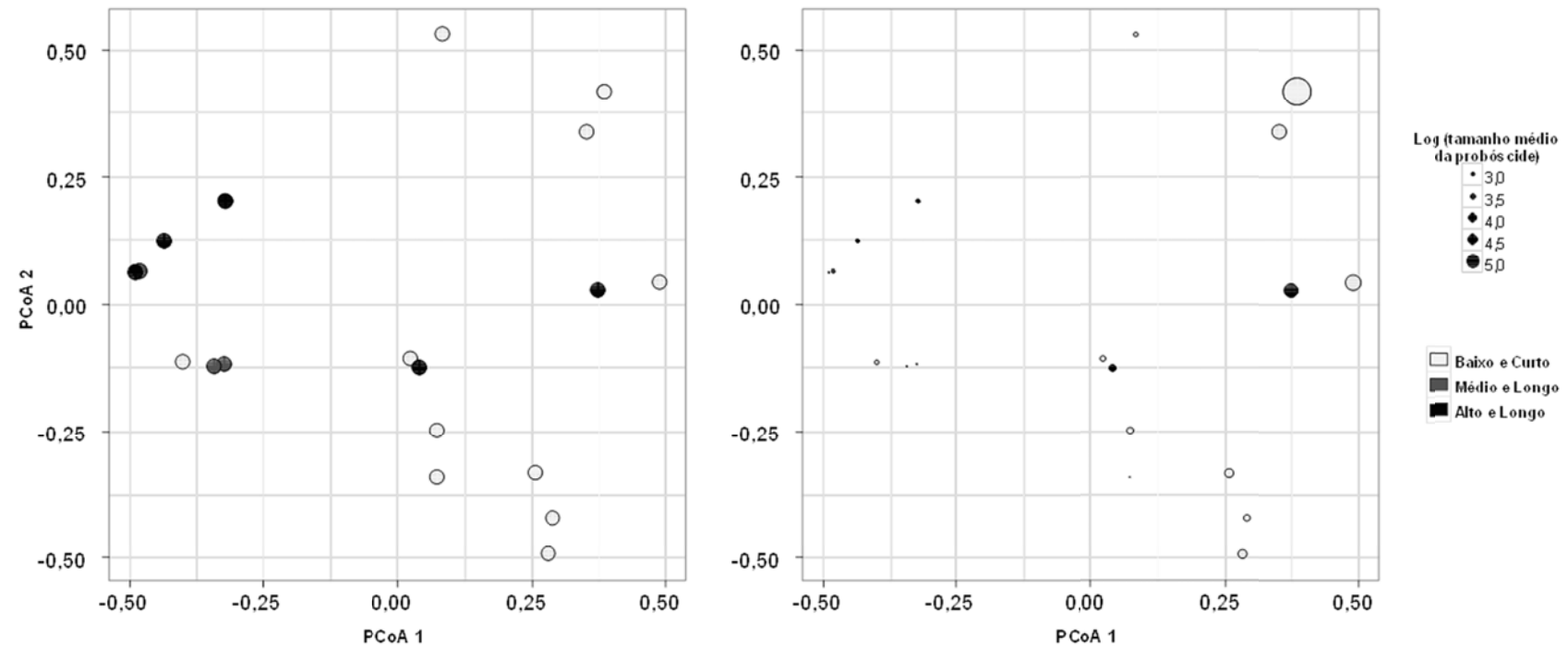


Figura 2.8. Composição de visitantes florais (PCoA) em populações de *E. azurea* entre as diferentes intensidades de pulso de inundação do Pantanal (esquerda) e tamanho médio da probóscide por população (direita).

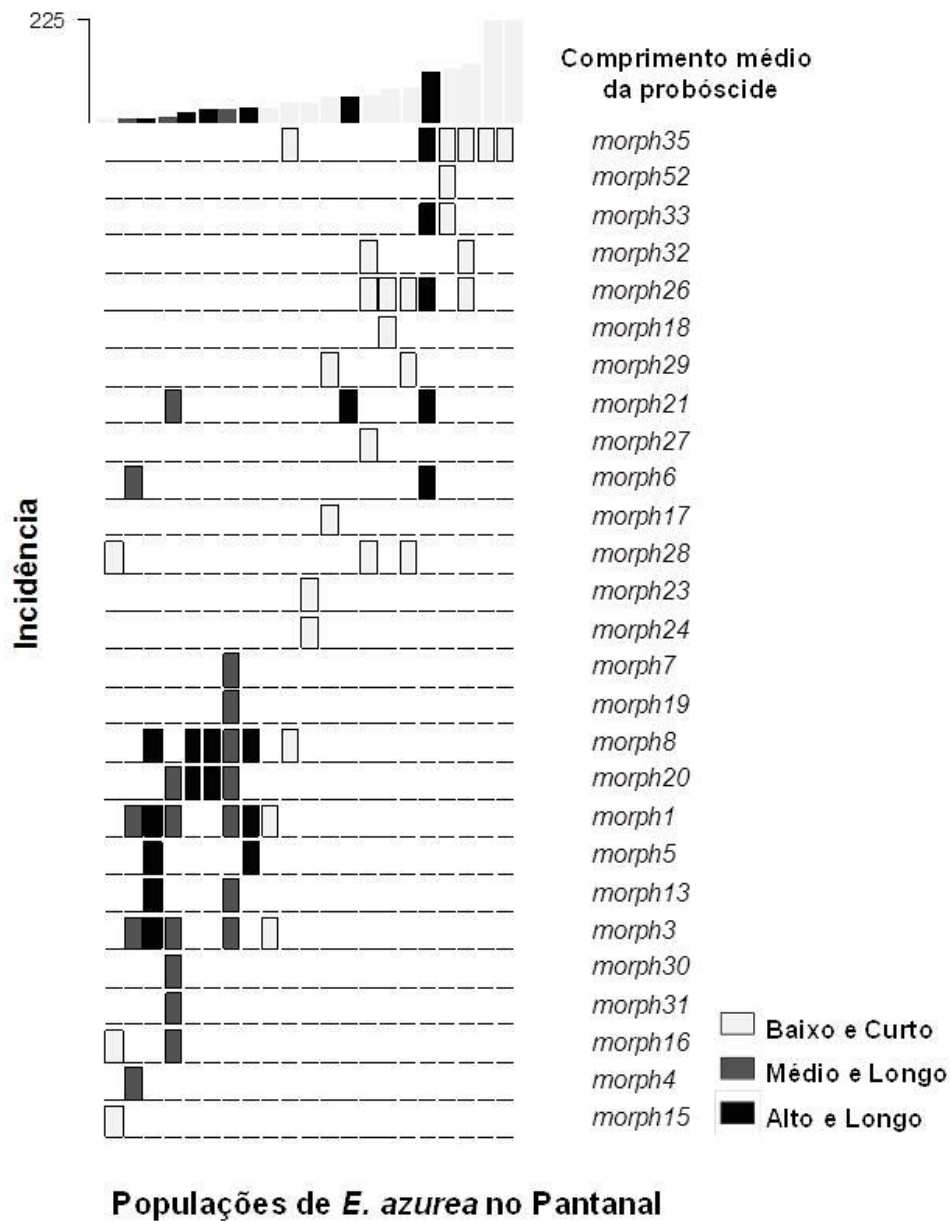


Figura 2.9. Ordenação direta da comunidade de visitantes florais de *E. azurea*, capturadas nas 21 populações amostradas ao longo dos diferentes regimes de inundação no Pantanal, ponderada pelo tamanho médio da probóscide (mm) de cada população (Fotografias digitais das espécies aqui apresentadas, são encontradas nas Figuras 2.S1 e 2.S2; Fotos: N.L. Cunha).

A composição de visitantes florais de *E. azurea* é espacialmente auto-correlacionada (teste de Mantel, $r = 0.35$, $p = 0.001$), assim como o comprimento médio da probóscide nas populações (teste de Mantel, $r = 0.14$, $p = 0.045$). As populações mais próximas entre si apresentam composição de visitantes florais mais similar que populações mais distantes geograficamente, assim como o comprimento médio da probóscide, o qual também é mais parecido em populações espacialmente mais próximas (Figura 2.8, 2.9, 2.10).

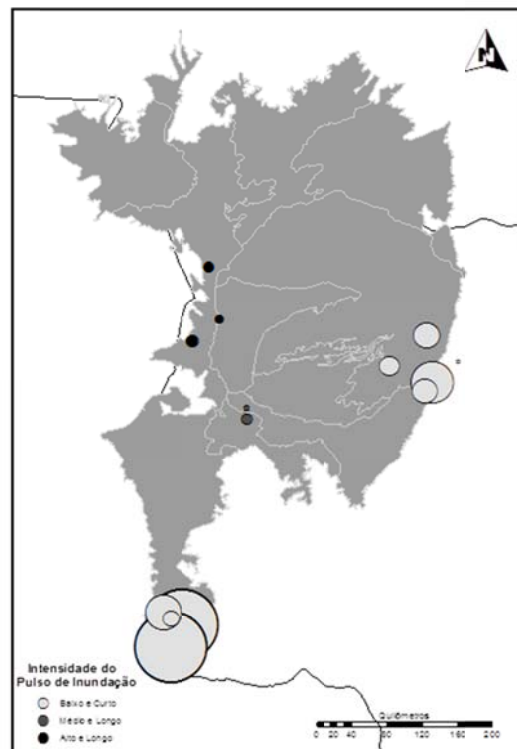


Figura 2.10. Tamanho médio da probóscide em cada população amostrada no Pantanal. Notar que populações nas bordas, limites leste e sul, do Pantanal apresentaram tamanho médio de probóscide maior que as encontradas nas porções centro-sul e borda oeste, locais com maiores intensidades e duração do pulso de inundação.

Comprimento médio dos visitantes florais e hercogamia recíproca

A reciprocidade entre anteras e estigmas de alturas equivalentes em flores de *E. azurea* é explicada pelo comprimento médio da probóscide dos visitantes florais nas populações que ocorrem, que por sua vez está relacionado com o regime de inundação no Pantanal (Tabela 2.3, Figura 2.10 e 2.11). A região com inundação média e longa (sub-regiões de Miranda e Aquidauana), apesar do baixo número de populações amostradas, possuem exclusivamente visitantes florais de probóscide curta ($< 65 \mu\text{m}$) e populações com baixa reciprocidade floral. Em diversas observações em outras populações na mesma região (Miranda e Aquidauana) ao longo de vários anos e distintos períodos, também não foram encontrados visitantes florais de longa probóscide (obs. pess.). Por outro lado, as populações com regime de inundação alto e longo (sub-regiões do Rio Taquari e Rio Paraguai) também apresentam baixo comprimento médio da probóscide, no entanto alta reciprocidade. As populações com maiores comprimentos médios de probóscide e também maiores valores de reciprocidade foram encontradas em regiões com intensidade de inundação baixa e curta, como Nabileque, Leque do Taquari e porção nordeste de Aquidauana. Nestas sub-regiões foram encontrados visitantes com probóscide curta e longa.

Tabela 2.3. Resultado do modelo generalizado (GAMLSS) utilizando distribuição beta inflacionada da relação entre reciprocidade com comprimento médio da probóscide e pulso de inundação no Pantanal. As linhas em cinza apontam as relações significativas entre variáveis.

Variável	Estimativa	Erro padrão	valor de t	valor de p	
Tamanho					
comprimento médio da probóscide	0.00291	0.00146	1.99	0.0521	*
Pulso de Inundação					
Baixo e Curto	1.1223	0.17517	6.41	7.1008E-08	*****
Médio e Longo	-0.64875	0.11804	-5.5	1.6362E-06	*****
Alto e longo	1.82648	0.17997	10.15	2.5400E-13	*****
Coefficientes					
Sigma	-1.2953	0.1214	-10.6731	4.92E-14	
Nu	-2.5055	0.5200	-4.8182	1.61E-05	
Tau	-16.5920	573	-0.0290	9.77E-01	

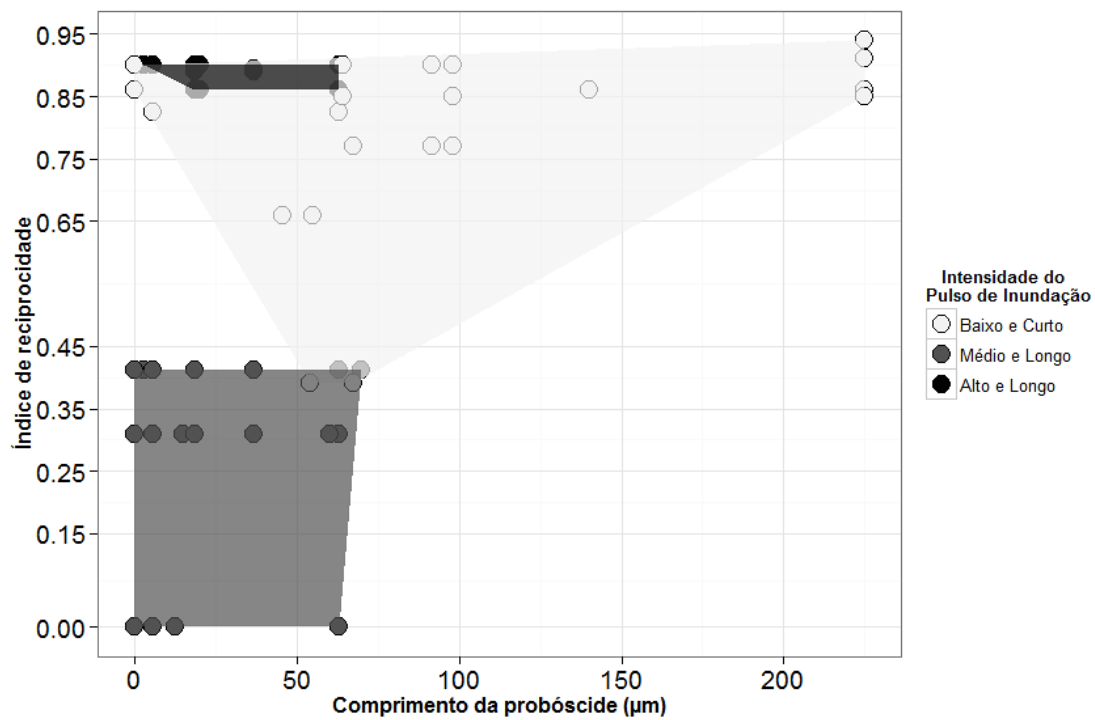


Figura 2.11. Relação entre o comprimento médio da probóscide e índice de reciprocidade para populações de *Eichhornia azurea* no Pantanal. Os polígonos indicam grupos formados por diferentes intensidades de inundação. Cada ponto representa uma espécie de visitante floral em determinada população.

As regiões onde foram encontrados os maiores valores médios de probóscide – inundação baixa e curta, possuem grande sobreposição com as três alturas de estigma e anteras da tríptica *E. azurea* (Figura 2.12). Nessas regiões certamente ocorrem cruzamentos não associativos legítimos entre morfotipos florais. Por outro lado, as populações em regiões com inundação de média a alta magnitude e longa duração, o comprimento médio das probóscides aparenta ser insuficiente para transferir pólen das anteras curtas para estigmas longos (Figura 2.12). Apesar de ser uma análise gráfica e não levar em consideração o comportamento de visitação das abelhas, esta abordagem permite especular sobre a limitação no transporte de pólen em cruzamentos não associativos para essas regiões, o qual pode ser reforçada pelo menor valor de reciprocidade encontrado nas populações dessas sub-regiões (Figura 2.7).

h

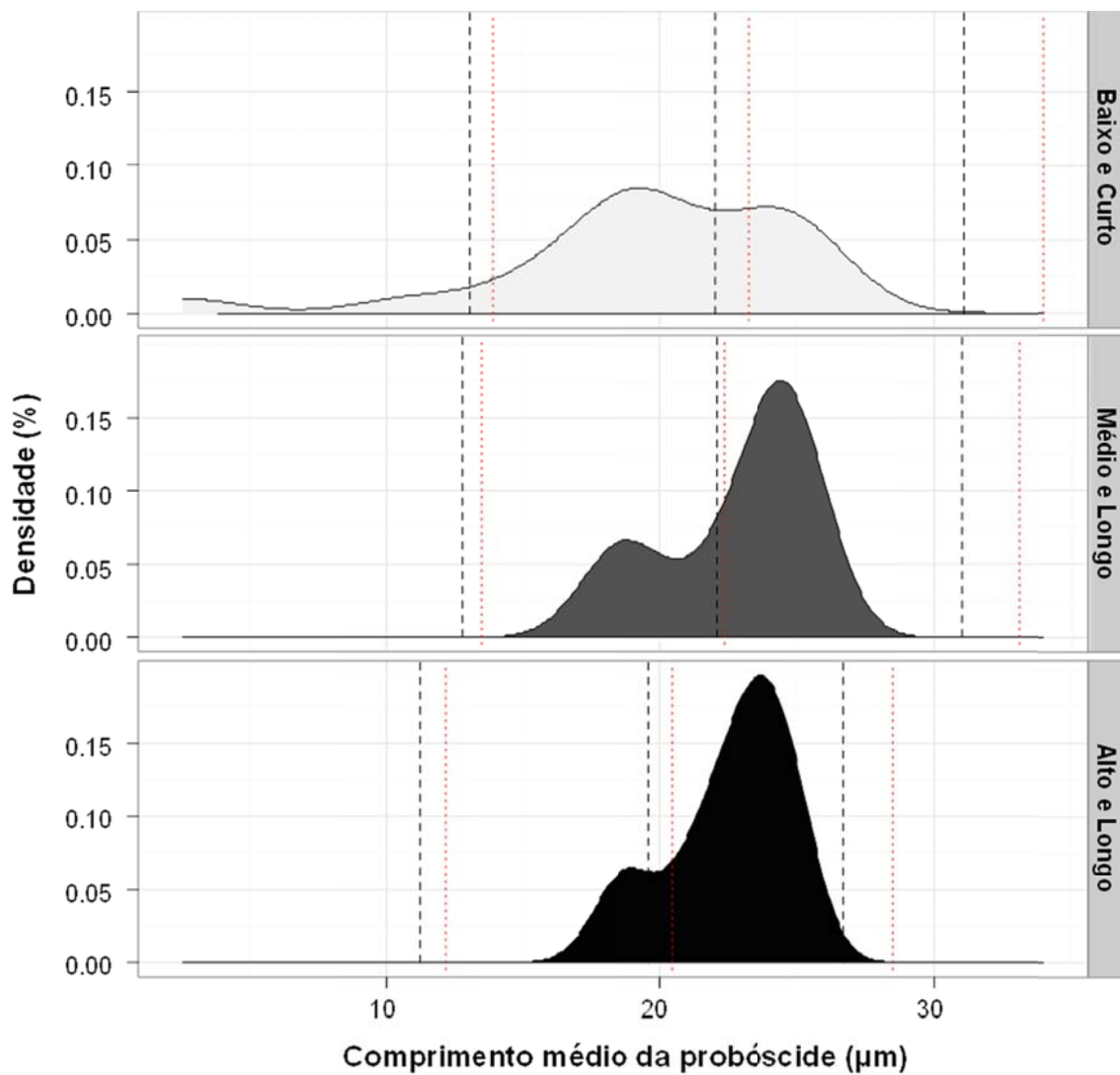


Figura 2.12. Distribuição de Kernel do comprimento médio da probóscide de cada espécie de visitante floral entre os diferentes regimes de pulso de inundação no Pantanal. As linhas verticais pretas e vermelhas representam, respectivamente, o comprimento médio das anteras e estigmas encontrados em cada sub-região do Pantanal (ver Capítulo 3), ordenados da esquerda para a direita (estruturas curtas, médias e longas).

DISCUSSÃO

O principal resultado encontrado demonstra que a fauna de visitantes florais de *E. azurea*, bem como sua funcionalidade, variam espacialmente entre regiões com distintos regimes de inundação no Pantanal. Essa variação na composição de espécies e trato funcional é potencialmente um dos fatores responsáveis pela redução da hercogamia recíproca em regiões com a ausência de abelhas de probóscide longa. A relação íntima entre a presença de abelhas especialistas e perfeita funcionalidade da tristilia em *E. azurea* já foi anteriormente reportada (Barrett 1978, Alves dos Santos, 2002). A ausência de abelhas oligoléticas é apontada como importante fator para a quebra do sistema da tristilia, levando à seleção e fixação de fenótipo semi-homostílico auto-compatível (Barrett 1978, Alves dos Santos 2002). Entretanto, no presente estudo, constatou-se a redução da hercogamia recíproca em regiões onde as comunidades de visitantes florais não apresentavam probóscide longas o suficiente para promover polinizações legítimas. Provavelmente, as regiões onde não foram encontradas abelhas oligoléticas estão ocorrendo altos níveis de transferência de pólen de forma ilegítima (auto-polinização, geitonogamia e polinização intra-morfo), conduzindo à esse cenário característico de depressão endogâmica (redução da hercogamia recíproca e variação nos tratos florais) (Baker 1966, Ornduff 1972, Barrett 1988, 1992).

Os resultados indicam que regiões com inundação de baixa magnitude e curta duração, apresentam abelhas especialistas de longa probóscide, por outro lado, as regiões com inundação de magnitude média a alta e duração longa a

comunidade de abelhas é composta por espécies generalistas e de probóscide curta. A magnitude e imprevisibilidade do pulso de inundação aparentam ser forças seletivas para a ocorrência de abelhas especializadas em Pontederiaceae na região central do Pantanal. Algumas hipóteses para ausência dessas espécies nessas regiões podem ser levantadas. A primeira hipótese seria que a longa duração da inundação restrinja a oferta de áreas de nidificação para essas abelhas. Estudos sobre a biologia de abelhas especialistas (e.g. *Ancylloscelis*) em polinizar flores de Pontederiaceae são escassos. Em estudo com abelha do gênero no México e Colômbia, a nidificação é realizada no solo e encostas de terra (Michener 1974, Torchio 1974). Com o periódico alagamento da região, que muitas vezes é imprevisível, provavelmente os ninhos sejam alagados impossibilitando o desenvolvimento dessas abelhas. Por outro lado, nas regiões de borda leste e sul do Pantanal (sub-regiões Nabileque, Leque do Taquari e porção NE de Aquidauana), a inundação é muito mais previsível e de curta duração, permitindo a sincrônica ocorrência dessas abelhas com a floração de *E. azurea*.

A segunda hipótese que pode ser levantada para a não ocorrência de abelhas oligoléticas nas regiões com inundação de magnitude média e alta e longa duração do Pantanal está relacionada à grande amplitude de variação das condições encontradas. É provável que os extremos encontrados nessas regiões (períodos de secas e cheias), limitem a capacidade competitiva dessas abelhas causando deslocamento por abelhas e moscas generalistas e exóticas encontradas com frequência na região (e.g. *Apis mellifera* e *Trygona* sp - Boff

2003, obs. pess.). Em um ambiente muito instável e competitivo, interações especializadas são mais prováveis de serem extintas (Solé & Montoya 2001, Memmott *et al.* 2004, Montoya *et al.* 2006, Bascompte & Jordano 2007, Aizen *et al.* 2008).

A terceira hipótese que pode explicar a ausência abelhas especialistas nas regiões com maior intensidade de inundação é a presença massiva de potenciais predadores (aves, anuros, odonatas, aranhas entre outros) (Suttle 2003). Apesar de não apresentar grande número de espécies endêmicas, o Pantanal possui enorme abundância para todos os grupos de organismos, o que é parcialmente atribuída à alta produtividade existente durante a inundação (Harris *et al.* 2005, Junk *et al.* 2006). Estudos com abelhas oligoléticas comparando o desenvolvimento de ninhos, competição com outros visitantes florais, além de pressão de predação sob diferentes regimes de inundação são necessários para compreender os processos que limitam a ocorrência de abelhas de probóscide longa nas regiões com inundação de média a alta magnitude e longa duração no Pantanal.

Apesar de pouco número de populações amostradas na região com inundação de média magnitude e longa duração (sub-região de Miranda e Aquidauana), durante anos de observações não sistemáticas, além de estudos com abelhas e polinização conduzidos na região (Boff 2003), nunca foram encontradas abelhas especialistas em Pontederiaceae. Nessa região, a comunidade de visitantes florais de *E. azurea* é majoritariamente composta por abelhas generalistas e sirfídeos, o qual potencialmente promovem polinizações

ilegítimas. Este é provavelmente um dos fatores responsáveis pela menor reciprocidade hercogâmica nas flores dessa região (ver capítulo 3). Por outro lado, na sub-região do Paraguai, que apresenta inundação de alta magnitude e longa duração, não foram encontradas populações com baixa reciprocidade apesar de também não terem sido capturadas abelhas especialistas. É provável que nesta região, devido às intensas flutuações do nível d'água e por receber sementes e propágulos de praticamente todo o Pantanal, a reprodução sexuada tenha pouca importância, não havendo pressão seletiva para a quebra do sistema da heterostilia.

As abelhas do gênero *Ancyloscelis* são os polinizadores mais eficientes de *E. azurea* encontrados no Pantanal. Alves dos Santos & Wittmann (2000) e Alves dos Santos (2002) reportaram importância similar dessa espécie para polinizações legítimas em populações de *E. azurea* no Sudeste e Sul do Brasil. Além disso, *Ancyloscelis gigas* é apontada como principal polinizador de *E. azurea* na Amazônia (Barrett 1978). A ampla distribuição do gênero aparenta estar associada à distribuição de espécies das famílias de Pontederiaceae e Convolvulaceae (Alves dos Santos 1999). No entanto, abelhas *Centris* e *Sphecidae* também apresentaram morfologia do corpo e comportamento de forrageio suficiente para a realização de cruzamentos legítimos, ao menos para o transporte de pólen entre as anteras médias e estigmas médios, e anteras longas e estigmas de mesma altura. Durante as visitas foi possível verificar contato da cabeça e abdômen com esses tratos florais. O comprimento da probóscide em abelhas *Centris* não aparenta ser o suficiente para atingir as anteras curtas, podendo ser um

polinizador mais, ou unicamente, eficiente para os morfotipos médio e longo. Por outro lado, apesar das abelhas Sphecidae apresentarem longa probóscide (as mais longas entre todos os polinizadores capturados), observações em estereomicroscópio não permitiram ver estruturas (cerdas) para a adesão de grãos de pólen, como o encontrado em *Ancyloscelis* (Alves dos Santos 1999, Alves dos Santos & Wittmann 2000). Em abelhas do gênero *Ancyloscelis*, a probóscide longa é densamente coberta por cerdas, que são extremamente importantes para a adesão de grãos de pólen das anteras curtas e posterior polinização de estigmas curtos (Alves dos Santos 1999, 2002, Alves dos Santos & Wittmann 2000). Investigações mais detalhadas são necessárias para determinar sua respectiva importância para a transferência de pólen de forma legítima em *E. azurea*.

O presente estudo aponta que a composição de visitantes florais bem como sua funcionalidade em *E. azurea* varia conforme diferentes intensidade de inundação no Pantanal. Apesar de amostragens pontuais, o conhecimento básico aqui gerado é importante e concordante com variações na expressão e quebra da tristilia em *E. azurea* no Pantanal, bem como para conhecimento da fauna de visitantes florais dessa região.

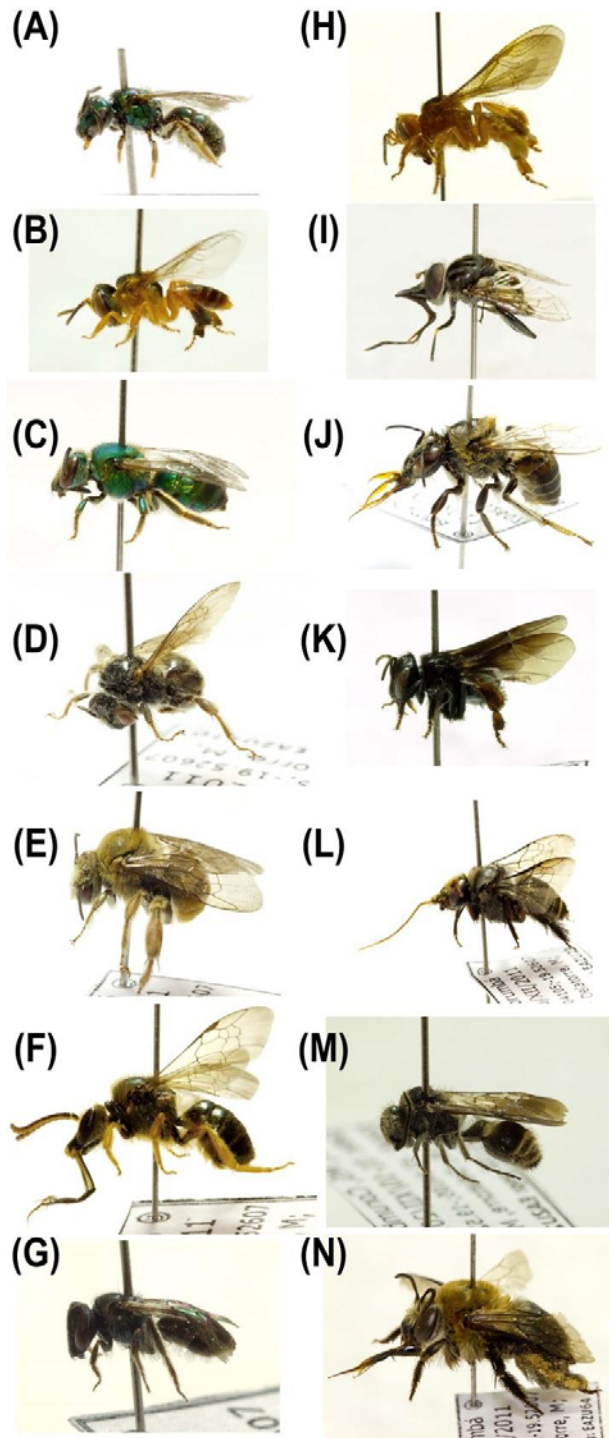


Figura 2. S1. Espécies de visitantes florais de *E. azurea* registradas ao longo das 21 populações amostradas. As fotografias estão ordenadas (A – N) conforme 14 primeiros morfotipos da esquerda para direita na Figura 2.7. As fotos não esta na mesma escala (Fotos: N.L. Cunha).

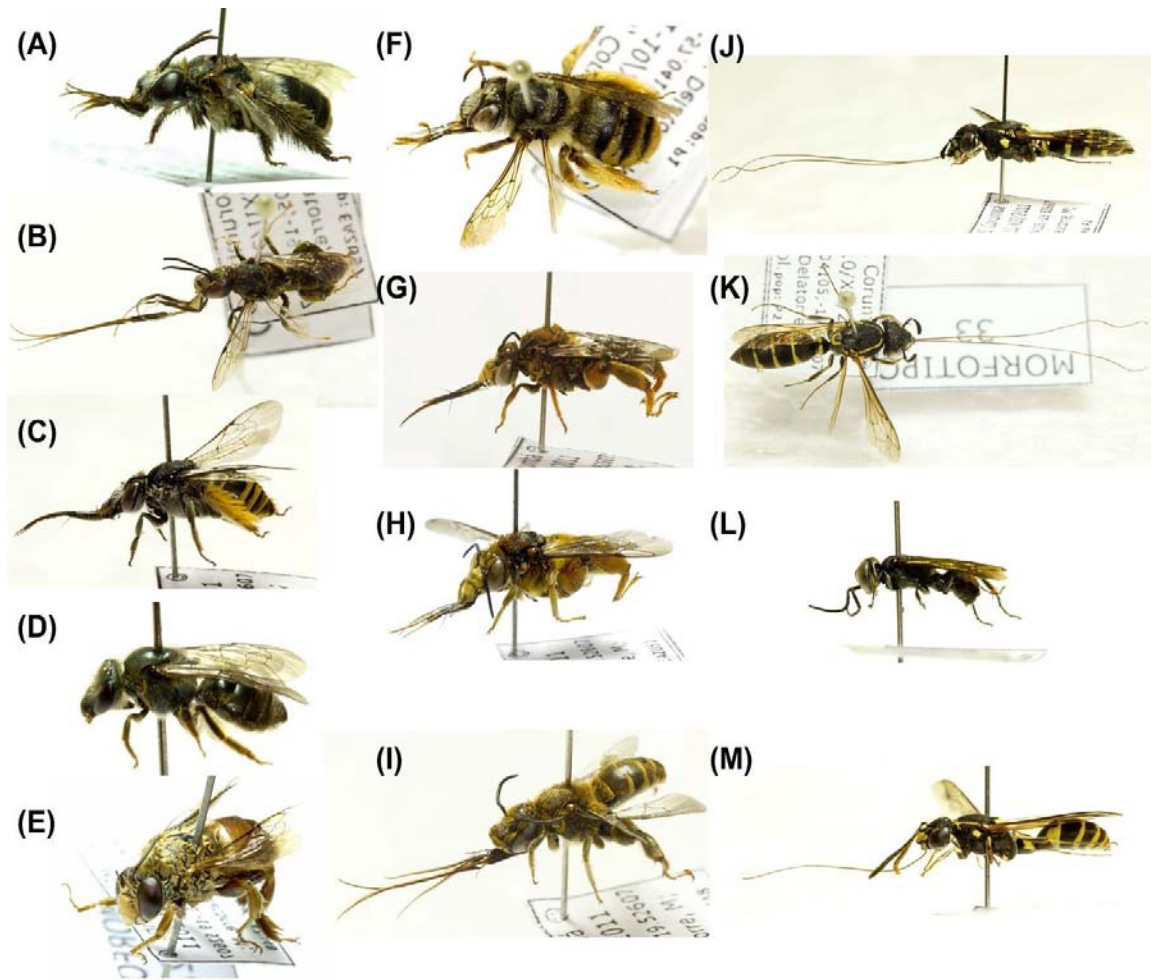


Figura 2. S2. Espécies de visitantes florais de *E. azurea* registradas ao longo das 21 populações amostradas. As fotografias estão ordenadas (A – M) conforme décimo quinto a vigésimo terceiro morfotipo da esquerda para direita na Figura 2.7. As fotos não esta na mesma escala (Fotos: N.L. Cunha).

Página intencionalmente deixada em branco

CAPÍTULO 3

FATORES QUE DETERMINAM A VARIAÇÃO DE TRATOS FLORAIS E QUEBRA DA TRISTILIA EM *EICHHORNIA AZUREA*

RESUMO

Processos ecológicos evolutivos como efeito fundador, deriva genética e seleção natural podem conduzir à variação nas taxas de endogamia em populações de espécies de ampla distribuição. Em plantas, variações morfológicas em estruturas reprodutivas de polimorfismos genéticos como a heterostilia são bons modelos para compreender processos que levam à manutenção ou quebra de sistemas de auto-incompatibilidade. Neste capítulo, uso a espécie tristílica auto-incompatível *Eichhornia azurea* para testar hipótese de variação na expressão da heterostilia em uma região com diferentes intensidades de inundação e composição de visitantes florais. Trinta e quatro populações de *E. azurea* de quatro categorias de inundação tiveram estruturas florais mensuradas e em parte delas os visitantes florais foram amostrados entre dezembro de 2011 e setembro de 2012. Populações de *E. azurea* em região com inundação de média magnitude e longa duração apresentaram maior variação nas estruturas reprodutivas e quebra da tristilia. Além do mais, nessas populações também não foram registrados polinizadores especializados em transferir pólen entre anteras e estigmas de altura equivalente. Por outro lado, populações em região com inundação de baixa magnitude e curta duração apresentaram pouca variação nas estruturas da flor e a presença de abelhas oligoléticas de *E. azurea*. A variação nas estruturas florais de *E. azurea* é explicada por um conjunto de variáveis, dentre elas a distribuição espacial das populações, intensidade de inundação, além da presença de polinizadores de probóscide longa.

PALAVRAS-CHAVE: abelhas oligoléticas, incompatibilidade heteromórfica, planície de alagamento, Pontederiaceae, pulso de inundação, variação floral, variação intraespecífica.

ABSTRACT

Ecological and evolutive process such as founder event, genetic drift and natural selection can lead to variation in selfing taxes in populations with wide distribution. In plants, morphological variations in reproductive structures of genetic polymorphisms such as heterostyly are good models to understand process of maintenance and breakdown of self-incompatibility. At this chapter, I used the tristylous self-incompatible species *Eichhornia azurea* to test the hypotheses of variation in the expression of heterostyly in a region with different flood intensity and floral visitors composition. Thirty four populations of *E. azurea* in four inundations categories were sampled for floral measures and some of them for floral visitors between December 2011 and September 2012. Populations of *E. azurea* in region with medium magnitude and long duration showed higher variation in reproductive structures and breakdown of tristily. In addition, on these populations were not found specialized pollinators for pollen transfer between anthers and stigmas of equivalent height. In the other hand, populations located in region with inundation of low magnitude and short duration presented less variation in floral structures and presence of oligolectic bees of *E. azurea*. The variation on floral morphs structures of *E. azurea* is explained by a group of variables as spatial distribution of populations and its flood intensity, apart from pollinators with long proboscides.

KEY-WORDS: flood pulse, floodplain, floral variation, intraspecific variation, heteromorphic incompatibility, Pontederiaceae, oligolectic bees.

INTRODUÇÃO

Embora os efeitos negativos da endogamia sejam bastante conhecidos (Fisher 1930, Muller 1932), a frequente transição entre a fertilização cruzada obrigatória e a auto-fertilização têm intrigado cientistas desde há muito tempo (Darwin 1878, Fisher 1941, Stebbins 1974). Enquanto a exogamia promove a variabilidade genética em populações e manutenção da heterozigosidade (Fisher 1930, 1941), a endogamia tem as vantagens da transmissão de dois conjuntos de genes para a prole (indivíduos exogâmicos somente transmitem um único conjunto do material genético), e garantia reprodutiva independente de vetores especializados para a polinização (Lei de Baker – Baker 1967, Pannel & Barrett 1998). Devido à maior capacidade de transmissão de seu genótipo, plantas auto-compativeis podem aumentar rapidamente sua frequência genotípica em populações naturais (Fisher 1941, Lloyd 1979). No entanto, a redução da aptidão desses indivíduos por depressão endogâmica pode limitar ou inibir a transmissão desses genótipos (Takebayashi & Morrell, 2001).

Polimorfismos genéticos associados a características reprodutivas podem ser úteis como ferramentas para compreender os processos evolutivos que moldam o sistema reprodutivo de espécies de plantas, dentre eles a heterostilia (Barrett *et al.* 2009). A heterostilia é um polimorfismo genético incomum em angiospermas onde espécies podem apresentar dois (distilia) ou três morfotipos florais (tristilia) que diferem entre si quanto à altura das anteras e estigmas (Darwin 1878, Charlesworth 1979, Ganders 1979, Barrett 1993). Este polimorfismo é geralmente acompanhado de características auxiliares, como relação proporcional do tamanho dos grãos de pólen e estigma com a

altura das anteras (e.g. anteras mais altas tem grãos de pólen maiores e estigmas mais altos papilas estigmáticas maiores), e inversamente proporcional para a quantidade de grãos de pólen (menor em anteras mais altas), além de incompatibilidade heteromórfica (Ganders 1979, Barrett 1993). A formação de frutos e sementes é maior por meio de transferência de grãos de pólen de altura equivalente ao estigma receptor (hercogamia recíproca). Em espécies tristílicas é possível três combinações entre pólen e estigma, caracterizadas como polinizações cruzadas legítimas (anteras longas com estigma longo, anteras médias com estigma médio, anteras curtas com estigma curto). As demais combinações possíveis entre anteras e estigmas de alturas diferentes (polinização cruzada ilegítima, autopolinização) resultam em pouca ou nenhuma semente. A morfologia floral da heterostilia é apontada como um mecanismo que promove a transferência de pólen de forma precisa entre anteras e estigmas de altura equivalente mediada por agentes polinizadores (Darwin 1877, Ganders 1979, Barrett & Glover 1985, Baena-Díaz *et al.* 2012), além de evitar as interferências entre pólen e estigma dentro da mesma flor (Lloyd & Webb, 1992).

A tristilia é mais rara que a distilia dentre as angiospermas, reportada principalmente para quatro famílias não relacionadas filogeneticamente – Amaryllidaceae, Lythraceae, Oxalidaceae e Pontederiaceae. Há enorme variação na incompatibilidade trimórfica e de características auxiliares da tristilia entre espécies e famílias (Barrett 1993, Graham & Barrett 2004). Apesar da origem polifilética, a herança da tristilia aparenta ser governada por um par de loci di-alélicos *S* e *M*, com ação epistática de *S* em relação a *M*. Os genótipos *SSMM*, *SSMm*, *SSmm*, *SsMM*, *SsMm* e *Ssmm* expressam o

morfotipo curto, *ssMM* e *ssMm* morfotipo mediano, e *ssmm* morfotipo longo (Charlesworth 1979, Barrett 1993). A natureza genética da expressão da tristilia ainda é controversa (Ness 2011), alguns autores apoiam a ação de um supergene (Ernst 1955, Ornduff 1972, Lewis 1975, Lewis & Jones 1992, Barrett 2002, Barrett & Shore 2008), enquanto outros, na ação pleiotrópica de alguns genes na expressão de vários tratos reprodutivos característicos da tristilia (Charlesworth 1979, Dulberguer 1992).

A manutenção da tristilia em populações auto-incompatíveis opera sob seleção de frequência-dependência negativa dos morfotipos florais e cruzamentos indiscriminados entre morfotipos mediados por vetores especializados (Ganders 1979, Charlesworth 1979, Barrett 1993). Variações nas proporções entre morfotipos florais dentro e entre populações por processos estocásticos (flutuações populacionais naturais, efeito fundador e gargalo populacional), ou determinísticos (como desempenho diferenciado entre morfotipos florais, ausência de polinizadores eficientes e stress ambiental) podem conduzir à quebra da tristilia por meio da seleção de fenótipo auto-compatível conhecido como semi-homostílico, o qual apresenta redução do tamanho floral e estames dispostos próximos ao estigma para auto-fertilização (Baker 1966, Ornduff 1972, Barrett 1988). Variações na expressão da hercogamia (distância entre as anteras e estigmas) e de características auxiliares da heterostilia entre morfotipos florais podem ser interpretados como respostas fenotípicas para evolução da endogamia. No entanto, populações de espécies tristílicas podem apresentar processos distintos para a manutenção e quebra do sistema da heterostilia (Ornduff 1972, Charlesworth 1979, Weller

1986, Barrett 1988, Eckert *et al.* 1996, Mat & Lovett-Doust 2005, Colautti *et al.* 2010, Ness *et al.* 2010).

Eichhornia (8-9 espécies) é gênero de ervas palustre estritamente aquático pertencente a Pontederiaceae, pequena família das monocotiledôneas com cerca de 6-9 gêneros e 35-40 espécies (Angiosperm Phylogeny Group 2009). Análises baseadas em caracteres morfológicos (Eckenwalder & Barrett 1986), DNA plastidial (Graham & Barrett 1995) e DNA nuclear (Ness 2011, Ness *et al.* 2011), sustentam que o gênero não é monofilético. A tristilia ocorre em três espécies (*E. azurea*, *E. crassipes* e *E. paniculata* - Barrett 1988) que diferem quanto à forma de vida, presença de reprodução clonal, e distribuição geográfica. *Eichhornia crassipes* é aquática flutuante livre de vida longa, forte reprodução clonal, com distribuição nativa para porção sul Neotropical, no entanto amplamente distribuída como exótica nas regiões tropicais de todo o mundo (Barrett & Forno 1982). *Eichhornia paniculata* é aquática emergente, anual ou perene de vida curta, não apresenta reprodução clonal, localmente abundante, porém com distribuição restrita ao nordeste brasileiro, Cuba, Jamaica, Nicarágua, e registros esporádicos para Equador e Centro-Oeste brasileiro (Ness 2011). Por outro lado, *Eichhornia azurea* é aquática flutuante fixa, rizomatosa e perene, possui reprodução clonal e ocorre em toda a região Neotropical. A quebra da tristilia já foi reportada para populações das três espécies, principalmente devido a fatores como ausência de polinizadores eficientes, efeito fundador, deriva genética, gargalo populacional e stress ambiental (Barrett 1977, 1978, Alves do Santos 2002, Barrett *et al.* 2009). A maior parte dos estudos que abordam a quebra da tristilia foi realizada com *E. paniculata* (Barrett & Husband 1990, Barrett & Harder 1992, Barrett *et al.* 2009),

e poucos estudos com *E. crassipes* (Barrett & Forno 1982) ou *E. azurea* (Barrett 1978, Barrett 2000, Alves do Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). Entretanto, nenhum dos estudos buscou compreender quais fatores ecológicos podem determinar a evolução da endogamia e a quebra da tristilia em *E. azurea* em ampla escala geográfica.

O objetivo deste capítulo é compreender quais fatores podem determinar a evolução da endogamia e a quebra da tristilia em *E. azurea*. Especificamente responder: (i) A comunidade de visitantes florais, bem como o tamanho e comprimento médio do corpo e probóscide, dos visitantes florais em cada população e categorias de inundação, explicam as variações nos tratos florais associados à tristilia em *E. azurea*? (ii) Existe variação na hercogamia recíproca entre populações de *E. azurea* no Pantanal? (iii) A variação na hercogamia recíproca é explicada pelo gradiente de intensidade de inundação no Pantanal e tamanho populacional? (iv) Regiões que apresentam flores com variação nas características auxiliares da tristilia e hercogamia também apresentam flores menores? (v) A variação nos tratos florais e hercogamia de *E. azurea* é explicada espacialmente no Pantanal?

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de estudo

O Pantanal, localizado no centro da América do Sul (15 – 20 ° sul), é caracterizado pela depressão geológica Rio Paraguai; é circundado pelos planaltos de Maracaju-Campo Grande e Taquari-Itiquira a leste, Guimarães e Parecis a norte, Urucum-Amolar a oeste e Bodoquena a sul (Assine 2003).

Representa a maior planície alagável da Terra com cerca de 135.000 km² constituído de área inundável (Silva & Abdon 1998, Assine 2003) e 160.000 km² ao todo (Junk & Nunes da Cunha 2005), com altitude entre 80 e 190 metros.

A origem das terras úmidas e sistema lacustre do Pantanal ocorreram na transição entre o Pleistoceno e Holoceno, onde o Pantanal passou por diversas mudanças climáticas: 40.000 – 8000 anos atrás frio e seco, 8000 – 3500 anos atrás quente e úmido, 3500 – 1500 anos atrás quente e seco, e 1500 – Presente quente e úmido (Ab'Saber 1988; Iriondo & Garcia 1993; Stevaux 2000). A alternância entre períodos secos e úmidos levou a diferentes padrões de deposição de sedimento no Rio Paraguai e seus tributários, resultando em um mosaico de distintas formações geomorfológicas atualmente cobertas por vários tipos vegetacionais (Short & Blair, 1986; Jimenez-Rueda *et al.*, 1998). A formação do Pantanal foi marcada por altas taxas de extinção de organismos aquáticos decorrentes dos extremos períodos secos, havendo vários eventos de recolonização destes organismos provindos da região baixa do Rio Paraguai, Cerrado ao entorno, bacia Amazônica e Chaco (Junk & Nunes da Cunha 2005). É provável que o pequeno intervalo de tempo desde o último período de extrema seca tenha sido insuficiente para o desenvolvimento de espécies endêmicas, além do mais, é possível presumir que o papel da inundação na imigração e transporte passivo dos organismos tenha limitado processos de especiação por segregação espacial das populações.

Atualmente, a maior força estruturadora da paisagem pantaneira é o pulso de inundação anual, geralmente unimodal, que apresenta considerável variação espacial e temporal na planície alagável (Hamilton *et al.* 1996, Silva &

Abdon 1998, Junk & Da Silva 1999, Junk 2000, Hamilton 2002, Gonçalves *et al.* 2011). A água pluvial é retida na planície durante os períodos chuvosos causando o alagamento de extensas áreas, e escoar vagarosamente no sentido leste-oeste em direção ao rio Paraguai através de riachos permanentes e temporários, regionalmente conhecidos como *corixos* e *vazantes*, respectivamente. A variação sazonal dos níveis da água é de 2 a 5 m no rio Paraguai, entretanto, as demais regiões do Pantanal geralmente apresentam valores menores (Ponce 1995, Hamilton *et al.* 1996, Hamilton 2002).

O clima da região é Tropical (Aw de Köppen) com estações secas e úmidas bem definidas (maio-outubro e novembro-abril, respectivamente). A precipitação anual varia de 1000-1500 mm, com maior parte das chuvas ocorrendo entre novembro e março. Devido à baixa elevação e localização no continente a região está sujeita à penetração de massas de ar polares durante o inverno, podendo reduzir drasticamente as temperaturas e causar pequenas geadas (Hamilton *et al.* 1996, Hamilton 2002).

O Pantanal apresenta grande variedade de sub-regiões com distintas características geomorfológicas, hidrológicas e ecológicas. O número de sub-regiões e os critérios para sua classificação são diferentes entre autores, podendo levar em consideração percepções tradicionais, limites políticos, características geomorfológicas e hidrológicas (EDIBAP 1979, Adámoli 1982, RADAMBRASIL 1982). Neste trabalho seguirei a nomenclatura proposta por Hamilton *et al.* (1996), que divide o Pantanal em 10 sub-regiões. As sub-regiões são classificadas de acordo com os maiores rios que fluem através delas, e esses limites refletem diferenças hidrológicas e geomorfológicas entre sub-regiões (Figura 3.1), o que é de particular importância para este estudo.

Além do mais, também será usada a classificação proposta por Gonçalves *et al.* (2011) para as diferentes magnitudes e durações do pulso de inundação no Pantanal.

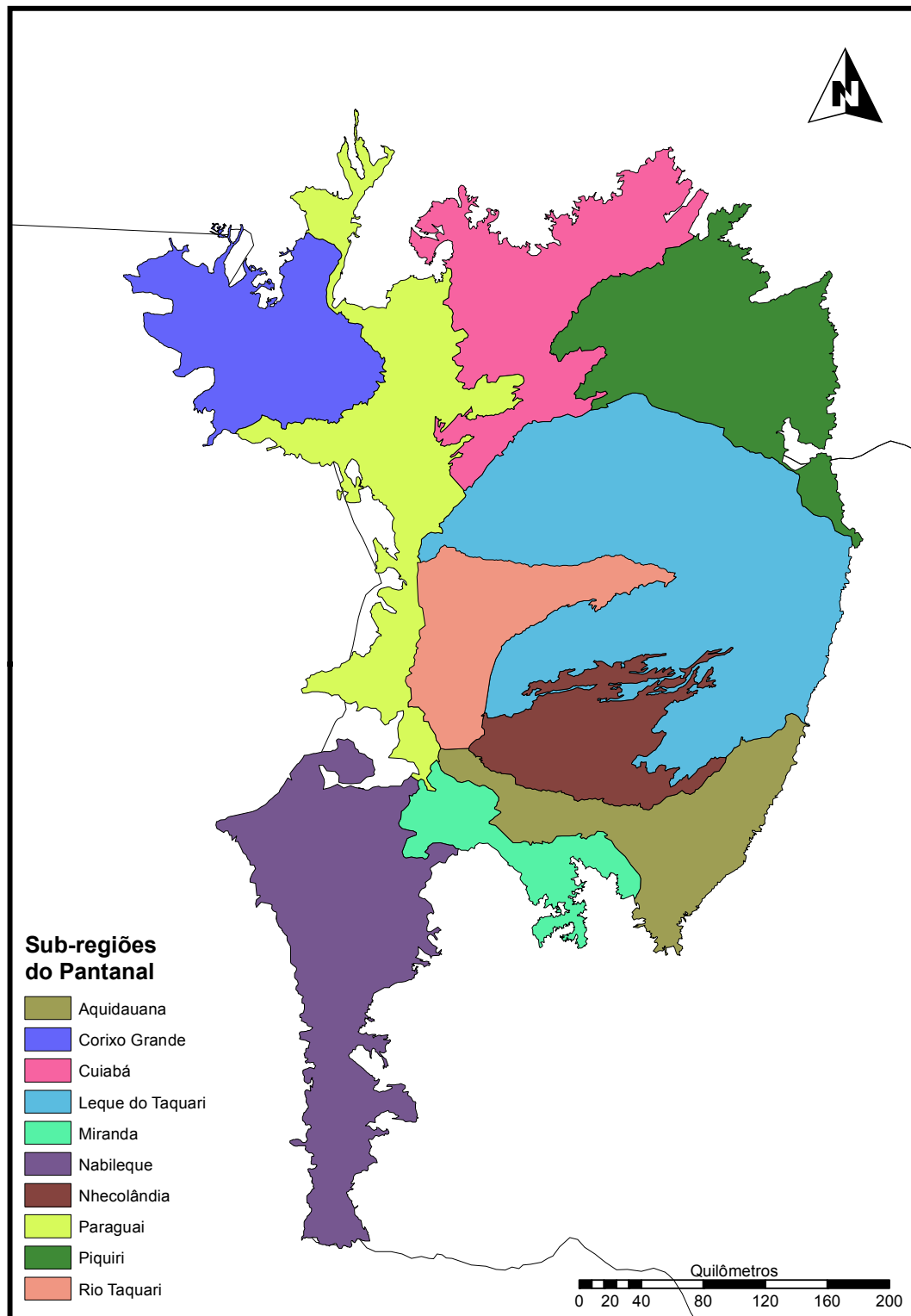


Figura 3.1. Sub-regiões do Pantanal de acordo com Hamilton *et al.* 1996.

Descrição da espécie

Eichhornia azurea é macrófita aquática perene, rizomatosa, flutuante fixa no substrato (Pott & Pott 2000). Pode ser encontrada em ambientes aquáticos das bacias hidrográficas da Amazônia, Paraguai e Paraná (Barrett 1978; Bianchi *et al.* 2000; Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009, Cunha *et al.* 2012). As flores variam de azul a roxa com seis pétalas de bordo fimbriado e guia de néctar (Figura 3.2). Cada flor possui três estames longos e três curtos conectados à parte interna do tubo floral e altura do estigma variando conforme o comprimento do estilete, o que caracteriza o morfotipo floral (Figura 3.3). O número de flores por inflorescência pode variar (30-120) com as características físico-químicas da água e nutrientes (Bueno 2003, Cunha N.L. observação pessoal). Ao final da floração, a inflorescência prostra na água para o desenvolvimento dos frutos (Alves dos Santos 2002, Cunha & Fischer 2009). No Pantanal, *E. azurea* pode apresentar flores ao longo do ano inteiro em corpos de água permanente, enquanto em lagoas efêmeras a floração ocorre a partir da metade do período das chuvas (fevereiro) (Cunha N.L. observação pessoal). Os frutos são cápsulas que podem conter mais de 100 sementes (~1-2 mm de comprimento). As flores são visitadas por diversa gama de moscas, borboletas e abelhas, no entanto os cruzamentos legítimos são realizados por abelhas solitárias de probóscide longa, (Barrett 1978, Alves dos Santos & Wittmann 2000, Alves dos Santos 2002). Apresenta pronunciada reprodução clonal, e os níveis de incompatibilidade heteromórfica variam de compatível (quebra da tristilia, Barrett 1978, Alves dos Santos 2002), a moderada (Cunha & Fischer 2009) e forte (Bianchi *et al.* 2000).

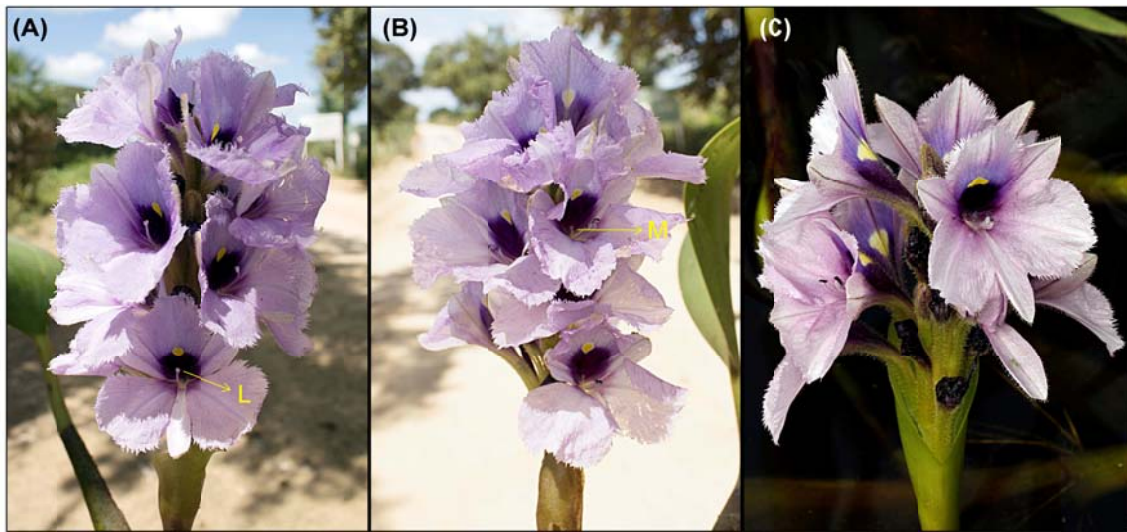


Figura 3.2. Inflorescência do morfotipo longo (A), médio (B) e curto (C) de *Eichhornia azurea*, Pantanal. As setas indicam os estiletes longo (L) e médio (M), o estilete curto não é visível por estar no fundo do tubo floral (Fotos:N.L. Cunha).

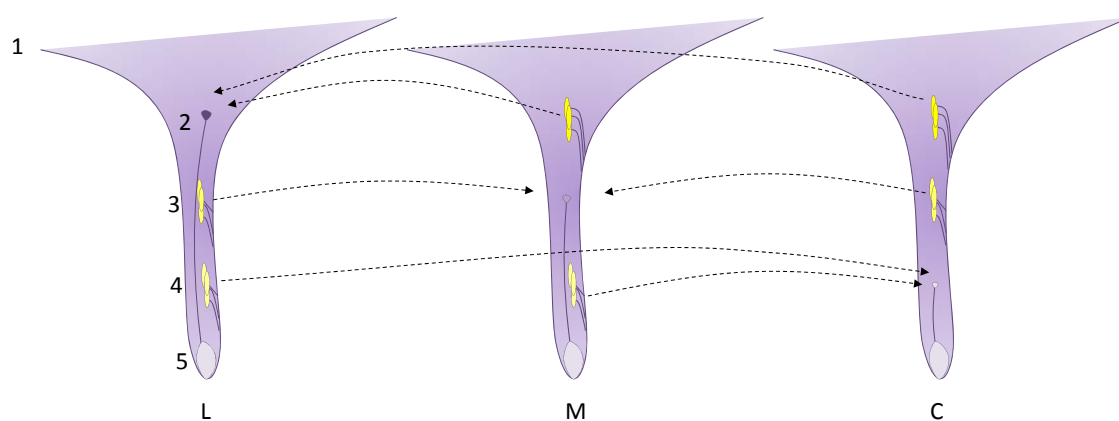


Figura 3.3. Representação esquemática dos morfotipos heterostílicos em *Eichhornia azurea*.

(1) pétalas, (2) estigma e estilete, (3) primeiro conjunto de três anteras, (4) segundo conjunto de três anteras, (5) ovário. Notar que as estruturas foram descritas para o morfotipo longo, no entanto todas ocorrem em todos os morfotipos, porém em alturas diferentes. As setas apontam a transferência de pólen sob polinizações legítimas (hercogamia recíproca), qualquer outra combinação entre pólen e estigma resultará em poucas ou nenhuma semente.

Amostragem

Trinta e quatro populações de *Eichhornia azurea* de oito sub-regiões do Pantanal e quatro categorias de inundação (considerando a magnitude e duração) foram amostradas entre o período de dezembro de 2011 e setembro de 2012, além de uma população amostrada em novembro de 2007. (Tabela 3.1, Figura 3.4). Foram amostradas lagoas permanentes, temporárias, lagoas formadas ao longo de estradas devido à escavação e uso da terra para construção da estrada (aterro), corixos, vazantes, e canais que conectam grandes lagos aos rios. A distância entre populações variou entre 1 a 670 km (Figura 3.4). O tamanho populacional foi determinado a partir de estimativa visual do número de rametos e inflorescências. Sete categorias foram criadas baseadas no número de inflorescências na população: 1-25; 26-50; 51-100; 101-200; 201-500; 501-1000 e >1000. Morfotipos florais são facilmente identificados em campo. Em populações com até 200 indivíduos, foram verificadas todas as inflorescências.

As populações também foram classificadas de acordo com a magnitude e duração da inundação. Foram criadas quatro grandes categorias baseadas em conhecimento prévio da região e informações disponíveis na literatura em relação à magnitude e duração da cheia em cada região (Gonçalves *et al.* 2011): magnitude baixa de curta duração (baixa e curta), magnitude média e de média duração (média e média), magnitude média e de longa duração (média e longa), e magnitude alta de longa duração (alta e longa)

Tabela 3.1. Total de populações amostradas por sub-região para a realização de medidas florais, de pólen e captura de polinizadores de *Eichhornia azurea* no Pantanal.

Sub-região			Dados tomados					
População	Tamanho	Estrutura populacional	Filetes e estiletes	Pétalas	Pólen	Polinizadores		
Nabileque								
EAZU64	1_25	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU65	101-200	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU66A	1_25	Monomórfica	X	X				
EAZU66C	51-100	Trimórfica	X	X	X			
EAZU68	101-200	Trimórfica	X		X			
EAZU70	501-1000	Trimórfica	X	X	X			
EAZU73	201-500	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU74	201-500	Trimórfica	X	X		X		
Aquidauana								
EAZU35	51-100	Trimórfica	X	X	X			
EAZU46	51-100	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU47	51-100	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU50	201-500	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU57	101-200	Trimórfica	X	X	X	X		
Miranda								
EAZU23	1000-10000	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU24	101-200	Trimórfica	X	X	X			
EAZU25	101-200	Trimórfica	X	X	X			
EAZU40	101-200	Trimórfica	X	X	X			
EAZU42	101-200	Trimórfica	X	X	X			
EAZU45	101-200	Trimórfica	X	X	X			
Medalha	201-500	Trimórfica	X					
Nhecolândia								
EAZU05	501-1000	Dimórfica	X					
EAZU17	51-100	Trimórfica	X	X	X			
EAZU32	201-500	Trimórfica	X	X	X			
Leque Taquari								
EAZU48	51-100	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU58	1_25	Monomórfica	X		X	X		
EAZU59	51-100	Trimórfica	X	X	X	X		
EAZU60	51-100	Monomórfica	X		X	X		
EAZU62	1_25	Dimórfica	X		X			
Paraguai								
EAZU78	1000-10000	Trimórfica	X	X		X		
EAZU79	1000-10000	Trimórfica	X	X				
EAZU80	1000-10000	Trimórfica	X	X				
EAZU81	1000-10000	Trimórfica	X	X		X		
Rio Taquari								
EAZU86	1000-10000	Trimórfica	X			X		
Cuiabá								
EAZU84	1000-10000	Trimórfica	X	X				
Total	8	34	-	-	34	27	24	16

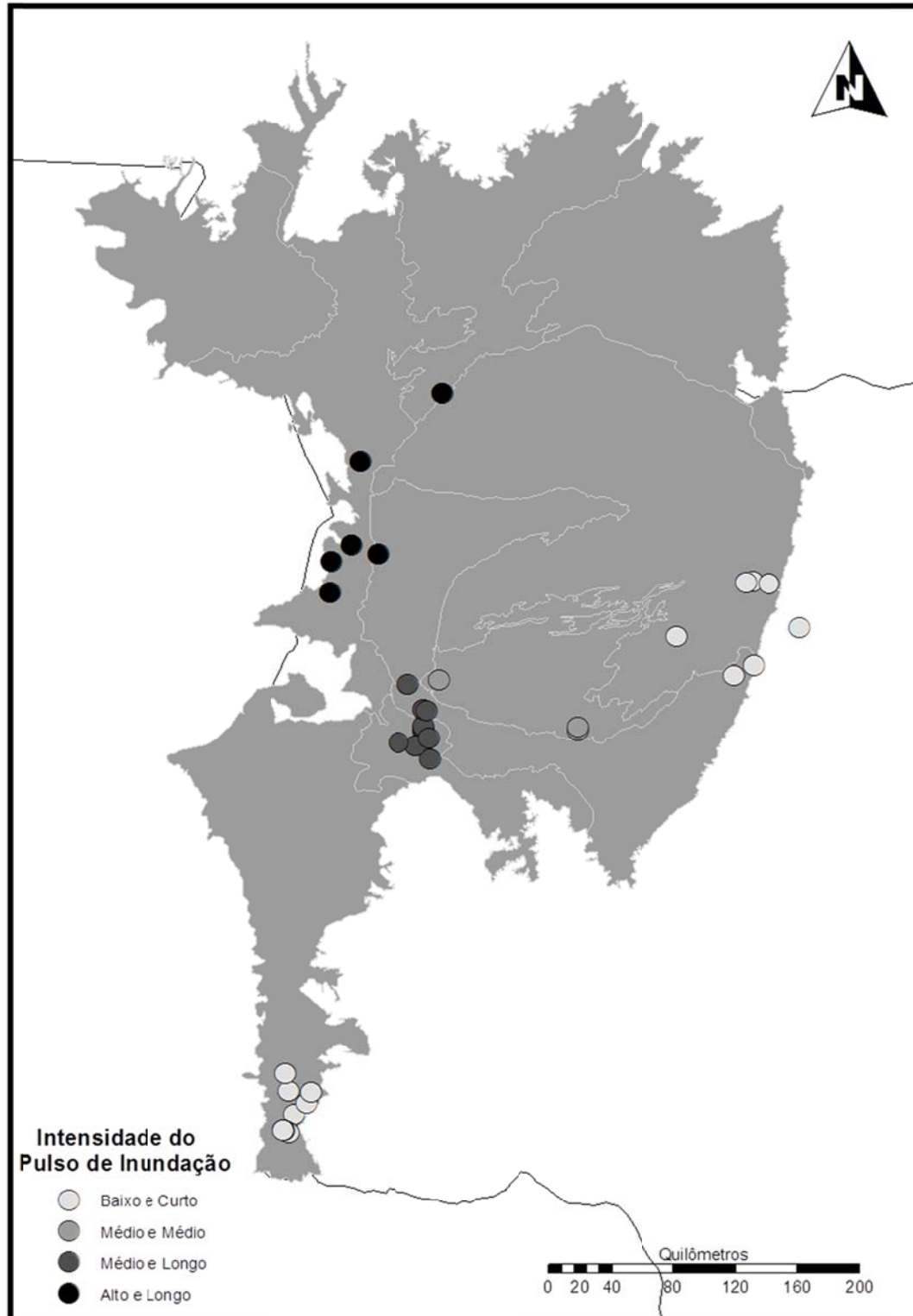


Figura 3.4. Distribuição das 34 populações de *Eichhornia azurea* amostradas em novembro de 2007, e entre 2011 e 2012 no Pantanal para morfometria floral.

Morfometria floral

As medidas florais foram tomadas em campo com auxílio de paquímetro digital ($\pm 0,1$ mm). Uma flor por inflorescência foi amostrada ao azar e realizada onze medidas nas pétalas, filetes e pistilos. As medidas da altura das anteras e estigma foram realizadas seguindo a ordem de acesso às estruturas florais, visando não comprometer a qualidade dos dados tomados com o manuseio das flores (e.g. as flores do morfotipo longo tiveram o estigma medido primeiramente, seguido dos conjuntos de anteras, enquanto no médio primeiramente foram medidas as anteras longas e na sequência o estigma e anteras) (Figura 3.5). Variações florais dentro do mesmo indivíduo são pouco comuns, e no geral uma única flor é o suficiente para representar as características florais do indivíduo amostrado. No entanto, algumas anomalias no mesmo indivíduo foram encontradas, e também já reportadas para *E. paniculata* (Barrett & Husband 1990), estes casos são analisados descritivamente.

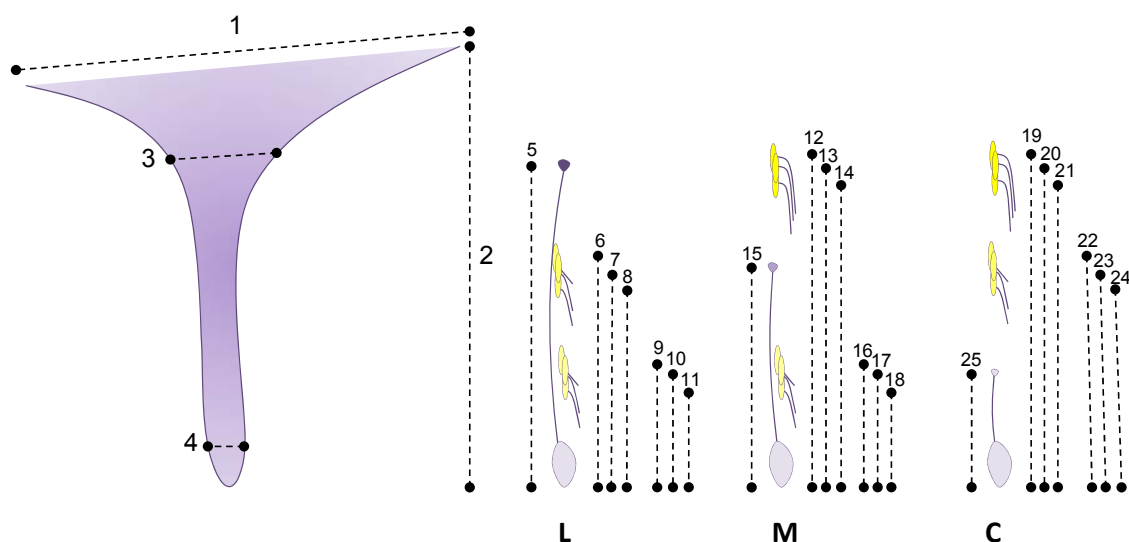


Figura 3.5. Esquema das medidas florais tomadas em flores de *Eichhornia azurea* no Pantanal. (1) largura das pétalas, (2) comprimento da flor, (3) largura da abertura do tubo floral, (4) largura na base do tubo floral, (5) comprimento do pistilo do morfotipo longo, (6), (7) e (8) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *m* do morfotipo longo; (9), (10) e (11) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *c* do morfotipo longo, (12), (13) e (14) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *l* do morfotipo médio, (15) comprimento do pistilo do morfotipo médio, (16), (17) e (18) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *c* do morfotipo médio, (19), (20) e (21) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *l* do morfotipo curto, (22), (23) e (24) comprimentos do primeiro, segundo e terceiro filetes *m* do morfotipo curto, (25) comprimento do pistilo do morfotipo curto.

Medição e contagem dos grãos de pólen

As medidas de grãos de pólen foram realizadas em 24 populações de cinco subregiões do Pantanal (Tabela 3.1, Figura 3.6). A estimativa do número de grãos de pólen foi realizada com o auxílio de hemocitômetro (Câmara de Neubauer) e microscópio óptico com aumento de 40x. Anteras fechadas encontradas em botões florais em pré-antese foram utilizadas para a contagem do pólen. Em observações preliminares, não foi constatado diferenças na quantidade e tamanho dos grãos de pólen entre anteras abertas em flores e fechadas em botões florais. A utilização de botões assegura que a antera não tenha sofrido perda de grãos de pólen por dispersão. Inicialmente, em duas populações (pop 17 e pop 23), foram realizadas contagens e medidas de grãos pólen em todas as anteras (três longas e três curtas) de um mesmo botão floral. Ao verificar que não existem diferenças no tamanho e quantidade de grãos de pólen entre anteras do mesmo conjunto (Figura 3.S e Figura 3.S), para indivíduos das demais populações foi adotada a contagem de somente uma antera por conjunto de anteras, escolhida ao azar. No campo, após a realização das medidas florais em dado indivíduo, botões florais eram armazenados em microtubo plástico com álcool 70%. Em laboratório uma antera por conjunto foi retirada com pinça e macerada em microtubo com 0,8 ml de solução de álcool 70% e surfactante Tween 80. A adição de surfactante quebra a tensão superficial e promove a homogeneização dos grãos de pólen na solução. Os microtubos eram agitados em vórtex (~15 - 20 segundos) e retirado 0,1 ml da solução com auxílio de micropipeta de precisão. A fração da solução foi adicionada no hemocitômetro para a realização da estimativa dos grãos de pólen (Maêda 1985).

A medição dos grãos de pólen foi realizada com auxílio de objetiva milimetrada. Após a contagem, cinco grãos de pólen foram escolhidos para medições do comprimento. A média aritmética do comprimento dos grãos de pólen foi utilizada para representar o tamanho do grão de pólen do conjunto de anteras de determinada altura e morfotipo/indivíduo.

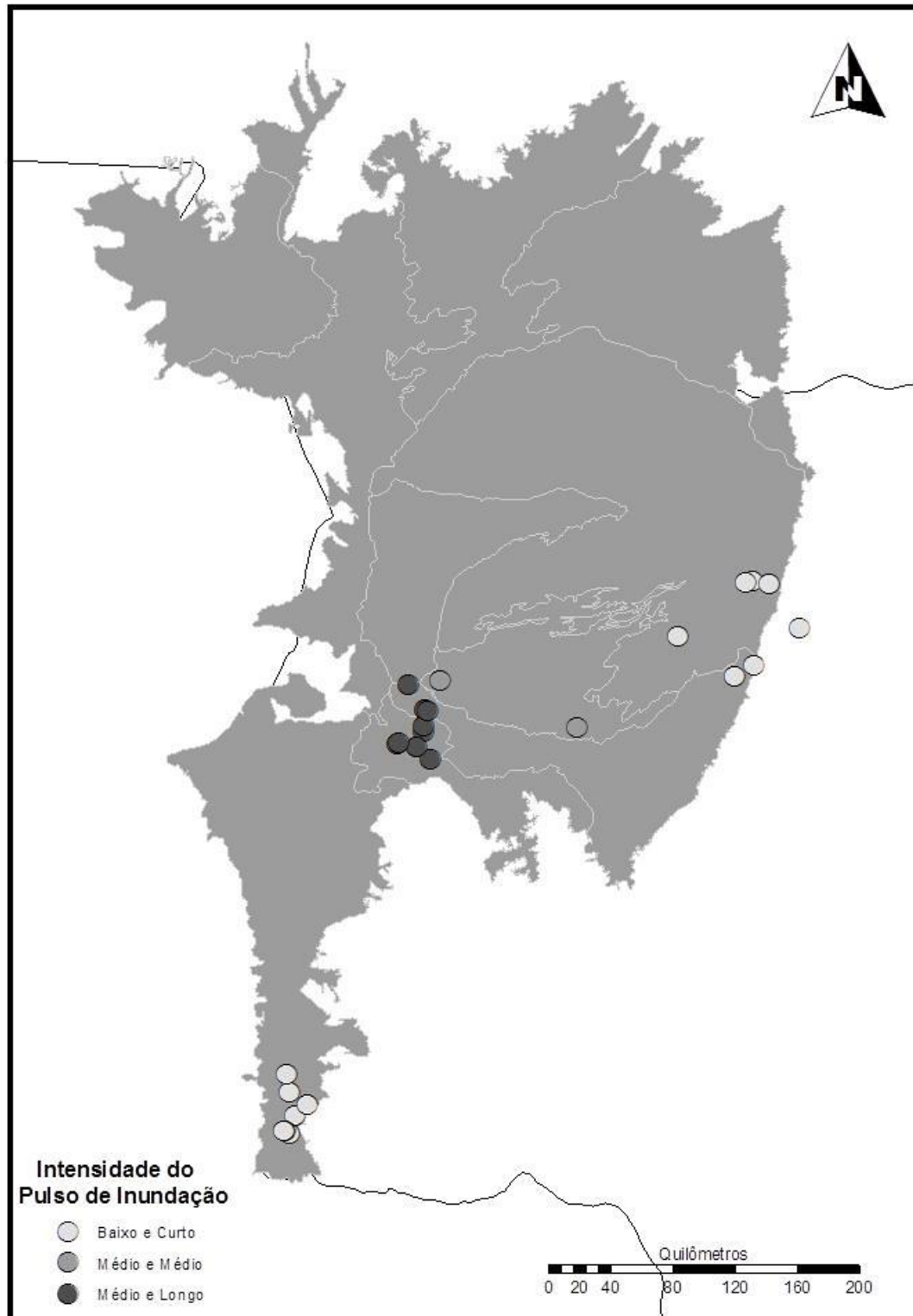


Figura 3.6. Distribuição das 24 populações de *E. azurea* amostradas entre 2011 e 2012 no Pantanal para medição e contagem dos grãos de pólen.

Visitantes florais

A amostragem de visitantes florais de *E. azurea* foi realizada de forma qualitativa pelo método de busca ativa utilizando redes entomológicas. O esforço aplicado foi proporcional à oferta de visitantes na população e número de morfotipos identificados em campo. Os visitantes foram mortos com Acetato de Etila, composto que promove a projeção da probóscide dos invertebrados quando mortos, armazenados individualmente em microtubos e congelados. Em laboratório, os visitantes foram alfinetados, etiquetados e identificados até o menor nível taxonômico possível. O comprimento da probóscide, a largura e o comprimento do corpo de cada visitante floral foram medidos com estereomicroscópio óptico e objetiva.

Análises de dados

Medidas florais

As quatro medidas do perianto tiveram sua dimensionalidade reduzida a partir de análise de componentes principais (PCA), o número de eixos escolhidos para representar o tamanho e forma floral foi determinado utilizando o critério de Kaiser-Guttman, onde somente eixos com variância acima de 1 são utilizados. Em algumas populações não foi possível mensurar as pétalas das flores, havendo somente medidas dos estiletes e filetes. Dessa forma, foram declarados modelos incluindo a forma e tamanho floral, como somente parte das populações amostradas, e modelos excluindo essas informações, com todas as populações. Para relacionar o tamanho e forma floral com a reciprocidade (ver abaixo) foi calculado o valor médio dos “scores” da PCA

obtidos em cada população, e este valor utilizado para representar o tamanho e forma floral da população.

Visitantes florais

A dimensionalidade dos dados da comunidade de visitantes florais foi reduzida através de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Foi criada matriz de associação, utilizando o índice de Sorensen, da matriz de presença e ausência dos visitantes florais registrados em cada população, e estes dados submetidos à PCoA. Regressão linear entre as distâncias originais da matriz (matriz de associação de Sorensen) e as distâncias finais obtidas pelos “scores” da ordenação (matriz de associação Euclidiana) foi utilizada para determinar a porcentagem de variância recuperada pela ordenação e então determinado quantos eixos foram utilizados para representar a composição de espécies.

Em cada população foi calculado o comprimento e largura média do tórax, e comprimento médio da probóscide de cada espécie de visitante floral. A partir do valor médio dessas variáveis para cada espécie de visitante em cada população, foi calculado um valor médio dessas variáveis para a população, e estes valores utilizados para representar essas variáveis em cada população nos testes inferenciais (Hurlbert 1984).

Testes inferenciais

Inicialmente são apresentados padrões globais, para todas as características florais mensuradas em *E. azurea* no Pantanal. Para testar as relações das

variações das estruturas florais ao longo do gradiente de inundação foram usados Modelos Generalizados Lineares Mistos (GLMM, Pinheiro & Bates, 2000; Zuur *et al.* 2009), utilizando distribuição gaussiana e métodos restritivos de máxima verossimilhança (REML). Para a realização dos modelos mistos foi utilizado o comprimento da estrutura floral como variável dependente, o tipo de estrutura floral (anteras *c*, *m*, *l* e estiletes *C*, *M*, *L*) interagindo com a intensidade do pulso de inundação, além de tamanho populacional como variável independente com efeito fixo, e indivíduo aninhado à população como variável independente com efeito aleatório. A determinação de variáveis fixas e aleatórias é baseada, respectivamente, no conhecimento prévio ou não da variável tomada. Estruturas florais são variáveis categóricas que apresentam certa variação, no entanto é esperado que, dentro de uma população, os morfotipos curtos sejam menores que os médios, o qual é menor que os longos, assim como para os conjuntos de anteras, portanto atribui-se efeito fixo. Por outro lado, desconhecemos as variações dentro de cada indivíduo e população, logo se trata como efeito aleatório. Inicialmente foram declarados modelos mais complexos, os quais foram sucessivamente simplificados através da remoção das variáveis sem efeito significativo. O melhor modelo foi escolhido pelo melhor ajuste dos resíduos e menores AIC (Critério de informação Akaike) e BIC (Critério de Informação Bayesiano). Modelos distintos para diferentes objetivos foram utilizados devido às diferenças no esforço amostral (Tabela 3.2), e também para evitar super parametrização dos modelos devido às limitações de tamanho amostral e excesso de variáveis com diversos níveis fatoriais. Para testar a relação do comprimento das estruturas florais com pulso de inundação, tamanho populacional, composição e tratos funcionais

médios dos visitantes florais, foram usados os modelos presentes na Tabela 3.2 e 3.3; para testar se o tamanho das flores é explicado pelo morfotipo floral e pulso de inundação, foi utilizando o seguinte modelo:

$$\text{scores da PCA} \sim \text{Estrutura floral} + \text{Morfotipo floral} + \text{Pulso de Inundação}, \text{Populações}$$

Sendo o scores da PCA a variável dependente, Estrutura floral, Morfotipo floral e Pulso de Inundação variáveis independentes de efeito fixo, e Populações variável independente de efeito aleatório.

Comparações *a posteriori* para determinação das diferenças entre níveis de cada fator no modelos gerados, foi realizada com análises de comparações múltiplas das médias utilizando contrastes específicos de Tukey (Hothorn *et al.* 2008).

Tabela 3.2. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação dos comprimentos das estruturas florais de *Eichhornia azurea* com intensidade do pulso de inundação e tamanho populacional. O modelo com melhor ajuste está com realce cinza.

Modelo	Variável dependente	Variável independente		AIC	BIC
		Efeito fixo	Efeito aleatório		
a	comprimento (mm)	~ Estrutura floral * Pulso de Inundação + tamanho populacional	indivíduo / População	30774.69	30965.35
b	comprimento (mm)	~ Estrutura floral + Pulso de Inundação + tamanho populacional	indivíduo / População	30782.93	30966.78
c	comprimento (mm)	~ Estrutura floral * Pulso de Inundação	indivíduo / População	32134.08	32311.12

Tabela 3.3. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação dos comprimentos das estruturas florais de *Eichhornia azurea* com a comunidade de visitantes florais, além do tamanho e comprimento médio do corpo e probóscide, respectivamente, dos visitantes florais em cada população e sub-região do Pantanal. O modelo com melhor ajuste está com realce cinza.

Modelo	Variável dependente	Variável independente								AIC	BIC						
		Efeito fixo				Efeito aleatório											
a	comprimento (mm)	~	Estrutura floral	*	Pulso de Inundação	+	média probóscide	+	PCoA1	+	PCoA2	Indivíduo /	População	11431.66	11571.51		
c	comprimento (mm)	~	Estrutura floral	*	Pulso de Inundação	+	média probóscide	+	PCoA1	+	PCoA2	Indivíduo /	População	11431.66	11571.51		
b	comprimento (mm)	~	Estrutura floral	*	Pulso de Inundação	+	média corpo	+	média probóscide	+	PCoA1	+	PCoA2	Indivíduo /	População	11432.77	11578.44
d	comprimento (mm)	~	Estrutura floral	*	Pulso de Inundação	+	PCoA1	*	PCoA2			Indivíduo /	População	11442.20	11576.24		
e	comprimento (mm)	~	Estrutura floral	*	Pulso de Inundação	+	média probóscide	PCoA1	*	PCoA2		Indivíduo /	População	11673.86	11761.32		

Para testar se a variação na hercogamia recíproca é explicada pelo gradiente de intensidade de inundação no Pantanal e tamanho populacional, inicialmente foi calculado o índice de reciprocidade entre morfotipos florais. A reciprocidade foi calculada com o programa RECIPRO (Sánchez *et al.* 2013). O resultado gerado é um índice que pode variar de 0 a 1, onde 0 são populações que apresentam o valor mínimo de reciprocidade entre indivíduos e 1 valor máximo.

A relação da reciprocidade com o tamanho populacional e sub-regiões do Pantanal foi analisada com Modelos Generalizados Aditivos para Localização de Escala e Forma (“GAMLSS - Generalized Additive Models for Location Scale and Shape”) utilizando distribuição beta-inflacionada (Rigby & Stasinopoulos 2005). Modelos de regressão beta são bastante robustos para modelar dados com limites de amplitude, pois apresentam diversos formatos de distribuição de densidade que variam com os parâmetros da distribuição, permitindo a visualização de relações que seriam obscuras em modelos lineares e correlações (Rigby & Stasinopoulos 2005, Ospina & Ferrari 2012). No entanto, dados de proporção, taxas e índices incluem valores de zero e um que não podem ser descartados. Neste caso a distribuição beta não permite inferências probabilísticas, e inclusão de modelos com 0 e 1 inflacionados aparentam ser ideais para situações que a variável de interesse é contínua e restrita aos intervalos de $[0,1)$, $(0,1]$ ou $[0,1]$ e esta relacionada a outras variáveis através de uma estrutura de regressão (Ferrari & Cribari-Neto 2004). Os 0s gerados pelos valores de índices podem ser ocasionados por grandes desvios na proporção de cada morfotipo mensurado para o cálculo do índice, ou pelo fato de a população realmente apresentar baixo valor de reciprocidade.

Para testar se existe relação da variação do tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras, e se esta variação é explicada pelo regime de inundação, tamanho populacional, composição de visitantes florais e tamanho médio do corpo e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população, foram utilizados os modelos da Tabela 4. Para testar se existe relação da quantidade de grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras, e se esta variação é explicada pela inundação do Pantanal, tamanho populacional, composição de visitantes florais e tamanho médio do corpo e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população, foram utilizados os modelos da Tabela 3.5.

Todas as análises e gráficos foram realizados com a “Unidade de Interface Gráfica R” (R Core Team, 2013), com auxílio dos pacotes “vegan” (Oksanen *et al.* 2012), “gamlss” (Rigby & Stasinopoulos, 2005), “lme4” (Bates *et al.* 2012), “nlme” (Pinheiro *et al.* 2012), “multcomp” (Hothorn *et al.* 2008), “reshape” (Wickham, 2007), “plyr” (Wickham, 2007), “doBy” (Højsgaard *et al.* 2012), “lattice” (Sarkar, 2008) e “ggplot2” (Wickham, 2009).

Tabela 3.4. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação do tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de *E. azurea* com diferentes níveis de pulso de inundação do Pantanal, tamanho populacional, composição de visitantes florais e tamanho médio do corpo e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população. O modelo com melhor ajuste esta com realce cinza.

Modelo	Variável dependente	Variável independente										AIC	BIC							
		Efeito fixo								Efeito aleatório										
a	tamanho polén	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2	População	3581.31	3633.58				
b	tamanho polén	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	média torax	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2	População	3594.53	3646.81
c	tamanho polén	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2	População	3597.10	3653.71		
d	tamanho polén	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	Tamanho populacional	+	média torax	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1 + Eixo PCoA 2	População	3612.57	3673.51
e	tamanho polén	~	Altura da antera	*			Pulso de Inundação	+	Tamanho populacional	+	média torax	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1 + Eixo PCoA 2	População	3612.57	3673.51

Tabela 3.5. Seleção de modelos mistos generalizados para testar a relação da quantidade de grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de *E. azurea* com diferentes níveis de pulso de inundação do Pantanal, tamanho populacional, composição de visitantes florais e tamanho médio do corpo e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população. O modelo com melhor ajuste esta com realce cinza.

Modelo	Variável dependente	Variável independente										AIC	BIC									
		Efeito fixo									Efeito aleatório											
a	quantidade de pólen	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	média torax	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2		População	11950.52	12015.79	
b	quantidade de pólen	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2						População	11950.94	12011.88	
c	quantidade de pólen	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	Tamanho populacional	+	média torax	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2	População	11950.98	12020.56
d	quantidade de pólen	~	Morfotipo floral	+	Altura da antera	*	Pulso de Inundação	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2				População	11963.8	12024.73	
e	quantidade de pólen	~	Altura da antera	*			Pulso de Inundação	+	Tamanho populacional	+	média torax	+	média corpo	+	média probóscide	+	Eixo PCoA 1	+	Eixo PCoA 2	População	11989.07	12050.01

RESULTADOS

Análises descritivas

Morfometria floral

Foram medidas 961 flores de *E. azurea*, distribuídas em 343, 298 e 320 dos morfotipos L, M e C, respectivamente. Agrupando os dados, independentemente das sub-regiões do Pantanal e intensidade do pulso de inundação, o comprimento médio (mm) do estilete (desvio padrão) foi 30,95 ($\pm$ 4,64), 21,59 ($\pm$ 2,26) e 12,99 ($\pm$ 1,46), para os morfotipos florais L, M e C, respectivamente (Tabela 3.6). O comprimento médio dos filetes longos, M x l e C x l (morfotipo x altura da antera), foi respectivamente, 28,98 (4,55) e 29,55 (3,88), enquanto dos médios, L x m e C x m, foi respectivamente 21,10 (2,94) e 20,65 (2,95), e curtos, L x c e M x c, foi respectivamente 11,99 (2,24) e 12,12 (2,11) (Tabela 3.6). Houve correspondência entre a altura dos estigmas e a altura equivalente das anteras, para os valores globais de comprimento das estruturas reprodutivas de *E. azurea* no Pantanal. Entretanto, os estiletes são, em média, levemente mais compridos que os conjuntos de filetes (0,5 - 1 mm). O desvio padrão do comprimento dos estiletes e filetes longos é até duas vezes maior que o encontrado para os estiletes e filetes médios e curtos. Por outro lado, os estiletes e filetes curtos apresentaram menor variação de comprimento. Muitas flores não apresentavam clara separação entre os conjuntos de anteras e altura do estigma, conferindo a estas flores a condição de semi-homostilia (Figura 3.7, Figura 3.8). Em seis indivíduos foram encontrados flores semi-homostílicas e flores com clara hercogamia na mesma inflorescência. Esses casos foram raros, e unicamente registrados nas regiões de Miranda e

Aquidauana (populações EAZU 23, 25, 46), regiões com pulso de inundação de média intensidade de longa duração.

Tabela 3.6. Comprimento médio (mm), desvio padrão (DP), mínimo (min.), máximo (max.), número de flores (n), e populações (pop (n)) dos tratos florais medidos (Morfotipo L: longo, M: Médio, C: Curto, Estil: Estilete, l: longo, m: médio, c: curto) em *Eichhornia azurea* em cada condição de inundação do Pantanal.

Magnitude e duração de Pulso de inundação	Morfotipo floral	Estrutura floral	Comprimento (mm)					pop (n)
			média	DP	Coef. Var.	min.	max.	
Baixa e Curta	L	Estil	33.09	3.22	0.10	23.26	40.36	95
	M	l	30.97	3.24	0.10	18.70	40.34	111
	C	l	31.14	3.08	0.10	23.55	41.90	107
	M	Estil	22.31	1.59	0.07	16.44	25.72	111
	L	m	22.28	2.54	0.11	16.12	34.67	95
	C	m	21.86	2.24	0.10	14.23	28.21	107
	C	Estil	13.48	1.21	0.09	10.69	16.50	111
	L	s	12.72	1.82	0.14	7.89	18.12	95
	M	s	12.74	1.78	0.14	8.27	21.98	107
Média e Média	L	Estil	32.95	2.73	0.08	25.17	38.84	25
	M	l	30.66	3.07	0.10	23.40	37.00	25
	C	l	30.03	3.12	0.10	20.39	37.50	28
	M	Estil	21.19	1.59	0.07	17.60	23.80	25
	L	m	21.81	2.78	0.13	12.98	27.13	25
	C	m	20.30	3.03	0.15	11.51	28.26	28
	C	Estil	12.95	1.13	0.09	9.88	16.41	28
	L	s	12.40	2.19	0.18	6.27	18.88	25
	M	s	11.99	1.92	0.16	8.00	15.86	25
Média e Longa	L	Estil	28.19	4.84	0.17	10.45	37.67	169
	M	l	26.09	4.92	0.19	11.50	36.33	124
	C	l	27.14	4.17	0.15	12.00	36.00	128
	M	Estil	20.50	2.64	0.13	10.06	24.67	124
	L	m	19.79	2.95	0.15	10.11	29.50	169
	C	m	19.12	3.17	0.17	8.61	29.60	128
	C	Estil	12.11	1.45	0.12	8.50	15.67	128
	L	s	11.12	2.34	0.21	2.50	21.15	169
	M	s	11.26	2.26	0.20	4.62	21.86	124
Alta e Longa	L	Estil	34.05	1.50	0.04	31.17	37.46	54
	M	l	30.91	2.11	0.07	26.35	35.98	38
	C	l	31.27	2.09	0.07	26.88	36.21	57
	M	Estil	23.20	1.18	0.05	20.21	25.44	38
	L	m	22.40	1.83	0.08	17.81	27.60	57
	C	m	21.66	2.02	0.09	16.06	27.44	57
	C	Estil	13.88	1.20	0.09	10.34	15.90	57
	L	s	13.01	1.60	0.12	9.28	17.00	54
	M	s	13.11	1.64	0.13	9.58	17.72	38
Total	L	Estil	30.95	4.64	0.15	10.45	40.36	343
	M	l	28.98	4.55	0.16	11.50	40.34	298
	C	l	29.55	3.88	0.13	12.00	41.90	320
	M	Estil	21.59	2.26	0.10	10.06	25.72	298
	L	m	21.10	2.94	0.14	10.11	34.67	343
	C	m	20.65	2.95	0.14	8.61	29.60	298
	C	Estil	12.99	1.46	0.11	8.50	16.50	320
	L	s	11.99	2.24	0.19	2.50	21.15	343
	M	s	12.12	2.11	0.17	4.62	21.98	320

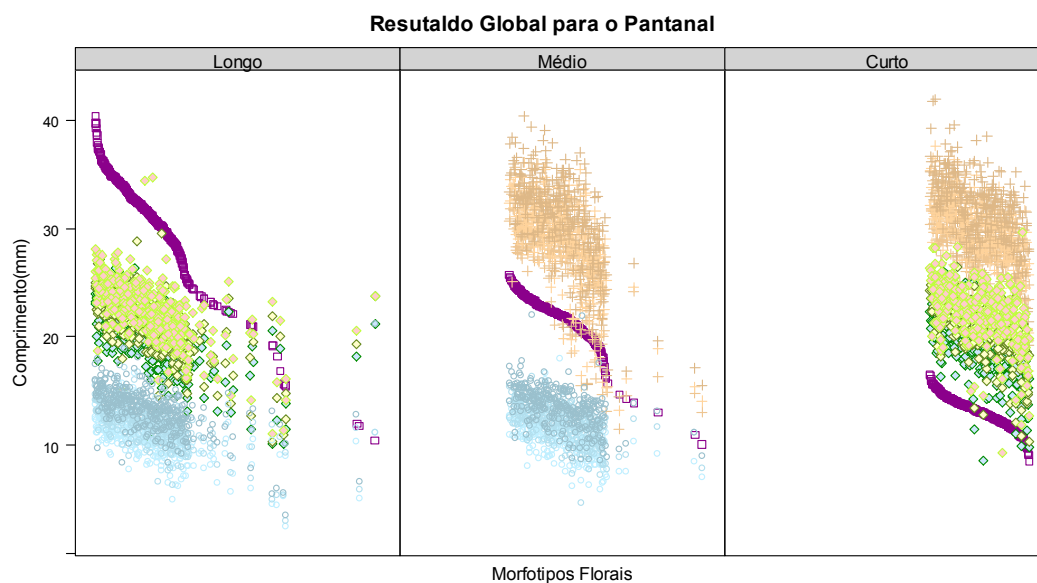


Figura 3.7. Variação na altura dos estigmas e anteras entre os morfotipos florais da espécie trístilica *Eichhornia azurea* no Pantanal. Os símbolos quadrados correspondem às alturas dos estigmas, os em forma de “sinal positivo” ao conjunto de anteras longas, losangos indicam as alturas das anteras médias, e círculos às anteras curtas. Notar gradiente de cor dentro do mesmo nível de altura da antera, o qual corresponde às medidas das alturas das três anteras dentro de um mesmo conjunto (e.g. Morfotipo Longo, antera curta1, curta2 e curta3, ver figura 3.3 e 3.5). As flores estão ranqueadas pela altura do estigma (maior para menor) dentro de cada morfotipo floral. Importante notar a sobreposição das anteras e estigmas em várias flores em todos os morfotipos florais.



Figura 3.8. Flores semi-homostílicas registradas nas sub-regiões de Miranda, Aquidauana e Nabileque. É possível determinar de qual morfotipo floral a semi-homostilia derivou, a partir da inserção dos filetes no tubo floral. (A) linha de flores semi-homostílicas derivadas do morfotipo longo, (B) derivadas do morfotipo médio, e (C) derivadas do morfotipo curto. Notar que a altura do estigma em cada tipo semi-homostílico, pode ficar correspondente aos dois níveis de altura das anteras (e.g. B flor 1 e flor 3). Setas brancas apontam a localização do estigma e colchetes o conjunto de anteras o qual é sobreposto. As flores não estão na mesma escala. (Fotos N.L. Cunha).

Grande parte dessas flores sem clara separação entre anteras e estigmas foi encontrada nas regiões de Miranda e Aquidauana, inundação de média magnitude e longa duração, além de dois casos isolados na região do Nabileque e Nhecolândia (Figura 3.8 e 3.9).

Analisando unicamente as alturas dos estigmas, as populações localizadas em áreas com pulso de inundação de média magnitude e longa duração (sub-regiões de Miranda e porção oeste de Aquidauana) apresentaram menores valores de comprimento médio, sendo o morfotipo longo o que apresentou maior discrepância em relação ao encontrado em populações localizadas em áreas sob diferentes intensidades de pulso de inundação (morfotipo longo, Miranda 28,19 mm, demais regiões 32,95 mm – 34,05 mm) (Tabela 3.6). Nestas populações, os menores valores registrados do comprimento dos estiletes do morfotipo longo e médio são equivalentes ao encontrado nos morfotipos médios e curto em outras regiões (Tabela 3.6, Figura 3.10). No entanto, os valores máximos encontrados nessas regiões são similares ou muito próximos aos reportados para as demais sub-regiões amostradas (Tabela 3.6, Figura 3.10). A enorme variação nas populações dessas regiões pode ser observada pelos maiores coeficientes de variação, podendo ser até três vezes maiores que os encontrados nos demais níveis de inundação.

O comprimento médio dos filetes, similarmente ao encontrado para a altura dos estigmas, foi menor nas populações sob pulso de inundação de média magnitude e longa duração - regiões de Miranda e oeste de Aquidauana (Tabela 3.6, Figura 3.10). As alturas dos filetes longos em populações localizadas sob essas condições são até 5 mm menores que a média das

longas encontradas para populações com diferentes magnitudes de pulso de inundação, e os filetes médios até 3,5 mm menores (Tabela 3.6, Figura 3.10). É possível verificar que existe grande dispersão das medidas dessas estruturas florais, e que grande parte das anteras longas das regiões com pulso de inundação médio e longo apresentam comprimento muito próximo ao encontrado nas anteras médias dessas e outras regiões (Figura 3.10). Para o comprimento dos filetes, com exceção das populações de Miranda, a variação média entre níveis de altura é menor que a encontrada para estigma (Figura 3.10).

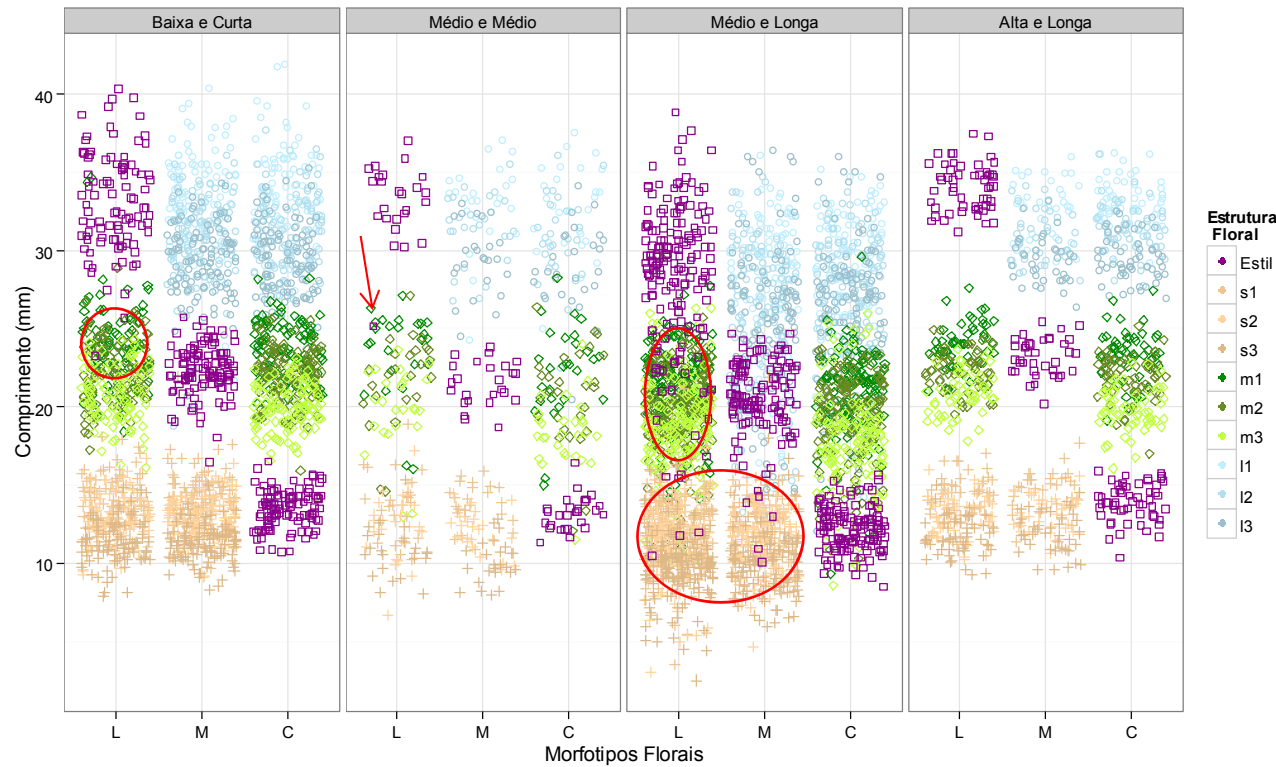


Figura 3.9. Variação da altura dos estigmas e anteras de morfotipos florais de *Eichhornia azurea* entre regiões do Pantanal com diferentes intensidades do e pulso de inundação. L, M e C correspondem aos morfotipos Longo, Médio e Curto, respectivamente. Estil = estiletes, s1-3 = comprimento dos filetes curtos, m1-3 = comprimento dos filetes médios, l1-3 = comprimentos dos filetes longos. Notar a sobreposição das anteras e estigmas em várias flores (círculos vermelhos e seta), principalmente nas flores de populações em área com intensidade de Inundação de média magnitude e longa duração (sub-regiões de Aquidauana e Miranda), e casos isolados somente para o morfotipo longo na região do Nabileque e Nhecolândia (pulso de inundação baixa e curta, e média e média).

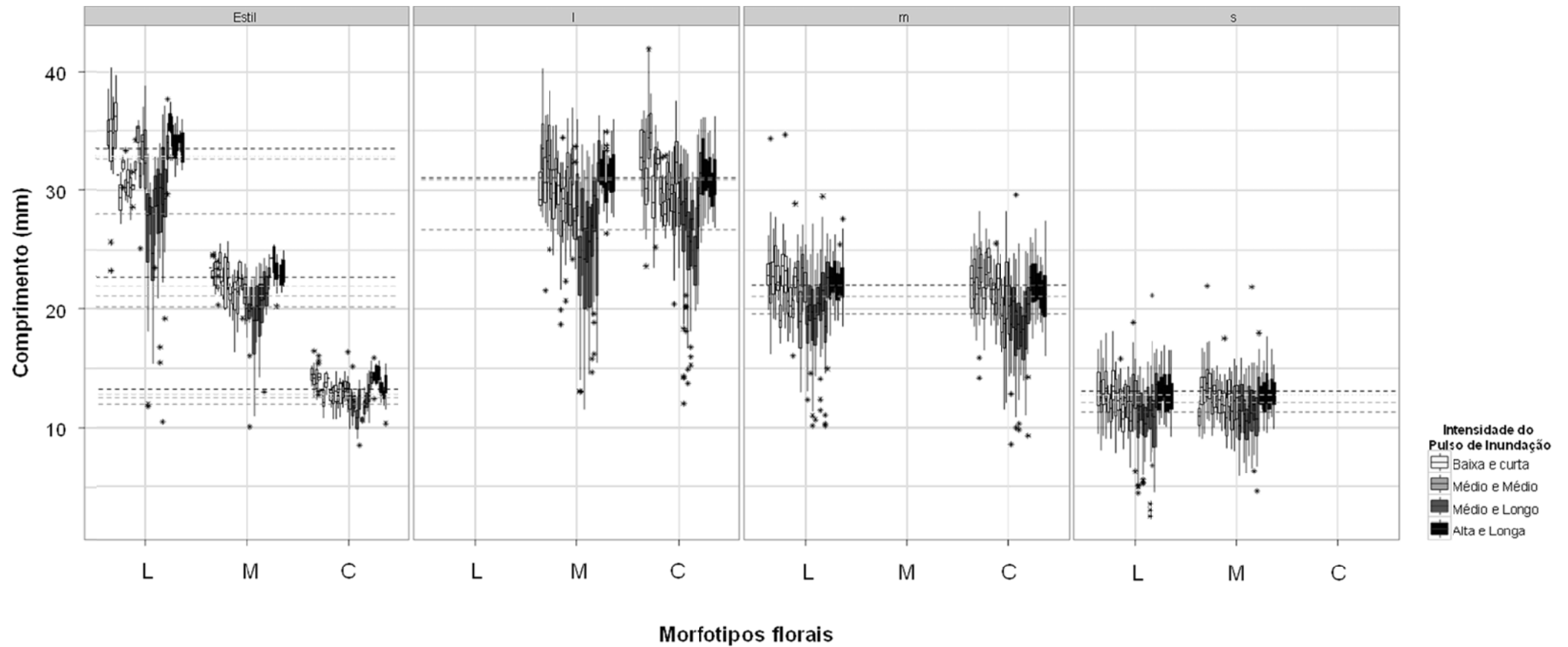


Figura 3.10. Variação na altura dos estigmas (Estil) e anteras (l, m e s) entre morfotipos florais e populações de *Eichhornia azurea* em regiões do Pantanal com diferentes magnitudes de Pulso de Inundação. As linhas pontilhadas correspondem às médias do comprimento do estilete para cada condição de Pulso de Inundação. Notar a maior variação das médias encontrada no morfotipo Longo e menor no morfotipo Curto, além de menores valores registrados para populações em regiões de Pulso de Inundação de médio intensidade e longa duração.

As medidas do perianto das flores de *E. azurea* não variaram entre morfotipos florais (Tabela 3.7). O comprimento médio, a largura da base e a abertura da corola também não variaram entre morfotipos florais (Tabela 3.7). Entretanto, houve variação de tamanho das flores entre regiões do Pantanal. Assim como encontrado para as estruturas reprodutivas a corola das flores foi menor nas regiões com inundação de magnitude média e longa duração (sub-regiões de Miranda e Aquidauana) (Tabela 3.7).

A análise de componentes principais (PCA) utilizando as quatro medidas das pétalas recuperou 70% da variância com o primeiro eixo. De acordo com critério Kaiser-Guttman, somente este eixo foi utilizado para representar o tamanho e forma da flor, por apresentar autovalores maiores que 1. O eixo principal apresentou moderada relação negativa com as quatro variáveis (comprimento da flor: $r = -0,55$, largura das pétalas: $r = -0,51$, largura da base da corola: $r = -0,43$, largura abertura da corola: $r = -0,50$), no entanto o eixo foi invertido para apresentação gráfica por tornar o entendimento mais intuitivo (Figura 3.11). As populações com flores menores foram geograficamente próximas, compreendendo as sub-regiões de Aquidauana, Miranda e Nhecolândia.

Tabela 3.7. Média, desvio padrão (DP), mínimo e máximo da largura e comprimento das pétalas, e largura da base e no final da corola (ver Figura 5) entre morfotipos florais de *Eichhornia azurea* entre regiões do Pantanal com diferentes intensidades de inundação, e agrupando todos os dados (Total).

Perianto	Morfotipo Floral	Intensidade PI	média	DP	Coef. Var.	min.	max.	n	Pop (n)
Comprimento da flor	L	Baixo e Curto	46.9	4.6	0.097	33.0	56.0	79	14
	M		46.4	5.6	0.121	29.4	56.4	91	
	C		47.7	4.1	0.086	35.8	55.6	88	
	L	Médio e Médio	42.4	7.1	0.167	27.0	54.0	25	3
	M		42.7	4.1	0.095	34.6	51.0	25	
	C		44.1	4.8	0.108	36.1	53.3	28	
	L	Médio e Longo	37.6	5.9	0.157	13.8	49.3	158	9
	M		36.4	5.6	0.154	21.3	46.3	113	
	C		38.4	5.4	0.141	19.5	51.5	118	
	L	Alto e Longo	48.6	2.5	0.052	44.3	55.5	22	5
	M		47.1	2.6	0.056	43.0	52.1	12	
	C		49.8	3.5	0.070	40.6	56.5	19	
	L	Total	41.4	7.1	0.172	13.8	56.0	284	31
	M		40.6	7.1	0.175	21.3	56.4	241	
	C		42.9	6.6	0.155	19.5	56.5	253	
Largura da pétala	L	Baixo e Curto	36.7	4.2	0.114	21.8	45.0	79	14
	M		37.2	7.3	0.196	3.0	53.5	91	
	C		37.6	4.9	0.130	25.2	49.2	88	
	L	Médio e Médio	33.9	7.6	0.223	21.0	45.9	25	3
	M		31.4	6.6	0.211	23.4	45.5	25	
	C		33.3	6.3	0.189	21.0	47.1	28	
	L	Médio e Longo	27.6	5.3	0.193	5.1	41.1	158	9
	M		27.4	5.9	0.217	0.3	39.2	113	
	C		28.6	5.2	0.181	14.0	47.5	118	
	L	Alto e Longo	38.8	4.4	0.113	31.1	48.1	22	5
	M		35.4	3.2	0.090	31.0	41.7	12	
	C		39.3	5.1	0.129	31.4	50.9	19	
	L	Total	31.5	6.9	0.220	5.1	48.1	284	31
	M		31.1	7.7	0.247	0.3	53.5	241	
	C		32.8	6.8	0.208	14.0	50.9	253	
Largura da base da corola	L	Baixo e Curto	3.4	0.5	0.161	1.8	4.4	79	14
	M		3.3	0.5	0.141	2.2	4.4	91	
	C		3.3	0.5	0.147	2.2	4.3	88	
	L	Médio e Médio	2.9	0.3	0.112	2.5	3.5	25	3
	M		3.0	0.5	0.167	1.6	3.8	25	
	C		3.0	0.4	0.141	2.1	3.7	28	
	L	Médio e Longo	2.9	0.5	0.184	1.6	4.4	158	9
	M		2.8	0.5	0.174	1.2	4.7	113	
	C		2.9	0.5	0.176	1.5	4.0	118	
	L	Alto e Longo	3.5	0.4	0.111	2.7	4.0	22	5
	M		3.7	0.4	0.118	3.0	4.8	12	
	C		3.7	0.5	0.131	3.0	4.8	19	
	L	Total	3.1	0.6	0.185	1.6	4.4	284	31
	M		3.0	0.5	0.178	1.2	4.8	241	
	C		3.1	0.6	0.179	1.5	4.8	253	
Abertura da corola	L	Baixo e Curto	10.2	1.6	0.154	4.5	13.5	79	14
	M		10.4	1.6	0.154	4.4	14.6	91	
	C		10.3	1.5	0.148	5.2	14.3	88	
	L	Médio e Médio	9.3	1.8	0.193	6.6	13.6	25	3
	M		8.5	1.6	0.190	5.1	11.8	25	
	C		9.5	1.4	0.146	6.9	11.6	28	
	L	Médio e Longo	7.5	2.2	0.289	2.2	13.2	158	9
	M		7.9	2.1	0.266	2.8	13.5	113	
	C		7.8	2.0	0.250	3.4	14.4	118	
	L	Alto e Longo	8.6	1.3	0.150	7.1	12.0	22	5
	M		8.2	1.1	0.133	7.0	10.4	12	
	C		9.1	1.3	0.145	7.1	11.6	19	
	L	Total	8.5	2.3	0.268	2.2	13.6	284	31
	M		8.7	2.2	0.248	2.8	14.6	241	
	C		8.9	2.1	0.231	3.4	14.4	253	

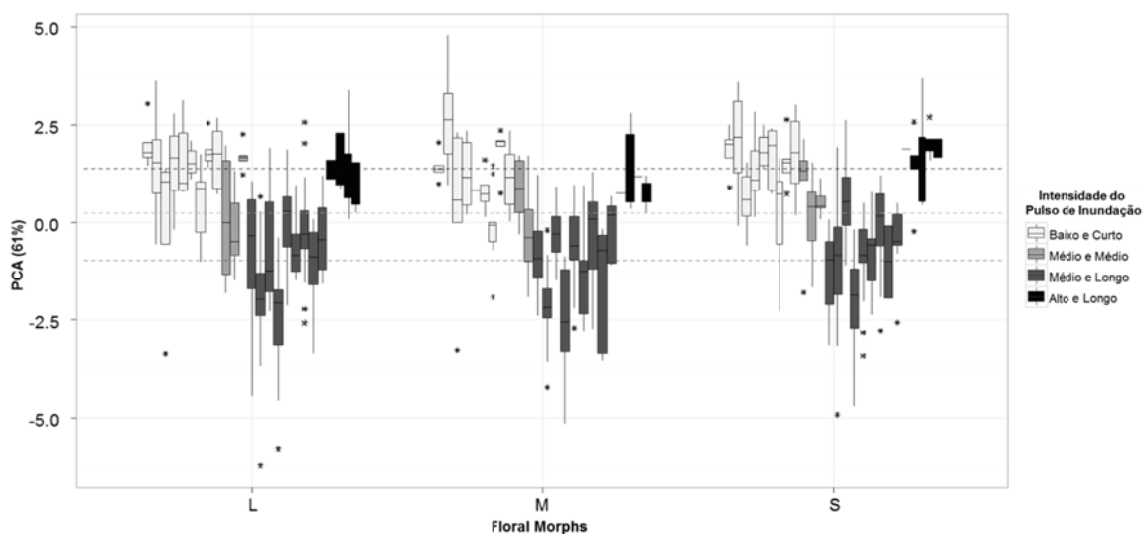


Figura 3.11. Relação do tamanho e forma floral representado pelo componente principal das variáveis: comprimento e largura das pétalas, e largura na base e abertura da corola (70% variância explicada). Todas as variáveis apresentam relação negativa com o eixo principal, porém o eixo foi invertido para auxiliar a interpretação, logo valores positivos correspondem a flores maiores. As linhas pontilhadas representam o valor médio do scores da PCA para cada categoria de pulso de inundação (em regiões com intensidade baixa e curta e alta e longa estão sobrepostas), independente do morfotipo floral.

Medidas de pólen

Agrupando os dados das 24 populações amostradas em cinco sub-regiões do Pantanal, foi estimado o tamanho e quantidade de grãos de pólen em 1215 anteras ($L = 438$, $M = 395$, $C = 382$) de 608 indivíduos distribuídos em 389 anteras de estames longos (l), 408 de estames médios (m) e 418 de estames curtos (c). O tamanho médio do grão de pólen das anteras longas, médias e curtas para o Pantanal foi, respectivamente, $C \times l = 61,5$ e $M \times l = 60,5$, $C \times m = 50,3$ e $L \times m = 49,8$, $L \times c = 38,9$ e $M \times c = 39,4$ (Tabela 3.8, Figura 3.12). Os maiores grãos de pólen foram encontrados nas anteras l ($84 \mu\text{m}$), enquanto os menores nas anteras c ($30 \mu\text{m}$). Dentro da mesma flora, é nítida a diferença do tamanho dos grãos de pólen entre níveis de antera, no entanto, o mesmo nível de antera não difere entre morfotipos florais. (Tabela 3.8, Figura 3.12). O tamanho do pólen das anteras l é mais variável que o encontrado nas m e c . O desvio padrão do tamanho de pólen para essas anteras é 6,7 para $C \times l$ e 8,3 para $M \times l$, sendo praticamente o dobro do encontrado para os grãos de pólen das anteras c (Tabela 3.8, Figura 3.12 A). As flores semi-homostílicas conservavam parcialmente o tamanho do pólen da antera que se encontrava na mesma altura que o estigma. As flores semi-homostílicas derivadas do morfotipo longo, o pólen da antera média alongada apresentava tamanho similar ao comumente encontrado nas anteras médias e assim sucessivamente (média $\pm$ desvio padrão; semi-L, $m = 51,6 \pm 3,05$, $c = 34,2 \pm 3,95$; semi-M, $l = 49,8 \pm 10,99$, $c = 40,1 \pm 4,31$; semi-C, $l = 69,2 \pm 0$, $m = 50 \pm 0$).

Tabela 3.8. Estimativa da média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (Coef. Var.), número de flores e número de populações para medidas do tamanho e quantidade de grãos de pólen entre morfotipos florais de *Eichhornia azurea* em quatro categorias de intensidade do pulso de inundação do Pantanal.

Pulso de Inundação	Morfotipo floral	Altura da antera	Tamanho médio do grão de pólen (μm)			Número médio de grãos de pólen por antera (n)			número de flores	número de populações
			média	DP	Coef. Var.	média	DP	Coef. Var.		
Baixo e Curto	Longo	<i>m</i>	50.8	4.8	0.094	12706	5595	0.440	85	13
		<i>c</i>	38.7	3.0	0.077	19906	7276	0.366	85	
	Médio	<i>l</i>	64.1	6.0	0.093	12711	7376	0.580	90	
		<i>c</i>	39.7	4.1	0.103	19912	7893	0.396	91	
	Curto	<i>l</i>	63.9	6.5	0.102	11283	5875	0.521	92	
		<i>m</i>	51.3	3.7	0.072	16489	6988	0.424	90	
Médio e Médio	Longo	<i>m</i>	50.7	3.6	0.070	11738	8772	0.747	19	9
		<i>c</i>	39.2	3.3	0.083	21634	12175	0.563	19	
	Médio	<i>l</i>	60.6	6.4	0.106	13050	10500	0.805	23	
		<i>c</i>	38.2	2.3	0.059	17384	11539	0.664	23	
	Curto	<i>l</i>	61.1	4.7	0.076	11214	5722	0.510	19	
		<i>m</i>	51.2	5.2	0.102	16327	14691	0.900	19	
Médio e Longo	Longo	<i>m</i>	49.0	5.3	0.109	13770	8290	0.602	115	2
		<i>c</i>	39.0	3.7	0.095	17580	10322	0.587	115	
	Médio	<i>l</i>	56.4	9.0	0.159	9585	5787	0.604	83	
		<i>c</i>	39.5	5.0	0.128	15784	9903	0.627	85	
	Curto	<i>l</i>	59.0	6.5	0.110	13010	9199	0.707	82	
		<i>m</i>	49.1	4.5	0.091	18549	11164	0.602	80	
Total	Longo	<i>m</i>	49.8	5.1	0.102	13181	7403	0.562	219	24
		<i>c</i>	38.9	3.4	0.087	18835	9504	0.505	219	
	Médio	<i>l</i>	60.5	8.3	0.136	11427	7340	0.642	196	
		<i>c</i>	39.4	4.4	0.111	17857	9409	0.527	199	
	Curto	<i>l</i>	61.5	6.7	0.109	12010	7475	0.622	193	
		<i>m</i>	50.3	4.3	0.086	17345	9860	0.568	189	

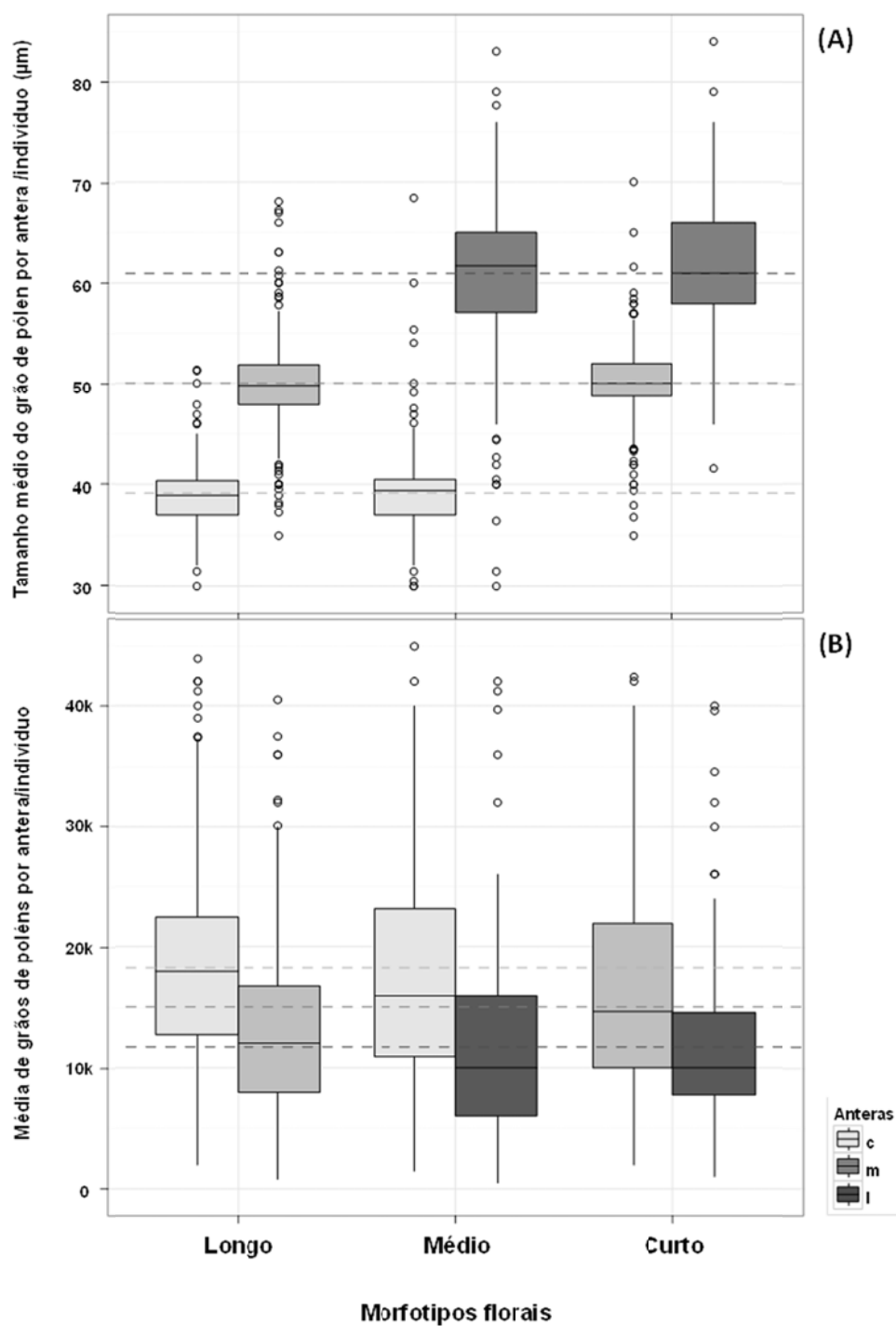


Figura 3.12. Tamanho médio (A) e quantidade média estimada de grãos de pólen (B) entre as diferentes alturas de anteras e morfotipos florais de *Eichhornia azurea* no Pantanal. As linhas pontilhadas representam as médias encontradas para cada altura de antera independente do morfotipo floral

O resultado global para o Pantanal mostrou grande variação de tamanho e sobreposição dos grãos de pólen entre regiões com diferentes intensidades de pulso de inundação (Tabela 3.8, Figura 3.13 A). Os grãos de pólen das anteras de estames *l* de algumas populações na sub-região de Miranda, possuem tamanho similar ao pólen das anteras de estames médios de *E. azurea* (Figura 3.13 A); populações sob o regime de inundação Médio e Longo apresentaram as maiores variações de tamanho de grãos de pólen no Pantanal. Houve grande sobreposição de tamanho entre grãos de pólen de anteras dos estames *l* e *m*, e mais raramente o tamanho destas se sobrepunha com os grãos de pólen das anteras dos estames *s* como encontrado nas populações com inundação de média intensidade e longa duração (Figura 3.14 A, Figura 3.S4).

Diferentemente do encontrado para o tamanho, a estimativa de quantidade de grãos de pólen apresenta diferenças menos expressivas entre diferentes alturas de anteras (Tabela 3.8, Figura 12 B). A quantidade média de pólen foi similar entre as anteras *c* dos morfotipos L e M (18.834,6 e 17.856,7, resp.), e entre anteras *l* dos morfotipos M e C (11.426,9 e 12.009,7), no entanto diferiram entre anteras *m* dos morfotipos L e C (13.180,9 e 17.344,8) (Tabela 3.9). Baseado nos valores médios é evidente a separação na quantidade de grãos de pólen entre as alturas de anteras dentro do mesmo morfotipo floral, porém existe bastante sobreposição entre morfotipos florais, independente da altura da antera (Tabela 3.8, Figura 3.12 B). Estames *l* do morfotipo longo, não diferem quanto a quantidade de pólen dos estames *m* dos morfotipos médio e curto, assim como a quantidade de grãos das anteras *m* do morfotipo curto não difere da quantidade encontrada nas anteras *m* dos morfotipos longo e médio

(anova, estames, GL = 2, F = 60,8, $p < 0,0001$; estames * morfotipos, GL = 3, F = 8,6, $p < 0,00001$)

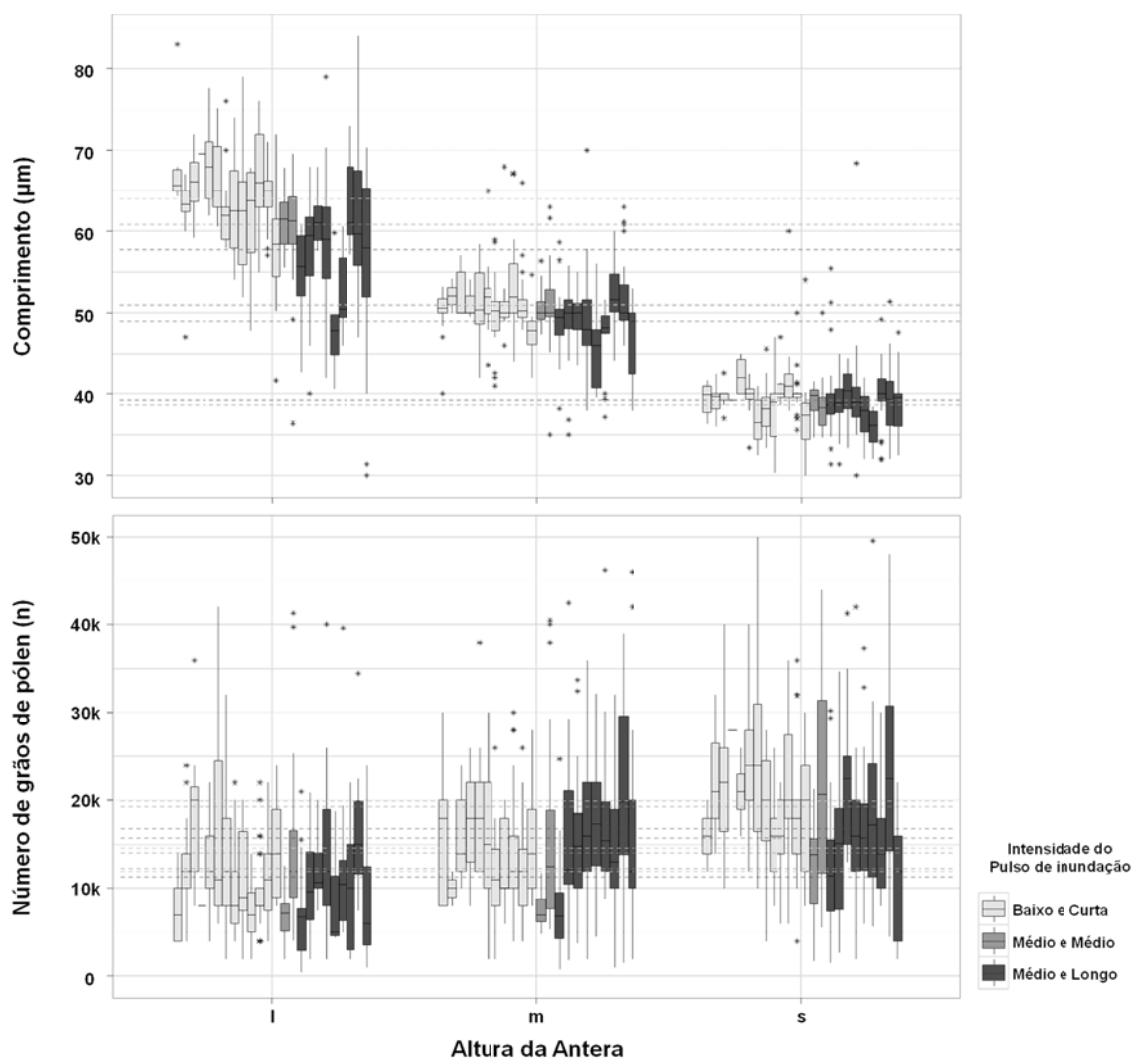


Figura 3.13. Tamanho médio (A) e quantidade média estimada de grãos de pólen (B) entre as diferentes alturas de anteras e morfotipos florais de *Eichhornia azurea* nas 24 populações localizadas em regiões com três distintas intensidades e duração do pulso de inundação no Pantanal. As linhas pontilhadas representam as médias encontradas para cada altura de antera em cada condição de inundação, independente do morfotipo floral

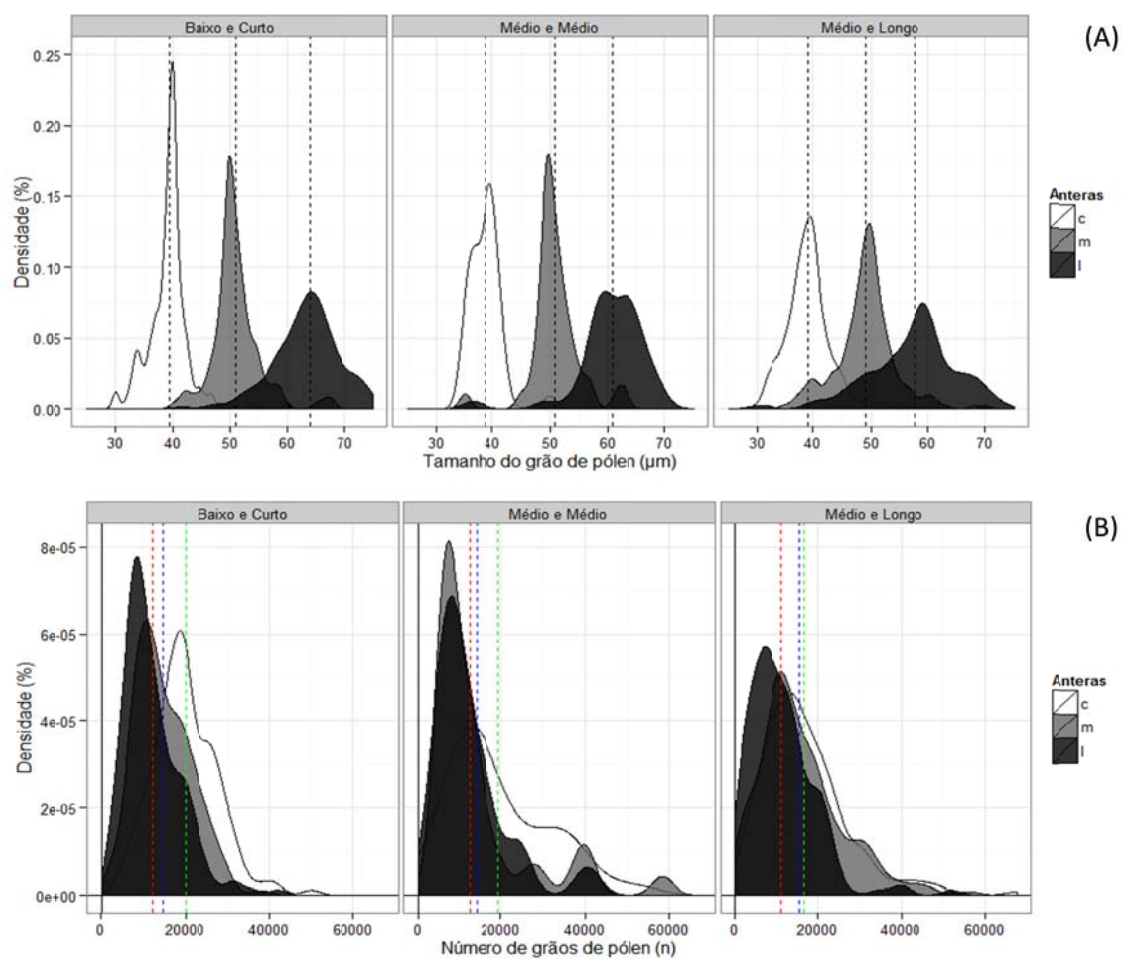


Figura 3.14. Densidade Kernel do tamanho médio (A) e quantidade média estimada (B) de grãos de pólen de *Eichhornia azurea* entre as diferentes alturas de anteras, morfotipos florais e intensidade do Pulso de Inundação no Pantanal. As linhas tracejadas perpendiculares correspondem às médias do tamanho do grão de pólen para cada altura de antera, no caso da quantidade de pólen as linhas verde, azul e vermelha para as anteras *c*, *m* e *l*.

Em todas as alturas de anteras houve grande dispersão dos dados, conferindo altos valores de desvio padrão e coeficiente de variação, sendo os maiores encontrados nas alturas com maiores médias de quantidade de grãos de pólen estimada (Tabela 3.8, Figura 3.13 B).

A quantidade de grãos de pólen dos estames curtos apresentou pouca variação entre morfotipos florais e diferentes níveis de pulso de inundação (Figura 3.14 B), contudo, as anteras dos estames curtos de populações de pulso de inundação Médio e Longo, apresentaram quantidade de pólen equivalente ao encontrado nos estames *m* de *E. azurea*. Por outro lado, os estames *l* e *m*, além de apresentarem pouca variação entre regiões, tiveram grande sobreposição quanto à quantidade e tamanho. A quantidade de pólen nos estames *m* foram levemente superior ao encontrado nos estames *l* entre os diferentes níveis de inundação no Pantanal, porém com distribuição de valores largamente sobreposta (Figura 3.15 B, Figura 3.S5). Em todas as regiões, os estames *m* do morfotipo curto, apresentaram cerca de 30% a mais de grãos de pólen que a mesma antera do morfotipo L (Tabela 3.8).

Hercogamia recíproca entre morfotipos florais

O índice de reciprocidade de altura entre estames e variou de 0, nas regiões de Miranda e Aquidauana, a 0,94 na região do Nabileque (Tabela 3.9). O maior valor médio de reciprocidade por sub-região (média do índice de reciprocidade entre as populações) foi encontrado nas sub-regiões do Paraguai e Cuiabá, e menores nas regiões de Miranda e Aquidauana, onde também foram registradas maiores variações de reciprocidade entre populações (Tabela 3.9, Figura 3.15).

Tabela 3.9. Valores médios, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (Coef. Var.), mínimo (min.) e máximo (máx.) do índice de reciprocidade por intensidade do pulso de inundação e sub-região do Pantanal. Os valores totais foram calculados para todas as 31 populações agrupadas.

Intensidade do Pulso de Inundação	Sub-região	populações (n)	média	DP	Coef. Var.	min.	máx.
Baixa e Curta	Nabileque	8	0,88	0,08	0,09	0,67	0,94
	Aquidauana	2	0,62	0,00	0,00	0,39	0,85
	Leque Taquari	2	0,80	0,05	0,07	0,77	0,90
Média e Média	Nhecolândia	3	0,83	0,05	0,06	0,75	0,86
Média e Longa	Aquidauana	3	0,55	0,00	0,00	0,31	0,78
	Miranda	7	0,48	0,17	0,35	0,00	0,67
Alta e Longa	Paraguai	4	0,90	0,02	0,02	0,86	0,91
	Rio Taquari	1	0,89	0,00	0,00	0,89	0,89
	Cuiabá	1	0,90	0,00	0,00	0,90	0,90
4	8	31	0,66	0,04	0,06	0,00	0,94

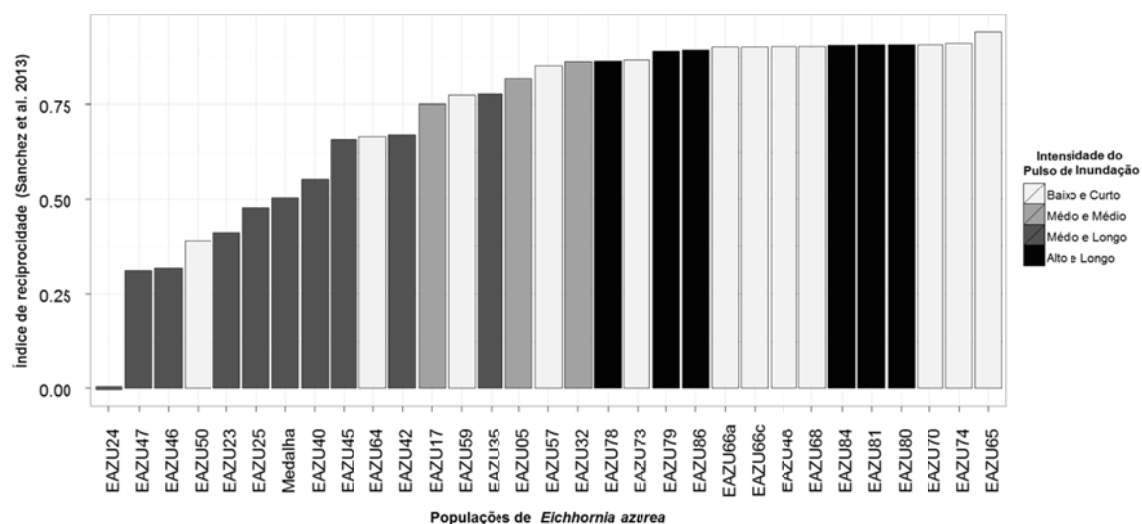


Figura 3.15. Distribuição do índice de reciprocidade (Sanchez *et al.* 2013) entre 31 populações de *Eichhornia azurea* de oito sub-regiões do Pantanal. Valores próximos a 1 indicam perfeita reciprocidade entre estigmas e anteras de alturas equivalentes, e valores próximos a 0 o contrário.

*

Testes inferenciais

Morfometria floral

Durante o processo de seleção dos modelos mistos, foi verificado que a variável tamanho populacional não tem relação com as estruturas florais de *E. azurea* e foram excluídas das análises. O resultado dos modelos mistos generalizados considerando somente as estruturas florais para todas as flores mensuradas no Pantanal (objetivo *i*), tendo os diferentes níveis de pulso de inundação como efeito aleatório, aponta diferenças significativas para todas as estruturas de *E. azurea* (num GL = 6, dens GL = 5739, $F = 27744,102$, $p < 0,0001$; Estrutura * Pulso de Inundação - num GL = 15, dens GL = 5739, $F = 41,242$, $p < 0,0001$) (Tabela 3.11). A comparação múltipla usando contrastes específicos apontou diferenças para todas as combinações entre estiletes e filetes de posições diferentes ($p < 0,0001$ para todas as combinações, menos entre C – c, $p = 0,005$), exceto entre a altura do estigma M e os estames *m* ($p = 0,74$). No entanto a diferença média entre a altura de estigmas e anteras de níveis equivalentes foi mínima ($\sim 0,5$ mm) e biologicamente a espécie é claramente tristílica apresentando hercogamia recíproca, porém com enorme variação das estruturas entre populações.

Houve efeito da intensidade e duração do pulso de inundação no Pantanal sobre o tamanho das estruturas florais de *E. azurea* (num GL = 3, dens GL = 958, $F = 130.876$, $p < 0,0001$;) (Tabela 3.11). A análise de contrastes múltiplos aponta que as diferenças nas estruturas ocorrem unicamente entre as populações de pulso de inundação Médio e Longo com as demais regiões ($p < 0,0005$). (Tabela 3.11).

A interação entre intensidade de Pulso de Inundação e estrutura floral apresentou efeito no comprimento das estruturas (num GL = 15, dens. GL = 6666, $F = 27.695$, $p < 0.0001$) (Tabela 3.10). Flores sob condições de pulso de inundação de média intensidade e longa duração apresentaram maior variação de tamanho que o encontrado em outros regimes de inundação. Condições de pulso de inundação Médio e Longo apresentaram flores com estames e estiletes mais compridos que sob outras condições de inundação. As estruturas reprodutivas das flores de *E. azurea* foram menores e com maior variação de tamanho em regiões com pulso de inundação Médio e Longo que em regiões com outros regimes de inundação. (Figura 3.9 e 3.10). Contrastes específicos comparando a interação entre estrutura floral e pulso de inundação geraram 276 comparações par a par, o resultado aponta que, no geral, as estruturas florais da região com pulso de inundação Médio e Longo são menores que o encontrado nas demais regiões do Pantanal.

Tabela 3.10. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando os comprimentos das estruturas florais de *E. azurea* entre populações com diferentes regimes de inundação no Pantanal. L, M, C, *l*, *m* e *c*, correspondem às alturas dos estigmas longos, médios e curtos, e anteras dos filetes longos, médios e curtos, respectivamente.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p
Estrutura					
<i>l</i>	31.10	0.32	6666	98.14	0.0000 *****
L	33.00	0.40	6666	81.76	0.0000 *****
<i>m</i>	22.03	0.32	6666	69.06	0.0000 *****
M	22.36	0.39	6666	57.29	0.0000 *****
<i>c</i>	12.72	0.32	6666	39.94	0.0000 *****
C	13.51	0.39	6666	34.43	0.0000 *****
Pulso de Inundação					
Médio Médio	-0.65	0.76	31.00	-0.85	0.3993
Médio Longo	-4.14	0.49	31.00	-8.47	0.0000 *****
Alta e Longo	0.07	0.58	31.00	0.12	0.9058
Estrutura * Pulso de inundação					
L * Médio Médio	0.49	0.63	6666	0.78	0.4377
<i>m</i> * Médio Médio	-0.63	0.33	6666	-1.92	0.0553
M * Médio Médio	-0.81	0.62	6666	-1.30	0.1944
<i>c</i> * Médio Médio	-0.33	0.33	6666	-1.01	0.3136
C * Médio Médio	-0.05	0.60	6666	-0.09	0.9291
L * Médio e Longo	0.03	0.36	6666	0.09	0.9266
<i>m</i> * Médio e Longo	2.08	0.20	6666	10.52	0.0000 *****
M * Médio e Longo	2.52	0.37	6666	6.81	0.0000 *****
<i>c</i> * Médio e Longo	3.03	0.20	6666	15.44	0.0000 *****
C * Médio e Longo	3.05	0.37	6666	8.24	0.0000 *****
L * Alto e Longo	0.98	0.48	6666	2.03	0.0424 *
<i>m</i> * Alto e Longo	-0.06	0.26	6666	-0.22	0.8284
M * Alto e Longo	0.79	0.53	6666	1.50	0.1347
<i>c</i> * Alto e Longo	0.28	0.27	6666	1.04	0.2979
C * Alto e Longo	0.36	0.47	6666	0.76	0.4479

A comunidade de potenciais visitantes florais de *E. azurea* foi composta de 27 morfotipos de abelhas e moscas. As sub-regiões mais ricas foram Nabileque e Aquidauana, com 11 e 10 espécies registradas, respectivamente. Por outro lado, a região do Rio Taquari foi a mais pobre com apenas duas espécies registradas (Tabela 2.2). As demais regiões tiveram riqueza entre 6 e 7 espécies. Quando comparado por categoria de pulso de inundação, a maior riqueza de espécies foi encontrada nas regiões com inundação de baixa intensidade e curta duração (19 espécies), seguido pelas populações com pulso de inundação Médio e Longo (13 espécies), e Alto e Longo (6 spp.)

A análise de coordenadas principais (PCoA) recuperou 40 % da variação da comunidade de visitantes florais de *E. azurea* em duas dimensões. A comunidade de visitantes florais representada pelas duas coordenadas principais, o comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população, além de regiões com distintos pulsos de inundação explicam as variações no tamanho das estruturas florais de *E. azurea* no Pantanal (estrutura floral, num GL = 6, dens GL = 2102, $F = 14.027,268$, $p < 0,0001$; Pulso de Inundação, num GL = 2, dens GL = 407, $F = 132,070$, $p < 0,0001$; comprimento médio da probóscide, num GL = 1, dens GL = 407, $F = 5,554$, $p < 0,0189$; PCoA 1, num GL = 1, dens GL = 407, $F = 2,139$, $p = 0,1443$; PCoA 2, num GL = 1, dens GL = 407, $F = 36,607$, $p < 0,0001$; estrutura * Pulso de Inundação, num GL = 10, dens GL = 2102, $F = 28,467$, $p < 0,0001$; PCoA 1* PCoA 2, num GL = 1, dens GL = 406, $F = 1,850$, $p = 0,1745$) (Tabela 3.11) (ver capítulo 2, Tabela 2.2, Figura 2.8 e 2.9). Como no modelo anterior, a estimativa dos parâmetros mostra clara variação entre altura das estruturas florais, Pulso de Inundação, e interação entre esses fatores. A composição de visitantes

florais da região de pulso de inundação Médio e Longo é distinta da encontrada nas regiões de pulso de inundação Baixo e Curto e Alto e Longo. Além de distinta apresentam menores valores de comprimento médio da probóscide (Tabela 3.11, Tabela 2.2, Figura 2.9).

Tabela 3.11. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando os comprimentos das estruturas florais de *E. azurea* com a comunidade de visitantes florais, comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população, além de Pulso de Inundação do Pantanal.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p
Estrutura					
<i>l</i>	31.32	0.36	2102	87.81	0.0000 *****
<i>L</i>	33.35	0.43	2102	77.10	0.0000 *****
<i>m</i>	21.82	0.36	2102	60.20	0.0000 *****
<i>M</i>	22.48	0.42	2102	53.33	0.0000 *****
<i>c</i>	12.27	0.36	2102	34.17	0.0000 *****
<i>C</i>	13.36	0.42	2102	31.74	0.0000 *****
Pulso de Inundação					
Médio e Longo	-1.63	0.65	407	-2.52	0.0122 *****
Alto e Longo	3.98	0.69	407	5.77	0.0000 *****
Polinizadores					
Comprimento médio da probóscide	-0.03	0.01	407	-4.58	0.0000 ****
Eixo 1 - PCoA	5.79	0.89	407	6.50	0.0000 ****
Eixo 2 - PCoA	-5.30	0.64	407	-8.33	0.0000 ****
Estrutura * Pulso de Inundação					
<i>L</i> * Médio e Longo	-1.07	0.53	2102	-2.02	0.0431 *
<i>m</i> * Médio e Longo	2.22	0.33	2102	6.62	0.0000 ****
<i>M</i> * Médio e Longo	3.53	0.65	2102	5.43	0.0000 ****
<i>c</i> * Médio e Longo	4.10	0.34	2102	12.18	0.0000 ****
<i>C</i> * Médio e Longo	4.26	0.63	2102	6.78	0.0000 ****
<i>L</i> * Alto e Longo	0.54	0.55	2102	0.98	0.3255
<i>m</i> * Alto e Longo	-0.15	0.29	2102	-0.50	0.6140
<i>M</i> * Alto e Longo	0.46	0.67	2102	0.69	0.4899
<i>c</i> * Alto e Longo	0.13	0.33	2102	0.39	0.6985
<i>C</i> * Alto e Longo	0.27	0.47	2102	0.57	0.5716

O tamanho floral (resumido por PCA) é explicado pelos morfotipos florais e Pulso de Inundação (morfotipos florais, num GL = 3, dens GL = 5224, $F = 25.13453$, $p < 0,0001$; Pulso de Inundação, num GL = 3, dens GL = 1, $F = 127.51503$, $p < 0,065$, Morfotipo floral * Pulso de Inundação, num GL = 6, dens GL = 5224, $F = 2,92913$, $p < 0,0075$) (Tabela 3.12). No entanto, apesar do modelo apontar diferença do tamanho do perianto entre morfotipos florais, ao testar comparações por meio de contrastes específicos não são detectadas diferenças significativas; por outro lado, as flores da região com pulso de inundação de intensidade média e longa duração apresentaram no geral flores menores que as demais regiões amostradas ($p < 0,0001$) (Figura 3.11 e Tabela 3.12).

Tabela 3.12. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando o tamanho do perianto floral, representado pelo principal eixo da PCA (70% de variância explicada), entre morfotipos florais e populações com diferentes regimes de inundação.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p
Morfotipo floral					
L	-1.32	0.11	5224	-12.07	0.0000 *****
M	-1.24	0.11	5224	-11.14	0.0000 *****
C	-1.37	0.11	5224	-12.75	0.0000 *****
Pulso de Inundação					
Médio Médio	1.30	0.17	1	7.84	0.0807
Médio Longo	2.42	0.15	1	16.17	0.0393 *
Alto e Longo	0.02	0.18	1	0.11	0.9277
Morfotipo floral * Pulso de Inundação					
M * Médio Médio	0.21	0.15	5224	1.47	0.1420
S * Médio Médio	0.06	0.14	5224	0.46	0.6448
M * Médio Longo	-0.10	0.10	5224	-0.94	0.3464
S * Médio Longo	-0.20	0.10	5224	-2.09	0.0367 *
M * Alto e Longo	0.23	0.19	5224	1.19	0.2342
S * Alto e Longo	-0.37	0.17	5224	-2.19	0.0286 *

Medidas de pólen

O tamanho dos grãos de pólen diferiu entre os estames longos, médios e curtos (num DF = 3, den DF = 600, $F = 29973,2$, $p < 0,001$) (Figura 3.12 A), entre regiões com distintos regimes de inundação (num DF = 2, den DF = 600, $F = 28,630$, $p < 0,001$), e a interação entre comprimento dos estames e pulso de inundação (num DF = 4, den DF = 600, $F = 19,337$, $p < 0,001$) (Tabela 3.13). Os contrastes específicos apontam diferenças entre todas as combinações de alturas de anteras, bem como pulso de inundação. Noutro modelo, o tamanho médio da probóscide, e composição de visitantes florais (PCoA 1 e 2) não explicam a variação no tamanho dos grãos de pólen de *E. azurea* (Tabela 3.14).

Tabela 3.13. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando o tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de *E. azurea* e diferentes regimes de inundação no Pantanal.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p	
Estrutura						
<i>l</i>	63.92	0.39	600	165.36	0.0000	*****
<i>m</i>	51.12	0.39	600	129.94	0.0000	*****
<i>c</i>	39.26	0.39	600	99.95	0.0000	*****
Pulso de Inundação						
Médio e Médio	-3.08	0.89	407	-3.45	0.0006	*
Médio e Longo	-6.20	0.56	407	-11.08	0.0000	*
Estrutura * Subregião						
<i>m</i> * Médio e Médio	2.81	1.19	600	2.35	0.019	*
<i>c</i> * Médio e Médio	2.51	1.16	600	2.16	0.031	*
<i>m</i> * Médio e Longo	4.00	0.72	600	5.54	0.000	*****
<i>c</i> * Médio e Longo	6.20	0.72	600	8.61	0.000	*****

Tabela 3.14. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando o tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de anteras em flores de *E. azurea*, diferentes regimes de inundação no Pantanal, composição de visitantes florais e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais em cada população.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p
Anteras					
<i>l</i>	66.53	1.70	571	39.22	0.0000 *****
<i>m</i>	53.23	1.74	571	30.58	0.0000 *****
<i>c</i>	41.75	1.71	571	24.43	0.0000 *****
Pulso de Inundação					
Médio e Longo	-10.93	3.01	7	-3.62	0.0085 *
Polinizadores					
Comprimento médio da probóscide	-0.01	0.03	7	-0.27	0.7968
Eixo 1 - PCoA	-4.74	4.41	7	-1.08	0.3178
Eixo 2 - PCoA	-0.14	2.66	7	-0.05	0.9600
Estrutura * Subregião					
<i>m</i> * Médio e Longo	5.28	1.08	571	4.90	0.0000 *
<i>c</i> * Médio e Longo	6.65	1.07	571	6.23	0.0000 *

Por outro lado, a quantidade de grãos de pólen foi inversamente proporcional à altura, anteras longas apresentaram menor quantidade de grãos de pólen e anteras curtas maiores valores (Figura 3.13, num DF = 3, den DF = 1185, $F = 202,655$, $p < 0,001$), porém não há diferenças entre diferentes intensidades de Pulso de Inundação (num DF = 2, den DF = 22, $F = 0,356$, $p = 0,7042$); mas há na interação entre esses fatores (numDF = 4, denDF = 600, $F = 2,92$, $p = 0,02$) (Tabela 3.15, Figura 3.13 B, Figura 3.14 B). As diferenças ocorreram unicamente entre estames de níveis diferentes entre regimes de inundação (e.g. estames c de pulso de inundação Alto e Curto com estames l de pulso de inundação Médio e Longo). Também não há relação da quantidade de grãos de pólen com tamanho médio da probóscide e visitantes florais (probóscide média, numDF = 1, denDF = 7, $F = 1,682$, $p = 0,2357$; PCoA 1, numDF = 1, denDF = 7, $F = 0,0886$, $p = 0,7746$; PCoA 2, numDF = 1, denDF = 2, $F = 1,793$, $p = 0,127$) (Tabela 3.16).

Tabela 3.15. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando a variação de tamanho dos grãos de pólen entre as diferentes alturas de estames em flores de *E. azurea* com Pulso de inundação no Pantanal.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p
Altura de Antera					
<i>l</i>	11724.57	628.08	600	18.67	0.0000 *****
<i>m</i>	14774.06	639.00	600	23.12	0.0000 *****
<i>c</i>	20067.57	638.05	600	31.45	0.0000 *****
Pulso de Inundação					
Médio e Médio	500.18	1449.52	407	0.35	0.7302
Médio e Longo	-624.60	908.89	407	-0.69	0.4923
Altura de Antera * Pulso de Inundação					
<i>m</i> * Médio e Médio	-1409.33	1916.63	600	-0.74	0.462
<i>c</i> * Médio e Médio	-1114.62	1863.27	600	-0.60	0.550
<i>m</i> * Médio e Longo	1298.06	1160.01	600	1.12	0.264
<i>c</i> * Médio e Longo	-2212.55	1156.78	600	-1.91	0.056

Tabela 3.16. Resultado do modelo misto generalizado (GLMM) testando a variação da quantidade de grãos de pólen entre as diferentes alturas de estames em flores de *E. azurea* com Pulso de inundação no Pantanal.

Variáveis	Valor	Erro padrão	gl	Valor-T	valor de p	
Altura da Antera						
<i>l</i>	16407.81	3637.62	571	4.51	0.0000	****
<i>m</i>	18723.38	3685.81	571	5.08	0.0000	****
<i>c</i>	24203.45	3651.05	571	6.63	0.0000	****
Pulso de Inundação						
Médio e Longo	-2737.95	6532.26	7	-0.42	0.6877	
Polinizadores						
Comprimento médio da probóscide	-121.30	67.61	7	-1.79	0.116	
Eixo 1 - PCoA	3930.95	9659.93	7	0.41	0.696	
Eixo 2 - PCoA	-7587.93	5801.56	7	-1.31	0.232	
Altura da Antera * Pulso de Inundação						
<i>m</i> * Médio e Longo	1740.71	1590.52	571	1.09	0.274	
<i>c</i> * Médio e Longo	-1391.29	1573.60	571	-0.88	0.377	

Hercogamia recíproca entre morfotipos florais

A reciprocidade floral é diferente entre Pulsos de Inundação no Pantanal, porém, não esta relacionada ao tamanho populacional e dos periantos de *E. azurea* (Tabela 3.17, Figura 3.16). Populações em regiões com pulso de inundação Médio e Longo apresentaram grande dispersão de valores de reciprocidade (Tabela 3.17, Figura 3.16).

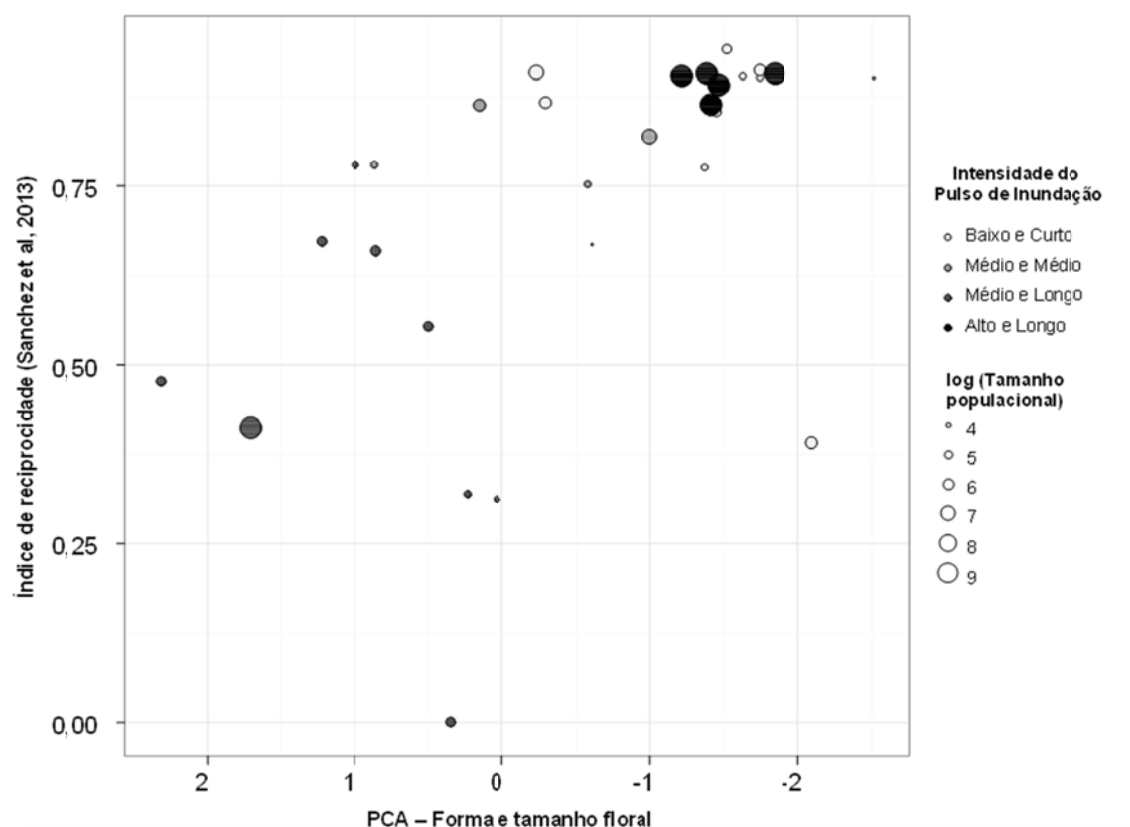


Figura 3.17. Relação do índice de reciprocidade entre os três morfotipos florais de *E. azurea*, com o tamanho floral (PCA 1, 70%), tamanho populacional e Pulso de Inundação.

Tabela 3.17. Resultado de modelo geral linearizado com distribuição beta inflacionada testando a relação entre o índice de reciprocidade com tamanho populacional, tamanho floral e Pulso de Inundação no Pantanal.

Variável	Estimativa	Erro padrão	valor de t	valor de p
Tamanho				
log (tamanho populacional)	-0.0001	0.0001	-1.0143	0.3210
PCA 1	0.1754	0.1869	0.9386	0.3577
Pulso de Inundação				
Baixo e Curto	1.8080	0.3355	5.3897	0.0000 ****
Médio e Médio	1.3460	0.3175	4.2388	0.0003 ****
Médio e Longo	0.0101	0.2615	0.0387	0.9695
Alto e Longo	2.7480	0.7961	3.4521	0.0022 ***
Coefficientes				
Sigma	-1.0020	0.1593	-6.2870	0.0000
Nu	-3.3320	1.0180	-3.2740	0.0028
Tau	-15.6100	281	-0.0555	0.9562

DISCUSSÃO

O resultado global demonstra que *Eichhornia azurea* é claramente tristílica no Pantanal, havendo hercogamia recíproca para os três níveis de altura das estruturas florais. No entanto, o comprimento das estruturas florais não é constante e apresenta enorme variação dentro de uma população e entre populações, reduzindo a hercogamia recíproca. Essa variação é explicada por um conjunto de variáveis, dentre elas a distribuição espacial das populações e intensidade da inundação, além da oferta de polinizadores de longa probóscide.

Variações florais e fixação de variante auto-compatível (quebra do da tristília) em *Eichhornia azurea* é conhecida para populações na Costa Rica e no sudeste do Brasil, entretanto esses estudos apontaram unicamente a quebra do sistema para flores do morfotipo mediano (Barrett 1978, Alves do Santos 2002), ao passo que no Pantanal a quebra ocorre a partir de flores dos três morfotipos. A semi-homostilia em flores de *E. azurea* no Pantanal, pode ocorrer nas mais diversas combinações da altura dos estigmas e conjunto de anteras, e não somente através do alongamento das anteras curtas. Em espécies tristílicas, a quebra do sistema ocorre com maior frequência em flores do morfotipo mediano, por meio do alongamento dos filetes curtos até atingirem altura equivalente ao estigma (Seburn *et al.* 1990, Richards *et al.* 1992), porém casos isolados para o morfotipo longo de *E. paniculata* na Nicarágua e México já foram reportados (Barrett 1996, Vallejo-Marín & Barrett 2009). Embora essas formas variantes ocorram para todos os morfotipos florais de *E. azurea* no Pantanal, flores do morfotipo médio apresentam variação com maior frequência.

Regiões com menores comprimentos médios de probóscide (pulso de inundação Médio e Longo e Alto e Longo) apresentaram os menores comprimentos médios de estruturas florais de *E. azurea* e maior variação de tamanho dentre elas, ao passo que as regiões com maiores comprimentos de probóscide, apresentaram menor variação nas estruturas. A ausência de polinizadores oligoléticos ou aqueles que possam mediar de forma eficiente a transferência de pólen entre alturas equivalentes de pólen e estigma, é apontada como forte pressão seletiva para a quebra da tristilia em espécies de *Eichhornia* (Barrett 1978, Alves dos Santos 2002). Por outro lado, as populações sob maiores influências do rio Paraguai e/ou grandes rios do Pantanal, onde a inundação possui alta magnitude e longa duração, não apresentaram variação extrema ou flores semi-homostílicas. É provável que sob essas condições de extrema flutuação hídrica, a reprodução sexuada tenha pouca ou nenhuma importância para *E. azurea*.

No entanto, é provável que a ausência de polinizadores especializados não seja a única força seletiva, para explicar a maior variação de tamanho das estruturas florais de *E. azurea*. Nas regiões onde ocorreram as maiores frequências de flores semi-homostílicas e variação de tamanho das estruturas florais, além da ausência de polinizadores oligoléticos, existem várias populações que são permanentes, com aparente pouca migração de rametos pelo pulso de inundação. Além do mais, essas plantas sobrevivem sob condições estressantes de déficit hídrico nos períodos secos, porém com flores. Essas condições aliadas com a grande quantidade de visitantes florais ilegítimos, como sirfídeos e abelhas de probóscide curta, e floração ininterrupta, podem maximizar a endogamia para garantir a reprodução, e

conduzir a este cenário de alterações no sistema da tristilia nessas populações do Pantanal. Clones da tristílica *E. paniculata* expostos à condições ambientais estressantes apresentam menor hercogamia que aqueles em condições ideais para o desenvolvimento (Vallejo-Marín & Barrett 2009). Similarmente, em flores da tristílica *Lythrum salicaria* (Lythraceae), diversos tratos vegetativos e reprodutivos tiveram relação negativa com o stress hídrico, dentre eles a hercogamia floral (Mal & Lovett-Doust, 2005). Em espécies homostílicas, o stress hídrico aparenta exercer influência negativa na quantidade de flores, frequência da floração e qualidade das sementes produzidas (Sultan 2000, Dorken & Barrett 2004, Gianoli 2004). A variação fenotípica em tratos reprodutivos de *E. azurea* no Pantanal deve contribuir para a manutenção da espécie e estruturação genética das populações nas diversas condições ambientais encontradas na região. Apesar de mais comum em espécies efêmeras, a endogamia oferece igual chance de assegurar a reprodução em espécies perenes, porém é evitado por causa da depressão endogâmica em indivíduos adultos e custos futuros para sobrevivência em reprodução (Morgan *et al.* 1997). Entretanto, somente com estudo experimental controlado comparando genótipos das sub-regiões de Miranda e Aquidauana com genótipos do Leque do Taquari (extremos fenotípicos encontrados) sob diferentes condições de stress, será possível determinar se esse polifenismo nos tratos reprodutivos é uma característica intrínseca de *E. azurea*, ou adaptações genotípicas locais às condições ambientais distintas encontradas ao longo do gradiente de inundação.

As regiões com maiores variações das estruturas florais e quebra do sistema da tristilia, também apresentaram flores menores independente do

morfotipo floral. A redução do perianto floral pode ser interpretada como uma resposta fenotípica à endogamia e/ou ao stress ambiental. Este fenômeno é descrito para diversas espécies de plantas, inclusive para Pontederiaceae (Sultan 2000, Fishman *et al.* 2002, Grossenbacher & Whittall 2011). No caso da endogamia, a alocação de energia para as partes florais com função de atração de polinizadores é diminuída por meio de seleção estabilizadora (Darwin, 1878; Ornduff, 1969; Cruden, 1977, Barrett 1985, Busch 2005, Wright *et al.* 2013). Entretanto, apesar de menor tamanho floral, e maior frequência de flores modificadas e/ou semi-homostílicas nessas regiões, em muitas flores menores, a hercogamia ainda é clara, com a separação das anteras e estigmas na mesma flor (Figura 3.9). Contudo, mesmo havendo a hercogamia, o menor tamanho floral pode em vários casos alterar a funcionalidade da estrutura floral. Por exemplo, algumas flores do morfotipo longo, apresenta comprimento do estilete correspondente ao morfotipo mediano, e assim para demais morfotipos (ver Figura 3.7 e Figura 3.9). Isso aumenta substancialmente as chances desse estigma receber pólen ilegítimo das anteras médias de um indivíduo L ou C normal. É possível que os efeitos da interação entre endogamia e stress ambiental estejam atuando sinergicamente para causar esse resultado, pois não foram encontradas populações compostas unicamente por flores modificadas (resposta fenotípica à endogamia). Por outro lado, a ocorrência rara de flor grande semi-homostílica na região do Nabileque (inundação Baixa e Curta) indica que a semi-homostilia pode ser expressa independentemente da variação de outros tratos florais (e.g. tamanho do perianto), assim como reportado para *E. paniculata* (Vallejo-Marín & Barrett 2009). Neste caso, a

semi-homostilia pode ser produto da endogamia e não de condições adversas do ambiente.

A plasticidade fenotípica em função do stress ambiental e endogamia tem papel fundamental na evolução do sistema reprodutivo de plantas tristílicas. A habilidade plástica e evolutiva de alterar a distância entre as estruturas femininas e masculinas dentro da mesma flor (hercogamia) conforme as condições ambientais enfrentadas, garante a reprodução sexuada de espécies tristílicas sob ausência de polinizadores efetivos, e em populações com proporções desiguais ou ausência de morfotipo floral, por meio da auto-fertilização (Baker 1967, Barrett 1992, Takebayashi & Morrell 2001). Geralmente essas características são fundamentais para espécies que participam de eventos de colonização de longa distância, efeito fundador e gargalo populacional, onde estarão sujeitas a tamanho populacional efetivo reduzido, condições ambientais adversas e pequena variabilidade genética (Pannell & Barrett 1998, Busch 2011). Variações fenotípicas em respostas a esses eventos já foram documentados para algumas espécies tristílicas como *E. paniculata*, *Oxalis alpina* e *L. salicaria* (Barrett 1992, Weller 1976a, Mal & Lovett-Doust, 2005). Essas observações encaixam de alguma forma na lei de Baker (Baker 1967), o qual prediz que indivíduos auto-compatíveis são mais aptos para colonização e estabelecimento de novas populações após eventos de dispersão a longa distância e isolamento. Somente com estudos genéticos será possível estimar qual o provável processo causador de tamanha variação nos tratos reprodutivos dessas populações no Pantanal.

As sub-regiões de Miranda e Aquidauana (inundação de média magnitude e longa duração), que apresentaram enorme variação nos tratos

reprodutivos, possuem solo mais argiloso que o encontrado nas demais regiões, possibilitando que a água acumule por mais tempo. Essa oferta de umidade prolongada faz com que nessas regiões várias das populações sejam permanentes, e mesmo sob condições adversas durante o período das secas, ainda ofertem flores durante todo o ano (obs. pess.). Indivíduos clonais em populações permanentes frequentemente produzem flores simultaneamente, promovendo considerável auto polinização por geitonogamia – entre flores da mesma inflorescência, flores de diferentes inflorescências mas do mesmo indivíduo, e flores de diferentes rametos do mesmo clone (Eckert 2000). Esse fenômeno maximiza a endogamia e reduz o sucesso da exogamia masculina pela auto-fertilização, conduzindo a um cenário de depressão endogâmica e alterações fenotípicas associadas (Holsinger *et al.*, 1984, Barrett 2003).

Nessas regiões de inundação de média intensidade e longa duração, não foram encontrados abelhas de probóscide longa capazes de transportar o pólen entre os diferentes níveis de estames (Alves dos Santos 2002). A ação em conjunto da maior duração do pulso de inundação e ausência de polinizadores específicos, pode conduzir à seleção de genótipos auto-compatíveis em *E. azurea* nessas condições. Por outro lado, nas regiões da borda leste e sul do Pantanal, regiões onde o pulso de inundação é baixo e de curta duração, ocorrem os fenótipos com hercogamia recíproca mais bem marcada, e as populações de *E. azurea* são sazonais, com floração durante o período de chuvas sincronizada à disponibilidade de polinizadores oligoléticos. As populações na borda oeste do Pantanal, representada pelos grandes lagos encontrados na região, também são permanentes e com poucos visitantes oligoléticos, porém não apresentam variações expressivas nos tratos

reprodutivos. Essas populações aparentam ter reprodução vegetativa muito mais pronunciada que a reprodução sexuada. São populações que sofrem grandes distúrbios anuais em decorrência do pulso de inundação, onde a variação do nível da água pode chegar a cerca de 6 m. Sob essas condições, a reprodução sexuada tem pouca relevância, o que pode ser corroborado pelo baixo número de sementes e frutos formados nessas regiões (obs. pessoal). Sob essas condições, é esperado que não haja pressão seletiva para favorecer a endo- ou exogamia, e conseqüente alterações fenotípicas florais, sendo um sistema reprodutivo misto a regra (Goodwillie 2005, Wright *et al.* 2013). Ademais, também seria inesperado plasticidade fenotípica em tratos vegetativos nessas condições, por se tratar de regiões sem limitação hídrica, e que recebem genets potencialmente de quase todo o Pantanal. Estudos genéticos são necessários para estimar qual processo evolutivo conduziu essas populações para este cenário de enorme variação nos tratos reprodutivos ao longo do gradiente do pulso de inundação no Pantanal.

Uma interessante observação foi a alta frequência de ocorrência e intensidade de herbivoria sobre partes reprodutivas de *E. azurea* principalmente nas populações com pulso de inundação Médio e Longo (sub-regiões de Miranda e Aquidauana), no entanto comum em todas as populações visitadas nesse estudo. Apesar de não ter sido objetivo do estudo, foram observados besouros, gafanhotos e lesmas de aparentemente poucas espécies como os principais responsáveis pela florivoria em *E. azurea* no Pantanal. Praticamente todas as partes do perianto, anteras e estigmas eram comidos. Sendo muito comum, principalmente na região de Miranda e Aquidauana, as anteras e estigmas longos estarem completamente comidos,

fenômeno que pode favorecer a auto-fertilização e seleção de cleistogamia (Steets & Ashman 2004, Steets *et al.* 2006). A herbivoria sobre partes reprodutivas é geralmente negligenciada em modelos sobre os processos que determinam o tipo de sistema reprodutivo em plantas – auto-compatível, auto-incompatível, sistemas reprodutivos mistos (Steets & Ashman 2004, McCall & Irwin 2006, Steets *et al.* 2006). Estudos futuros contemplando informação sobre as taxas de herbivoria foliar e floral permitirão compreender a importância desse fator na quebra do sistema da tristilia e variação fenotípica em *E. azurea*.

Os casos de flores com instabilidade no desenvolvimento foram encontrados, onde a mesma inflorescência apresentava flores semi-homostílicas e flores com clara hercogamia. Diversos fatores podem determinar a instabilidade do desenvolvimento floral, como homozigose, mutações, quebra de genes complexos adaptados e estresse ambiental. O único caso similar a este, é reportado para *E. paniculata*, o qual são propostas a hipótese de instabilidade no desenvolvimento e plasticidade na expressão fenotípica em função das condições ambientais (Vallejo-Marín & Barrett 2009). Variações na hercogamia provindas de plasticidade fenotípica ou instabilidade do desenvolvimento podem permitir que indivíduos modifiquem as taxas de fertilização endo ou exogâmica para corresponder às condições ambientais atuais em que vivem. O aumento na autofertilização pode ser favorável em ambientes mais estressantes onde tanto fatores bióticos (e.g. abundância de polinizadores, herbivoria) e/ou abióticos (e.g. disponibilidade de água para manter a densidade e tamanho populacional) limitem a polinização cruzada (Stebbins, 1957, Elle & Hare, 2002; Moeller & Geber, 2005). As populações de *E. azurea* que apresentaram grande variação das estruturas florais e estas

raras anomalias no Pantanal crescem em ambientes com limitação de serviço eficiente de polinização e sob condições extremas de seca e alta densidade populacional. À medida que as águas escoam, muitas vezes ocorre maior acúmulo de plantas em determinada área da lagoa que ainda contem água ou umidade, consequentemente aumentando a competição por recursos (obs. pess.). Geralmente essas plantas são menores e menos vistosas, e possivelmente menos atrativas para polinizadores. Sob essas condições, aliada a uma região com pouca presença de visitantes oligoléticos, é provável que a seleção atue favorecendo tratos que promovam a endogamia. Além do mais, o fato de serem populações permanentes, e não haver intenso fluxo hídrico é presumível que as sementes produzidas sob essas condições sejam dispersas junto a mesma população, na mesma lagoa, aumentando a depressão endogâmica. Experimentos controlados com sementes dessas populações, podem ajudar a entender quais forças determinam mais fortemente a expressão da semi-homostilia em *E. azurea*.

As variações das estruturas florais de *E. azurea* no Pantanal foram mais fortes nas estruturas longas (alturas das anteras e estigmas) que nas médias. A instabilidade do desenvolvimento pode ser uma hipótese para explicar essa maior variação. As estruturas longas passam por processo ontogenético mais demorado até atingir o tamanho final, o que potencialmente aumenta as chances de variações em função da oferta de recursos. Outra hipótese seria a base genética que envolve a expressão dessas estruturas. Como tanto o estigma quanto as anteras longas apresentaram maior variação de tamanho, se essa variação for regulada geneticamente, é provável que os mesmo genes atuem para ambas as estruturas.

Eichhornia azurea possui clara separação de tamanho de grãos de pólen entre as três alturas de anteras, no entanto, assim como as estruturas florais, o pólen provindo das anteras longas apresenta maior variação de tamanho. A correlação positiva entre tamanho do grão de pólen e altura da antera já foi anteriormente reportada para populações de *E. azurea* na Amazônia, além de ser característica auxiliar comum em espécies tristílicas com incompatibilidade heteromórfica (Barrett 1978, Ganders 1979, Barrett 1993). Entretanto, os tamanhos reportados são em média 20 μm maiores ($l = \sim 90$, $m = \sim 73$, $s = \sim 61$, Barrett 1978) que os aqui descritos para cada altura de antera. Essa ampla diferença pode ser em decorrência do método utilizado para a realização das medidas, que não está detalhadamente explicado no estudo citado. Por outro lado, essas diferenças podem ser adaptações locais às diferentes condições ambientais bióticas (polinizadores, herbívoros) e abióticas (oferta de recursos, temperatura) encontradas entre Amazônia e Pantanal, sem aparente valor adaptativo. Estudos comparando o tamanho de grãos de pólen entre populações de *E. azurea* ao longo de toda a sua distribuição são necessários para compreender quais fatores determinam tamanha variação entre macrorregiões.

O tamanho do pólen das anteras longas apresentaram as maiores amplitudes de variação, ao passo que os grãos das anteras curtas a menor variação. Assim como para os tratos florais, as maiores variações de tamanho de grãos de pólen ocorreram nas sub-regiões de Miranda e Aquidauana (pulso de inundação Médio e Longo), regiões com maior sobreposição entre as anteras médias e longas. Como parece ocorrer para as estruturas florais, a instabilidade no desenvolvimento pode ser determinante sobre a variação de

tamanho dos grãos de pólen. O pólen dos estames longos é maior pois demanda mais reserva para o crescimento do tubo polínico (Ganders 1979, Barrett *et al.* 2000), portanto a quantidade de recursos disponíveis pode estar diretamente relacionada com a quantidade e qualidade do grão de pólen. Caso as plantas dessas regiões estejam em constante limitação de recursos, é provável que isto seja importante fator para determinar as maiores oscilações nas estruturas que demandam mais investimento energético, como o pólen. Por outro lado, a maior variação pode estar dissociada de variações ambientais abióticas, e ser uma resposta fenotípica à endogamia existente nessas populações. Como há relação dessa variação com o tamanho médio das probóscide e composição de visitantes florais, é provável que à ausência de polinizadores efetivos nessas regiões estejam promovendo a seleção de grãos de pólen das anteras longas mais parecidos com os encontrados nas anteras médias. *Apis mellifera* e outras abelhas generalistas além de moscas sirfídeos, visitantes mais frequentes nas regiões com maior variação de tamanho do grão de pólen, coletam pólen preferencialmente das anteras longas e em menor proporção das anteras médias (Wolfe & Barrett 1987, Harder & Barrett 1993, obs. pessoais), o que provavelmente promove grande quantidade de polinizações ilegítimas entre esses dois morfotipos florais, conferindo maior similaridade de características da tristilia, dentre elas o tamanho do grão de pólen.

A quantidade média de grãos de pólen é diferente entre as três alturas de antera (correlação negativa com altura das anteras), porém há enorme sobreposição entre elas, além de não haver diferenças entre sub-regiões do Pantanal. Os altos desvios encontrados sustentam essa afirmação. Essa foi a

única característica das flores mensuradas que não teve relação com o gradiente de inundação. A ausência de relação da variação da quantidade de grãos de pólen entre regimes de inundação no Pantanal, composição e comprimento médio da probóscide dos visitantes florais, e tamanho floral, pode indicar que esta variável é pouco influenciada pela endogamia, em contraste com as demais estruturas florais de *E. azurea*. Estudos controlados comparando a variação da quantidade de pólen entre anteras de flores do mesmo indivíduo e entre indivíduos sob diferentes condições ambientais são necessários para melhor compreender essa enorme sobreposição na quantidade de grãos de pólen entre as três diferentes alturas de anteras de *E. azurea*.

As anteras *c* dos morfotipos Longo e Médio apresentam quantidade de pólen parecida ao encontrado nas anteras *m* do morfotipo C, similarmemente, as anteras *l* dos morfotipos C e M, possuem quantidade de pólen equivalente ao encontrado nas anteras *m* do morfotipo L. Aparentemente, existe algum fator regulador da produção de grãos de pólen dentro de cada flor, onde as anteras com menor tamanho de grãos de pólen terão maior quantidade de grãos e vice-versa. No entanto, isso não implica necessariamente que as anteras *c* terão mais grãos de pólen que as *m*, e estas, que as *l*. Em uma espécie que apresenta flexibilidade no sistema de incompatibilidade, a regulação intrafloral na produção de grãos de pólen, pode ser uma estratégia para a distribuição de recursos em similar proporção para ambos os conjuntos de anteras dentro de uma mesma flor (equilíbrio entre tamanho e quantidade dos grãos de pólen). Este equilíbrio pode aumentar as chances de transferência de pólen provindo de cada altura de antera, mesmo que transferências ilegítimas entre alturas de

anteras e estigmas não sejam equivalentes. Em um cenário onde a produção de pólen é categoricamente distinta entre as três alturas de anteras, as chances de polinizações ilegítimas seriam reduzidas pela diferença nos valores absolutos de pólen entre as alturas de anteras.

As anteras *m* do morfotipo C apresentaram cerca de 25% mais grãos de pólen que as anteras *m* do morfotipo L, similar resultado foi reportado para *P. cordata* (Price & Barrett 1982, Barrett *et al.* 1983). Diferenças no desenvolvimento floral entre níveis de estames são sugeridas como processos para o surgimento dessa diferença que não tem notável função adaptativa. Provavelmente a mesma conjectura seja válida para *E. azurea*, entretanto variações na quantidade de pólen entre morfotipos florais pode representar alterações na expressão do gênero, podendo um morfotipo ser funcionalmente mais masculino (curto) e outro mais feminino (longo), e isso contribuir em algum momento para a história evolutiva da espécie. Variações na expressão do gênero entre morfotipos florais já foram reportadas para espécies distílicas (Avila-Sakar & Domínguez 2000, Gonzáles *et al.* 2005, Rosas & Domínguez *et al.* 2009).

O índice de hercogamia desenvolvido para espécies tristílicas aparenta ser uma ferramenta útil para estudar a variação da hercogamia recíproca entre populações. As conclusões obtidas por meio dos valores do índice foram muito similares ao encontrado para os modelos generalizados lineares mistos (GLMM), havendo a vantagem de serem mais facilmente gerados e interpretados. Os menores valores do índice de hercogamia recíproca ocorrem em região com maior variação nos tratos florais e menor tamanho médio de probóscide e pulso de inundação Médio e Longo (sub-regiões Miranda e

Aquidauana), o que concorda com os modelos generalizados mistos apresentados anteriormente.

Em nenhum modelo testado, houve relação do tamanho populacional de *E. azurea* com a variação dos comprimentos das estruturas florais (filetes, estilietes, perianto) e tamanho e quantidade de grãos de pólen. Conclusão que contrasta com diversos estudos o qual reportam forte relação positiva do tamanho populacional com melhor desempenho do sistema da heterostilia para diversos taxa (Barrett & Kohn 1991, Husband & Barrett 1992a, 1999, Pannel & Barrett 2001). Duas conjecturas podem ser feitas para explicar a ausência de relação com essas variáveis no Pantanal. A primeira deve-se à instabilidade encontrada na região em decorrência do pulso de inundação (efeitos estocásticos). A variação do nível da água promove flutuação do tamanho populacional ao longo do ano e entre anos (obs pes.), e possivelmente a variação da proporção de morfos e tamanho populacional efetivo. Devido a essa oscilação espacial e temporal, é improvável que o tamanho populacional e desigualdade morfotípica sejam forças seletivas determinantes para a quebra do sistema da tristilia no Pantanal. Por outro lado, a segunda conjectura, pode ser a forma como foram tomados os dados, que pode limitar generalizações quanto ao real tamanho populacional e estruturação morfotípica. A estimativa de tamanho populacional por categorias é uma forma viável para a realização deste procedimento em campo, mas reflete uma única fotografia no espaço e tempo da população em questão. Além do mais, a floração de *E. azurea* apresenta pico imprevisível, devido à instabilidade encontrada na região. O censo periódico do tamanho populacional e estrutura dos morfotipos florais de populações, além da estimativa do tamanho efetivo dessas populações

(Husband & Barrett 1992a), poderão indicar qual das hipóteses é mais provável.

Este estudo apresenta fortes evidências que a quebra do sistema da tristilia em *Eichhornia azurea* é determinada pela interação entre fatores estocásticos, pulso de inundação - o qual promove variações imprevisíveis no tamanho e duração populacional; e determinísticos - ausência de polinizadores oligoléticos e estresse ambiental. É provável que diversos caminhos para a quebra do sistema em direção da auto-fertilização ocorram em *E. azurea* no Pantanal, em virtude das diferentes características demográficas encontradas nas sub-regiões estudadas. A habilidade de colonização das mais diversas áreas aquáticas, como rios, corixos, lagos permanentes e temporários, diques, “caixas de empréstimo”, planície de alagação, pastos úmidos entre outros, pode atuar como fator determinante para a seleção de sistema flexível de reprodução da espécie (Cunha & Fischer 2009), e quebra da tristilia.

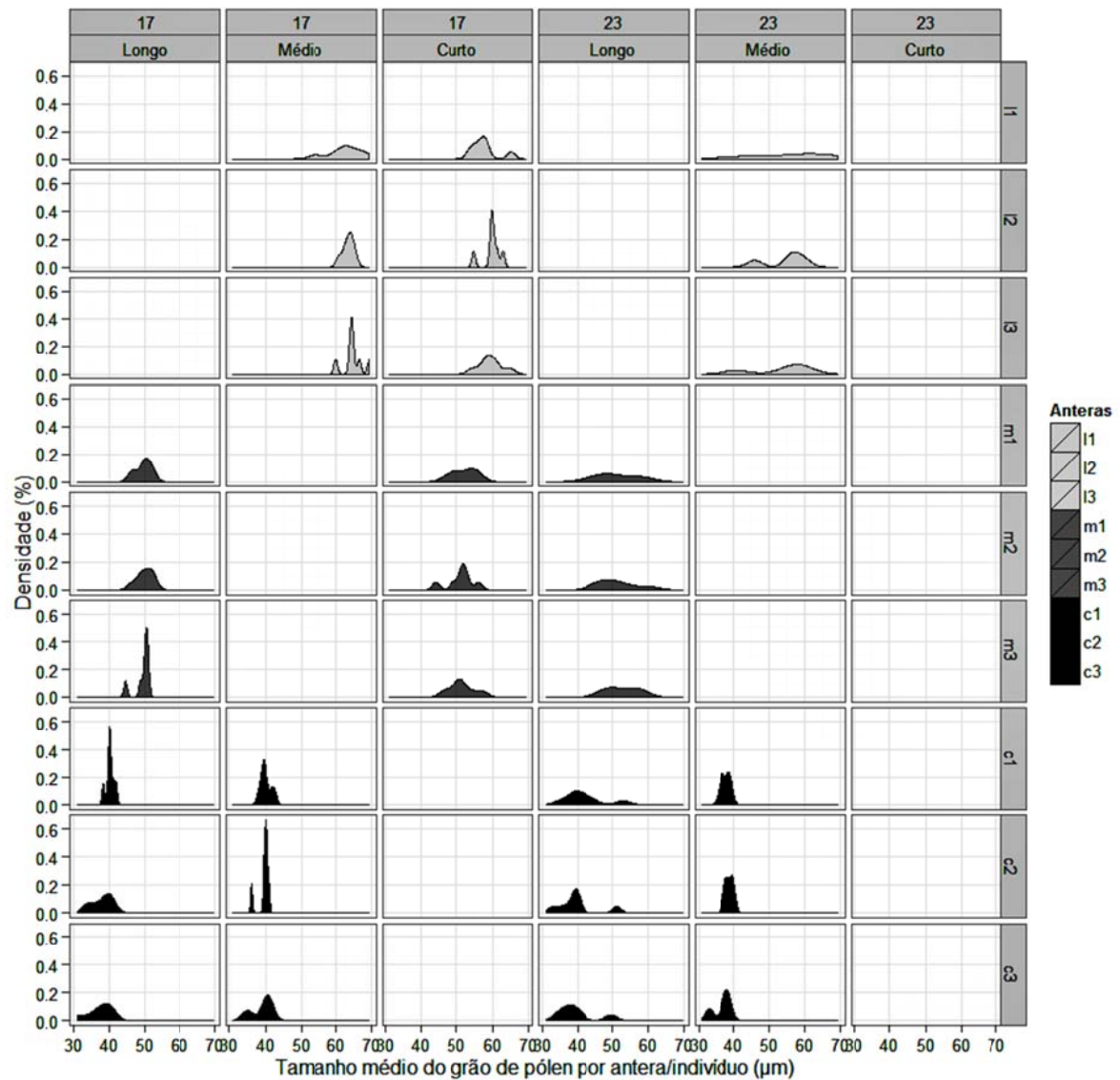


Figura 3.S1. Tamanho do grão de pólen encontrado em cada antera (total seis anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* em duas populações no Pantanal Sul (EAZU 17 e EAZU 23). O morfotipo curto da população 23 tiveram poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel.

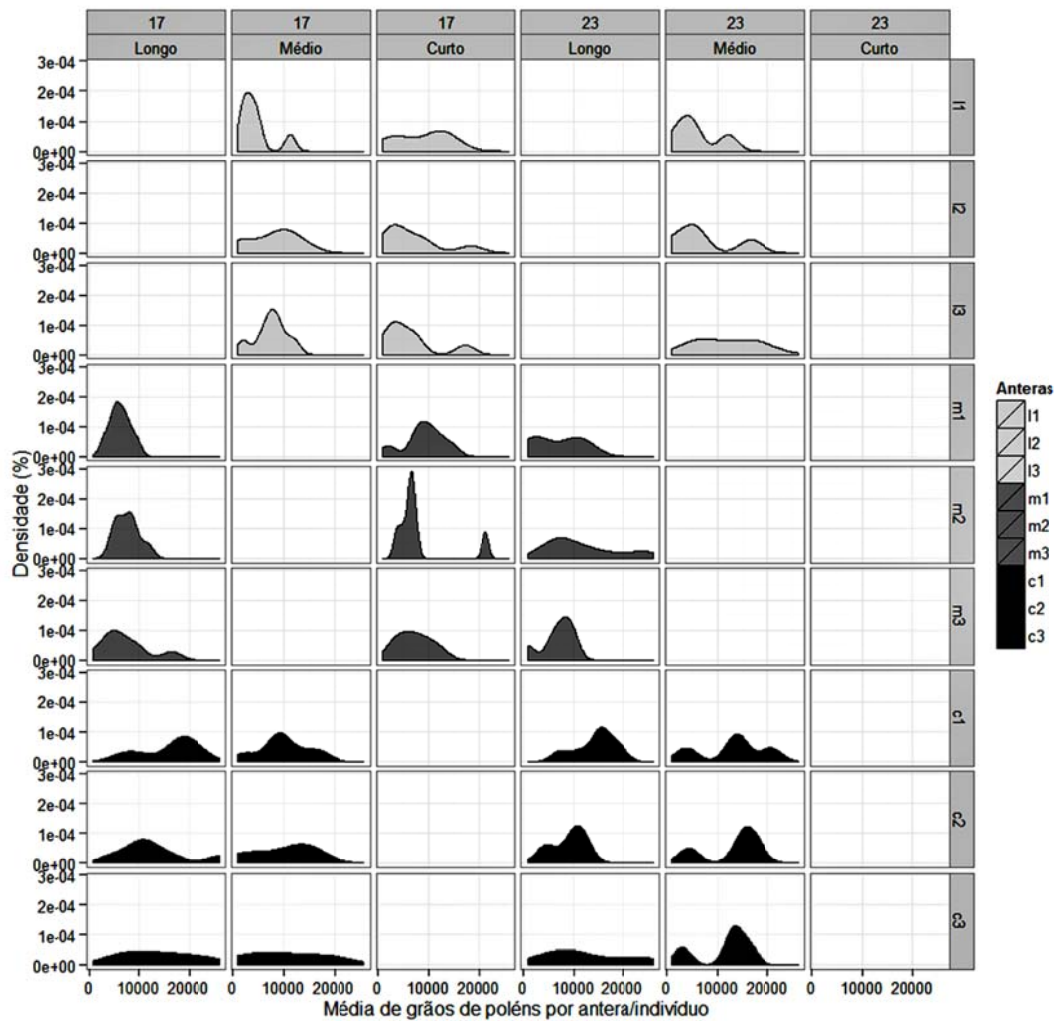


Figura 3.S2. Quantidade de grãos de pólen encontrados em cada antera (total seis anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* em duas populações no Pantanal Sul (EAZU 17 e EAZU 23). O morfotipo curto da população 23 tiveram poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel.



Figura 3.S3. Fotografias de flores pequenas do morfotipo longo encontradas na sub-região de Miranda, Pantanal. As setas apontam a localização do estigma e as elipses amarelas cada conjunto de anteras (Fotos: N.L. Cunha).

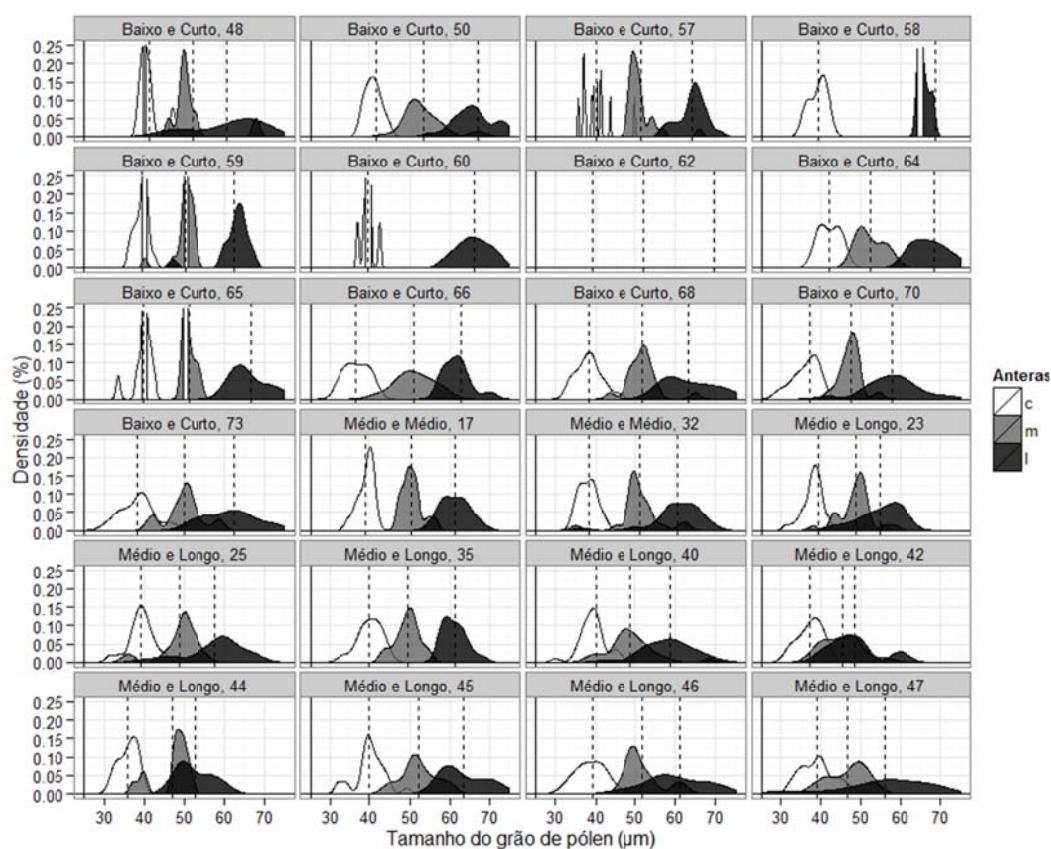


Figura 3.S4. Densidade de Kernel do tamanho médio dos grãos de pólen encontrados em cada antera (total duas anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* nas 24 populações amostradas em cinco sub-regiões do Pantanal Sul. A última população, Leque Taquari 62 teve poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel.

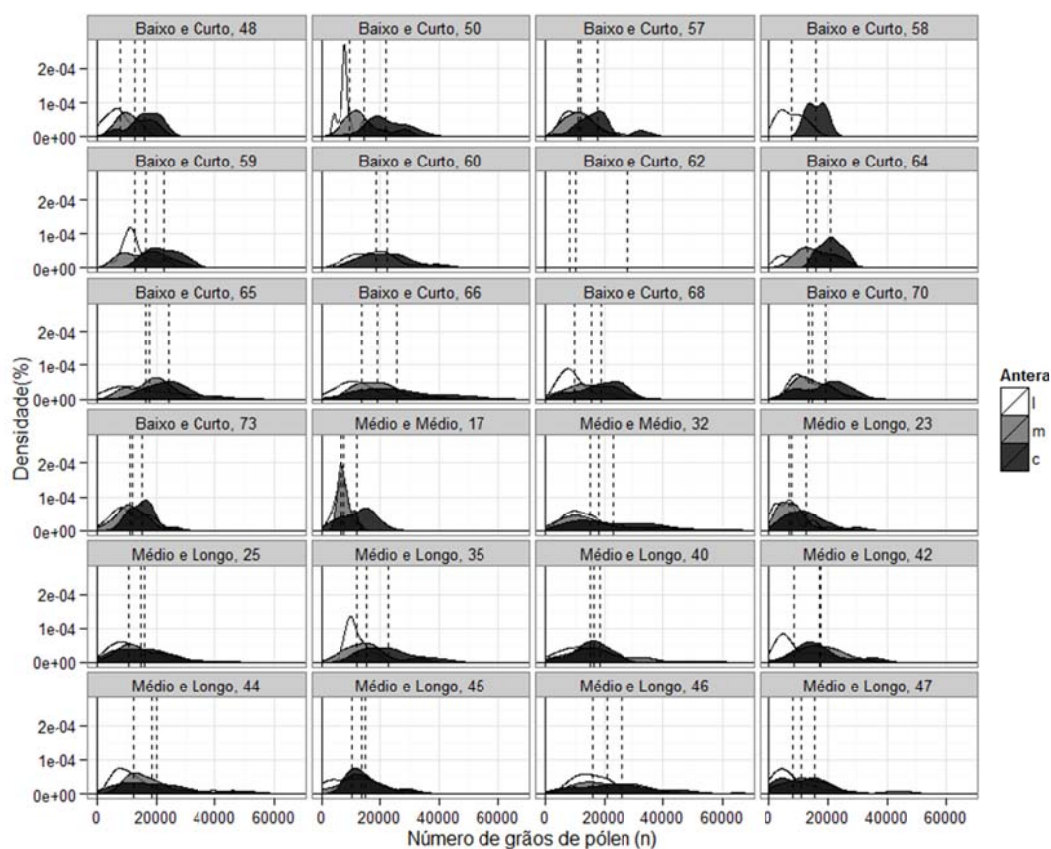


Figura 3.S5. Densidade de Kernel da quantidade média de grãos de pólen encontrados em cada antera (total duas anteras por flor) entre os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* nas 24 populações amostradas em cinco sub-regiões do Pantanal Sul. A última população, Leque Taquari 62 teve poucas observações, não sendo o suficiente para a estimativa de densidade de Kernel.

Página intencionalmente deixada em branco

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Síntese

Nesta tese, investiguei a manutenção, variação e quebra da tristilia em *Eichhornia azurea* em uma região de história geológica recente e grande oscilação das condições ambientais. Amostrei várias populações para estimar a frequência morfológica, visitantes florais e medir estruturas reprodutivas. A frequência morfológica apresenta grande variação de equidade entre morfotipos florais, característica típica para espécies que sofrem com eventos estocásticos. Este resultado é provável dado a instabilidade periódica promovida pelo pulso de inundação. Por outro lado, o morfotipo médio apresentou menor frequência que os demais, a menor aptidão resultante de depressão endogâmica é apontada como provável fator responsável por esse resultado. A interação entre eventos estocásticos e seleção natural determina a grande variação de equidade entre morfotipos florais e menor frequência do morfotipo médio.

A comunidade de visitantes florais difere espacialmente, bem como sua funcionalidade. Visitantes florais das bordas sul e leste do Pantanal, regiões com pulso de inundação de magnitude baixa e duração curta, são diferentes da encontrada nas regiões centro-sul e oeste do Pantanal, regiões com inundação de magnitude média a grande e duração longa. As diferenças na comunidade de visitantes florais também é refletida em sua funcionalidade, abelhas de probóscide longa somente foram frequentes nas populações de *E. azurea* amostradas no Sul e Leste do Pantanal, enquanto nas regiões centro-sul e oeste, não foram

encontrados visitantes florais de probóscide longa. De forma correspondente, a reciprocidade hercogâmica entre morfotipos florais de *E. azurea* foi maior em populações que apresentaram abelhas de longa probóscide, e menores em populações com ausência desses visitantes especializados. Discuto os efeitos da depressão endogâmica, ocasionada pela ausência de vetores especializados, nas modificações florais favorecendo a auto-fertilização. Variação espacial nas interações com polinizadores é um importante fator para modificações dos tratos reprodutivos de *E. azurea*. Além disso, levanto três hipóteses para a ausência de visitantes florais especializados em regiões com inundações de magnitude média a longa e duração longa.

Grandes variações espaciais nas estruturas reprodutivas de flores de *E. azurea* estão associadas aos diferentes níveis de inundação encontrado no Pantanal. Regiões com pulso de inundação de magnitude média e duração longa apresentaram populações com flores menores, menor reciprocidade entre morfotipos florais e maior variação de tamanho nas estruturas. Por outro lado, as flores de populações com inundação baixa e curta, e alta e longa (magnitude e duração respectivamente), apresentaram pouca variação nas estruturas. Discuto a ação sinérgica da intensidade do pulso de inundação, auto correlação espacial e presença de polinizadores especializados para este resultado. Nas regiões com melhor funcionamento da tristilia, são encontrados dois cenários: em regiões com inundação de baixa magnitude e curta duração, as populações apresentam ciclo de floração sincrônico à presença de abelhas especializadas, além de serem efêmeras. É provável que existam altas taxas de alogamia nessas populações,

apesar de também terem sido encontrados alguns variantes semi-homostílicos, e a reprodução sexuada seja muito importante nessas regiões. O segundo cenário é encontrado em regiões com inundação de magnitude alta e duração longa.

Nessas populações não foram encontradas alterações florais, tampouco abelhas oligoléticas. Discuto que nessas regiões é provável que a reprodução clonal tenha maior importância, por meio da dispersão de propágulos durante a grande variação no nível d'água. Dessa forma a ausência de visitantes florais especializados não é importante pressão para alteração dos tratos florais. Por outro lado, as plantas localizadas na região com inundação de magnitude média e duração longa são perenes, ofertam flores o ano inteiro mesmo em períodos mais secos, e não possuem visitantes florais especializados. Discuto que esses fatores em conjunto são forças direcionadoras para a grande variação e quebra do sistema da tristilia em *E. azurea*.

Pesquisas futuras

Aponto vários caminhos e hipóteses para explicar os resultados gerados nesse trabalho, os quais certamente abrem linhas para pesquisas futuras com tristilia e sua interação com variáveis bióticas e abióticas. Investigações sobre a frequência morfológica de outras espécies tristílicas no Pantanal, serão importantes para compreender se a menor frequência do morfotipo médio ocorreu por fatores históricos em *E. azurea*, ou uma pressão seletiva imposta pela interação entre ambiente e forma de vida. Além disso, aponto que a ausência de padrão quanto à

distribuição de equidade entre populações é causada pela instabilidade do Pantanal. Estudos com demais espécies tristílicas deverão apresentar resultado similar caso a flutuação anual do nível das águas seja importante fator estocástico.

Levanto hipóteses para a não ocorrência de abelhas oligoléticas em regiões com inundações de maior magnitude e duração no Pantanal. Estudos sobre a biologia desses animais envolvendo locais de nidificação, período de atividade ao longo do ano e reprodução serão importantes para compreender se regiões com maiores períodos alagados são limitantes para a ocorrência dessas espécies. Pesquisas sobre a pressão de predação e menor aptidão em região estressante como o Pantanal também serão importantes para compreender a ausência dessas abelhas em algumas regiões.

Finalmente, a enorme variação dos tratos florais em regiões com inundação de magnitude média e duração longa merece estudos com condições ambientais controladas. Sugiro que a persistência de indivíduos de *E. azurea* durante os períodos secos promova instabilidade no desenvolvimento de suas flores. No entanto não é claro se a instabilidade no desenvolvimento é causada por estresse ambiental, depressão endogâmica ou ambos. Estudos controlados com plantas originárias de regiões com e sem variação floral, submetidas a diferentes condições ambientais, auxiliarão na compreensão de quais são os processos direcionadores de variação na expressão da tristilia em *E. azurea*.

Ademais, observei maiores pressões de herbivoria em regiões com maior variação de tratos florais e quebra da tristilia (pulso de inundação de média

magnitude e longa duração). O papel deste tipo de interação antagonista na autofertilização de plantas é pouco explorada e aparenta ser importante em *E. azurea*. Estudos futuros envolvendo a herbivoria e variações na expressão floral são necessários para compreender a contribuição deste fator na quebra do sistema e favorecimento da endogamia.

Finalmente estudos moleculares visando compreender o isolamento e fluxo gênico entre populações, e o papel do pulso de inundação na homogeneização genética de populações de *E. azurea* serão importantes para compreender a estruturação genética desta espécie nessa região de história geológica recente. Além disso, estudos genéticos permitirão investigar a hipótese sobre a importância da reprodução sexuada e assexuada entre regiões com diferentes regimes de inundação.

Meu trabalho de tese acrescenta informação inédita sobre a variação morfológica, de visitantes florais e de tratos reprodutivos de *E. azurea* em uma região com história geológica recente e variações extremas na paisagem ao longo do ano. Espero que meu trabalho seja um pequeno, porém importante passo para o avanço de pesquisas com sistemas reprodutivos e polimorfismos genéticos florais nos Neotrópicos.

LITERATURA CITADA

- Ab'Saber, A.N., 1988. O Pantanal Mato-Grossense e a teoria dos refugios. *Revista Brasileira de Geografia* 50, 9–57.
- Adámoli, J. 1982. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. Discussão sobre o conceito de “Complexo do Pantanal”. In: *Anais do XXXII Congresso Nacional de Botânica* 109–119. Universidade Federal de Piauí, Teresina, Brazil.
- Agren, J., & L. Ericson. 1996. Population structure and morph-specific fitness differences in tristylous *Lythrum salicaria*. *Evolution* 50:126–139.
- Aigner P.A. 2001. Optimality modeling and fitness trade-offs: when should plants become pollinator specialists? *Oikos* 95: 177–184.
- Aizen M. A., Morales C.L., Morales J.M. 2008. Invasive mutualists erode native pollination webs. *PLoS biology* 6: e31.
- Alves dos Santos I. & Wittmann D. 2000. Legitimate pollination of the tristylous flowers of *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea). *Plant Systematics and Evolution* 223: 127–137.
- Alves dos Santos I. 1999. Polinização de macrófitas aquáticas da família Pontederiaceae. *Perspectivas da Limnologia no Brasil. Gráfica e Editora União, São Luís. 191p.* São Luis, 191.
- Alves dos Santos I. 2002. Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 77: 499–507.

- Anderson, N., & P. Ascher. 1995. Style morph frequencies in Minnesota populations of *Lythrum* (Lythraceae). *Sexual plant reproduction* 8:105–112..
- Andersson S. 1994. Unequal morph frequencies in populations of tristylous *Lythrum salicaria* (Lythraceae) from southern Sweden. *Heredity* 72:81–85.
- Avila-Sakar G. & Domínguez C.A. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866–877.
- Angiosperm Phylogeny Group. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121
- Assine M.L. 2003. Sedimentação na Bacia do Pantanal Mato-Grossense, Centro-Oeste do Brasil. *Tese livre docência* - Unesp Rio Claro: 115.
- Baena-Díaz F., Fornoni J., Sosenski P., Molina-Freaner F.E., Weller S.G., Pérez-Ishiwara R. & Domínguez C.A. 2012. Changes in reciprocal herkogamy during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina* increase efficiency in pollen transfer. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 574–83.
- Baker H. G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution* 20:349–368
- Baker H. G. 1967. Support for Baker's law-as a rule. *Evolution* 21: 853–856.
- Barrett S.C.H. & Glover D.E. 1985. On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristily. *Evolution* 39: 766–774

-
- Barrett S.C.H. & Harder LD. 1992. Floral variation in *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms (Pontederiaceae) II. Effects of development and environment on the formation of selfing flowers. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 83–107.
- Barrett S.C.H. & Husband BC. 1990. Variation in Outcrossing Rates in *Eichhornia paniculata*: The Role of Demographic and Reproductive Factors*. *Plant Species Biology* 5: 41–55.
- Barrett S.C.H. 1977. Tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth). *Evolution* 33: 499–510.
- Barrett S.C.H. 1978. Floral biology of *Eichhornia azurea* (swartz) kunth (pontederiaceae). *Aquatic Botany* 5: 217–228.
- Barrett S.C.H. 1985. Floral trimorphism and monomorphism in continental and island populations of *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms.(Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 25: 41–60.
- Barrett S.C.H. 1988. Evolution of breeding systems in Eichhornia: A review. *Ann Mo Bot Gard* 75:741–760
- Barrett S.C.H. 1989. The evolutionary breakdown of heterostyly. In: Linhart Y, Bock J. eds. *The evolutionary ecology of plants*. Boulder, CO: Westview Press, 151–169.

-
- Barrett S.C.H. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences* 351: 725–733.
- Barrett S.C.H. & Forno I.W. 1982. Style morph distribution in new world populations of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laubach (water hyacinth). *Aquatic Botany* 13:299–306.
- Barrett S.C.H., Jesson, L. K. & Baker A.M. 2000. The Evolution and Function of Styler Polymorphisms in Flowering Plants. *Annals of Botany* 85: 253–265.
- Barrett S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature reviews. Genetics* 3: 274–84.
- Barrett S.C.H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358: 991–1004.
- Barrett S.C.H., Ness R.W. & Vallejo-Marín M. 2009. Evolutionary pathways to self-fertilization in a tristylous plant species. *The New phytologist* 183: 546–56.
- Barrett S.C.H., Price S. & Shore J. S. 1983. Male fertility and anisoplethic population structure in tristylous *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Evolution* 37:745–759.
- Barrett S.C.H. & Shore I.S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41:34~354

-
- Barrett, S.C.H. & Arroyo, M., 2012. Variation in floral morph ratios in tristylous *Oxalis squamata* (Oxalidaceae): an Andean alpine endemic. *Botany*, 6, pp.1–6.
- Barrett, S.C.H. & Forno, W. 1982. Style morph distribution in New World populations of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Sohns-Laubach (water hyacinth). *Aquatic Botany* 13: 299-306.
- Barrett, S.C.H. & Kohn, J. 1991. The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Eds. D. Falk & K.E. Holsinger), pp. 3–30. Oxford University Press
- Barrett, S.C.H. 1978. Floral biology of *Eichhornia azurea* (swartz) kunth (pontederlaceae). *Aquatic Botany* 5, 217–228.
- Barrett, S.C.H. 1988. Evolution of breeding systems in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75, 741–760 (1988).
- Barrett, S.C.H. 1992. Editor. *Evolution and Function of Heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin
- Barrett, S.C.H., & Husband, B. C. 1990. Variation in Outcrossing Rates in *Eichhornia paniculata*: The Role of Demographic and Reproductive Factors*. *Plant Species Biology* 5:41–55. Wiley Online Library. doi: 10.1111/j.1442-1984.1990.tb00191.x.

- Barrett, S.C.H., & Husband, B. C. 1997. Ecology and genetics of ephemeral plant populations: *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae) in northeast Brazil. *Journal of Heredity* 88:277. Am Genetic Assoc.
- Barrett, S.C.H., 1990. The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(5), pp.144–148.
- Barrett, S.C.H., 1993. The evolutionary biology of tristylly. *Oxford surveys in evolutionary biology*, 9, pp.283–283.
- Barrett, S.C.H., Harder, L.D. & Cole, W.W., 2004. Correlated evolution of floral morphology and mating-type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution; international journal of organic evolution*, 58(5), pp.964–75.
- Barrett, S.C.H., Morgan, M.T., & Husband, B.C. 1989. Dissolution of a complex genetic polymorphism: the evolution of selffertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution*, 43(7): 1398–1416. doi:10.2307/2409456.
- Barrett S.C.H., Cole W.W., Arroyo J.P., Cruzan M.B. & Lloyd D.G. 1997. Sexual polymorphisms in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae): is this species tristylous? *Heredity* 78:135–145.
- Barrett. S.C.H. & Shore J.S. 2008. New insights on heterostyly: Comparative biology, ecology and genetics. In: *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms*. (Ed. V. Franklin-Tong). Springer-Verlag, Berlin. pp. 3–32.

- Bascompte J. & Jordano P. 2007. Plant-Animal Mutualistic Networks: The Architecture of Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 567–593.
- Bates D., Maechler M. & Bolker B. 2012. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999999-0. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Bianchi, M. B., Vesprini, J. & Barrett, S.C.H. Trimorphic incompatibility in *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae). *Sexual Plant Reproduction* 12, 203–208 (2000).
- Boff S.V. 2008. Flora de Capões e Hymenoptera (Abelhas E Vespas) Visitantes de Flores no Pantanal do Miranda-Abobral. Mestrado em Biologia Vegetal - UFMS: 97p.
- Bueno, P. A. A. 2003. Relação de características morfológicas e implicações evolutivas em *Eichhornia azurea*, no Pantanal sulmatogrossense. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.
- Busch, J.W. 2005. The evolution of self-compatibility in geographically peripheral populations of *Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 92: 1503–1512.
- Busch, J.W. 2011. Demography, pollination, and Baker's Law. *Evolution; international journal of organic evolution* 65: 1511–3.

- Case, A.L. & Barrett, S.C.H. 2004. Environmental stress and the evolution of dioecy: *Wurmbea dioica* (Colchicaceae) in Western Australia. *Evolutionary Ecology* 18: 145–164.
- Charlesworth D. 1979. The evolution and breakdown of tristylly. *Evolution* 33: 486–498.
- Colautti R.I., White N.A. & Barrett S.C.H. 2010. Variation of Self-Incompatibility within Invasive Populations of Purple Loosestrife (*Lythrum salicaria* L.) from Eastern North America. *International Journal of Plant Sciences* 171: 158–166.
- Conner, J.K. 2006. Chapter 14 - Ecological genetics of floral evolution pp: 260-294, em: Harder L.D., Barrett S.C.H. 2006 Ecology and evolution of flowers. New York: Oxford University Press. 391p.
- Costich D.E. 1995. Gender specialization across a climatic gradient: experimental comparison of monoecious and dioecious *Ecballium* Ecology (Washington D C) 76: 1036-1050.
- Cruden, R.W., 1977. Pollen-ovule ratios: conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32-46.
- Cunha N.L. & Fischer E.A. 2009. Breeding system of tristylous *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) in the southern Pantanal, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 280: 53–58.
- Cunha N.L., Delatorre M., Rodrigues R.B., Vidotto C., Gonçalves F., Scremin-Dias E., Damasceno-Júnior G., Pott V.J. & Pott A: Structure of aquatic

- vegetation of a large lake, western border of the Brazilian Pantanal.
Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia 2012, 72:519–531.
- Darwin C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species.
London: John Murray.
- Darwin C. 1878. *The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom*,
2nd edn. London, UK: John Murray.
- Dorken M.E. & Eckert C.G. 2001. Severely reduced sexual reproduction in
northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae).
Journal of Ecology 89:339-350.
- Dorken, M.E. & Barrett, S.C.H. 2004. Phenotypic plasticity of vegetative and
reproductive traits in monoecious and dioecious populations of *Sagittaria
latifolia* (Alismataceae): a clonal aquatic plant. Journal of Ecology 92: 32–
44.
- Dulberger R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the
heterostylous syndrome, pp. 41-84 in Evolution and Function Of
Heterostyly, edited by S. C. H. Barrett. Springer-Verlag, New York
- Eckenwalder J.E. & Barrett S.C.H. 1986. Phylogenetic Systematics of
Pontederiaceae. *Systematic Botany* 11: 373.

- Eckert C.G. & Barrett S.C.H. 1992. Stochastic loss of style morphs from populations of tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution* 46: 1014–1029.
- Eckert C.G. & Barrett S.C.H. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection vs. historical contingency. *Ecology* 76: 1051–1066.
- Eckert C.G. & Mavraganis, K., 1996. Evolutionary consequences of extensive morph loss in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): a shift from tristily to distily? *American journal of botany*, 83(8), pp.1024–1032.
- Eckert C.G. 2000. Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology* 81: 532–542.
- Eckert C.G., Manicacci D. & Barrett S.C.H. 1996. Genetic Drift and Founder Effect in Native Versus Introduced Populations of an Invading Plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution* 50: 1512.
- EDIBAP. 1979. Estudo de Desenvolvimento Integrado da Bacia do Alto Paraguai. Relatório de 1a. Fase. Brazilian Government–United Nations Development Programme–Organization of American States, Brasília.
- Elle E. & Hare J.D. 2002. Environmentally Induced Variation in Floral Traits Affects the Mating System in *Datura wrightii*. *Functional Ecology*. 16: 79–88.
- Ernst A. 1955. Self-fertility in monomorphic *Primulas*. *Genetica* 27, 391–448.
- Feinsinger P., Busby W.H. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* 73:231–235

-
- Ferrari S. & Cribari-Neto F., 2004. Beta Regression for Modelling Rates and Proportions. *Journal of Applied Statistics*, 31(7), pp.799–815.
- Finney D., 1983. Genetic equilibria of species with self-incompatible polymorphisms. *Biometrics*, 39(3), pp.573–585.
- Fisher R. A. & Mather K. 1943. The inheritance of style length in *Lythrum salicaria*. *Ann. Eugen.* 12:1-23.
- Fisher R. A. 1930. The genetical theory of natural selection. Oxford, Clarendon Press.
- Fisher R. A. 1941. The theoretical consequences of polyploid inheritance for the mid style form of *Lythrum salicaria*. *Ann. Eugen.* 11 :31-38. .
- Fisher R. A. 1944. Allowance for double reduction in the calculation of genotype frequencies with polysomic inheritance. *Ann. Eugen.* 12: 169-171.
- Fisher R.A. 1935. The theoretical consequences of polyploid inheritance for the mid style form in *Lythrum salicaria*. *Ann. Eugen.* 11, 31-8
- Fishman L., Kelly A.J. & Willis J.H. 2002. Minor quantitative trait loci underlie floral traits associated with mating system divergence in *Mimulus*. *Evolution; international journal of organic evolution* 56: 2138–55.
- Ganders F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607–35.
- Gianoli E. 2004. Plasticity of Traits and Correlations in Two Populations of *Convolvulus arvensis* (Convolvulaceae) Differing in Environmental Heterogeneity. *International Journal of Plant Sciences* 165: 825–832.

- Gonçalves H.C., M. Mercante & Santos E.T. 2011. Hydrological cycle. Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia 71:241–253.
- González C., Ornelas J.F. & Jiménez L. 2005. Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Annals of botany* 95: 371–8.
- Goodwillie C., Kalisz S. & Eckert C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, Theoretical Explanations, and Empirical Evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 47–79.
- Graham S.W. & Barrett S.C.H. 2004. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 91: 1007–1021.
- Graham S.W., Kohn J.R., Morton B., Eckenwalder J.E. & Barrett S.C.H. 1998. Phylogenetic congruence and discordance among one morphological and three molecular data sets from Pontederiaceae. *Systematic biology* 47: 545–67.
- Graham, S.W. & Barrett, S.C.H. 1995. Phylogenetic systematics of Pontederiales: implications for breeding-system evolution. In: Monocotyledons: Systematics and Evolution (Eds. P.J. Rudall, P.J. Cribb, D.F. Cutler & C.J. Humphries), pp. 415–441. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

- Grossenbacher D.L. & Whittall J.B. 2011. Increased floral divergence in sympatric monkeyflowers. *Evolution; international journal of organic evolution* 65: 2712–2718.
- Haldane J.B.S. 1936. Some natural populations of *Lythrum salicaria*. *Journal of Genetics* 32:393-397.
- Halkka O. & Halkka L. 1974. Polymorphic balance in small island populations of *Lythrum salicaria*. *Ann. Bot. Fenn.* 11:267-270
- Hamilton S. K., Sippel S. J. & Melack J. M. 1996. Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. *Archiv für Hydrobiologie* 137(1), 1–23.
- Hamilton, S.K. 2002. Hydrological controls of ecological structure and function in the Pantanal wetland (Brazil). Pp. 133-158. In: McClain, M. (Ed.). *The Ecohydrology of South American Rivers and Wetlands*. Manaus, International Association of Hydrological Sciences.
- Harder L.D. & Barrett S.C.H. 1993. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: effects of anther position and pollinator specialization. *Ecology* 74: 1059–1072.
- Harder L.D. & S.C.H. Barrett. 2006. *The Ecology and Evolution of Flowers*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Harris M. B., Tomas W., Mourão G., Da Silva C. J., Guimarães E., Sonoda F. & Fachim E. 2005. Safeguarding the Pantanal Wetlands: Threats and

- Conservation Initiatives. *Conservation Biology*, 19: 714–720. doi: 10.1111/j.1523-1739.2005.00708.x
- Heuch I. & Lie R. T. 1985. Genotype frequencies associated with incompatibility systems in tristylous plants. *Theoretical Population Biology* 27:318–336. doi: 10.1016/0040-5809(85)90004-8.
- Heuch I. 1979. Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theoretical Population Biology*, 15:43-57
- Højsgaard S & Halekoh U. with contributions from J. Robison-Cox, K. Wright & A. A. Leidi. 2012. doBy: doBy - Groupwise summary statistics, general linear contrasts, population means (least-squares-means), and other utilities. R package version 4.5-5. <http://CRAN.R-project.org/package=doBy>
- Holsinger K. E., Feldman M. W. & Christiansen F. B. 1984. The evolution of self-fertilization in plants: a population genetic model. *American Naturalist* 124: 446-453.
- Hothorn T., Bretz F. & Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346--363.
- Hurlbert S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological monographs* 54: 187–211.
- Husband B.C. & Barrett S.C.H. 1991. Pollinator visitation patterns in populations of Tristylous *Eichhornia panicllata* in northeastern Brazil. *Oecologia* 89: 365-371

- Husband B.C. & Barrett S.C.H. 1992a. Effective Population Size and Genetic Drift in Tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* 46: 1875–1890.
- Husband, B. C., & S.C.H. Barrett. 1992b. Genetic drift and the maintenance of the style length polymorphism in tristylous populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* 69:440–440.
- Husband, B.C. & Barrett, S.C.H. 1992c. Pollinator visitation in populations of Tristylous *Eichhornia paniculata* in northeastern Brazil. *Oecologia*, 89: 365–371
- Husband, B.C. & Barrett, S.C.H. 1999. Spatial and temporal variation in population size of *Eichhornia paniculata* in ephemeral habitats: implications for metapopulation dynamics. *Journal of Ecology* 86: 1021–1031.
- Iriondo M. H. & Garcia N.O. 1993. Climatic variations in the Argentine plains during the last 18,000 years, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 101: 209-220.
- Jimenez-Rueda, J.R., Pessotti, J.E.S. & Mattos, J.T. 1998. Modelo para o estudo da dinâmica evolutiva dos aspectos fisiográficos dos pantanais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 33: 1763–1773.
- Junk W.J. & Nunes da Cunha C. 2005. Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. *Ecological Engineering* 24: 391–401.

- Junk W.J., Nunes da Cunha C., Wantzen K.M., Petermann P., Strüssmann C., Marques M.I. & Adis J. 2006. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences* 68: 278–309.
- Junk, W.J. & Da Silva, C.J., 1999: O “Conceito do pulso de inundação” e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. In: EMBRAPA (Ed.), *Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal. Manejo e Conservação*. EMBRAPA, Corumbá, Brazil, pp. 17–28.
- Kissling, J & Barrett, S.C.H. 2013. Variation and evolution of herkogamy in *Exochaenium* (Gentianaceae): implications for the evolution of distyly. *Annals of Botany*. 112(1): 95-102.
- Lewis D. & Jones D. A. 1992. The genetics of heterostyly, pp. 129- 130 in: *Evolution and Function of Heterostyly*, edited by S. C. H. Barrett. Springer-Verlag, New York.
- Lewis D. 1975. Heteromorphic incompatibility system selection under disruptive. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 188:247–256.
- Linhart Y.B. & Grant M.C. 1996. Evolutionary Significance of Local Genetic Differentiation In Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237–277.
- Liu W., Wang Y., Chen Q. & Yu S. 2013. Pollination of invasive *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) by the introduced honeybee (*Apis mellifera* L.) in South China. *Plant Systematics and Evolution*. 299: 817-825.

- Lloyd D.G. & Webb C.J. 1992. The evolution of heterostyly. In: Barrett S.C.H., ed. *Evolution and function of heterostyly*, Berlin: Springer Verlag, 151-178.
- Lloyd D.G. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist* 113: 67–79.
- Maêda J.M. 1985. *Manual para uso da câmara de Newbauer para contagem de pólen em espécies florestais*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Silvicultura, Seropédica.
- Mal T & Lovett-Doust J. 2005. Phenotypic plasticity in vegetative and reproductive traits in an invasive weed, *Lythrum salicaria* (Lythraceae), in response to soil moisture. *American Journal of Botany* 92: 819–825.
- Manicacci D. & Barrett S.C.H. 1996. Fertility differences among floral morphs following selfing in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): inbreeding depression or partial incompatibility? *American Journal of Botany* 83:594–603.
- Martin T.G., Wintle B.A., Rhodes J.R., Kuhnert P.M., Field S.A., Low-Choy S.J., Tyre A.J. & Possingham H. P. 2005. Zero tolerance ecology: improving ecological inference by modelling the source of zero observations. *Ecology Letters* 8:1235–1246.
- McCall A.C. & Irwin R.E. 2006. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology letters* 9: 1351–65.

-
- Memmott J., Waser N.M., Price M. V. 2004. Tolerance of pollination networks to species extinctions. *Proceedings of The Royal Society B.- Biological sciences* 271: 2605–11.
- Meyer D., Zeileis A. & Hornik K. 2012. vcd: Visualizing Categorical Data. R package version 1.2-13.
- Michener C. 1974. Further notes on nests of *Ancyloscelis* (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 47.
- Mitchell R.J., Irwin R.E., Flanagan R.J., Karron J.D. 2009. Ecology and evolution of plant-pollinator interactions. *Annals of Botany* 103: 1355–63.
- Moeller D.A. 2006. Geographic structure of pollinator communities, reproductive assurance, and the evolution of self-pollination. *Ecology* 87:1510–22.
- Moeller D.A. & Geber M.A. 2005. Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution; international journal of organic evolution* 59:786–99
- Montoya J.M., Pimm S.L. & Solé R. V. 2006. Ecological networks and their fragility. *Nature* 442: 259–64.
- Morgan M. T. & Barrett S.C.H. 1988. Historical factors and anisoplethic population structure in tristylous *Pontederia cordata*: a reassessment. *Evolution* 42:496–504.
- Morgan M.T., Schoen D.J., Bataillon T.M. 1997. The evolution of self-fertilization in perennials. *The American naturalist* 150:618–38.
- Muller H. J. 1932, Some genetic aspects of sex. *American Naturalist*. 66: 118-138.

- Ness R.W. 2011. Molecular Population Genetic Consequences of Evolutionary Transitions from Outcrossing to Selfing in Plants. Doctor of Philosophy - Department of Ecology and Evolutionary Biology University of Toronto: 288.
- Ness R.W., Graham S.W. & Barrett S.C.H. 2011. Reconciling Gene and Genome Duplication Events: Using Multiple Nuclear Gene Families to Infer the Phylogeny of the Aquatic Plant Family Pontederiaceae. *Molecular Biology and Evolution* 28: 1–33.
- Ness R.W., Wright S.I. & Barrett S.C.H. 2010. Mating-system variation, demographic history and patterns of nucleotide diversity in the Tristylous plant *Eichhornia paniculata*. *Genetics* 184: 381–92.
- Nunes da Cunha, C. & Junk, W.J., 2004. Year-to-year changes in water level drive the invasion of *Vochysia divergens* in Pantanal grasslands. *Applied Vegetation Science* 7, 103–110.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R. B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H. & Wagner H. 2012. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-5. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ornduff R. 1972. The breakdown of trimorphic incompatibility in *Oxalis* section Corniculatae. *Evolution* 26: 52–65
- Ospina R. & Ferrari S.L.P. 2012. A general class of zero-or-one inflated beta regression models. *Computational Statistics & Data Analysis* 56(6):1609–1623.

-
- Pannell J.P & Barrett, S.C.H. 2001. Effects of population size and metapopulation dynamics on a mating-system polymorphism. *Theoretical Population Biology* 59: 145–155.
- Pannell J.R. & Barrett S.C.H. 1998. Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. *Evolution* 52: 657–668.
- Pannell J.R., Dorken M.E. & Eppley S.M. 2005. "Haldane's Sieve" in a metapopulation: sifting through plant reproductive polymorphisms. *Trends in Ecology & Evolution* 20(7): pp.374–9.
- Pérez-Barrales R.R., Vargas P. & Arroyo J.P. 2006. New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. *Apodanthi*. *The New phytologist* 171: 553–67.
- Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D. & the R Development Core Team 2012. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-106.
- Pinheiro J.C. & Bates D.M. 2000. "Mixed-Effects Models in S and S-PLUS", Springer.
- Ponce V.M. 1995. *Hydrologic and Environmental Impact of the Paraná-Paraguay Waterway on the Pantanal of Mato Grosso (Brazil)*. San Diego State University, San Diego, 125 pp.
- Pott A. & Pott V. J. 2000. *Plantas aquáticas do Pantanal*. EMBRAPA. Brasília. 404p (ISBN: 85-7383-091-3)

- Price S.D. & Barrett S.C.H. 1982. Tristyly in *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Canadian Journal of Botany* 60: 897–905.
- R Core Team 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rosas F. & Domínguez C.A 2009. Male sterility, fitness gain curves and the evolution of gender specialization from distyly in *Erythroxylum havanense*. *Journal of evolutionary biology* 22: 50–9.
- Ornduff R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* 18: 121–133.
- RADAMBRASIL. Levantamentos dos recursos naturais. Cuiabá-Rio de Janeiro: Ministério das Minas e Energia. Secretária Geral. Projeto RADAMBRASIL. Folha SD 21, 1982. p. 448.
- Richards J.H., Barrett S.C.H. & Garden F.T. 1992. The development of heterostyly. *Evolution and function of heterostyly*: pp 85–128.
- Rigby R.A. & Stasinopoulos D.M. 2005. Generalized additive models for location, scale and shape,(with discussion). *Applied Statistics*. 54, part 3, pp 507–554.
- Sánchez J.M., Ferrero V. & Navarro, L. 2008. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (sensu lato) plant populations. *Annals of Botany* 102: 463–472.

-
- Sánchez J.M., Ferrero V., Navarro L. 2013. Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations (T Elzenga, Ed.). *Plant Biology* 15: 616-620.
- Santos-Gally R., Pérez-Barrales R., Simón V.I. & Arroyo J. 2013. The role of short-tongued insects in floral variation across the range of a style-dimorphic plant. *Annals of botany* 111: 317–28.
- Sarkar D. 2008. *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, New York. ISBN 978-0-387-75968-5
- Schlindwein C. & Medeiros P.C.R. 2006. Pollination in *Turnera subulata* (Turneraceae): Unilateral reproductive dependence of the narrowly oligolectic bee *Protomeliturga turnerae* (Hymenoptera, Andrenidae). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 201: 178–188.
- Schoch-Bodmer, H. 1938. The proportion of long-, mid-, and short-styled plants in natural populations of *Lythrum salicaria*. *Journal of Genetics*. 36: 39-43.
- Seburn C.N.L., Dickinson T.A. & Barrett S.C.H. 1990. Floral variation in *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms (Pontederiaceae): I. Instability of stamen position in genotypes from northeast Brazil. *Journal of Evolutionary Biology* 3: 103–123.
- Short N.M. & Blair Jr. R.W. 1986. Geomorphology from space. A global overview of regional landforms. NASA SP-486. Washington, DC.
- Silva, J.D.S.V. da & Abdon, M.D.M., 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa agropecuária brasileira* 33: 1703–1711.

-
- Sokal R.R. & Rohlf F. J. 2011. *Biometry* 4th. 937p (ISBN 0716786044). W. H. Freeman pub.
- Solé R. V. & Montoya J.M. 2001. Complexity and fragility in ecological networks. *Proceedings of The Royal Society B - Biological sciences* 268: 2039–2045.
- Sosenski P., Fornoni J., Molina-Freaner F.E., Weller S.G. & Domínguez C.A. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylly-distylly transition in *Oxalis alpina*. *The New phytologist* 185: 829–840.
- Souza, P.C.B. 2006. Frequência de Morfos heterostílicos em *Eichhornia azurea* no Sistema de Baías Caiçara, Cáceres-MT, Brasil. *Monografia de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Mato Grosso*. UFMT.
- Stebbins G. 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist* 91:337–354.
- Stebbins G. L. 1974. *Flowering plants: evolution above the species level*. Belknap Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Steets J. & Ashman T. 2004. Herbivory alters the expression of a mixed-mating system. *American Journal of Botany* 91: 1046–1051.
- Steets J.A., Hamrick J.L. & Ashman T.L. 2006. Consequences of vegetative herbivory for maintenance of intermediate outcrossing in an annual plant. *Ecology* 87: 2717–27.

-
- Stevaux J.C., 2000. Climatic events during the late Pleistocene and Holocene in the upper Parana River: Correlation with NE Argentina and South-Central Brazil. *Quaternary International* 72: 73 – 86.
- Sultan S.E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* 5: 537–42.
- Suttle K.B. 2003. Pollinators as mediators of top-down effects on plants. *Ecology Letters* 6: 688–694.
- Takebayashi N. & Morrell P.L. 2001. Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany* 88: 1143.
- Thompson J.N. 2005. *The Geographic Mosaic of Coevolution*. University of Chicago Press, Chicago. 442 pp
- Torchio P. 1974. Notes on the biology of *Ancyloscelis armata* Smith and comparisons with other anthophorine bees (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 47: 54–63.
- Vallejo-Marín M. & Barrett S.C.H. 2009. Modification of flower architecture during early stages in the evolution of self-fertilization. *Annals of botany* 103: 951–62.
- Vallejo-Marín M., Dorken M.E. & Barrett S.C.H. 2010. The Ecological and Evolutionary Consequences of Clonality for Plant Mating. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 193–213.

-
- Weller S.G. 1976a. Breeding system polymorphism in a heterostylous species. *Evolution* 30:442–454.
- Weller S.G. 1976b. The genetic control of tristily in *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Heredity* 37:387-393.
- Weller S.G. 1981. Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* (Rose) Kunth (Oxalidaceae) in southeastern Arizona. *Botanical Journal of the Linnean Society* 83:189-198.
- Weller S.G. 1986. Factors influencing frequency of the mid-styled morph in tristylous populations of *Oxalis alpina*. *Evolution* 40: 279–289.
- Weller S.G., Domínguez C. A., Molina-Freaner F.E., Fornoni J. & Leubhn G. 2007. The evolution of distyly from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American journal of Botany* 94: 972–85.
- Wickham H. 2007. Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software* 21(12).
- Wickham H. 2009. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer New York.
- Wickham H. 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software* 40(1): 1-29.
- Wolfe L.M. & Barrett S.C.H. 1987. Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata* L. *Oecologia* 74: 347–351.

-
- Wolfe L.M. & Barrett S.C.H. 1989. Patterns of pollen removal and deposition in tristylous *Pontederia cordata* L. (Pontederiaceae). *Biological Journal of Linnean Society* 36:317-329.
- Wright S.I., Kalisz S. & Slotte T. 2013. Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20130133.
- Zuur A., Ieno E.N., Walker N., Saveliev A.A. & Smith G.M. 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. Springer, 574p.