

MARCELO SOBRAL LEITE

**ANTECOLOGIA DE PODOSTEMACEAE EM ECOSISTEMAS
AQUÁTICOS ASSOCIADOS À FLORESTA ATLÂNTICA NORDESTINA**

RECIFE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANTECOLOGIA DE PODOSTEMACEAE EM ECOSISTEMAS
AQUÁTICOS ASSOCIADOS À FLORESTA ATLÂNTICA NORDESTINA

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal, Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Machado
Área de Concentração: Ecologia Vegetal
Linha de Pesquisa: Biologia Floral e da
Reprodução

RECIFE, 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leite, Marcelo Sobral

Antecologia de Podostemaceae em ecossistemas aquáticos associados à Floresta Atlântica nordestina / Marcelo Sobral Leite– Recife: O Autor, 2013.

185 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Isabel Cristina Machado

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 2013.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Plantas aquáticas 2. Polinização 3. Mata Atlântica I. Machado, Isabel Cristina (orientadora) II. Título**

583.82 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 216

MARCELO SOBRAL LEITE

**ANTECOLOGIA DE PODOSTEMACEAE EM ECOSISTEMAS
AQUÁTICOS ASSOCIADOS À FLORESTA ATLÂNTICA NORDESTINA**

Tese de doutorado apresentada à banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Isabel C.S. Machado – UFPE

Profa. Dra. Kayna Agostini - UFSCAR

Profa. Dra. Cibele Cardoso de Castro - UFRPE

Profa. Dra. Ana Virginia Lima Leite - UFRPE

Prof. Dr. Rafael Batista Louzada - UFPE

Dedico ao Professor Geraldo Mariz (in memoriam)

Agradecimentos

Sou grato a todos que me auxiliaram durante o transcorrer desta tese. Em especial, a Msc. Polyhanna Gomes (UNESP) pelo auxílio no campo, nas análises estatísticas, na leitura crítica dos capítulos e na confecção das pranchas, além da amizade e carinho; e a Profa. Dra. Isabel C.S. Machado (UFPE) pela orientação e amizade.

Agradeço também aos membros do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva e demais laboratórios da UFPE. Especialmente a Tarcila de Lima Nadia, Elisângela Lúcia de Santana Bezerra, Ana Carolina Galindo da Costa, Camila Carvalho de Gusmão Lôbo, Joel Araújo Queiroz, Kelaine de Miranda Demétrio e Lucinéia Avelino da Silva (LABFLOR), João Batista de Oliveira Júnior (Herbário URM), Liliane Galindo Dantas (Laboratório de Citogenética Vegetal), João Amazonas e Marlene de Alencar Barbosa (Herbário Geraldo Mariz) pela amizade e apoio. Agradeço ainda a Regina Carvalho (UFPE) pelas ilustrações botânicas, ao Msc. Airton Carvalho (UFPB) pela identificação dos visitantes florais, a Profa. Dra. Aldaléa S. Tavares (UFSC) pela identificação e confirmação das Podostemaceae; e, finalmente, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

1. Apresentação.....	2
2. Sistemas reprodutivos, polinização e visitantes florais em Podostemaceae: uma revisão com ênfase nos táxons neotropicais.....	4
2.1. Introdução.....	7
2.2. Material e Métodos.....	8
2.3. Resultados.....	10
2.4. Conclusões e perspectivas.....	15
3. Evidências morfológicas sobre a polinização em Podostemaceae: o caso de <i>Apinagia</i> spp.....	37
3.1. Introdução.....	40
3.2. Material e Métodos.....	41
3.3. Resultados.....	45
3.4. Discussão.....	46
4. Estratégias reprodutivas múltiplas (ERM) em angiospermas: evidências experimentais em Podostemaceae.....	61
4.1. Introdução.....	64
4.2. Material e Métodos.....	66
4.3. Resultados.....	71
4.4. Discussão.....	73
5. Antecologia, sistema de cruzamento e avaliação em médio prazo do sucesso natural de <i>Tristicha trifaria</i> (Bory ex Willd.) Spreng. (Podostemaceae: Tristichoidae).....	91
5.1. Introdução.....	94
5.2. Material e Métodos.....	95
5.3. Resultados.....	99
5.4. Discussão.....	101
6. Antecology and reproductive system of <i>Mourera fluviatilis</i> (Podostemaceae): pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family?.....	118
Resumo.....	130
Abstract.....	131
Apêndices.....	132

Apresentação

O domínio da Floresta Atlântica se compõe de múltiplas fitofisionomias; conjuntos de ecossistemas intrinsecamente associados como manguezais, restingas e rios contíguos aos remanescentes florestais. A Floresta Atlântica Nordeste corresponde a uma faixa de 80 km de florestas que cobriam 56.400 km² de áreas ao norte do rio São Francisco, equivalente a 4,3% da Floresta Atlântica brasileira original. Dessa porção, restam pouco mais de 2% da vegetação original, atualmente formada por fragmentos florestais de reduzido tamanho (<500 ha) e elevado grau de isolamento. Entre os ambientes associados à Floresta Atlântica Nordeste, os córregos e rios encontram-se entre os mais ricos e ameaçados, por pressão de uso, poluição e manejo inadequado. Diante desse cenário, é necessário embasar o manejo e proteção destes ecossistemas aquáticos, a partir do conhecimento científico, direcionando tomadas de decisão.

Na região neotropical, nosso conhecimento sobre aos grupos biológicos típicos desses biótopos aquáticos encontra-se em nível de classificação e levantamento de espécies. Nesse contexto, as hidrófitas estão entre os grupos mais negligenciados cientificamente. Embora reconhecidas quanto à sua importância para: (a) manutenção da estrutura física de mananciais utilizados no abastecimento humano; (b) produtividade primária; (c) produção de oxigênio; e (d) manutenção da biodiversidade aquática e ecotonal, conhecemos a maioria destas plantas apenas por descrições taxonômicas. Estudos ecológicos, incluindo pesquisas sobre reprodução, em plantas aquáticas são escassos, impossibilitando a visualização de padrões gerais. Trabalhos que contemplem tais aspectos são fundamentais ao entendimento: (1) da dinâmica populacional; (2) das relações evolutivas; (3) para planos de manejo e conservação e (4) utilização comercial. Apesar de nossa carência de conhecimento, é possível perceber entre as hidrófitas ampla diversidade de sistemas de polinização, possivelmente a mais elevada dentre as angiospermas.

Podostemaceae são reófitas submersas restritas a ambientes de cachoeiras com dinâmica hidrológica de ampla flutuação sazonal do nível das águas. Sua plasticidade estrutural e fenotípica confere a estas hidrófitas extrema adaptabilidade e dominância em ambientes reófilos inóspitos para a maioria das espermatófitas. No neotrópico, formam extensos prados subaquáticos em águas com baixa produtividade, respondendo pela produção do carbono autóctone, fonte abundante de alimento para a rica biota associada. A crescente destruição destes ecossistemas aquáticos tornou algumas Podostemaceae ameaçadas de extinção, a exemplo de *Mourera fluviatilis* Aubl. e *Podostemum saldanhanum* (Warm.) Philbrick & Novelo, que atualmente figuram na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.

As Podostemaceae se destacam também pela escassez de dados sobre aspectos reprodutivos. Nosso conhecimento acerca dos sistemas de polinização, cruzamento, ocorrência de autocompatibilidade e tipos de polinizadores é incipiente para essa família. Os poucos estudos de caso existentes sugerem que a autogamia predomina e que a anemofilia é o principal sistema de polinização, pois, apesar de submersas, as Podostemaceae apresentam floração emersa. O ciclo de vida de seus representantes é modulado pelo nível das águas dos rios, cuja diminuição na estação seca permite a exposição das flores aos agentes polinizadores. Esse padrão fenológico explosivo atrai ampla gama de visitantes florais, principalmente insetos antófilos menos especializados como algumas espécies poliléticas de Apinae e Halictinae (Hymenoptera: Apidae). Evidências experimentais recentes, no entanto, indicam que a alogamia mediada por insetos e vento (ambofilia) e mecanismos de auto-incompatibilidade parcial podem ser comuns nessas macrófitas aquáticas. Tais observações vão de encontro à reconhecida autogamia comum em plantas aquáticas, interpretada como resposta a situações ecológicas desfavoráveis à polinização cruzada atribuídas a esse meio.

Em função dessa dinâmica ambiental extrema, a floração e frutificação nesta família é abundante, mas rápida e extremamente sazonal, dificultando as pesquisas. Correntezas rápidas e fortes, sol pleno, sítios rochosos em áreas florestais densas, de difícil acesso e distantes de agrupamentos humanos são condições comumente enfrentadas pelos pesquisadores que buscam conhecer estas plantas. Ao mesmo tempo, as técnicas de cultivo *in vitro* não permitem aos pesquisadores acessarem determinadas informações, tais como mecanismos de incompatibilidade e crescimento de tubos polínicos em laboratório.

A presente tese tem por objetivo geral descrever a antecologia de espécies de *Apinagia* Tulasne, *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. e *M. fluviatilis* em rios associados à Floresta Atlântica Nordeste, além investigar a fenologia, os mecanismos de polinização e os sistemas de cruzamento. Os objetivos supracitados foram determinados a partir das seguintes hipóteses gerais: (I) O padrão fenológico e a regularidade fenológica das espécies de *Apinagia* é Explosivo e Anual e Regular, respectivamente; (II) Os insetos visitantes florais são abelhas poliléticas das subfamílias Apinae e Halictinae; (III) As Podostemaceae são autocompatíveis, mas apresentam maior sucesso reprodutivo a partir de polinizações cruzadas e ;(IV) a ambofilia é o sistema de polinização nestas espécies. Para tanto, me embasei em: (1) ampla revisão de literatura; (2) descrições morfológicas e investigações de biologia floral e; (3) evidências experimentais sobre os sistemas de cruzamento e mecanismos de polinização. Essas informações, acompanhadas de discussões e conclusões preliminares serão apresentados em cinco capítulos a seguir.

Capítulo 1

Sistemas reprodutivos, polinização e visitantes florais em Podostemaceae:
uma revisão com ênfase nos táxons neotropicais

Manuscrito a ser submetido ao periódico “The Botanical Review”

Sistemas reprodutivos, polinização e visitantes florais em Podostemaceae: uma revisão com ênfase nos táxons neotropicais

Marcelo Sobral-Leite^{1,3}, José Alves de Siqueira Filho², Isabel Cristina Machado¹

1. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901.

2. Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Centro de Referência para a Recuperação de Áreas Degradadas da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco – CRAD/UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, BR 407, km 12, lote 543, Distrito de Irrigação Senador Nilo Coelho, Zona Rural, Petrolina – PE, CEP: 56.300-990.

3. msobralleite@yahoo.com.br

Resumo Dentre os grupos funcionais de angiospermas, as plantas aquáticas apresentam ampla diversidade de estratégias reprodutivas e de polinização. A escassez de pesquisas, no entanto, impossibilita a visualização de padrões. Podostemaceae se destaca entre as aquáticas menos conhecidas quanto a esse aspecto. Referências clássicas postulam que variações morfo-estruturais das flores repercutem nos sistemas de polinização, sendo Podostemoideae entomófilas e Tristichoideae anemófilas e autógamas. Nossos objetivos foram rever na literatura informações sobre os aspectos reprodutivos e de polinização em Podostemaceae, respondendo às questões: (1) quantas espécies têm inferências sobre sistemas reprodutivos e de polinização?; (2) quais são seus visitantes florais?; e (3) tipos de estratégias reprodutivas e mecanismos de polinização caracterizam subfamílias ou regiões geográficas? Encontramos informações para 73 espécies de 28 gêneros das duas subfamílias, sendo 68 espécies e 23 gêneros pertencentes a Podostemoideae e cinco espécies e cinco gêneros a Tristichoideae. *Apinagia* (11 spp.), *Ledermanniella* (8 spp.), *Rhyncholacis* (6 spp.) e *Zeylanidium* (5 spp.), tendo *Cladopus*, *Marathrum* e *Polypleurum* (quatro espécies cada) foram os gêneros com mais informações. Trinta e duas espécies (43.8%) apresentaram dados sobre sistema de polinização. *Apinagia glaziovii*, *A. richardiana*, *A. riedelii*, *Apinagia* sp., *L. quangensis*, *M. rubrum*, *Mourera fluviatilis* e *D. ceylanica* foram consideradas ambófilas. Encontramos 24 insetos visitantes florais entre espécies (16), gêneros (13) e famílias (7) pertencentes a quatro ordens: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Odonata. Reunidas estas informações chegamos as seguintes conclusões: (1) A variação na altura do androceu descrita para algumas spp. neotropicais - morfos florais “longistaminados” e “brevistaminados” - provavelmente favorece a polinização cruzada. (2) A ampla superfície recoberta por papilas estigmáticas exerceria função-chave na captação de grãos de pólen transportados pelo vento. (3) Espécies entomófilas apresentam características florais específicas (e.g. estames vistosos e chamativos e odor), assim como aquelas predominantemente anemófilas; (4) Os vários registros de mais de um sistema de polinização dentro de uma mesma espécie, indica que ambofilia seja estratégia relevante em Podostemaceae; (5) Contrastando com as demais famílias de plantas aquáticas, Podostemaceae utilizam estratégias reprodutivas e de polinização generalistas. Dentre as quais, a ambofilia e, possivelmente estratégias de cruzamento misto.

Palavras-chave alogamia autogamia cleistogamia entomofilia anemofilia ambofilia sistemas de cruzamento misto “crossing flowers” polinizadores

Introdução

Dentre os vários grupos funcionais de angiospermas, as plantas aquáticas apresentam a maior diversidade de estratégias reprodutivas e de polinização (Sculthorpe, 1967; Cook, 1988; 1990; Philbrick, 1988; Barrett et al., 1993; Grace, 1993; Philbrick & Les, 1996). Propagação clonal intensiva e de variados tipos (Sculthorpe, 1967; Hutchinson, 1975; Grace, 1993), alternada a mecanismos evolutivamente derivados de polinização são encontrados entre as hidrófitas (Barrett, 1988; Osborn & Schneider, 1988; Vieira & Lima, 1997; Carvalho & Schlindwein, 2011; Sobral-Leite et al., 2011). Estreitas relações co-evolutivas com polinizadores como oligolectia (Vieira & Lima, 1997; Carvalho & Schlindwein, 2011), sistemas de cruzamento complexos, e.g. heterostilia (Barrett, 1988; Barrett et al., 1993), hidrofilia (Cox & Knox, 1988; Les, 1988; Philbrick, 1988) e ambofilia (Osborn & Schneider, 1988; Gupta & Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011) são descritos para estas plantas. Tais estratégias reprodutivas podem ainda divergir marcadamente entre táxons filogeneticamente relacionados (Cook, 1988; Philbrick & Les, 1996) ou ocorrer simultaneamente em uma mesma espécie ou grupo irmão (Sobral-Leite et al., 2011, submetido).

Nosso conhecimento sobre as estratégias reprodutivas de hidrófitas, contudo, se deve majoritariamente a boas descrições em poucos estudos (Cook, 1988; Barrett et al., 1993). Embora importantes para compreensão das relações evolutivas e das dinâmicas ecológicas (Cook, 1988; Philbrick, 1988; Barrett et al., 1993; Philbrick & Les, 1996), as pesquisas sobre polinização e sistemas de cruzamento em hidrófitas são escassas, impossibilitando a visualização de padrões (Barrett et al., 1993).

Entre as famílias de angiospermas aquáticas, Podostemaceae se destaca dentre as menos conhecidas com relação aos aspectos reprodutivos (Sculthorpe, 1967; Cook, 1988, 1990; Philbrick & Novelo, 1995, 1998). Estas reófitas compreendem cerca de 54 gêneros e 300 espécies dulciaquícolas, predominantemente pantropicais (Koi et al. 2012), excetuando-se os gêneros *Cladopus* e *Hydrobryum* que alcançam as zonas temperadas (Ameka et al., 2003; Philbrick, 2004). As regiões neotropical e tropical africana são seus centros de diversidade (Van Royen, 1951; Ameka et al., 2003), sendo a primeira reconhecida como o centro de origem da família (Van Royen, 1951). Restritas a ambientes lóticos de corredeiras e cataratas (Sculthorpe, 1967; Cook, 1990), o ciclo reprodutivo de seus representantes é determinado pelos ritmos sazonais de cheias e vazantes dos rios (Cook, 1990; Philbrick & Novelo, 1995). Na estação chuvosa, permanecem submersas em crescimento vegetativo e, durante a estação seca, a vazante permite a emersão destas plantas e a exposição de suas flores ao meio aéreo (Willis, 1902; Van Royen, 1951).

Podostemaceae sensu lato se subdivide em duas subfamílias, Podostemoideae e Tristichioideae (Philbrick, 2004), sendo atribuído que as variações morfo-estruturais das flores entre elas podem repercutir diferencialmente sobre seus sistemas de polinização (Willis, 1902; Rutishauser & Huber, 1991; Rutishauser, 1997). Willis (1902) postulou que a poliandria, a disposição dos estames e estigmas e a variação no número de óvulos estariam associadas a uma gradiente de polinização em Podostemaceae, da entomofilia como caráter basal, a anemofilia como derivado. Rutishauser (1997) argumenta que, nas Podostemoideae neotropicais dos gêneros *Apinagia*, *Mourera* e *Rhyncholacis*, pedicelos e estames de cores vistosas, poliandria e presença de compostos aromáticos estariam relacionados à entomofilia. Em Tristichioideae, postula-se que a autogamia casmógama, a cleistogamia, além da anemofilia sejam típicas (Arber, 1920; Grubert, 1974; Rutishauser & Huber, 1991; Rutishauser, 1997). Inferências sobre os sistemas reprodutivos e mecanismos de polinização em Podostemaceae podem ser encontradas dispersas em diferentes tipos de estudo. Por exemplo, pesquisas sobre morfologia, disposição e merística de partes florais (e.g. Philbrick & Bogle, 1988; Khosla & Mohan Ram, 1993), palinologia e razão pólen-óvulo (e.g. Okada & Kato, 2002; Passarelli et al., 2002) e estudos de caso (Philbrick, 1984; Philbrick & Novelo, 1998; Khosla et al., 2000; 2001; Gupta & Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011) auxiliam na compreensão dos aspectos reprodutivos dessa família. A este respeito, Rutishauser (1997) reviu muitos aspectos relacionados à biologia reprodutiva de Podostemaceae a partir de um ponto de vista morfológico das flores.

Logo, nossos objetivos foram rever na literatura informações sobre os aspectos reprodutivos e de polinização em Podostemaceae, respondendo as questões: (1) quantas espécies têm inferências sobre sistemas reprodutivos e de polinização?; (2) quais são seus visitantes florais?; e (3) quais tipos de estratégias reprodutivas e de mecanismos de polinização caracterizam subfamílias ou regiões geográficas? Também discutimos o papel dos atributos florais e visitantes para os sistemas de cruzamento na família, comparando nossos resultados com os das demais angiospermas aquáticas e terrestres.

Material e métodos

Criação do banco de dados

Construímos um banco de dados a partir de quatro fontes básicas de informações: estudos (1) de biologia reprodutiva e polinização; (2) morfologia, anatomia e ontogenia de flores e partes florais; (3) ecologia e história natural e (4) taxonomia. Além destas fontes, utilizamos ainda: (5) análises de

espécimes dos herbários UFP, PEUFR, IPA, HUEFS, UFRN, SPF, e SP (Thiers, continuously updated). Submetemos o nome das espécies a uma cuidadosa revisão de sinonímia e padronizamos a grafia de acordo com os tratamentos taxonômicos mais recentes (Van Royen, 1951, 1953, 1954; Hollander & Berg 1983; Rye, 1990; Cusset, 1992; Kadono & Usui, 1995; Mathew & Satheesh, 1997; Kato & Kita, 2003; Kato et al., 2003; Ke et al., 2003; Rutishauser et al., 2004; Philbrick & Novelo 2004; Novelo et al., 2009; Philbrick et al., 2009, 2010; Tippery et al., 2011). Para a grafia dos demais táxons não contemplados em tais estudos seguimos The Plant List (2012).

Classificação do sistema reprodutivo, polinização e visitantes florais

Classificamos as Podostemaceae com relação aos sistemas reprodutivos, em quatro categorias básicas: (1) autógamas: espécies com descrição de campo, indicando autopolinização espontânea em qualquer fase da ântese (sensu Lloyd & Schoen, 1992) ou cujos dados morfológicos, anatômicos ou de razão pólen-óvulo evidenciem autogamia; (2) alógamas: espécies com descrição de campo, indicando recepção de pólen no estigma oriundo de flores diferentes, do mesmo ou de diferentes indivíduos (sensu Faegri & Pijl, 1979) ou cujos dados de razão pólen-óvulo indiquem alogamia (veja Okada & Kato, 2002); (3) cleistógamas: espécies com registros de formação de frutos e sementes a partir de botões com espátela irrompida (sensu Rutishauser, 1997) ou cujos dados de razão pólen-óvulo evidenciem cleistogamia (veja Okada & Kato, 2002); e (4) agamospérmicas: espécies com registros de formação de sementes sem a participação dos grãos de pólen (sensu Richards, 2003). Caso ocorressem citações diferentes dos sistemas reprodutivos supracitados para uma mesma espécie, classificamos a espécie em mais de uma categoria.

Com relação aos sistemas de polinização, classificamos as Podostemaceae em três categorias básicas: (1) anemófilas: espécies com registros de utilização do vento como vetor de pólen; (2) entomófilas: espécies com registro de insetos visitantes florais ou que interagissem de outra forma que levasse a polinização; e (3) ambófilas: espécies cujos registros indiquem a atuação de vetores bióticos (e.g. abelhas, besouros ou moscas) e do vento em seu sistema de polinização (Stellemann, 1984; Culley et al., 2002).

Incluímos os visitantes florais como abelhas, besouros, moscas e libélulas com registros na bibliografia levantada. Para as abelhas, submetemos o nome das espécies a uma revisão de sinonímia e padronizamos a grafia de acordo com Moure (2012). Para os demais táxons de visitantes florais, seguimos o Species Link (2012) para a grafia dos nomes.

Análises estatísticas

Para verificar a existência de diferença significativa entre as frequências de sistemas reprodutivos e de polinização inferidos pela literatura, utilizamos o Teste Qui-quadrado para heterogeneidade (Zar, 1996). Efetuamos essas análises no ambiente R Development Core Team (2012).

Resultados

Registros de biologia reprodutiva em Podostemaceae

Encontramos informações sobre biologia reprodutiva para um total de 73 espécies de 28 gêneros das três subfamílias, sendo 68 espécies e 23 gêneros pertencentes à Podostemoideae, quatro espécies e quatro gêneros a Tristichoideae e a Weddellinioideae monotípica *Weddellina squamulosa* Tul. (Tabela 1). Os gêneros mais bem representados foram: *Apinagia* (11 spp.), *Ledermanniella* (8 spp.), *Rhyncholacis* (6 spp.) e *Zeylanidium* (5 spp.), tendo *Cladopus*, *Marathrum* e *Polypleurum* quatro espécies cada. Quarenta e três por cento das espécies (30 spp.) são neotropicais, 34.2% (25 spp.) nativas da Ásia/Austrália e 26% (18 spp.) da África/Madagascar.

Detectamos diferença significativa ($\chi^2 = 88.25$, $df = 6$, $p < 0.001$) na proporção dos sistemas reprodutivos inferidos a partir da literatura (Fig. 1). Houve diferença significativa na proporção de espécies em relação à riqueza regional, com inferências reprodutivas (ver Koi et al. 2012) para Tristichoideae ($\chi^2 = 64.1148$, $df = 2$, $p < 0.001$) e não para Podostemoideae (Fig. 2). *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. (Tristichoideae) foi a única espécie registrada para os Neotropicos e África/Madagascar.

Trinta e duas espécies (43.8% do total) apresentaram informações sobre o sistema de polinização (Tabela 2). Destas, 21 espécies de 13 gêneros (19 spp. de 11 gen. para Podostemoideae) tem registros de anemofilia, 19 espécies de sete gêneros (duas spp. de dois gen. de Tristichoideae) para entomofilia. *Apinagia glaziovii* (Warm.) P.Royen, *A. richardiana* (Tul.) van Royen, *A. riedelii* (Bong.) Tul., *Apinagia* sp., *Leiothylax quangensis* Warming, *Marathrum rubrum* Novelo & Philbrick, *Mourera fluviatilis* Aubl. (Podostemoideae) e *Dalzellia ceylanica* (Gardner) Wight (Tristichoideae) tiveram registros de ocorrência de ambos os modos de polinização. Houve diferença significativa ($\chi^2 = 6.125$, $df = 2$, $p < 0.001$) entre as proporções de espécies anemófilas, entomófilas e que possuem registros de ambos os sistemas de polinização (Fig. 3).

Visitantes florais em Podostemaceae

Ampla gama de insetos figurou entre os visitantes florais e polinizadores de Podostemaceae (Fig. 4). Os primeiros registros de visitantes florais na família foram feitos nos primórdios do século XX, concomitantes as pesquisas taxonômicas e de morfologia floral. A partir de observações naturalísticas no Ceilão (atual Sri Lanka) e no Brasil, o botânico inglês J.C. Willis fez as primeiras considerações sobre visitantes florais no grupo.

Aqui, reconhecemos um total de 24 táxons da Classe Insecta entre espécies (16), gêneros (13) e famílias (7) pertencentes a quatro ordens: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Odonata (Tabela 3). Entre os visitantes florais, *Melipona* e *Trigona* (Hymenoptera; Apidae) foram os mais ricos com quatro espécies cada, sendo *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) e *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Apidae) os visitantes mais freqüentes com registros em cinco e quatro espécies de Podostemaceae, respectivamente (Tabela 3). Representantes das ordens Coleoptera (e.g. Hauman, 1948; Léonard, 1993; Léonard & Dessart, 1994), Diptera (e.g. Mukkada, 1969; Rutishauser & Grubert, 2000; Sobral-Leite et al., submetido, dados não publicados), Hymenoptera (Went, 1926; Gessner & Hammer, 1962; Grubert, 1974; Okada & Kato, 2002; Sobral-Leite et al., 2011) e Odonata (Sobral-Leite et al., submetido, dados não publicados) foram os mais freqüentes (Tabela 3). Tais registros estão, em sua maioria, concentrados em táxons neotropicais, sendo conhecidos nos paleotrópicos apenas os trabalhos de Mukkada (1969) para Ásia (Índia) e, para a África, Hauman (1948), Leonard (1993) e Léonard & Dessart (1994).

Willis (1902) postulou que em espécies neotropicais da família de flores fragrantas e perigônio vistoso, a exemplo de *Weddellina squamulosa* (Weddellinoideae), a visita de insetos (provavelmente abelhas) seria abundante. Registros pontuais de abelhas nas flores de Podostemaceae são freqüentes (e.g. Went, 1926; Gessner & Hammer, 1962; Grubert, 1974; Okada & Kato, 2002; Sobral-Leite et al., 2011).

Entre as espécies visitadas por abelhas estão *Apinagia staheliana* (Went) van Royen (Went, 1926), *Rhyncholacis penicillata* Matthiesen e *Weddellina squamulosa* Tul. (Gessner & Hammer, 1962) e *R. hydrocichorium* Tul. (Tavares, 1997). Conforme Tavares (1997), *Rhyncholacis hydrocichorium* do rio Urubu, Amazônia brasileira, tem visitas assíduas às flores por *Apis mellifera* L., *Centris* sp. e *Geotrigona*. A autora descreve ainda a mudança de coloração dessas flores, após a visita das abelhas, passando de brancas para cremes (Tavares, 1997).

Dados sistemáticos de frequência de visitantes florais em Podostemaceae, entretanto, foram obtidos recentemente a partir dos estudos com *M. fluviatilis* (Sobral-Leite et al., 2011) e *A. richardiana* (Tul.) P.Royen (Sobral-Leite et al., submetido) no NE do Brasil. As populações de *M. fluviatilis* dos rios Pirangi e Ipojuca têm suas flores visitadas com frequência por *A. mellifera*, *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Apinae), *Augochlora* sp. e *Augochloropsis* sp. (Halictinae) que

coletam pólen durante todo o período de floração, que vai de setembro a dezembro (Sobral-Leite et al., 2011). Por sua vez, os besouros foram os visitantes florais menos frequentes, com poucos registros pontuais para a África (Hauman, 1948; Léonard, 1993; Léonard & Dessart, 1994) e NE do Brasil (Sobral-Leite et al., dados não publicados). *Torridincola rhodesica* Steffan (Coleoptera: Torridincolidae) foi considerada polinizador efetivo de *Leiothylax quangensis* (Engl.) Warm. (Podostemoideae) no Zaire (Léonard, 1993; Léonard & Dessart, 1994). Para o NE do Brasil, Sobral-Leite et al. (dados não publicados) registraram a visita de espécimes de Coccinellidae e Erotylidae em *Apinagia* spp. O exame de pólen aderido as partes ventrais dos corpos destes insetos, juntamente a observações de seu comportamento de visita, sugerem que sejam polinizadores ocasionais (Sobral-Leite et al., dados não publicados). Embora representantes de Diptera sejam vistos nas flores destas hidrófitas (Mukkada, 1969; Rutishauser & Grubert, 2000; Sobral-Leite et al., submetido, dados não publicados), nossas observações sistemáticas de visitantes florais indicam que seus papéis como polinizadores são irrelevantes (Sobral-Leite et al., submetido; dados não publicados). Os táxons de Diptera registrados permanecem a maior parte do tempo parados sobre as flores, utilizando-as como suporte e raramente se deslocando entre elas.

Espécies de *Telebasis* (Coenagrionidae, Odonata) foram observadas nas flores de *Apinagia* spp. (*A. richardiana*, *A. glaziovii*, *A. riedelli* e *Apinagia* sp.) em rios do NE do brasileiro (Sobral-Leite et al., submetido; dados não publicados). Embora não desempenhem papel direto na polinização de *A. richardiana*, Sobral-Leite et al. (submetido, dados não publicados) explicam que a dispersão secundária pelo vento ocasionada pelos constantes pousos sobre os pedicelos (Fig. 4 f) promovida por estas libélulas possam desempenhar função na polinização da espécie. Apesar de artrópodes aquáticos não serem atraídos por pólen e néctar (Philbrick & Les, 1996.), o comportamento das espécies de *Telebasis* nas flores das *Apinagia* (Fig. 4 f) indicam o papel destes insetos como promotores de polinização. Philbrick & Les (1996) explicaram que insetos aquáticos utilizam flores para abrigo e acasalamento, podendo desempenhar função na polinização de hidrófitas ou mesmo exercer pressões seletivas sobre a evolução floral.

Sistemas de polinização em Podostemaceae

A anemofilia foi o sistema mais comum, seguida de entomofilia mediada por abelhas, besouros e moscas (Fig. 3). Por outro lado, sistemas de polinização generalistas, caracterizados pela atuação de vento e insetos concomitantemente (ambofilia) também foram encontrados entre as Podostemaceae.

Willis (1902) observou, em campo, a atuação do vento sobre a polinização em *Dalzellia zeylanica* (Gardner) Wight, *Farmeria metzgerioides* Willis, *Griffithella hookeriana* (Tul.) Warming, *Willisia* spp. e *Zeylanidium* spp. Accorsi (1944) constatou, por outro lado, quantidades massivas de pólen de *Podostemum ovatum* C. Philbrick & Novelo (sin. *Crenias weddelliana* (Tul.) C.D.K. Cook & Rutishauser) e *Wettsteiniola accorsii* (Toledo) van Royen carreadas pelo vento. Ele atribuiu a anemofilia como sistema de polinização largamente atuante nessas espécies (Accorsi 1944).

Crescimento agrupado, alta densidade de flores por unidade de área e pólen abundante e dispersável pelo vento são atributos anemófilos (Regal, 1982), reconhecidos em Podostemaceae (e.g. Accorsi, 1944; Philbrick & Novelo, 1998; Sobral-Leite et al., submetido, dados não publicados). Para *Leiothylax quangensis* Warming Hauman (1948) e Léonard (1993), atribuíram um sistema de polinização que utiliza tanto insetos (polinização por besouros), quanto vento (anemofilia). A utilização de dois vetores de pólen, sendo um biótico (insetos) e outro abiótico (vento) caracteriza um sistema de polinização conhecido como ambofilia (*sensu* Stellemann, 1984). Mecanismos duais de polinização foram atribuídos também a *Dalzellia zeylanica* (Gardner) Wight por Mukkada (1969). A visita massiva de moscas (Diptera) as suas flores, conjuntamente a observações destes insetos dispersando pólen, conduziram este autor a concluir que a espécie faz uso de um mecanismo de polinização que utiliza tanto vento quanto insetos.

Sistemas reprodutivos em Podostemaceae

Os sistemas reprodutivos em Podostemaceae são variados, com gradiente que vai desde cleistogamia com espatela irrompida (Imamura, 1928; Okada & Kato, 2002; Sehgal et al., 2009) a alogamia por vetores bióticos (Went, 1926; Tavares, 1997; Sobral-Leite et al., 2011) e vento (Philbrick & Novelo, 1998; Sobral-Leite et al., 2011, submetido, dados não publicados). O primeiro registro sobre sistemas reprodutivos na família são cleistogamia no tipo de *Cladopus nymanii* espécie nativa de Java por Möller (1899).

Accorsi (1946) comenta que além do pólen abundante disperso pelo vento e da alta densidade de flores de *Podostemum ovatum* C. Philbrick & Novelo e *Wettsteiniola accorsii* (Toledo) van Royen a autopolinização ocorre em função da proximidade entre anteras e estigmas no final da ântese (Fig. 5). Passarelli et al. (2002) consideraram *Apinagia glaziovii* (Warm.) van Royen, *A. riedelii* (Bongard) Tul. e *A. yguazuensis* Chodat et Vischer espécies autógamas com base na baixa atratividade das flores, baixo número de grãos de pólen e proximidade entre os órgãos sexuais da flor. Evidências experimentais, no entanto, Sobral-Leite et al. (dados não publicados)

mostraram a pólen carregado pelo vento, além de visita de insetos polinizadores em *A. glaziovii* e *A. riedelli*. Estes resultados sugerem que evidências experimentais em mais espécies do gênero, sobretudo, das seções de anteras introrsas e com variação no número de estames (e.g. *Hymenolacis* e *Eu-apinagia*), poderão trazer novos registros de ambofilia na família. Estudando o sistema reprodutivo de *Marathrum rubrum*, Philbrick & Novelo (1998) constataram que embora a autogamia seja predominante, relevante percentual de sementes é formado por polinização cruzada (10%), sugerindo importância do componente alógamo em sua manutenção populacional. Esses autores alertaram sobre a necessidade de serem efetuados estudos genéticos que possam elucidar melhor o papel da polinização cruzada para Podostemaceae.

Outras evidências foram propostas para indicar os sistemas reprodutivos na família. Okada & Kato (2002) propuseram a partir da razão pólen-óvulo (P/O), que espécies que apresentam valores de log P/O acima de 2.5 seriam alógamas e abaixo de 2.0 autógamas. Com base nestes dados, as espécies de Tristichioideae seriam autógamas, enquanto Podostemoideae alógamas, autógamas e cleistógamas. Esses autores, a partir de observações naturalísticas de visitantes florais de *Apinagia* sp. e *Rhyncholacis* sp., sugeriram ainda que abelhas Halictinae e espécies dos gêneros *Melipona* e *Trigona* (Apidae) seriam responsáveis pela maior parte da polinização. Assim evidência de visitantes aliada ao descritor P/O, indicam que a alogamia seja frequente entre essas Podostemoideae (Okada & Kato, 2002).

Morfologia e biologia floral relacionada aos sistemas de polinização

Willis (1902) postulou que em Podostemaceae a variação no número de óvulos e estames, estaria relacionada aos mecanismos de polinização das espécies. Flores com poucos óvulos e estames de um só lado, apresentariam anemofilia, enquanto numerosos óvulos e verticilos completos se relacionariam a entomofilia na família (Willis, 1902). A este respeito, Rutishauser (1997) comentou que em espécies de Podostemoideae Neotropicais, e.g. *Apinagia*, *Mourera* e *Rhyncholacis* as variação do número de estames são condições que sugerem a entomofilia. No entanto, ele prossegue afirmando que em alguns taxa Neotropicais dessa subfamília (e.g. *Podostemum* spp.) estames em um dos lados da flor seria condição relacionada a anemofilia.

Com base em análises de MEV das estruturas florais de *Apinagia* spp. aliadas a evidências experimentais, acessamos outros indicadores do sistema de polinização (Sobral-Leite et al. 2011, submetido; dados não publicados). Amplas áreas cobertas de papilas estigmáticas (Fig. 6 & 7), juntamente com a elevada proporção que os estigmas correspondem do pistilo (equivalendo entre 35-50% da altura total do pistilo em *A. richardiana*) indicam ser este um atributo relevante no sistema de polinização de Podostemaceae. Após testarmos experimentalmente o sistema de

polinização de *A. richardiana* (Tul.) P. Royen Aubl, concluímos que as numerosas papilas ao longo dos estigmas representam adaptação para captar pólen carregado pelo vento (Sobral-Leite et al., submetido).

Evidências recentes também nos mostram que variações florais intra-específicas, funcionais no sistema de polinização, podem ser mais frequentes entre espécies de *Apinagia* (Sobral-Leite et al., submetido, dados não publicados) e *Mourera* (Sobral-Leite et al., 2011). Sobral-Leite et al. (2011) registraram variações intra-populacionais e mesmo intra-individuais nas flores de *M. fluviatilis*, tendo “morfos” de estames curtos e longos, refletindo ou não a capacidade de autopolinização em final de ântese ou não. Para *A. glaziovii*, *A. ridelli*, *A. richardiana* e *A. sp.* registramos variações semelhantes (Sobral-Leite et al., submetido, dados não publicados). Estas “flores de cruzamento”, caracterizadas pela incapacidade de se autopolinizar ocorrem em outros grupos de angiospermas (Faegri & Pijl, 1979; Endress, 1994). Variações interpopulacionais nas de *Podostemum ceratophyllum* também foram registradas (Philbrick & Bogle, 1988; Tavares, 1997). Foi verificada nesta espécie uma redução no tamanho do ovário acompanhada por um aumento no número de anteras e altura dos filetes, especialmente em flores com seis ou sete anteras. Estes autores, concluíram que fatores genéticos mais do que ambientais são responsáveis pela formação destes morfos florais de *Podostemum ceratophyllum* (Philbrick & Bogle, 1988).

Conclusões e perspectivas

Reunidas estas informações chegamos as seguintes conclusões: (1) A variação na altura do androceu descrita para algumas spp. neotropicais – morfos florais “longistaminados” e “brevistaminados” provavelmente funciona como mecanismo favorecedor de polinização cruzada. Os morfos florais *brevis*, funcionariam como “crossing flowers”, pois a autopolinização em final de ântese não poderia ocorrer em função da hercogamia, apenas alogamia. (2) A ampla superfície recoberta por papilas estigmáticas exerceria função-chave na captação de grãos de pólen transportados pelo vento. (3) Espécies entomófilas apresentam características florais específicas (e.g. estames vistosos e chamativos e odor), assim como aquelas predominantemente anemófilas; (4) Os vários registros de mais de um sistema de polinização dentro de uma mesma espécie, indica que ambofilia seja estratégia relevante em Podostemaceae (5) Contrastando com as demais famílias de plantas aquáticas, cujas características reprodutivas comumente são especializadas, Podostemaceae utilizam estratégias reprodutivas e de polinização generalistas. Entre as quais, ambofilia e estratégias de cruzamento misto, frequentemente atuando em conjunto numa mesma espécie.

Agradecimentos

Agradecemos a Msc. P. Gomes (UNESP) pelo auxílio na confecção das pranchas e análises estatísticas, a R. Carvalho (UFPE) pelas ilustrações botânicas e aos curadores dos Herbários visitados pelo apoio durante a consulta aos acervos. Agradecemos também a Msc. S.C. Amoêdo (UNIR) pela cessão das imagens de *Mourera monadelphæ* e a Msc. H. Meda (Universidade de Heidelberg, Alemanha) pela ajuda na captura das imagens em MEV. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao qual somos gratos pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor (CNPq, processo 140933/2009-3) e de produtividade em pesquisa a última autora (CNPq, processo 305068/2008-3).

Referências bibliográficas

- Accorsi, W. R.** 1944. Contribuição para o estudo biológico das Podostemaceae do Salto de Piracicaba I. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz 1: 50–106.
- Ameka, G. K., G. C. Clerk, E. Pfeifer & R. Rutishauser.** 2003. Development morphology of *Ledermanniella bowlingii* (Podostemaceae) from Ghana. Plant Systematics and Evolution 237: 165–183.
- Arber, A.** 1920. Water plants: a study of aquatic angiosperms. Cambridge, Cambridge University Press, United Kingdom.
- Barrett, S. C. H.** 1988. Evolution of breeding system in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 741–760.
- Barrett, S. C. H., D. G. Eckert & B. C. Husband.** 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. Aquatic Botany 44: 105–145.
- Carvalho, A. T. & C. Schlindwein.** 2011. Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. Biological Journal of the Linnean Society 102: 355–368.
- Cook, C. D. K.** 1988. Wind pollination in aquatic Angiosperms. Annals of the Missouri Botanical Garden 75: 768–777.
- Cook, C. D. K.** 1990. Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing: The Hague, The Netherlands.
- Cook, C. D. K. & R. Rutishauser.** 2001. Name changes in Podostemaceae. Taxon 50: 1163–1167.

- Cox, P. A. & R. B. Knox.** 1988. Pollination postulates and two-dimensional pollination in hydrophilous Monocotyledons. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 811–818.
- Culley, T.M., S. G. Weller & A. K. Sakai.** 2002 The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 361–369.
- Culley, T. M. & M. R. Klooster.** 2007. The cleistogamous breeding system: A review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. *The Botanical Review*: 1–30.
- Cusset, G. & C. Cusset.** 1988. Etudes sur les Podostemales. 9. Délimitations taxonomiques dans les Tristichaceae. *Adansonia* 10: 149–177.
- Cusset, G. & C. Cusset.** 1988b. Etudes sur les Podostemopsida. 11. Repartition et evolution des Tristichaceae. *Adansonia* 10: 223–262.
- Cusset, C.** 1992. Contribution à l'étude des Podostemaceae: 12. Les genres asiatiques. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 4e Sér. 14, Sect. B, Adansonia* 1: 13–54.
- Endress, P. K.** 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, Cambridge University Press. United Kingdom.
- Faegri, K. & Pijl, van der.** 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- Gessner, F. & L. Hammer.** 1962. Ökologisch-physiologisch untersuchungen an den Podostemaceen des Caroni. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* 47: 497–541.
- Grace, J.B.** 1993. The adaptive significance of clonal reproduction in angiosperms: an aquatic perspective. *Aquatic Botany* 44: 159–180.
- Graham, S. A. & C. E. Word Jr.** 1975. The Podostemaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 56: 456–465.
- Grubert, M.** 1974. Podostemaceen-Studien. Teil 1. Zur Ökologie einiger venezolanischer Podostemaceen. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 50: 321–391.
- Grubert, M.** 1991. Ecologia de fanerogamas de saltos tropicales adaptadas en forma extrema. *Natúra (Caracas)* 91: 54–61.
- Gupta, C. K. & A. Sehgal.** 2009. Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae; Tristichaceae). *Aquatic Botany* 91: 51–56.
- Hall, J. B.** 1971. New Podostemaceae from Ghana with notes on related species. *Kew Bulletin* 26: 123–136.
- Haumann, L.** 1948. Podostemaceae. Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi. Spermatophytes. Vol.I: 219–226. Brussels: I.N.E.A.C.
- Hill, B. H. & J. R. Webster.** 1984. Productivity of *Podostemum ceratophyllum* in the New River, Virginia. *American Journal of Botany* 71: 130–136.

- Hollander, G. Den. & C. C. Berg.** 1983. A new species of *Apinagia* (Podostemonaceae) and a key to the *Apinagia* species in Suriname. *Acta Botanica Neerlandica* 32: 223–226.
- Hutchinson, G. E.** 1975. A treatise on limnology, v. 3. Limnological botany. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, and Toronto.
- Imamura, S.** 1928. Über *Hydrobryum japonicum* Imamura, eine neue Podostemonacee in Japan. *Botanical Magazine Tokyo* 43: 332–339.
- Jäger Zürn, I.** 1997. Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichioideae). *Aquatic Botany* 57: 151–182.
- Jäger Zürn, I. & C. J. Mathew.** 2002. Cupule structure of *Dalzellia ceylanica* and *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 72: 79–91.
- Kadono, Y. & N. Usui.** 1995. *Cladopus austro-asumiensis* (Podostemaceae), a new rheophyte from Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 46: 131–135.
- Kato, M. & Y. Kita.** 2003. Taxonomic study of Podostemaceae of China. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 54: 87–97.
- Kato, M., Y. Kita & S. Koi.** 2003. Molecular phylogeny, taxonomy and biogeography of *Malaccotristicha australis* comb. nov. (syn. *Tristicha australis*) (Podostemaceae). *Australian Systematic Botany* 16: 177–183.
- Ke, C. T. C., Q. Huaxing, C. Hua-Hsing, K. Hua-Xing & C. T. Philbrick.** 2003. Podostemaceae. *Flora of China* 5: 190–191.
- Khosla, C. & H. Y. Mohan Ram.** 1993. Morphology of flower, fruit, and seed in *Polypleurum stylosum*. *Aquatic Botany* 46: 255–262.
- Khosla, C., K. R. Shivanna & H. Y. Mohan Ram.** 2000. Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 67: 143–154.
- Khosla, C., K. R. Shivanna & H. Y. Mohan Ram.** 2001. Cleistogamy in *Griffithella hookeriana* (Podostemaceae). *South African Journal of Botany* 67: 320–324.
- Koi, S., Y. Kita, Y. Hirayama, R. Rutishauser, K. A. Huber & M. Kato.** 2012. Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 461–492.
- Léonard, J.** 1993. Etude phytosociologique des chutes de la Tshopo (Kisangani: Zaire). *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 62: 283–347.
- Léonard J. & P. Dessart.** 1994: Avis de recherche: Torridincolidés (Coleoptera) vivant en symbiose avec des podostémacées (Podostémales). *Bulletin & Annales de la Société Royale Belge d'Entomologie* 130: 71–76.

- Les, D. H.** 1988. Breeding systems, population structure, and evolution in hydrophilous Angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 819–835.
- Lloyd, D. G. & D. J. Schoen.** 1992. Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358–369.
- Mathew, C. J. & V .K. Satheesh.** 1996. *Zeylanidium maheshwarii* – a new species of the family Podostemaceae from India. *Aquatic Botany* 54: 73–78.
- Mathew, C. J. & V. K. Satheesh.** 1997. Taxonomy and distribution of Podostemaceae in Kerala, India. *Aquatic Botany* 57: 243–274.
- Möller, H.** 1899. *Cladopus nymanii* n. gen., n. sp., eine Podostemacée aus Java. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg* 1: 115–132.
- Moure, J. S.** 2012. Apini Latreille, 1802. In Moure, J. S., D. Urban & G. A. R. Melo (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed May/27/2013
- Mukkada, A. J.** 1969. Some aspects of the morphology, embryology and biology *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. *New Phytologist* 68: 1145–1158.
- Novelo R. A., C. T. Philbrick & G. E. Crow.** 2009. Podostemaceae. *Flora Mesoamericana* 3: 1–7. [book on the internet]. c2009 [updated 7 July 2009]. Available from: <http://www.tropicos.org/docs/meso/podostemaceae.pdf?projectid=3&langid=66>.
- Okada, H. & M. Kato.** 2002. Pollination systems inferred from pollen-ovule ratios of some species of Podostemaceae. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 53: 51–61.
- Osborn, J. M. & E. L. Schneider.** 1988. Morphological studies of the Nymphaeaceae *sensu lato*. XVI. The floral biology of *Brasenia schreberi*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 778–794.
- Passarelli, L. M., S. B. Girarde, & N. M. Tur.** 2002. Palynology of South América Podostemaceae. I. *Apinagia* Tul. *Grana* 41: 10–15.
- Philbrick, C. T.** 1984. Aspects of floral biology, breeding system, seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Systematic Botany* 9: 166–174.
- Philbrick, C. T.** 1988. Reproductive biology of freshwater aquatic Angiosperms: An introduction. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 739–740.
- Philbrick, C. T.** 2004. Podostemaceae (River-Weed family). In: Mori, N., A. Henderson, D.W. Stevenson & S.V. Heald (Eds.), *Flowering Plants of Neotropics*, Princeton University Press, Princeton and Oxford, pp. 302–304.
- Philbrick, C. T. & A. L. Bogle.** 1988. A survey of floral variation in the five populations of *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Rhodora* 90: 113–121.

- Philbrick, C. T. & G. E. Crow.** 1983. The distribution of *Podostemum ceratophyllum* Michx. (Podostemaceae). *Rhodora* 85: 325–341.
- Philbrick, C. T. & D. H. Les.** 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience* 46: 813–826.
- Philbrick, C. T. & R. A. Novelo.** 1995. New world Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* 47: 210–222.
- Philbrick, C. T. & R. A. Novelo.** 1997. Ovule number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquatic Botany* 57: 183–200.
- Philbrick, C. T. & R. A. Novelo.** 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany* 62: 199–206.
- Philbrick, C. T. & R. A. Novelo.** 2004. Monograph of *Podostemum*. *Systematic Botany Monographs* 70: 1–106.
- Philbrick, C. T., M. Vomela & R. A. Novelo.** 2006. Preanthesis cleistogamy in the genus *Podostemum* (Podostemaceae). *Rhodora* 108: 195–202.
- Philbrick, C. T., C. P. Bove & T. C. Edson Jr.** 2009. Monograph of *Castelnavia* (Podostemaceae). *Systematic Botany* 34: 715–729.
- Philbrick, C. T., C. P. Bove & I. S. Hannah.** 2010. Endemism in Neotropical Podostemaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 425–456.
- R Development Core Team** 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Regal, P.** 1982. Pollination by wind and animals: ecological and geographic patterns. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 13: 497–524.
- Rutishauser, R. & M. Grubert.** 1994. The architecture of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae) I. mature structures and leaf development. *Botanica Helvetica* 104: 179–194.
- Rutishauser, R. & M. Grubert.** 1999. The architecture of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): developmental morphology of inflorescences, flowers and seedlings. *American Journal of Botany* 86: 907–922.
- Rutishauser, R. & M. Grubert.** 2000. Developmental morphology of *Apinagia multibranchiata* (Podostemaceae) from the Venezuelan Guyanas. *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 299–323.
- Rutishauser, R.** 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquatic Botany* 57: 29–70.
- Rutishauser, R. & K. A. Huber.** 1991. The developmental morphology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae, Tristichoideae). *Plant Systematics and Evolution* 178: 195–223.

- Rutishauser, R., Novelo, R. A. & C. T. Philbrick.** 1999. Developmental morphology of new world Podostemaceae: *Marathrum* and *Vanroyenella*. *International Journal of Plant Sciences* 160: 29–45.
- Rutishauser, R., E. Pfeifer & A. Bernhard.** 2004. Podostemaceae of Africa and Madagascar: keys to genera and species, including genera descriptions, illustrations to all species known, synonyms, and literature list. Version 15-09-04. 2004. Internet <<http://systbot.unizh.ch/podostemaceae>>.
- Rye, B. L.** 1990. Pimelea. In: *Flora of Australia*. Volume 18, Podostemaceae to Combretaceae. Australian Government Publishing Service, Canberra, pp. 323–325.
- Sculthorpe, M. A. O.** 1967. *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. Edward Arnold, London, United Kingdom.
- Sehgal, A., M. Sethi & H. Y. Mohan Ram.** 2009. Development of the floral shoot and pre-anthesis cleistogamy in *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 222–236.
- Sobral-Leite M., J. A. Siqueira Filho, C. Erbar & I. C. Machado.** 2011. Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family? *Aquatic Botany* 95: 77–87.
- Sobral-Leite M., J. A. Siqueira Filho, C. Erbar & I. C. Machado.** (submetido) Anthecology and breeding system of *Apinagia richardiana* (Tul.) van Royen (Podostemaceae): mixed mating strategies in a Neotropical riverweed. *Annals of Botany* xxx: xxx–xxx.
- Stelleman, P.** 1984. Reflections on the transition from wind pollination to ambophily. *Acta Botanica Neerlandica* 33: 497–508.
- Subramanyam, K.** 1962. *Aquatic Angiosperms*. CSIR Monograph No. 3, New Delhi, India.
- Tavares A. S.** 1997. Podostemaceae de alguns rios de água preta do Estado do Amazonas. Ph.D. Thesis. Manaus: Universidade do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.
- Taylor, G.** 1953. Notes on Podostemaceae for the revision of the flora of west tropical Africa. *Bulletin of the British Museum* 1: 53–79.
- The Plant List.** Version 1. A working list of all plant species. [homepage on the internet]. c2010 [updated 2010; cited 2012 Apr. 10]. Available from: <http://www.theplantlist.org/>
- Thiers, B.** continuously updated. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. [homepage on the internet]. c2012 [updated ; cited 2012 Jul 09] Available from: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>
- Tippery, N. P., C. T. Philbrick, C. P. Bove & D. H. Les.** 2011. Systematics and phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany* 36: 105–118.

- Van Royen, P.** 1951. The Podostemaceae of the New World Part I. Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijks universiteit te Utrecht 107: 1–150.
- Van Royen, P.** 1953. The Podostemaceae of the New World Part II. Acta Botanica Neerlandica 2: 1–20.
- Van Royen, P.** 1954. The Podostemaceae of the new world. Part III. Acta Botanica Neerlandica 3: 215–263.
- Vieira, M. F. & N. A. de S. Lima.** 1997. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). Aquatic Botany 58: 89–98.
- Went, F. A. F. C.** 1926. Untersuchungen über die Podostemaceen III. Verhandelingen der Koninklijke Nederlandsche Akademie von Wetenschappen Amsterdam 25: 1–59.
- Willis, J. C.** 1902. Studies in the morphology and ecology of Podostemaceae of Ceylon and India. Annals of Royal Botanical Gardens, Peradeniya 1: 268–465.
- Zar, J. H.** 1996. Biostatistical Analysis, Third edition. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.

Tabela 1. Sistemas reprodutivos – cleistogamia, alogamia e autogamia - de espécies de Podostemaceae e suas respectivas subfamílias.

Subfamília/espécie	Sistema reprodutivo			Referências
	Cleistogamia	Autogamia	Alogamia	
Podostemoideae				
<i>Apinagia exilis</i> (Tul.) P.Royen			●	Gessner & Hammer, 1962
<i>A. glaziovii</i> (Warm.) P.Royen		●	●	Passarelli et al., 2002; Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>A. longifolia</i> (Tul.) P.Royen			●	Okada & Kato, 2002
<i>A. multibranchiata</i> (Matthiesen) P.Royen			●	Gessner & Hammer, 1962
<i>A. richardiana</i> (Tul.) P.Royen		●	●	Sobral Leite et al., submetido
<i>A. riedelii</i> (Bong.) Tul.		●	●	Passarelli et al., 2002; Sobral-Leite et al. dados não publicados
<i>Apinagia</i> sp.		●	●	Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Apinagia</i> sp. 1			●	Okada & Kato, 2002
<i>Apinagia</i> sp. 2		●		Okada & Kato, 2002
<i>A. staheliana</i> (Went) P.Royen			●	Went, 1926
<i>A. yguazuensis</i> Chodat & Vischer		●		Passarelli et al., 2002
<i>Cladopus japonicus</i> Imamura	●			Imamura, 1928; Okada & Kato, 2002
<i>C. nymanii</i> H.Möller	●			Möller, 1899; Okada & Kato, 2002
<i>C. queenslandicus</i> (Domin) C.D.K.Cook & Rutish.		●		Okada & Kato, 2002
<i>C. taiensis</i> C.Cusset		●		Okada & Kato, 2002
<i>Farmeria metzgerioides</i> (Trimen) Willis ex Hook.f.			●	Willis, 1902
<i>Griffithella hookeriana</i> (Tul.) Warm.	●	●		Willis, 1902; Khosla et al., 2001
<i>Hanseniella heterophylla</i> C.Cusset			●	Okada & Kato, 2002
<i>Hydrobryopsis sessilis</i> (Willis) Engl.	●			Sehgal et al., 2009
<i>H. griffithii</i> (Wall. ex Griff.) Tul.			●	Okada & Kato, 2002
<i>Ledermanniella abbayesii</i> (G.Taylor) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>L. adamesii</i> (G.Taylor) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>L. keayi</i> (G.Taylor) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>L. ledermannii</i> (Engl.) C.Cusset	●			Taylor, 1953; Rutishauser et al., 2004
<i>L. musciformis</i> (G.Taylor) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>L. pygmaea</i> (Pellegr.) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>L. tenuifolia</i> (G.Taylor) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>L. variabilis</i> (G.Taylor) C.Cusse	●			Taylor, 1953

<i>Leiothylax quangensis</i> (Engl.) Warm.	●	●	Hauman, 1948; Léonard, 1993; Léonard & Dessart, 1994
<i>Letestuellia chevalieri</i> G.Taylor	●		Taylor, 1953
<i>L. tisserantii</i> G.Taylor	●		Taylor, 1953
<i>Macropodiella garrettii</i> (C.H.Wright) C.Cusset	●		Taylor, 1953
<i>M. macrothyrsa</i> (G.Taylor) C.Cusset	●		Taylor, 1953
<i>Marathrum plumosum</i> (Novelo & C. T. Philbrick) C. T. Philbrick & C. P. Bove		●	Rutishauser et al., 1999
<i>M. rubrum</i> Novelo & C. Philbrick		●	Philbrick & Novelo, 1998; Rutishauser et al., 1999
<i>M. schiedeanum</i> (Cham.) Tul.		●	Rutishauser et al., 1999
<i>M. tenue</i> Liebm.		●	Philbrick & Novelo, 1997
<i>Mourera fluviatilis</i> Aubl.	●	●	Grubert, 1974; Rutishauser & Grubert, 1999; Okada & Kato, 2002; Sobral-Leite et al., 2011
<i>M. monadelpha</i> (Bong.) C. T. Philbrick & C. P. Bove		●	Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Oserya coulteriana</i> Tul.		●	Philbrick & Novelo, 1997
<i>O. longifolia</i> Novelo & C. Philbrick		●	Philbrick & Novelo, 1997
<i>Podostemum ceratophyllum</i> Michx.	●	●	Graham & Wood, 1975; Philbrick, 1981; Philbrick, 1984; Philbrick & Bogle, 1988
<i>P. ovatum</i> C. Philbrick & Novelo		●	Accorsi, 1944
<i>Podostemum</i> sp.		●	Okada & Kato, 2002
<i>P. weddellianum</i> (Tul.) C.T. Philbrick & Novelo	●		Philbrick et al., 2006
<i>Polyleurum elongatum</i> (Gardner) J.B. Hall		●	Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>P. stylosum</i> var. <i>laciniata</i> (Wight) Hall		●	Willis, 1902; Khosla & Mohan Ram, 1993; Khosla et al., 2000
<i>P. stylosum</i> var. <i>stylosum</i> (Wight) Hall		●	Willis, 1902; Khosla & Mohan Ram, 1993; Khosla et al., 2000
<i>P. submersum</i> J.B.Hall	●		Hall, 1971
<i>P. wallichii</i> (R. Br. ex Griff.) Warm.		●	Okada & Kato, 2002
<i>Rhyncholacis hydrocichorium</i> Tul.		●	Tavares, 1997
<i>R. lineares</i> Tul.	●		Tavares, 1997
<i>R. macrocarpa</i> Tul.		●	Gessner & Hammer, 1962
<i>R. penicillata</i> Matthiesen		●	Grubert, 1974

<i>Rhyncholacis</i> sp. 1			●	Okada & Kato, 2002
<i>Rhyncholacis</i> sp. 2			●	Okada & Kato, 2002
<i>Saxicolella flabellata</i> (G.Taylor) C.Cusset	●			Taylor, 1953
<i>S. marginalis</i> (G. Tayl.) C. Cussett	●			Taylor, 1953
<i>Stonesia fascicularis</i> G.Taylor	●			Taylor, 1953
<i>S. gracilis</i> G.Taylor	●			Taylor, 1953
<i>S. heterospathella</i> G. Tayl.	●			Taylor, 1953
<i>Synstylis micranthera</i> (P.Royen) C.Cusset			●	Okada & Kato, 2002
<i>Wettsteiniola accorsii</i> (Toledo) P.Royen		●	●	Accorsi, 1944
<i>Willisia arekaliana</i> Shivam. & Sadanand		●		Mohan Ram & Sehgal, 2001
<i>W. selaginoides</i> (Bedd.) Warm. ex Willis		●	●	Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>Zeylanidium barberi</i> (Willis) C. Cusset	●			Willis, 1902; Arber, 1920; Subramanyam, 1962; Sculthorpe, 1967; Okada & Kato, 2002
<i>Z. lichenoides</i> Engl.		●	●	Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>Z. maheshwarii</i> C.J.Mathew & Satheesh			●	Mathew & Satheesh, 1996
<i>Z. olivaceum</i> (Gardner) Engl.		●	●	Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>Z. subulatum</i> (Gardner) C. Cusset		●	●	Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
Tristichioideae				
<i>Dalzellia ceylanica</i> (Gardner) Wight	●	●	●	Willis, 1902; Mukkada, 1969; Okada & Kato, 2002
<i>Indotristicha ramosissima</i> (Wight) P. Royen		●	●	Willis, 1902; Rutishauser & Huber, 1991; Khosla et al., 2001; Mohan Ram & Sehgal, 2001; Gupta & Sehgal, 2009
<i>Malaccotristicha</i> sp.		●		Okada & Kato, 2002
<i>Tristicha trifaria</i> (Bory ex Willd.) Spreng.		●		Okada & Kato, 2002; Sobral-Leite et al., dados não publicados
Weddellinoideae				
<i>Weddellina squamulosa</i> Tul.		●	●	Grubert, 1974; Jäger-Zürn, 1997; Okada & Kato, 2002

Tabela 2. Sistemas de polinização – anemofilia e entomofilia- de espécies de Podostemaceae e suas respectivas subfamílias.

Subfamília/espécie	Sistema de polinização		Referências
	anemofilia	entomofilia	
Podostemoideae			
<i>Apinagia exilis</i> (Tul.) P.Royen		●	Gessner & Hammer, 1962
<i>A. glaziovii</i> (Warm.) P.Royen	●	●	Passarelli et al., 2002; Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>A. multibranchiata</i> (Matth.) van Royen		●	Gessner & Hammer, 1962; Grubert, 1974
<i>A. richardiana</i> (Tul.) van Royen	●	●	Sobral-Leite et al., submetido
<i>A. riedelii</i> (Bong.) Tul.	●	●	Passarelli et al., 2002; Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Apinagia</i> sp.	●	●	Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Apinagia</i> sp.1		●	Okada & Kato, 2002
<i>A. staheliana</i> (Went) van Royen		●	Went, 1926; Rutishauser & Grubert, 2000
<i>Farmeria metzgerioides</i> Willis	●		Willis, 1902
<i>Griffithella hookeriana</i> (Tul.) Warm.	●		Willis, 1902; Khosla et al., 2001
<i>Leiothylax quangensis</i> Warming	●	●	Hauman, 1948. Léonard, 1993; Léonard & Dessart, 1994
<i>Marathrum plumosum</i> (Novelo & C. T. Philbrick) C. T.Philbrick & C. P. Bove	●		Rutishauser et al., 1999
<i>M. rubrum</i> Novelo and Philbrick	●	●	Philbrick & Novelo, 1998; Rutishauser et al., 1999
<i>M. schiedeanum</i> (Cham.) Tul.		●	Rutishauser et al., 1999; Luna-Ramos et al., 2005
<i>Mourera fluviatilis</i> Aubl.	●	●	Sobral-Leite et al., 2011; Grubert, 1974; Rutishauser & Grubert, 1999; Okada & Kato, 2002
<i>M. monadelpha</i> (Bong.) C. T. Philbrick & C. P. Bove		●	Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Podostemum ceratophyllum</i> A. Michaux	●		Graham & Wood Jr., 1975
<i>Podostemum ovatum</i> C. Philbrick & Novelo	●		Accorsi, 1944
<i>Polypleurum elongatum</i> (Gardner) Hall	●		Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>P. stylosum</i> (Wight) Hall	●		Willis, 1902
<i>Rhyncholacis hydrocichorium</i> Tul.		●	Tavares, 1997
<i>R. macrocarpa</i> Tul.		●	Gessner & Hammer, 1962
<i>R. penicillata</i> Matthiesen		●	Grubert, 1974
<i>Rhyncholacis</i> sp.2		●	Okada & Kato, 2002

<i>Wettsteiniola accorsii</i> (Toledo) van Royen	●		Accorsi, 1944
<i>Willisia selaginoides</i> Warming ex J.C. Willis	●		Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>Zeylanidium lichenoides</i> Engl.	●		Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>Z. olivaceum</i> Engl.	●		Willis, 1902; Okada & Kato, 2002
<i>Z. subulatum</i> (Gardner) Cusset	●		Willis, 1902
Tristichioideae			
<i>Dalzellia ceylanica</i> (Gardner) Wight	●	●	Willis, 1902; Mukkada, 1969; Okada & Kato, 2002
<i>Indotristicha ramosissima</i> (Wight) van Royen	●		Willis, 1902; Rutishauser & Huber, 1991; Khosla et al., 2001; Mohan Ram & Sehgal, 2001; Gupta & Sehgal, 2009
<i>Weddellina squamulosa</i> Tul.		●	Grubert, 1974; Jäger-Zürn, 1997

Tabela 3. Visitantes florais (ordens, famílias e espécies) registrados em Podostemaceae.

Ordem/família/espécie	Podostemaceae	Referência
Coleoptera		
Coccinellidae	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i> , <i>A. riedelii</i> , <i>Apinagia</i> sp.	Sobral-Leite et al., dados não publicados
Erotylidae	<i>Apinagia</i> sp.	Sobral-Leite et al., dados não publicados
Torridincolidae		
<i>Torridincola rhodesica</i> Steffan	<i>Leiothylax quangensis</i>	Hauman, 1948; Léonard, 1993; Léonard & Dessart, 1994
Diptera		
Muscidae		
<i>Musca domestica</i> Linnaeus 1758	<i>Apinagia riedelii</i> , <i>Apinagia</i> sp.	Sobral-Leite et al., dados não publicados
Tabanidae		
<i>Tabanus</i> spp.	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i> , <i>A. riedelii</i> , <i>Apinagia</i> sp., <i>A. richardiana</i>	Sobral-Leite et al., submetido; Sobral-Leite et al., dados não publicados
Diptera spp.	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i> , <i>A. riedelii</i> , <i>Apinagia</i> sp., <i>A. richardiana</i> , <i>Dalzellia</i> <i>zeylanica</i> , <i>Marathrum rubrum</i> , <i>M.</i> <i>schiedeanum</i>	Mukkada, 1969; Rutishauser & Grubert, 2000; Sobral-Leite et al., submetido; Sobral-Leite et al., dados não publicados
Hymenoptera		
Apidae		
<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	<i>Apinagia richardiana</i> , <i>Mourera fluviatilis</i> , <i>M. monadelpha</i> , <i>Rhyncholacis</i> <i>hydrocichorium</i>	Tavares, 1997; Sobral-Leite et al., 2011; Sobral-Leite et al., submetido; Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Centris</i> spp.	<i>Rhyncholacis hydrocichorium</i>	Tavares, 1997
<i>Geotrigona</i> spp.	<i>Rhyncholacis hydrocichorium</i>	Tavares, 1997
<i>Augochlora</i> sp.	<i>Apinagia riedelii</i> , <i>Apinagia</i> sp., <i>A.</i> <i>richardiana</i> , <i>Mourera fluviatilis</i>	Sobral-Leite et al., 2011; Sobral-Leite et al., submetido; Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>Augochloropsis</i> sp.	<i>Apinagia richardiana</i> , <i>Mourera fluviatilis</i>	Sobral-Leite et al., 2011; Sobral-Leite et al., submetido
Halictinae spp.	<i>Rhyncholacis</i> sp.	Okada & Kato, 2002

<i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i> Smith, 1854	<i>Apinagia hulkiana</i> ^a , <i>A. secundiflora</i> ^a	Engel & Dingemans-Bakels, 1980
<i>M. (Michmelia) fasciata</i> Latreille, 1811	<i>Mourera fluviatilis</i>	Went, 1926
<i>M. (Michmelia) fulva</i> Lepeletier, 1836	<i>Apinagia hulkiana</i> ^a , <i>A. secundiflora</i> ^a	Engel & Dingemans-Bakels, 1980
<i>M. (Michmelia) scutellaris</i> Latreille, 1811	<i>Apinagia hulkiana</i> ^a , <i>A. secundiflora</i> ^a	Engel & Dingemans-Bakels, 1980
<i>Melipona</i> spp.	<i>Apinagia</i> sp., <i>Mourera fluviatilis</i> , <i>Rhyncholacis</i> sp.	Okada and Kato, 2002
<i>Partamona cupira</i> (Smith, 1863)	<i>Mourera fluviatilis</i>	Went, 1926
<i>Tetragona clavipes</i> (Fabricius, 1804)	<i>Apinagia exilis</i> , <i>A. multibranchiata</i> , <i>A. staheliana</i> , <i>Rhyncholacis macrocarpa</i>	Gessner & Hammer, 1962; Grubert, 1974
<i>T. ziegleri</i> (Fries, 1900)	<i>Apinagia staheliana</i>	Went, 1926
<i>Trigona pallens</i> (Fabricius, 1798)	<i>Mourera fluviatilis</i>	Went, 1926
<i>T. spinipes</i> (Fabricius, 1793)	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i> , <i>Apinagia</i> sp., <i>Mourera fluviatilis</i>	Sobral-Leite et al., 2011; Sobral-Leite et al., dados não publicados
<i>T. williana</i> Fries, 1900	<i>Mourera fluviatilis</i>	Went, 1926
<i>Trigona</i> spp.	<i>Apinagia multibranchiata</i> , <i>Apinagia</i> sp., <i>Marathrum rubrum</i> , <i>M. schiedeanum</i> , <i>Mourera fluviatilis</i> , <i>Rhyncholacis penicillata</i> , <i>Rhyncholacis</i> sp., <i>Weddellina squamulosa</i>	Went, 1926; Gessner & Hammer, 1962; Grubert, 1974; Jäger-Zürn, 1997; Rutishauser & Grubert, 1999; Rutishauser & Grubert, 2000; Okada & Kato, 2002
Odonata		
Coenagrionidae		
<i>Telebasis</i> spp.	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i> , <i>A. riedelii</i> , <i>A. richardiana</i>	Sobral-Leite et al., submetido; Sobral-Leite et al., dados não publicados

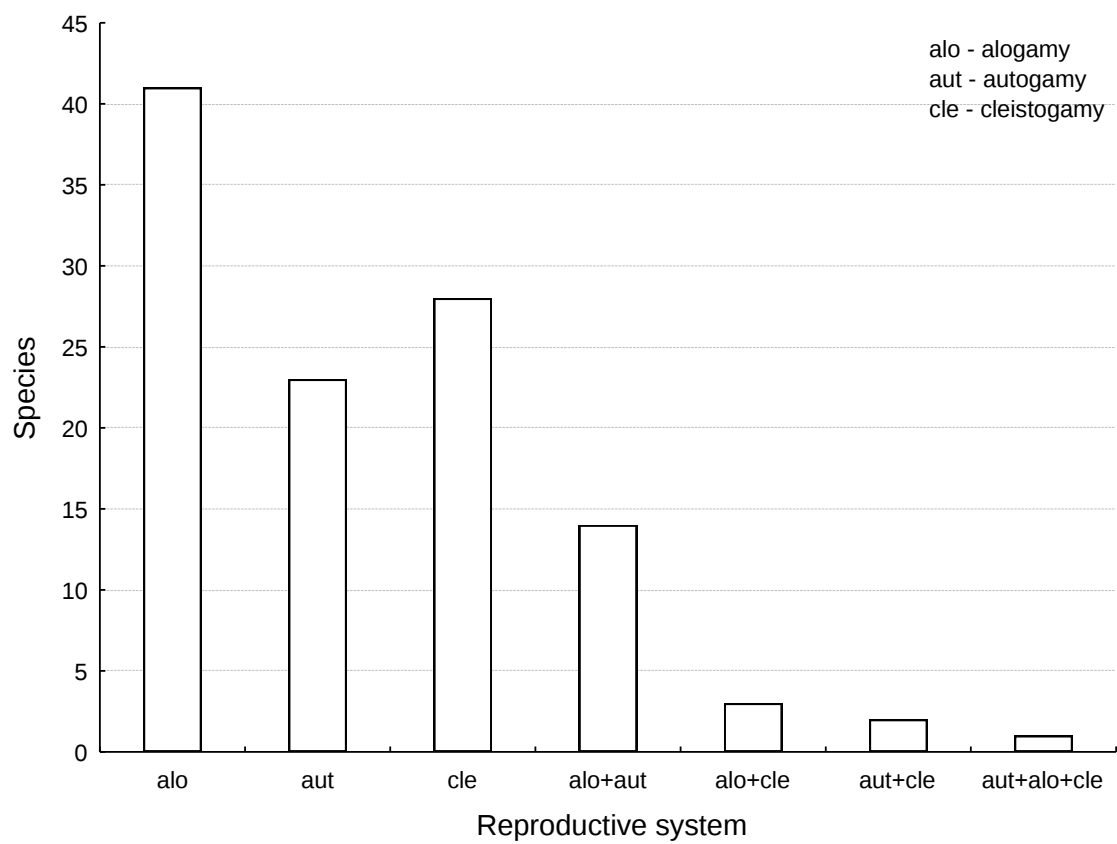


Figura 1. Espécies de Podostemaceae por categoria de sistema reprodutivo. Houve diferença significativa entre as proporções ($\chi^2 = 88.25$, $df = 6$, $p < 0.001$).

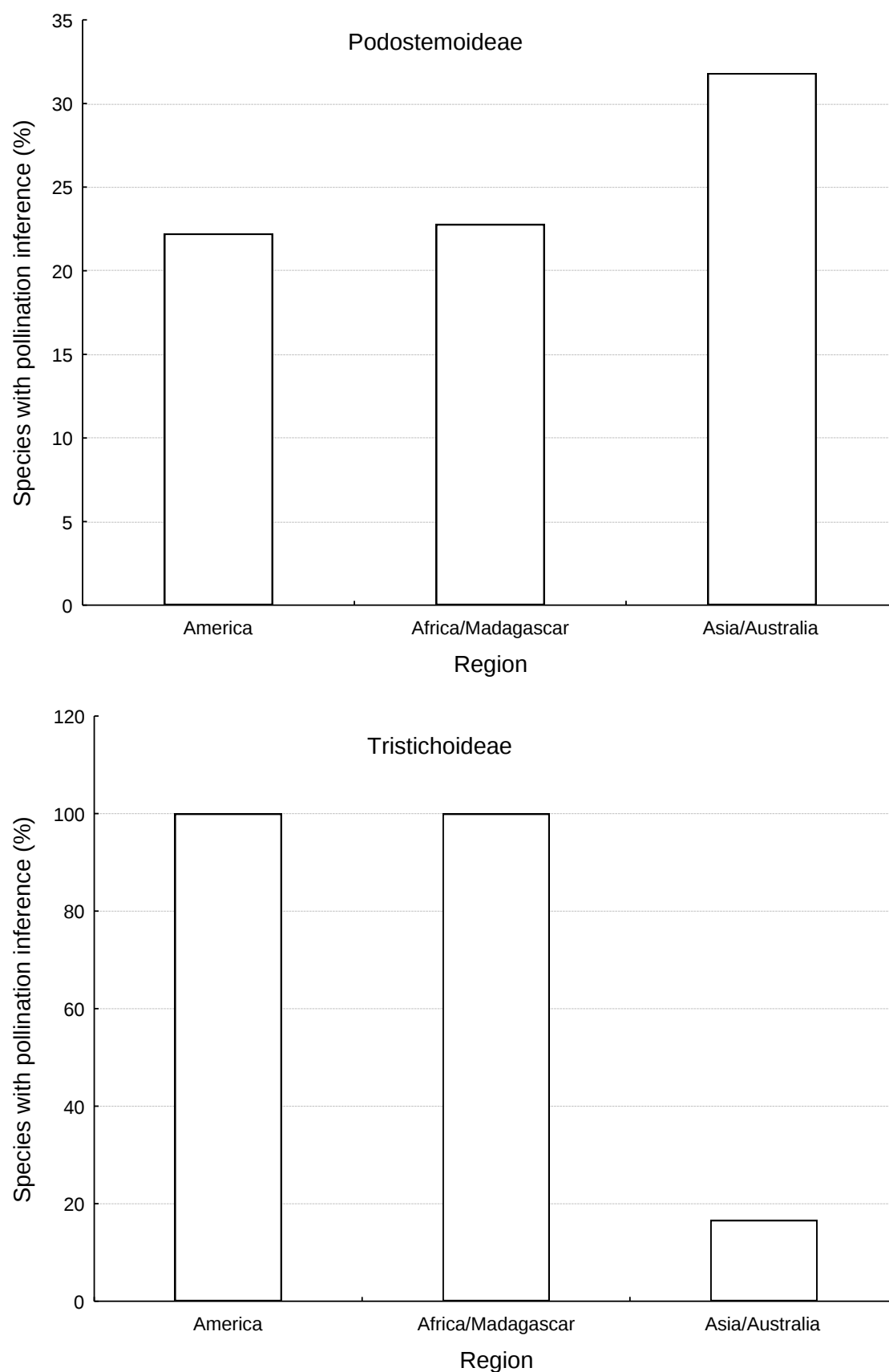


Figura 2. Proporção da riqueza regional de Podostemaceae (por subfamília) com inferências sobre aspectos reprodutivos, na América, na África/Madagascar e na Ásia/Austrália. Para número total de espécies em cada região veja Koi et al. (2012).

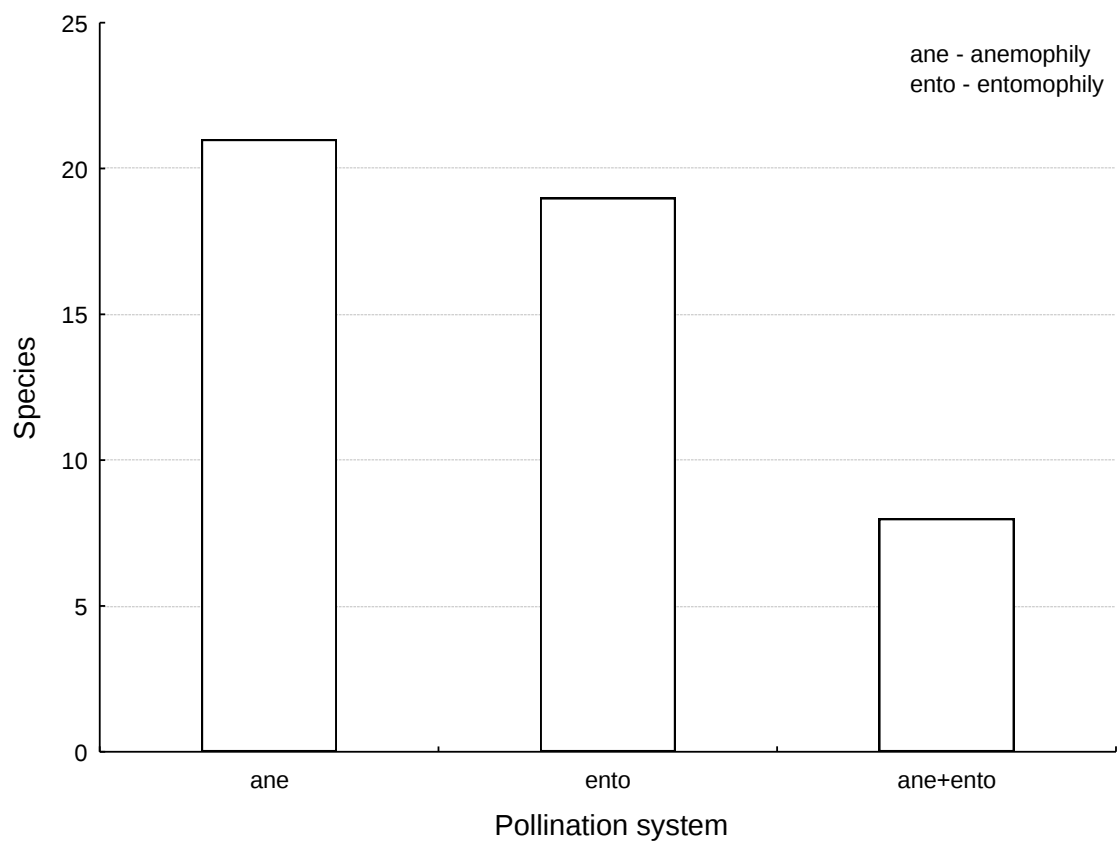


Figura 3. Espécies de Podostemaceae por categoria de sistema de polinização. Houve diferença significativa entre as proporções ($\chi^2 = 6.125$, $df = 2$, $p < 0.001$).

Figura 4. Visitantes florais de Podostemaceae neotropicais. (A) *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Augochlora* sp. (circulo preto) (Hymenoptera: Apidae), forrageando pólen em *M. fluviatilis* Aubl. do NE do Brasil. (B) Forrageamento de pólen de *A. mellifera* em *M. monadelpha* (Bong.) C.T. Philbrick & C.P. Bove do rio Madeira, região amazônica. (C) *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Apidae) polinizador efetivo de *M. fluviatilis* do rio Pirangi, NE do Brasil. (D) Detalhe de Syrphidae (Diptera) sobre os estames da flor de *M. fluviatilis* do NE do Brasil. (E) *Simulium* sp. (Diptera: Simuliidae) sobre as anteras de *M. fluviatilis* no rio Ipojuca, NE do Brasil. (F). *Telebasis* sp. (Odonata: Coenagrionidae), tocando (círculo e seta brancos) o pedicelo da flor de *Apinagia* sp. do rio Una, NE do Brasil, logo após o pouso. Barra de escala = 10 mm (A, B, C, D e F). Barra de escala = 5 mm (E).

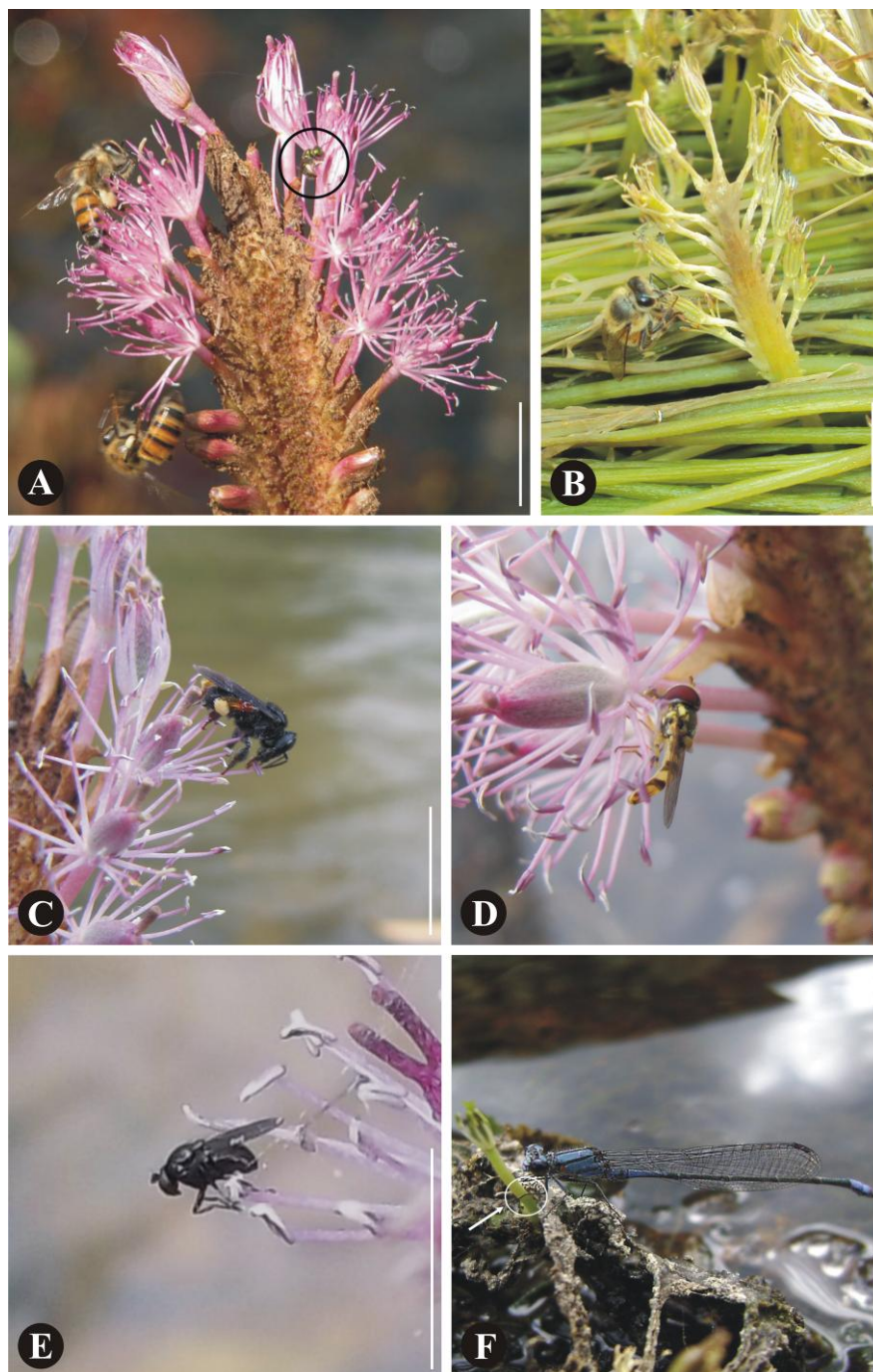


Figura 5. Seqüência de ântese do botão a deiscência da cápsula de (A) *Podostemum ovatum* C. Philbrick & Novelo e (B) *Wettsteiniola accorsii* (Toledo) P.Royen (Podostemoideae) a partir de observações de Accorsi (1944) e estudos de espécimes de herbário (*P. ovatum* IPA 2300; *W. accorsii* USP 171176). (a.) botão protegido ainda pela espatela membranácea (em). (b.) flor em ântese evidenciando estigmas (sti), ovário (o), tépalas (te), andropódio (an), filete (f), antera (a) e pedicelo. (c.) abertura dos lobos estigmáticos. (d.) início do alongamento dos filetes e andropódio, conduzindo as anteras em direção aos lobos estigmáticos. (e.) anteras tocam os lobos estigmáticos. (f.) cápsula recém formada. (g.) cápsula deiscente. Barra de escala = 1 mm.

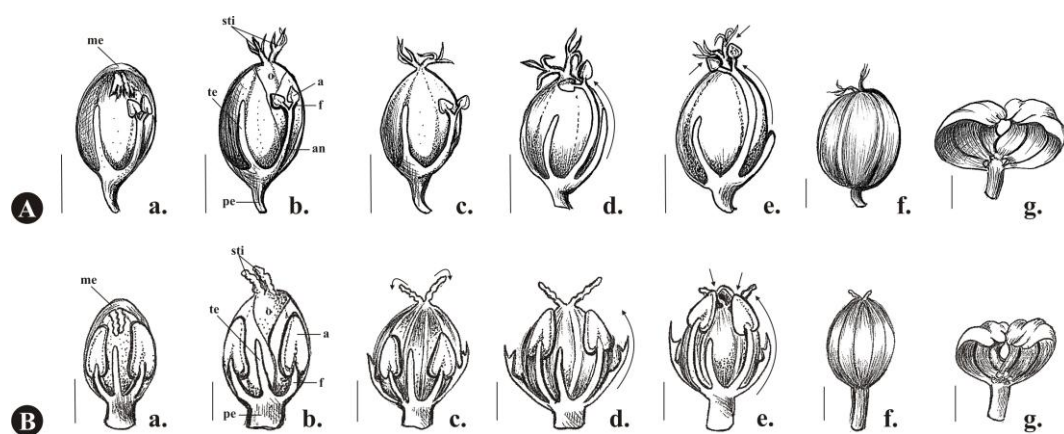


Figura 6. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos estigmas e papilas estigmáticas das Podostemaceae neotropicais: *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. richardiana* e *A. riedelii* (Podostemoideae). (A) Estigmas (sti) e parte do ovário (o) de *A. aff. glaziovii*, evidenciando a ampla superfície recoberta de papilas estigmáticas. Barra de escala = 400 μm . (B) Detalhe das papilas estigmáticas (sp) de *A. aff. glaziovii*. Barra de escala = 50 μm . (C) Estigmas (sti) e parte do ovário (o) de *A. riedelii*, evidenciando a ampla superfície recoberta de papilas estigmáticas. Barra de escala = 400 μm . (D) Detalhe das papilas estigmáticas (sp) de *A. riedelii*. Barra de escala = 50 μm . (E) Estigmas (sti) e parte do ovário (o) de *A. richardiana*, evidenciando a ampla superfície recoberta de papilas estigmáticas. Barra de escala = 400 μm . (F) Detalhe das papilas estigmáticas (sp) de *A. richardiana*. Barra de escala = 50 μm .

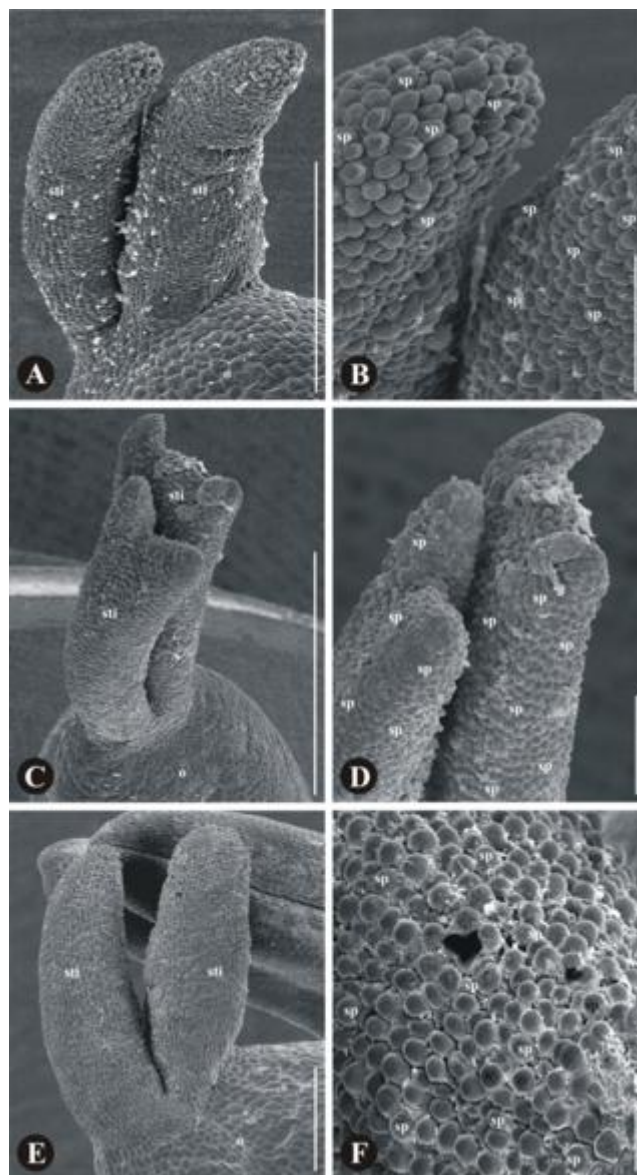
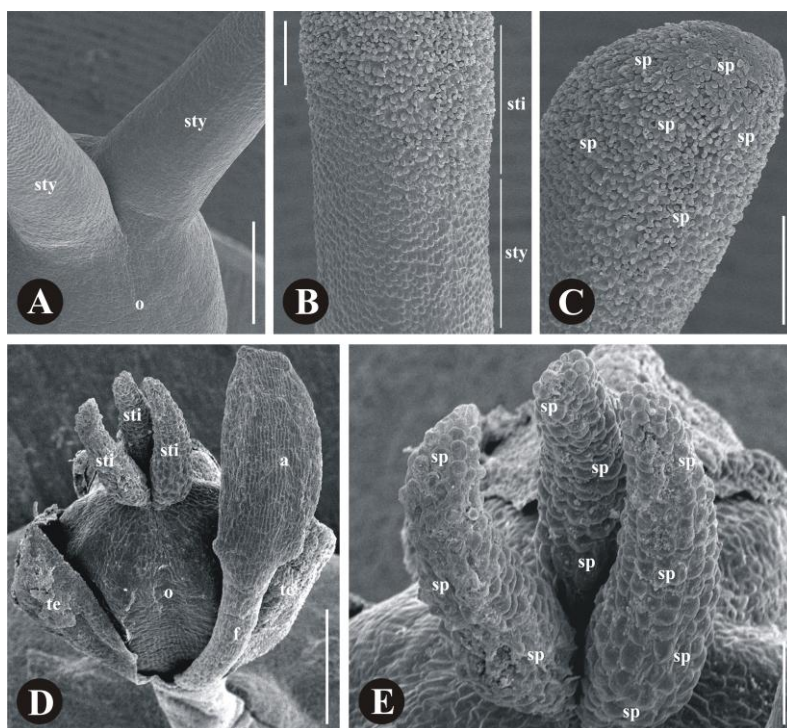


Figura 7. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos estigmas e papilas estigmáticas das Podostemaceae neotropicais: *Mourera fluviatilis* (Podostemoideae) e *Tristicha trifaria* (Tristichoideae). (A) Pistilo de *M. fluviatilis*, evidenciando o ovário (o) e os dois estiletes (sty), estruturas ausentes de papilas estigmáticas. Barra de escala = 400 µm. (B) Interface entre estilete (sty) e estigma (sti) de *M. fluviatilis*, na qual, as áreas recobertas de papilas estigmáticas se iniciam. Barra de escala = 400 µm. (C) Detalhe do ápice de um dos lobos estigmáticos de *M. fluviatilis* no qual percebe-se numerosas papilas estigmáticas recobrindo toda a superfície. Barra de escala = 50 µm. (D) Flor de *T. trifaria* na qual podem ser vistos ovário (o), tépalas (te), filete (f), antera (a), e os três estigmas (sti) proeminentes. Barra de escala = 100 µm. (E) Detalhe dos estigmas de *T. trifaria* evidenciando suas superfícies recobertas por papilas estigmáticas (sp.), regiões de recepção dos grãos de pólen. Barra de escala = 20 µm.



Capítulo 2

Evidências morfológicas sobre a polinização em Podostemaceae: o caso de
Apinagia spp.

Manuscrito a ser submetido ao periódico “Aquatic Botany”

Evidências morfológicas sobre a polinização em Podostemaceae: o caso de *Apinagia* spp.

M. Sobral-Leite^{a,*}, C. Erbar^b, I. Cristina Machado^a

a. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901.

b. Universität Heidelberg, Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Im Neuenheimer Feld 360, 69120 Heidelberg, Germany.

* msobralleite@yahoo.com.br

RESUMO

Atributos florais predizem guildas e tipos de visitantes florais. Eles são utilizados em inferências sobre sistemas reprodutivos e de polinização, especialmente em Podostemaceae, devido às dificuldades na obtenção de dados em campo. Estudamos a morfologia e biologia florais, incluindo observações palinológicas e estruturais em MEV, respondendo às questões: (1) caracteres florais classificam Podostemaceae como entomófilas ou anemófilas? (2) ocorre alongamento de estruturas florais, possibilitando contato entre estames e estigmas?; (3) quanto o estigma representa em relação ao total do pistilo?; e (4) a razão pólen-óvulo indica autogamia ou alogamia? Registramos alongamento de pedicelos entre as fases de botão e flor significativo ($p < 0.01$) e de filetes com o decorrer da antese ($p < 0.01$). Este último mecanismo permite o contato entre anteras e estigmas. A altura dos estigmas também diferiu entre botões e flores ($p < 0.01$), possivelmente ampliando a superfície estigmática, mas não diferiu do comprimento total do pistilo, correspondendo entre 34 e 36% da altura deste. A razão pólen-óvulo média foi de 66 (± 24 , $n = 30$) para *A. aff. glaziovii*, 140 (± 40 , $n = 30$) para *A. riedelii* e 147 (± 60 , $n = 30$) para *Apinagia* sp., qualificando as duas últimas como autógamas facultativas (IPC = 2). Os valores obtidos para *A. aff. glaziovii*, encontraram-se entre as categorias autógama obrigatória e facultativa (IPC entre 1 e 2). Em suma, concluímos que; (1) caracteres florais duais anemófilos e entomófilos, análogos aos descritos para táxons congêneres, sugerem a ocorrência de ambofilia. No entanto, evidências experimentais são necessárias para confirmar tal hipótese. (2) o alongamento do pedicelo entre as fases florais possivelmente desempenha papel na ecologia da polinização das *Apinagia* spp. (3) O alongamento dos filetes com anteras alcançando o nível dos estigmas, pode indicar a ocorrência de autopolinização espontânea.

Palavras-chave: angiospermas aquáticas, morfologia floral, biologia reprodutiva, síndromes florais, razão pólen-óvulo, autogamia

1. Introdução

Atributos florais podem predizer tipos de polinizadores, guildas ou sistemas de polinização em nível individual ou comunitário nas angiospermas (Faegri and Pijl, 1979; Machado et al., 2006). Horário de ântese, tamanho, formato e cor, guias de nectário, néctar e odores, além da palinologia, dão indicativos se a flor é autopolinizada, e mesmo zoófila, polinizada abioticamente ou ambos (Faegri and Pijl, 1979; Culley et al., 2002). Alongamento, deslocamento, posicionamento e merística das estruturas florais, por sua vez, exercem funções na biologia reprodutiva de algumas espécies (Prance et al., 1975; Osborn and Schneider, 1988; Yanagizawa and Gottsberger, 1983; Rutishauser, 1997; Gupta and Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011; submetido). Por exemplo, o alongamento de estruturas como pedicelos e filetes, tem papel chave na polinização de algumas Fabaceae terrestres (Yanagizawa and Gottsberger, 1983) e hidrófitas como Cabombaceae (Osborn and Schneider, 1988), Nymphaeaceae (Prance et al., 1975) e Podostemaceae (Gupta and Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011; submetido).

As eudicotiledôneas reófitas da família Podostemaceae com ca. 54 gêneros e 300 espécies pantropicais (Koi et al., 2012), têm sua reprodução tradicionalmente inferida por análises dos atributos florais (Willis, 1902; Philbrick, 1981; Philbrick and Bogle, 1988; Cook, 1990; Khosla and Mohan Ram, 1993; Rutishauser, 1997; Okada and Kato, 2002). Restritas a ambientes de corredeiras (Willis, 1902; Cook, 1990), a fenologia destas macrófitas é modulada pelos ritmos sazonais de cheias e vazantes; apenas na baixa das águas na estação seca ocorre floração (Willis, 1902; Philbrick and Novelo, 1995; 1998). Em decorrência da dificuldade na obtenção de dados experimentais em campo (Philbrick and Novelo, 1995; 1998), estudos morfológicos (Willis, 1902; Khosla and Mohan Ram, 1993; Rutishauser, 1997) e merísticos, e.g. razão pólen óvulo (Okada and Kato, 2002) têm auxiliado nossa compreensão sobre os sistemas reprodutivos e de polinização nessa família. Dentre os pesquisadores que se apoiaram na morfologia e merística, Willis (1902) postulou que a poliandria e a variação do número de óvulos entre as espécies seriam indicadores dos sistemas

de polinização em Podostemaceae. Poucos óvulos e estames em um só lado da flor caracterizariam anemofilia, enquanto que androceu em verticilo completo e numerosos óvulos indicariam entomofilia (Willis, 1902; Rutishauser, 1997). Caracteres florais relacionados a entomofilia; pedicelos e estames de cores vistosas, poliandria e presença de odor floral, são descritos para várias espécies dos gêneros neotropicais *Apinagia*, *Mourera* e *Rhyncholacis* (Rutishauser, 1997; Sobral-Leite et al. 2011). Análises recentes em microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram numerosas papilas ao longo de toda superfície dos estigmas de *Apinagia richardiana* (Tul.) P. Royen Aubl. (Sobral-Leite et al., submetido). Sobral-Leite et al. (submetido), testando experimentalmente seu sistema de polinização, concluíram que a ampla superfície estigmática (entre 35-50% da altura total do pistilo), coberta de papilas, representaria adaptação para captar pólen carregado pelo vento.

Logo, nosso objetivo foi verificar se os representantes do gênero *Apinagia* apresentam atributos que os enquadram em um único ou diferentes tipos de sistemas reprodutivos e de polinização. Para tanto, estudamos a morfologia e biologia floral, incluindo observações palinológicas e estruturais em MEV, respondendo às questões: (1) seus caracteres florais as classificam como entomófilas ou anemófilas? (2) ocorre alongamento de estruturas florais, e.g. pedicelos e filetes, possibilitando contato entre estames e estigmas?; (3) quanto o estigma representa em relação ao total do pistilo?; e (4) a razão pólen-óvulo indica autogamia ou alogamia? Discutimos ainda, o papel desses atributos, comparando com outras Podostemaceae e diferentes famílias de angiospermas aquáticas e terrestres.

2. Material e métodos

2.1. Espécies estudadas

Analizamos três espécies pertencentes ao gênero neotropical *Apinagia* Tulasne: *Apinagia* aff. *glaziovii* (Warm.) P.Royen, *A. riedelii* (Bong.) Tul e *Apinagia* sp. Estes táxons pertencem a seção Eu-*Apinagia* que junto com a seção *Hymenolacis*, engloba mais de 90% das espécies do gênero e compartilham semelhanças estruturais, e.g. anteras com deiscência introrsa (Van Royen, 1951).

2.2. Áreas de estudo

As áreas de estudo se inserem no Domínio da Floresta Atlântica Brasileira, setor ao norte do rio São Francisco, correspondendo aos subtipos vegetacionais: Floresta Ombrófila Aberta Submontana e Semidecidual Montana (IBGE, 1985; Veloso et al., 1991). O clima local é tropical quente e úmido com temperatura média anual em torno de 22-24 °C com quatro a cinco meses de estação seca entre outubro e fevereiro e chuvosa de março a setembro (IBGE, 1985) com precipitação pluviométrica anual média de 1300 mm (ITEP, 2012).

Coletamos ramos férteis, botões, flores e cápsulas das três espécies de *Apinagia* no início de cada estação seca de 2007 a 2009. Os sítios de coleta, todos localizados no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil (Fig. 1B e C), foram: para *Apinagia* aff. *glaziovii*, rio Una, riacho Mentirosos, município de Caruaru, corredeiras do sítio Flecheira (8°23'S to 35°59'W, 500 m a.s.l.); *A. riedelii*, rio Ipojuca, município de Primavera (8°19'S to 35°21'W, 129 m a.s.l.), próximo à cachoeira do Urubu; e *Apinagia* sp. rio Una, município de Agrestina, corredeiras do sítio Capivara (8°29'S to 35°55'W, 400 m a.s.l.). Depositamos os espécimes-testemunho no Herbário Geraldo Mariz, Universidade Federal de Pernambuco (UFP 41737, 46427 e 55835).

2.1. Caracteres florais

Com a finalidade de averiguar se os caracteres florais das espécies de *Apinagia* as classificam como entomófilas ou anemófilas, registramos: cor, possíveis áreas com osmóforos, dimensões, número e disposição das peças florais. Além disso, fizemos análises aceto palinológicas e em MEV dos grãos de pólen e pistilos. Testamos no campo os locais de emissão de odor em 30 flores ($n = 30$ indivíduos), no início e durante a ântese, utilizando Vermelho Neutro (Vogel, 1963). Imergimos as flores em solução aquosa (1:1000) desse corante por duas horas, em seguida as lavamos em água corrente, observamos e fotografamos. Para as análises morfométricas, morfológicas e classificação do pólen, utilizamos grãos acetolisados segundo Erdtman (1969). Os dados morfométricos obtidos representam 25 medidas para o diâmetro polar e equatorial de grãos de pólen oriundos de 25 flores de indivíduos diferentes. Para as análises em MEV, botões e flores foram desidratados em dimetoximetano, secos até o ponto crítico, utilizando CO₂ líquido, montados em *stubs* de alumínio, e metalizados com ouro. Posteriormente, examinamos esse material em microscópio eletrônico de varredura (AMR 1200B, Leitz, Alemanha; software: Sistema de Processamento de Imagem Digital 2.6), no Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Alemanha.

Fizemos a morfometria dos pedicelos, filetes e estigmas de botões e flores em final de ântese, com o intuito de verificar se existem diferenças na altura destas estruturas entre estas fases florais, promovendo o contato entre estames e estigmas. Para tanto, dissecamos botões e flores sob estereomicroscópio, seccionado com o auxílio de lâmina de bisturi a estrutura de interesse a partir de seu ponto de junção com a estrutura imediatamente adjacente. Posteriormente, medimos com o auxílio de paquímetro digital as estruturas florais dissecadas sob estereomicroscópio.

Obtivemos a razão estigma-pistilo, medida que revela quanto equivale o estigma em altura em relação ao total do pistilo (Sobral-Leite et al., submetido), dividindo a altura do estigma pela altura total do pistilo da mesma flor.

No cálculo da razão pólen-óvulo (segundo Cruden, 1977), utilizamos botões florais ($n = 30$ indivíduos) em pré-ântese fixados em etanol 70%. Estimamos o número de grãos de pólen por

antera utilizando microscópio óptico e câmara de Neubauer (Maêda, 1985). Para o cálculo do índice de polinização cruzada (IPC), seguimos Cruden (1977). Para estimar a viabilidade do pólen nós usamos a técnica de coloração do citoplasma com carmim acético a 2% (Radford et al., 1974), utilizando pólen de 30 botões ($n = 30$ indivíduos) em pré-ântese.

Para a análise do número de sementes por fruto, definimos em cada localidade um transecto de 30 m x 5 m, dentro do qual enumeramos 50 indivíduos e sorteamos entre 30 e 35 por espécie/localidade. Posteriormente, coletamos de um a dois frutos de cada um desses indivíduos sorteados e os acondicionamos em tubos de Eppendorf de 2 ml com etanol 70%. As sementes de cada fruto foram uniformemente distribuídas em lâminas histológicas com duas gotas de solução de ácido láctico e glicerol (3:1). Contamos as sementes sob estereomicroscópio, usando papel milimetrado e contador manual. Calculamos a razão semente-óvulo a partir da divisão do número de sementes de cada fruto individual pela média de óvulos por ovário da espécie em questão. Em cada localidade, enumeramos todos os indivíduos presentes num transecto de 10 m x 1 m e sorteamos entre 40 e 60 indivíduos férteis para verificar se existe correlação entre o número de flores e o tamanho do ramo. Acondicionamos individualmente as amostras e as fixamos em etanol 70% para posterior medição em laboratório com o auxílio de paquímetro digital e contagem do número de flores por ramo.

2.2. Análises estatísticas

Verificamos todos os dados numéricos testados quanto a presença de outliers com o Teste de Grubbs para outliers (Burke, 2001). Nós utilizamos o Teste T (ou o Teste de Mann-Whitney) para verificar diferenças na morfometria das estruturas florais (pedicelo, filetes e estigmas) entre botões e flores em final de antese. Para verificar se existe diferença entre a altura do filete do botão, altura do filete da flor e altura do pistilo, aplicamos o Teste de Kruskal Wallis (“stats” package for R Core Team 2012). Para detectar onde ocorre a diferença, utilizamos com Teste de Dun a posteriori, com a

função “oneway_test” do pacote “coin” (Hothorn et al. 2006). Verificamos também a existência de correlação entre tamanho do ramo e número de flores com a correlação de Spearmann (Zar, 1996). Utilizamos o ambiente R Development Core Team (2012) para efetuar as análises estatísticas supracitadas.

3. Resultados

3.1. Caracteres florais

As flores são zigomorfas, hermafroditas, com estames em verticilo incompleto (Fig. 2B, D e F), variando entre 2–4 (*A. aff. glaziovii* e *A. riedelii*) e 3–5 (Tabela 1), sendo sua que coloração variou de verde-claras (*Apinagia* sp.) a castanho-avermelhadas (*Apinagia* aff. *glaziovii* e *A. riedelii*) (Fig. 2). Os ovários são súperos, biloculares, globosos (*A. riedelii* e *Apinagia* sp.) a cilíndricos (*A. aff. glaziovi*) com dois lobos estigmáticos subulados (Fig. 3A e B) a bífidos (Fig. 3D e E), unidos nos botões, mas separados nas flores (Tabela 2). Papilas ocorreram ao longo de toda extensão dos lobos estigmáticos (Fig 3B e E). Os grãos de pólen são mônades esferoidais tricolpadas com exina espinhosa (Fig. 3C e F) e sua viabilidade média foi de 97.2% ($\pm 3.4\%$, $n = 30$) para *A. aff. glaziovii*, 97.6% ($\pm 2.1\%$, $n = 30$) para *A. riedelii* e 98.4% ($\pm 2\%$, $n = 30$) para *Apinagia* sp. As áreas coradas pelo Vermelho Neutro foram as espatelas, tépalas e ápices das anteras (Fig. 4). As flores não apresentaram odor perceptível ao olfato humano.

O comprimento do pedicelo variou significativamente entre botões e flores (Fig. 5A). Semelhantemente ao pedicelo, nós verificamos diferença significativa na altura dos filetes (Fig. 5B) e estigmas (Fig. 5C) entre essas fases, sendo que esse alongamento nos filetes permitiu que as anteras atingissem o nível dos estigmas.

A razão estigma-pistilo média foi de 35% ($\pm 0.06\%$, $n = 67$) em *Apinagia* aff. *glaziovi*, 36% ($\pm 0.05\%$, $n = 62$) em *A. riedelii* e 34% ($\pm 0.04\%$, $n = 60$) em *Apinagia* sp.

A razão pólen-óvulo média foi de 66 (± 24 , $n = 30$) para *A. aff. glaziovii*, 140 (± 40 , $n = 30$) para *A. riedelii* e 147 (± 60 , $n = 30$) para *Apinagia* sp., qualificando as duas últimas como autógamas facultativas (IPC = 2). Os valores obtidos para *A. aff. glaziovii*, encontraram-se entre as categorias autógama obrigatória e facultativa (IPC entre 1 e 2). A razão semente-óvulo média foi de 0.76 (± 0.23 , $n = 33$) para *A. aff. glaziovii*, 0.61 (± 0.28 , $n = 33$) para *A. riedelii* e 0.56 (± 0.27 , $n = 33$) para *Apinagia* sp. (Tabela 1).

As dimensões dos ramos férteis e os valores de número de flores por ramo das três espécies de *Apinagia* podem ser visualizados nas tabelas 1 e 2. Ocorreu correlação significativa entre o tamanho dos ramos e o número de flores produzidas em todas as espécies (*A. aff. glaziovii*; $r^2 = 0.89$, $t = 12513$, $p = 0.001$, *A. riedelii*; $r^2 = 0.88$, $t = 14.17$, $p = 0.001$, *Apinagia* sp. $r^2 = 0.63$, $t = 5.02$, $p = 0.001$), sendo os ramos maiores mais produtivos que os menores (Fig. 6).

4. Discussão

Estruturas reprodutivas expostas, perigônio de tépalas inconspícuas e numerosos grãos de pólen entre 13-16 μm são atributos relacionados à polinização abiótica ou autopolinização (Whitehead, 1969; Faegri and Pijl, 1979; Regal, 1982; Culley et al., 2002) que encontramos em todas as *Apinagia* estudadas. Com base em análises palinológicas de *Apinagia glaziovii* e *A. riedelii*, Passarelli et al. (2002) concluíram que a forma, estrutura e dimensões dos grãos de pólen as caracteriza autógamas. Por outro lado, a coloração vistosa das flores nas espécies desse gênero (Fig. 2), é considerada atrativa a visitantes florais e polinizadores (Rutishauser, 1997; Sobral-Leite et al., 2011; submetido). Caracteres florais análogos, incluindo disposição dos estames de um lado da flor; atributo anemófilo em Podostemaceae (Willis, 1902; Rutishauser, 1997), foram descritos por Sobral-Leite et al. (submetido) em *A. richardiana*. Contudo, baseados em evidências experimentais, estes autores concluíram que *A. richardiana* se trata de uma espécie ambófila, pois emprega insetos e vento como vetores de pólen (Sobral-Leite et al., submetido).

Considerando a ausência de hidrofília em Podostemaceae (Philbrick and Novelo, 2004), o alongamento do pedicelo que registramos nas espécies de *Apinagia* estudadas (Fig. 5A), provavelmente é uma adaptação que auxilia na emersão das flores (Gupta and Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011). Tal mecanismo de alongamento é referido para outras Podostemaceae (Khosla et al., 2000; Gupta and Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011), assim como para diferentes famílias hidrófitas (Prance et al., 1975; Osborn and Schneider, 1988). Gupta and Sehgal (2009) explicam, utilizando *Indotristicha ramosissima* (Wight) P. Royen (Podostemaceae), que a polinização aérea na família é facilitada não apenas pela baixa das águas, mas também pelo rápido alongamento do pedicelo. Em *Victoria amazonica* (Poepp.) J.C. Sowerby (Nymphaeaceae), o alongamento dessa estrutura floral possibilita a polinização acima da superfície da água por besouros terrestres *Cyclocephala* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) (Prance et al., 1975). Em Podostemaceae, o alcance da superfície da água por meio deste mecanismo possibilitaria a polinização por vetores bióticos, pelo vento ou por autopolinização (Philbrick and Novelo, 1998; Gupta and Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., submetido). Além de sinalizar o início da ântese (Philbrick, 1984; Philbrick and Novelo, 1998), outra função ecológica atribuída a este alongamento é o rompimento da espatela, estrutura membranácea que protege o botão (Schnell, 1967; 1998; Sobral-Leite et al., 2011). Examinando as flores de *A. richardiana* (Podostemaceae), Schnell (1998) conclui que o alongamento do pedicelo, e possivelmente de outras estruturas como filetes e estigmas, se deve a intensa divisão celular concomitante com a vazante na estação seca reprodutiva. O alongamento dos filetes que verificamos nas *Apinagia* spp. foi reportado também para outras famílias hidrófitas, incluindo Podostemaceae (Philbrick and Novelo, 1998; Gupta and Sehgal, 2009), Cabombaceae (Osborn and Schneider, 1988) e em Fabaceae terrestres (Yanagizawa and Gottsberger, 1983).

Em adição, o crescimento dos estigmas entre estas fases (Fig. 5C) possivelmente maximiza a possibilidade de captura de grãos de pólen por anemofilia. Em *A. richardiana*, Sobral-Leite et al. (submetido) constataram formação de sementes em experimentos com flores emasculadas. Estes autores atribuíram à ampla área de receptividade estigmática, além da elevada proporção de estigma

em relação ao pistilo (35-50%) como favoráveis a anemofilia bem como autopolinização nesta espécie de *Apinagia*.

De acordo com o IPC (Cruden, 1977), as espécies de *Apinagia* estudadas são autógamas facultativas. Nossos resultados de atributos florais sustentam essa classificação. Okada and Kato (2002) a partir de uma ampla análise de razão pólen-óvulo em espécies de Podostemaceae concluíram que valores de log p/o acima de 2.0 seriam preferencialmente de espécies alógamas. Com base nesse estudo, todas as *Apinagia* spp. analisadas por nós seriam alógamas. Embora autocompatibilidade e autogamia sejam comumente associados a Podostemaceae (Khosla and Sehgal, 2009; Sehgal et al., 2009; Sobral-Leite et al., 2011) e em demais famílias hidrófitas (Les, 1988; Philbrick and Les, 1996), sistemas mistos estão sendo crescentemente identificados nestes grupos de angiospermas (Khosla and Sehgal, 2009; Sobral-Leite et al., 2011; submetido). Em suma, concluímos que; (1) caracteres florais duais anemófilos e entomófilos, análogos aos descritos para táxons congêneres, sugerem a ocorrência de ambofilia. No entanto, evidências experimentais são necessárias para confirmar tal hipótese. (2) o alongamento do pedicelo entre as fases florais, semelhante ao registrado em outras Podostemaceae e demais famílias hidrófitas, possivelmente desempenha papel na ecologia da polinização das *Apinagia* spp. (3) O alongamento dos filetes com o alcance das anteras ao nível dos estigmas envoltos de papilas estigmáticas, pode indicar a ocorrência de autopolinização espontânea.

Agradecimentos

Agradecemos a MSc. P. Gomes (UNESP) pelo auxílio na confecção das pranchas e análises estatísticas, a Dr. A.S. Tavares (UFSC) pela identificação das espécies de *Apinagia*. Somos gratos também a Msc. H. Meda (Universidade de Heidelberg, Alemanha) pela captura das imagens em MEV e ao Msc. A.M. Wanderley (UFPE) pela concessão da imagem da flor de *A. aff. glaziovii* (Fig. 1B). Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico, ao qual somos gratos, pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor (CNPq, processo 140933/2009-3) e de produtividade em pesquisa a última autora (CNPq, processo 305068/2008-3).

Referências Bibliográficas

- Burke, S., 2001. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. LC GC Europe Online Supplement 5, 19–24.
- Cook, C.D.K., 1990. Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands.
- Cruden, R.W., 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31, 32–46.
- Culley, T.M., Weller, S.G., Sakai, A.K., 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* 17, 361–369.
- Erdtman, G., 1969. Handbook of Palynology. Hafner Publishing, New York, USA.
- Faegri, K., van Der Pijl, 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford.
- Gupta, C.K., Sehgal, A., 2009. Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae; Tristichioideae). *Aquat. Bot.* 91, 51–56.
- Hothorn T., Hornik K., Wiel M.A., Zeileis A., 2006. A Lego System for Conditional Inference. *The Am. Stat.* 60, 257–263.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1985. Atlas Nacional do Brasil: região Nordeste. IBGE, Rio de Janeiro, BR.
- ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco 2012. Precipitation dates. Available at <http://www.itep.br/LAMEPE.asp> (accessed July 2009).
- Koi, S., Kita, Y., Hirayama, Y., Rutishauser, R., Huber, K.A., Kato, M. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Bot. J. Linn. Soc.* 169, 461–492.

- Khosla, C., Mohan Ram, H.Y., 1993. Morphology of flower, fruit and seed in *Polypleurum stylosum*. Aquat. Bot. 46, 255–262.
- Khosla, C., Shivanna, K.R., Mohan Ram, H.Y., 2000. Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). Aquat. Bot. 67, 143–154.
- Les, D.H., 1988. Breeding systems, population structure, and evolution in hydrophilous Angiosperms. Ann. Missouri Bot. Gard. 75, 819–835.
- Machado, I.C., Lopes, A.V., Sazima, M., 2006. Plant sexual systems and a review of the breeding system studies in the Caatinga, a brazilian tropical dry forest. Ann. Bot. 97: 277–287.
- Maêda, J.M., 1985. Manual para uso de Câmara de Neubauer para contagem de grãos de pólen em espécies florestais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, BR.
- Okada, H., Kato, M., 2002. Pollination systems inferred from pollen-ovule ratios of some species of Podostemaceae. Acta Phytotax. Geobot. 53, 51–61.
- Osborn, J.M., Schneider, E.L. 1988. Morphological studies of the Nymphaeaceae sensu lato. XVI. The floral biology of *Brasenia schreberi*. Ann. Missouri Bot. Gard. 75, 778–794.
- Passarelli, L.M., Girarde, S.B., Tur, N.M. 2002. Palynology of South América Podostemaceae. I. *Apinagia* Tul. Grana 41, 10–15.
- Philbrick, C.T., 1981. Some notes regarding pollination in a New Hampshire population of *Podostemum ceratophyllum* Michx (Podostemaceae). Rhodora 48, 319–321.
- Philbrick, C.T., 1984. Aspects of floral biology, breeding system, and seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). Syst. Bot. 9, 166–174.
- Philbrick, C.T., Bogle, A.L., 1988. A survey of floral variation in five populations of *Podostemum ceratophyllum* Michx Podostemaceae. Rhodora 90, 113–121.
- Philbrick, C.T., Les, D.H., 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. Bioscience 46, 813–826.
- Philbrick, C.T., Novelo, A.R., 1995. New world Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. Brittonia 47, 210–222.

- Philbrick, C.T., Novelo, A.R., 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* 62, 199–206.
- Philbrick, C.T., Novelo, A.R., 2004. Monograph of *Podostemum*. *Syst. Bot. Monographs* 70.
- Prance, G.T., Prance, A.E., Arias, J.R., 1975. A biologia floral de *Victoria amazonica* (Poepp.) Sowerby (Nymphaeaceae). *Cienc. Cult.* 27, 1293–1297.
- R Development Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R., Bell, C.R., 1974. *Vascular Plant Systematics*. Harper & Row Publishers, New York, USA.
- Regal, P., 1982. Pollination by wind and animals: ecological and geographic patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13, 497–524.
- Rutishauser, R., 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquat. Bot.* 57, 29–70.
- Schnell, R., 1967. Etudes sur l'anatomie et la morphologie des Podostémacées. *Candollea* 22: 157–225.
- Schnell, R., 1998. Anatomie des Podostémacées. In: Carlquist, S., Cutler, D. F., Fink, S., Ozenda, P., Roth, I., Ziegler, H. (Eds.). *Encyclopedia of plant Anatomy: extreme adaptations in Angiospermous hydrophytes*. Borntraeger, Berlin, GDR, pp. 197–283.
- Sehgal, A., Sethi, M., Moham Ram, H.Y., 2009. Development of the floral shoot and pre-anthesis cleistogamy in *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 159, 222–236.
- Sobral-Leite, M., Siqueira Filho, J.A., Erbar, C., Machado, I.C., 2011. Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family? *Aquat. Bot.* 95, 77–87.
- Sobral-Leite, M., Siqueira Filho, J.A., Erbar, C., Machado, I.C., submitted. Anthecology and breeding system of *Apinagia richardiana* (Tul.) van Royen (Podostemaceae): mixed mating strategies in a Neotropical riverweed. *Ann. Bot.* xxx, xxx–xxx.

- Whitehead, D., 1969. Wind pollination in the angiosperms: evolutionary and environmental considerations. *Evolution* 23, 28–35.
- Willis, J.C., 1902. Studies in the morphology and ecology of Podostemaceae of Ceylon and India. *Ann. Roy. Bot. Gard., Peradeniya* 1, 268–465.
- Van Royen, P., 1951. The Podostemaceae of the new world. Part I. *Meded. Bot. Mus. Herb. Rijks Univ. Utrecht* 107, 1–150.
- Veloso, H.P., Rangel-Filho, A.L.R., Lima, J.C.A., 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.
- Vogel, S., 1963. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung. Über Bau und Funktion der Osmophoren. *Akad. Wiss. Literatur. Math-Naturwiss. Kl* 10, 600–763.
- Yanagizawa, Y., Gottsberger, G., 1983. Competição entre *Distictella elongata* (Bignoniaceae) e *Crotalaria anagyroides* (Fabaceae) com relação as abelhas polinizadoras no cerrado de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Portugalae Acta Biol.* 18, 149–166.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, Third edition. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.

Tabela 1. Merística (média±desvio padrão/amplitude) de estames, tépalas, grãos de pólen por antera, grãos de pólen por flor, óvulos por ovário, razões pólen-óvulo, semente-óvulo e sementes por cápsula de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp.

Character ($\bar{x} \pm \text{SD/R}$)	Species					
	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i>		<i>Apinagia</i> <i>riedelii</i>		<i>Apinagia</i> sp.	
	<i>n</i>		<i>n</i>		<i>n</i>	
Flowers/branch	40	20 ± 15.2/2–59	58	18.9 ± 18.4/2–95	40	26.3 ± 21/6–87
Stamens/flower	74	2.90 ± 0.69/2–4	47	3.34 ± 0.60/2–4	37	3.9 ± 0.67/3–5
Tepals/flower	30	5.6 ± 1.0/3–8	30	5.47 ± 0.97/3–7	30	4.27 ± 0.74/3–5
Pollen grains/anther	75	10.363 ± 4503.1/2.500–22.500	102	16.495 ± 5.618/5.000–28.750	112	15.335 ± 6057/3.750–30.000
Pollen grains/flower	30	25.908 ± 10.174/12.500–52.500	30	56.083 ± 16.602/27.500–90.000	30	57.250 ± 27.102/10.000–123.750
Ovules/ovary	30	394 ± 61.52/277–521	30	402 ± 59.92/289–550	30	389 ± 115/136–574
Pollen-ovule ratio	30	66 ± 24/35–145	30	140 ± 40/81–225	30	147 ± 60/49–312
Seed-ovule ratio	33	0.76 ± 0.23/0.32–1.07	33	0.61 ± 0.28/0.16–1.17	32	0.56 ± 0.27/0.17–1.12
Seed/capsule	33	403 ± 127/127–613	33	247 ± 113/63–469	32	218 ± 106/65–434

Tabela 2. Morfometria (média±desvio padrão/amplitude) de cápsulas, flores, pistilos, diâmetros equatoriais e polares dos grãos de pólen de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp.

Character ($\bar{x} \pm \text{SD/R}$)	Species					
	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i>		<i>Apinagia</i> <i>riedelii</i>		<i>Apinagia</i> sp.	
	<i>n</i>		<i>n</i>		<i>n</i>	
Fertile branch	40	78.7 ± 46.5/28.3–236	58	83.7 ± 40/25.4–215.6	40	87.2 ± 40.6/25.8–201.5
Flower	50	14.56 ± 2.93/8.66–20.12	50	17.32 ± 3.92/8.84–24.09	50	21.09 ± 4.82/10.97–32.83
Pistils	50	5.35 ± 0.81/2.99–6.84	50	5.06 ± 0.64/3.71–6.50	50	5.18 ± 0.64/3.57–6.59
Stigmatic lobes ^a	28	1.10 ± 0.58/0.43–2.65	30	0.66 ± 0.23/0.34–1.21	24	0.67 ± 0.18/0.35–0.99
Pistil-stigma ratio	67	0.35 ± 0.06/0.16–0.46	62	0.36 ± 0.05/0.21–0.51	60	0.34 ± 0.06/0.16–0.49
Hercogamy	17	0.62 ± 0.19/0.33–0.94	17	0.66 ± 0.26/0.14–1.05	33	0.64 ± 0.22/0.19–1.08
Pollen polar diameter ^b	25	13.22 ± 0.90/12–16	25	16.48 ± 1.41/14–20	25	14.20 ± 1.85/12–20
Pollen equatorial diameter ^b	25	13.87 ± 1.10/12–16	25	17.03 ± 1.41/15–20	25	15.10 ± 1.87/12–21
Capsule	50	3.65 ± 0.42/2.1–4.55	50	3.59 ± 0.38/2.23–4.28	50	3.46 ± 0.36/2.54–4.35

Length in mm. ^aDistance between. ^bLength in μm .

Figura 1. **A.** Distribuição de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp., localidades na região Sudeste de acordo com Van Royen (1951) e no Nordeste do Brasil. **B.** Nordeste do Brasil. **C.** Áreas de estudo de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. no estado de Pernambuco.

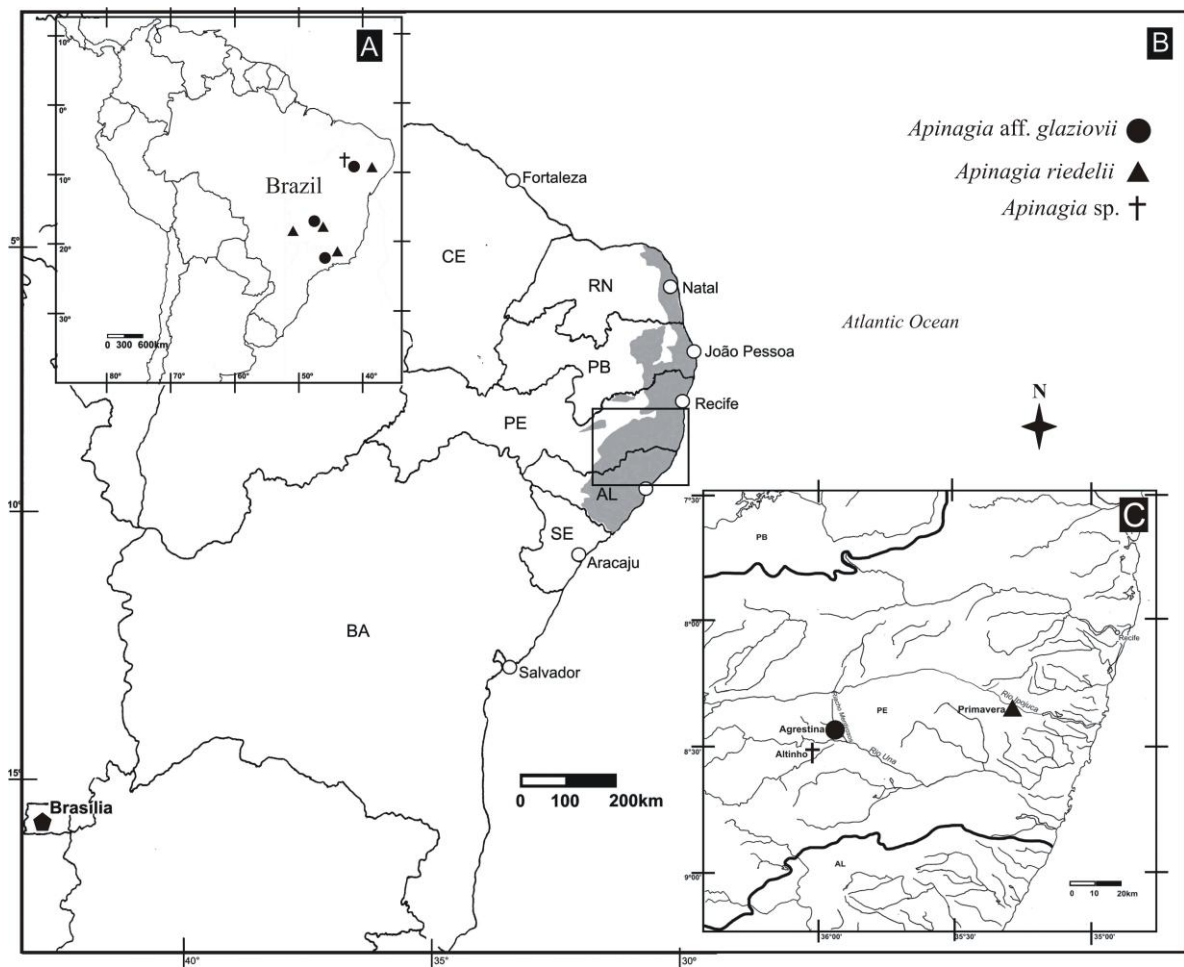


Figura 2. Hábitos e detalhes das flores de *Apinagia* aff. *glaziovii* (A e B), *A. riedelii* (C e D) e *Apinagia* sp. (E e F). Flores em detalhe (B, D e F), mostrando espatela membranácea (me), pedicelo (pe), estames (stm), tépala (te), ovário (o) e estigmas (sti). Barras de escala = 1 cm, 5 cm em *Apinagia* sp. (E).

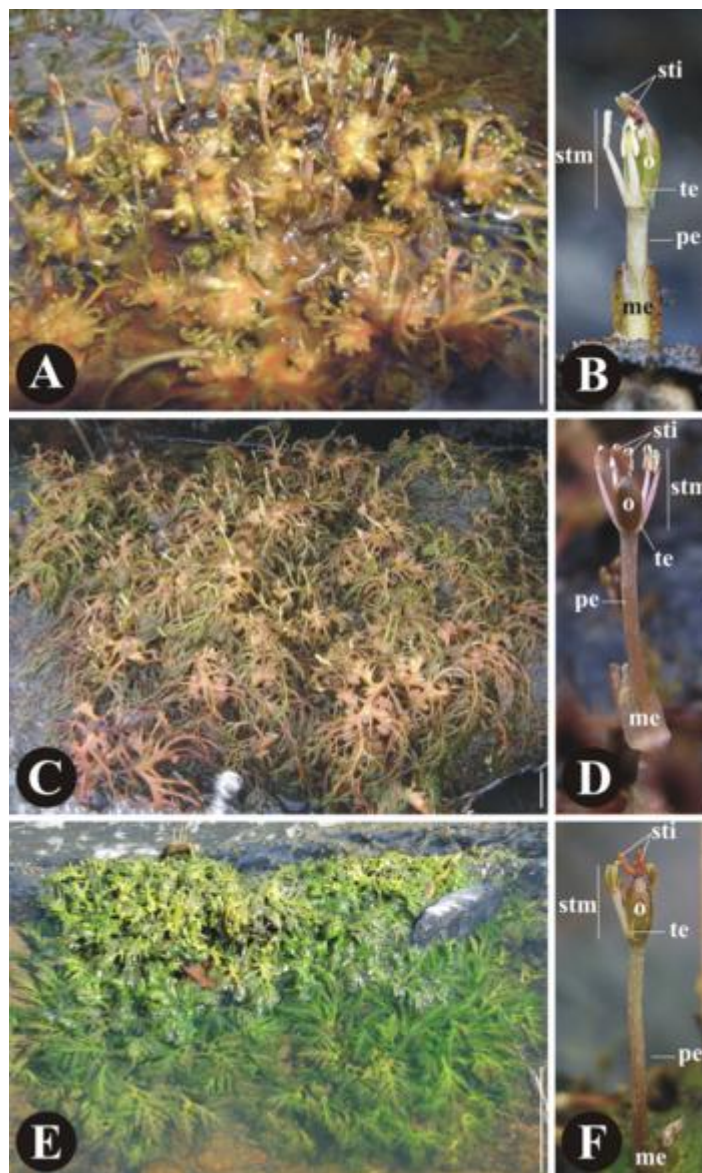


Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das flores e estruturas florais; estigmas, papilas estigmáticas e grãos de pólen de *Apinagia* aff. *glaziovii* e *A. riedelii* e *Apinagia* sp. (A) Flor de *A. aff. glaziovii* mostrando pedicelo (pe), tépala (te), estame (stm), filete (f), antera (a), ovário (o) e estigmas (sti). Barra de escala = 400 μ m. (B) Estigma evidenciando amplas superfícies recobertas por papilas estigmáticas. Barra de escala = 50 μ m. Detalhe das papilas. Barra de escala = 100 μ m. (C) Grãos de pólen esferoidais em mônades tricolpadas. Barra de escala = 20 μ m. (D) Flor de *A. riedelii* mostrando tépala (te), ovário (o) e estigmas (sti). Barra de escala = 400 μ m. (E) Estigmas (sti) de *A. riedelii*. Barra de escala = 50 μ m. Detalhe das papilas estigmáticas. Barra de escala = 100 μ m. (F) Grãos de pólen esferoidais em mônades tricolpadas de *A. riedelii*. Barra de escala = 20 μ m. (G) Flor de *Apinagia* sp. mostrando ovário (o) e estigmas (sti). Barra de escala = 400 μ m. (H) Estigma de *Apinagia* sp. evidenciando superfícies recobertas por papilas estigmáticas. Barra de escala = 500 μ m. Detalhe das papilas. Barra de escala = 10 μ m. (I) Grãos de pólen esferoidais em mônades tricolpadas de *Apinagia* sp.. Barra de escala = 10 μ m.

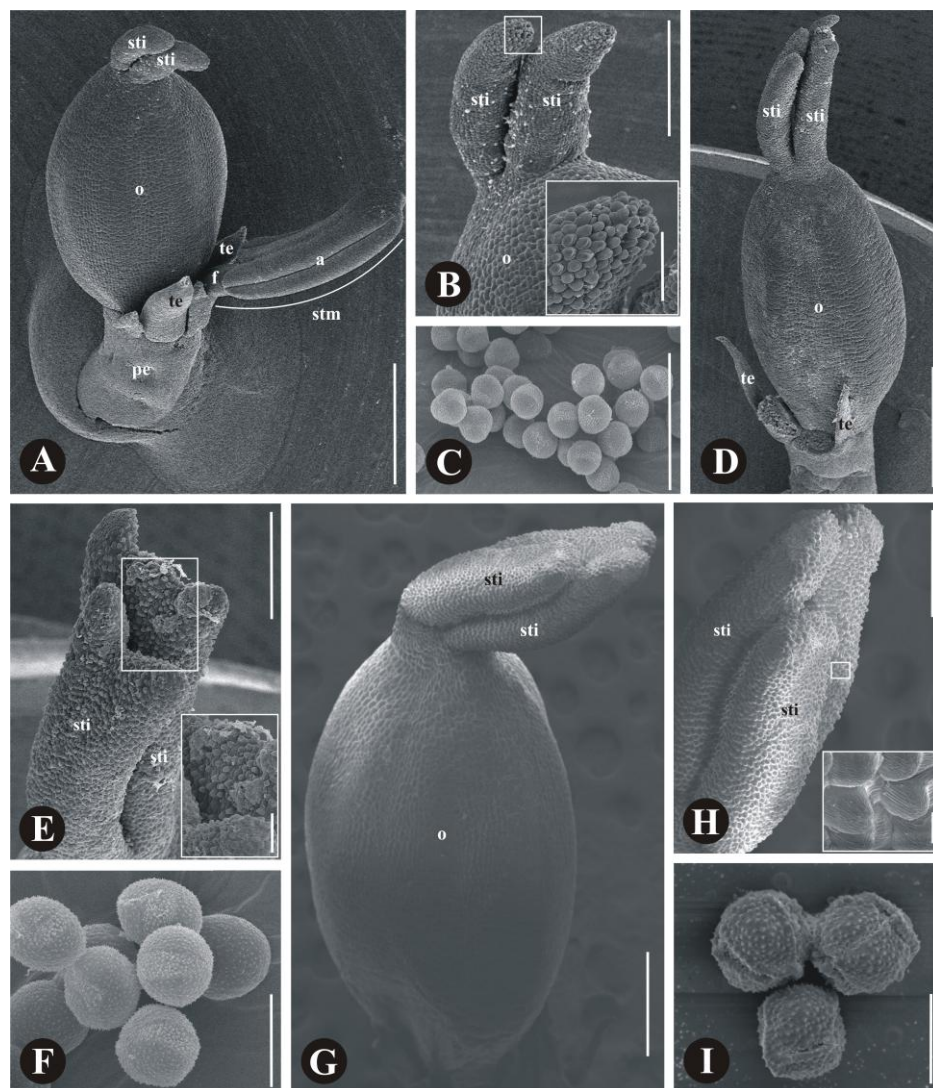
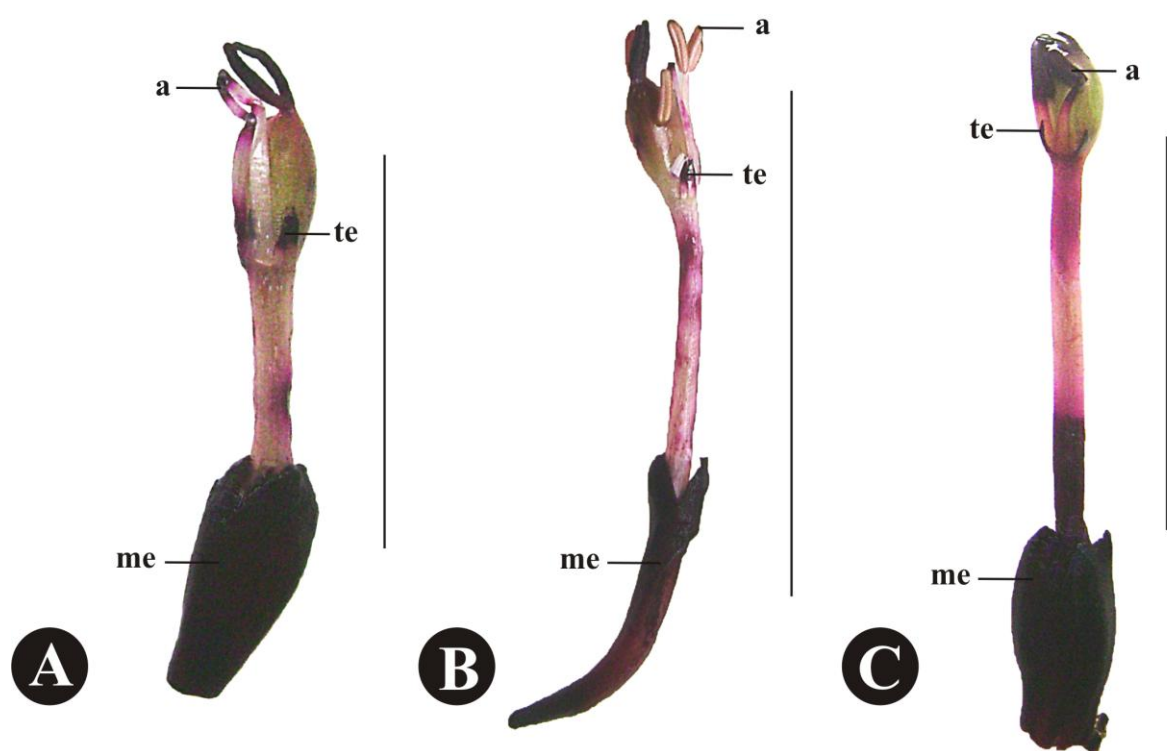


Figura 4. Áreas coradas pelo Vermelho Neutro (setas) nas flores de *Apinagia* aff. *glaziovii* (A), *A. riedelii* (B) e *Apinagia* sp. (C). Ápices das anteras (a), tépalas (te) e espatelas (me).



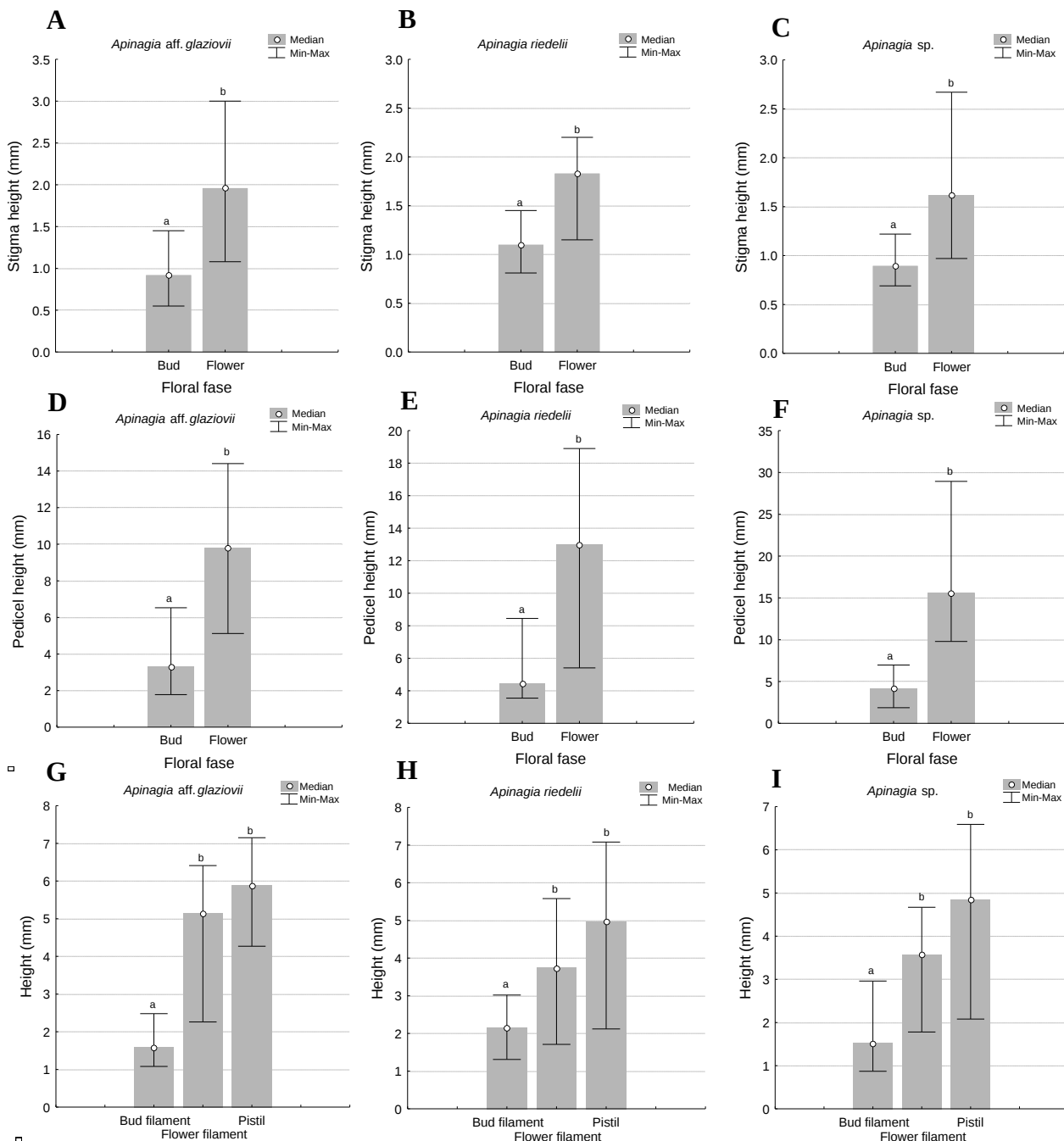


Figura 5. Comparação entre alturas de pedicelos, filetes e estigmas de botões e flores em final de nte de *Apinagia aff. glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia sp.* (A, B e C) Altura do pedicelo de botões e flores das três espécies diferiram significativamente entre estas fases florais (*A. aff. glaziovii*; $U = 26.5$; $p < 0.001$, *A. riedelii*; $U = 23$, $p < 0.001$ e *Apinagia sp.*; $U = 0.00$, $p < 0.001$). (D, E e F) Diferença na altura dos estigmas de botões e flores de *Apinagia spp.* (*A. aff. glaziovii*; $U = 60$, $p < 0.001$, *A. riedelii*; $U = 89$, $p < 0.001$ e *A. sp.*; $U = 51.5$, $p < 0.001$). (G, H e I) Comparação entre a altura dos filetes de botões, filetes de flores e pistilo de *Apinagia spp.* com diferenças entre as fases florais (*A. aff. glaziovii*; $H = 84.12$, $df = 2$, $p = < 0.001$, *A. riedelii*; $H = 107.12$, $df = 2$, $p = < 0.001$ e *Apinagia sp.*; $H = 226.6$; $df = 2$, $p < 0.001$).

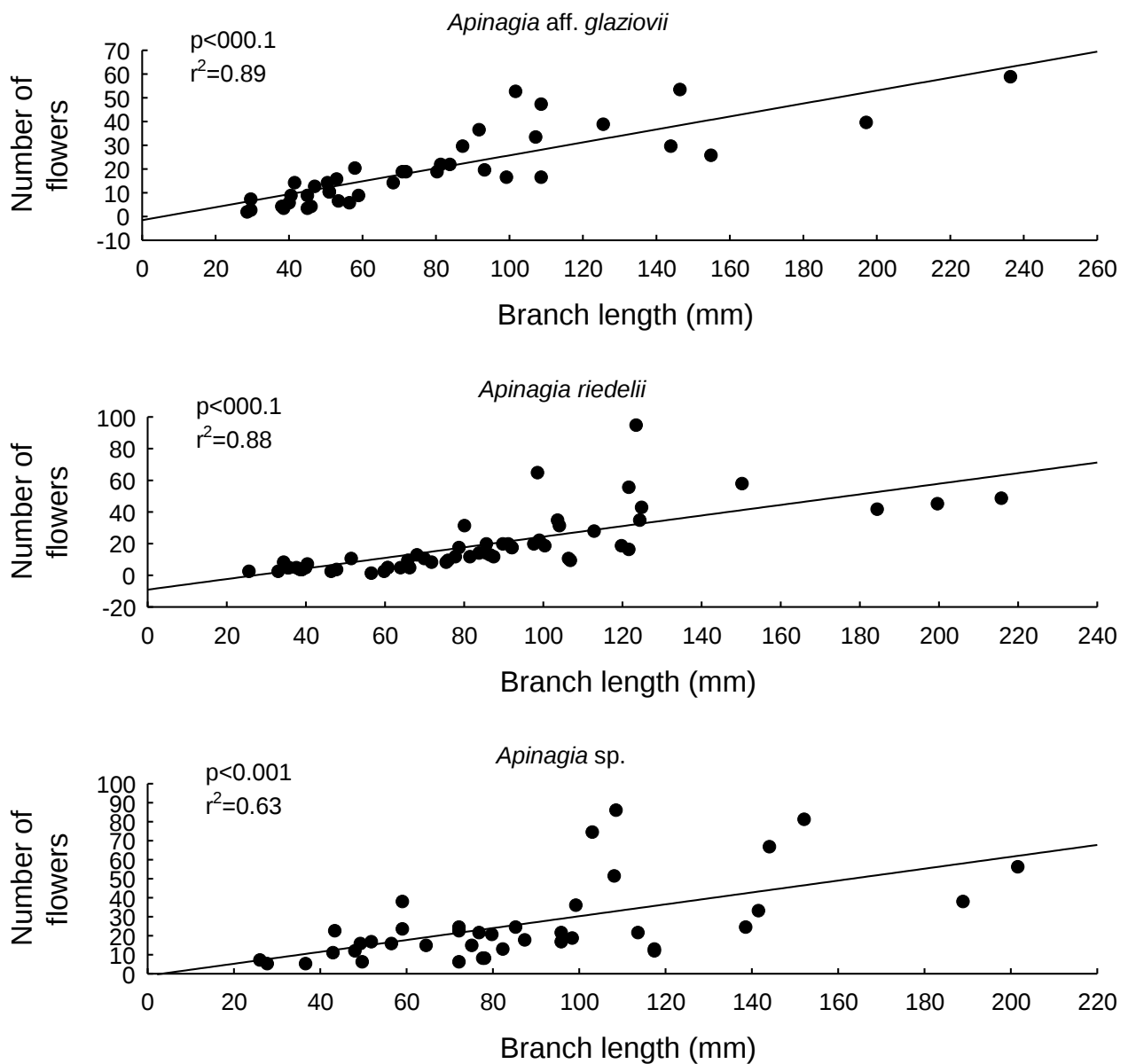


Figura 6. Correlações entre número de flores e o comprimento dos ramos em *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. Correlação positiva e significativa entre número de flores e comprimento dos ramos de *A. aff. glaziovii* ($n = 40$, $r^2 = 0.89$, $t = 12513$, $p = 0.001$). Em *A. riedelii* também foi verificada correlação entre número de flores e comprimento dos ramos ($n = 40$, $r^2 = 0.88$, $t = 14.17$, $p = 0.001$), ocorrendo o mesmo para *Apinagia* sp. ($n = 58$, $r^2 = 0.63$, $t = 5.02$, $p = 0.001$).

Capítulo 3

Estratégias reprodutivas múltiplas (ERM) em angiospermas: evidências
experimentais em Podostemaceae

Manuscrito a ser submetido ao periódico “Oecologia”

Estratégias reprodutivas múltiplas (ERM) em angiospermas: evidências experimentais em Podostemaceae

M. Sobral-Leite, C. Erbar, I. C. Machado

M. Sobral-Leite, I. C. Machado

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901.

e-mail:msobralleite@yahoo.com.br

C. Erbar

Universität Heidelberg, Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Im Neuenheimer Feld 360, 69120 Heidelberg, Germany.

Resumo Quais sistemas reprodutivos e de polinização atuam em alguns grupos de angiospermas, frequentemente, é questão de difícil determinação. A coocorrência de mecanismos como a ambofilia e sistemas mistos de cruzamento em algumas espécies, demonstra que tais estratégias reprodutivas podem ser mais complexas do que conhecemos atualmente. Analisamos experimentalmente o sistema reprodutivo e de polinização em Podostemaceae e identificamos atributos florais chave e o papel dos visitantes florais em sua biologia reprodutiva, testando três hipóteses: (i) em flores emasculadas e isoladas de insetos, mas não isoladas do vento, ocorre formação de sementes; (ii) o sucesso reprodutivo é maior em polinizações cruzada e; (iii) os polinizadores são abelhas poliléticas das subfamílias Apinae e Halictinae. Houve diferença significativa na produção de sementes entre experimentos emasculados e não emasculados ($p < 0.01$), embora nestes últimos tenham formado sementes, possivelmente através de pólen carregado pelo vento. Os insetos visitantes florais foram abelhas poliléticas, insetos alofilicos das subfamílias Apinae e Halictinae. Em suma, corroboramos nossas três hipóteses e concluímos; (1) A produção de sementes em flores emasculadas e isoladas de insetos, reforçam a atuação do vento no sistema de polinização das *Apinagia* estudadas. (2) As espécies de *Apinagia* são polinizadas por insetos alofílicos generalistas. (3) Ausência de diferença no crescimento de tubos polínicos e a prolífera produção de sementes em autopolinização e xenogamia, indicam ausência de mecanismos de autoincompatibilidade nestas espécies. (4) O acompanhamento da produção natural de sementes e sua variação anual sugere oferta sazonal diferencial de vetores, possivelmente influenciando no sucesso reprodutivo. (5) a adoção de ambofilia, aliada a indicações de ECM, sugerem estratégias reprodutivas múltiplas (ERM) adotadas por estas hidrófitas para produção de sementes.

Palavras-chave ambofilia estratégias de cruzamento misto cleistogamia macrófitas aquáticas

Introdução

Quais sistemas reprodutivos e de polinização atuam em alguns grupos de angiospermas, frequentemente, é questão de difícil determinação (Stelleman 1984; Culley et al. 2002; Goodwillie et al. 2005). A coocorrência de mecanismos como a ambofilia e sistemas mistos de cruzamento em algumas espécies, demonstra que tais estratégias reprodutivas podem ser mais complexas do que conhecemos atualmente (Philbrick and Novelo 1998; Goodwillie et al. 2005; Sobral-Leite et al. 2011; submetido). A ambofilia é um sistema de polinização que utiliza tanto insetos quanto vento como vetores de pólen, inclusive concomitantemente (Stelleman 1984; Culley et al. 2002). Este sistema ocorre em várias famílias de espermatófitas como Cycadaceae (Kono and Tobe 2007), Plantaginaceae (Stelleman 1984) e Podostemaceae (Philbrick and Novelo 1998; Sobral-Leite et al. 2011; submetido), sendo, possivelmente, sua abrangência na natureza subestimada (Culley et al. 2002). Em plantas que utilizam estratégias de cruzamento misto (ECM) a produção de frutos e sementes pode ser oriunda de diferentes balanços entre autopolinizações e cruzamentos mediados por vetores bióticos ou abióticos (Atluri et al. 2004; Goodwillie et al. 2005; Gupta and Sehgal 2009). Nestas espécies, caracteres morfológicos, fisiológicos, e fatores ambientais, favorecem autogamia e alogamia em proporções que podem variar interpopulacionalmente e mesmo sob diferentes escalas temporais (Ernst-Schwarzenbach 1956; Goodwillie et al. 2005; Zipperle et al. 2011).

Podostemaceae são eudicotiledôneas aquidulcícolas submersas restritas a ecossistemas de cachoeiras e corredeiras com marcada sazonalidade nos períodos de cheia e vazante (Van Royen 1951; Cook 1990). Estas reófitas são representadas por cerca de 50 gêneros e 300 espécies (Koi et al. 2012) em sua maioria pantropicais, embora os neotrópicos sejam seu centro de diversidade com aproximadamente 21 gêneros e 135 espécies (Philbrick et al. 2010; Tippery et al. 2011). *Apinagia* Tulasne é o gênero neotropical mais rico com 51 táxons, distribuídos ao norte, centro e nordeste da América do Sul (Van Royen 1951; Philbrick et al. 2010).

Embora os estudos sobre a biologia reprodutiva ainda sejam incipientes em Podostemaceae, experimentos de polinização recentes em representantes da família indicam a atuação de mecanismos reprodutivos mais complexos que os anteriormente descritos (see Gupta and Sehgal 2009; Sehgal et al. 2009; Sobral-Leite et al. 2011; submetido). Análises dos atributos florais, aliadas a experimentos em campo, sugerem a utilização por seus representantes de diferentes tipos de estratégias mistas ou sistemas múltiplos para produção de sementes (Gupta and Sehgal 2009; Sobral-Leite et al. 2011; submetido). Em *Indotristicha ramosissima* (Wt.) van Royen (Podostemaceae) a adoção de ECM foi sugerida com base em dados de razão pólen-óvulo e observações de autogamia tardia (Gupta and Sehgal 2009). Produção de sementes foi obtida em *Marathrum rubrum* Novelo & C. Philbrick, a partir de experimento para avaliar a atuação do vento no sistema de polinização (Philbrick and Novelo 1998). Entre os gêneros neotropicais *Apinagia*, *Mourera* e *Rhyncholacis*, há registros de abelhas poliléticas das subfamílias Apinae e Halictinae como visitantes florais (Went 1926; Gessner and Hammer 1962; Grubert 1974; Rutishauser 1997; Tavares 1997; Okada and Kato 2002) e polinizadoras promotoras de alogamia (Sobral-Leite et al. 2011; submetido). Exames dos atributos florais e experimentos em campo sugerem o funcionamento de um sistema ambófilo em *Mourera fluviatilis* Aubl. e *Apinagia richardiana* (Tul.) P. Royen (Sobral-Leite et al. 2011; submetido). Nestas espécies, a alogamia mediada por abelhas provavelmente se sobrepõe a atuação do vento. Tendo sido obtido maior sucesso reprodutivo em polinizações cruzadas em *M. fluviatilis* (Sobral-Leite et al. 2011) e sucesso semelhante entre cruzada e autopolinização em *A. richardiana*, sugerindo a adoção de EMC (Sobral-Leite et al. submetido).

Logo, nossos objetivos foram analisar experimentalmente o sistema de polinização e reprodutivo em Podostemaceae, além de identificar atributos florais chave e verificar o papel dos visitantes florais na biologia reprodutiva. Para tanto, utilizaremos espécies do gênero Neotropical *Apinagia*, testando três hipóteses: (i) em flores emasculadas e isoladas de insetos, mas não isoladas do vento, ocorre formação de sementes; (ii) o sucesso reprodutivo é maior em polinizações cruzada

ou ocorre semelhança entre o sucesso de polinizações cruzadas e autopolinizações e; (iii) os polinizadores são abelhas poliléticas das subfamílias Apinae e Halictinae. Discutimos ainda o papel dos atributos e visitantes florais para o sistema de polinização e reprodução destas espécies, comparando-os com outras Podostemaceae e angiospermas ECM.

Material e métodos

Espécies estudadas

Estudamos as espécies do gênero *Apinagia* Tulasne: *A. aff. glaziovii* (Warm.) P.Royen, *A. riedelii* (Bong.) Tul e *Apinagia* sp. Estes táxons pertencem à seção *Hymenolacis* cujas flores compartilham semelhanças estruturais (Van Royen 1951). Pertencem a seção *Eu-Apinagia* que juntamente a seção *Hymenolacis*, correspondem a mais de 90% do gênero (Van Royen 1951). Estas seções apresentam anteras com deiscência introrsa de pólen, vista como um atributo importante no sistema de polinização de algumas espécies da família (e.g. Philbrick 1984; Philbrick and Novelo 1998; Gupta and Sehgal 2009; Sobral-Leite et al. 2011).

Áreas de estudo

As áreas de estudo estão inseridas no Domínio da Floresta Atlântica Brasileira, setor ao norte do rio São Francisco (Fig. 1B), correspondendo aos subtipos vegetacionais: Floresta Ombrófila Aberta Submontana e Semidecidual Montana (IBGE 1985; Veloso et al. 1991). O clima local é tropical quente e úmido com temperatura média anual em torno de 22-24 °C com quatro a cinco meses de estação seca entre outubro e fevereiro e chuvosa de março a setembro (IBGE, 1985) com precipitação pluviométrica anual média de 1300 mm (ITEP 2012).

Nós conduzimos observações e experimentos *in locu* entre agosto e dezembro de 2007 a 2011 nos rios: Ipojuca, município de Primavera (8°19'S to 35°21'W, 129 m a.s.l.) e Una, riacho Mentirosos, nos municípios de Caruaru, corredeiras do sítio Flecheira (8°23'S to 35°59'W, 500 m a.s.l.) e Agrestina, corredeiras do sítio Capivara (8°29'S to 35°55'W, 400 m a.s.l.). Estes sítios estão localizados no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil (Fig. 1B-C). Nós depositamos os espécimes-testemunho no Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (UFP 41737, 46427 e 55835).

Biologia floral

Primeiro, obtivemos informações básicas sobre aspectos da biologia floral, e.g. início da antese e da receptividade estigmática, horário de liberação de pólen, com o intuito de efetuar os experimentos sobre o sistema reprodutivo e de polinização, posteriormente. Além disso, coletamos dados descritivos, úteis do ponto de vista analítico e funcional para os sistemas de polinização, e.g. instalação de coletores de pólen com glicerina, medidas de densidade de flores por unidade de área.

Em cada localidade, verificamos a densidade de flores das espécies de *Apinagia* montando um transecto de 10m x 1m, dentro do qual sorteamos entre 30 e 60 setores com um quadrado de 0.10 m² a partir do qual as contabilizamos. Registramos para todas as espécies: período de receptividade estigmática, emissão de odores florais, horário de início e duração da antese e disponibilidade de pólen. Verificamos emissão de odor em 30 flores ($n = 30$ indivíduos) por espécie, colocando-as em recipientes de vidro opacos e hermeticamente fechados, abertos após duas horas (Dobson et al. 2005). Testamos a receptividade estigmática no campo com peróxido de hidrogênio (Galen and Plowright 1987) e permanganato de potássio (Robinson, 1924), observando as reações com lentes de mão.

Nós instalamos, próximo as plantas de cada espécie, 10 placas de Petri ($n_{total} = 30$ placas) de 10 cm de diâmetro, com 2 ml de glicerina cada, para saber se no ambiente há transporte de pólen

pelo vento. As placas de Petri foram colocadas no mesmo dia, das 5:00 a.m. as 17:00 p.m., sendo a distância entre uma dada placa e as plantas mais próximas de cerca de 20 cm. Posteriormente, centrifugamos as amostras, preparamos lâminas, correspondendo uma pra cada placa, com gelatina e observamos sob microscópio para averiguar a presença de pólen.

Amostragem dos experimentos do sistema de polinização, reprodutivo e controle

Para os experimentos dos sistemas de polinização, reprodutivo e do controle (natural pollination), em cada localidade instalamos um transecto de 30m x 5m, no qual enumeramos 100 indivíduos e sorteamos entre 30 e 60 por espécie/localidade. No caso do controle, mantivemos as plantas sorteadas expostas a todos os possíveis vetores de pólen e as acompanhamos até a formação dos frutos. Em todos esses experimentos, utilizamos de uma a três flores por indivíduo, por tratamento, descartando os botões florais não utilizados sem danificar os ramos. Após os tratamentos, monitoramos a formação dos frutos semanalmente e os acondicionamos individualmente em tubos de Eppendorf de 2 ml com etanol 70%. As sementes de cada fruto foram uniformemente distribuídas em lâminas histológicas com duas gotas de solução de ácido láctico e glicerol (3:1). Nós contamos as sementes sob estereomicroscópio, usando papel milimetrado e contador manual.

Experimentos do sistema de polinização

Em ordem de testar quais vetores polinizam as espécies de *Apinagia*, vento, insetos ou ambos, conduzimos três experimentos em campo empregando grades de madeira (20 cm x 15 cm x 15 cm) sobre ramos férteis. Para os experimentos de exclusão de insetos com flores íntegras (não emasculadas) e com flores emasculadas, nós cobrimos as grades de madeira com tela de 0.5 mm de abertura, para impedir o acesso dos visitantes florais, mas não do fluxo de vento e passagem de pólen. Esse protocolo nos possibilitou verificar quanto da produção de sementes se deveu ao pólen

trazido pelo vento e quanto a este mais a autopolinização. No experimento de exclusão do vento e insetos (autopolinização espontânea) substituímos a tela por voile com 0.01 mm de abertura, impedindo a passagem de ambos vento (carreando pólen) e insetos. Nós também usamos flores emasculadas e expostas, cujas tépalas removemos, a fim de testar quanto da produção de sementes resultou de pólen interposto pelo vento ou por insetos, mesmo que as flores não tenham as partes atraentes aos insetos (estames e tépalas).

Experimentos do sistema reprodutivo

Analizamos o sistema reprodutivo das espécies de *Apinagia* a partir de duas aproximações: crescimento e penetração de tubos polínicos nos óvulos e produção de sementes. Analizamos o crescimento de tubos polínicos em flores das espécies *in vitro* com o intuito de avaliar a ocorrência de mecanismos de auto-incompatibilidade e tempo de crescimento. Para essa análise acondicionados em campo 60 pistilos por espécie em placas de Petri com ágar a 1% (Sobral-Leite et al. submetido). Em laboratório, efetuamos 30 autopolinizações manuais e 30 polinizações cruzadas manuais ($n = 30$ indivíduos/tratamento/espécies, $n_{total} = 90$). Nós coletamos 10 pistilos por tratamento em três diferentes horários: 24, 48 e 72 h, pós-polinização e os acondicionados em tubos de Eppendorf com AFA (álcool - formalina - ácido acético) para análise posterior. A preparação do material seguiu Martin (1959), e as observações foram feitas sob microscopia de fluorescência. Nós contamos os primeiros 200 óvulos de cada ovário, registrando quanto à presença ou não de tubos polínicos em cada óvulo.

Para a produção de sementes conduzimos em campo experimentos de autopolinização manual, polinização cruzada e verificação de agamospermia (Radford et al. 1974). Além disso, calculamos o índice de auto-incompatibilidade (ISI) de acordo com Zapata and Arroyo (1978) e o índice de polinização cruzada (IPC) conforme Cruden (1977). Autopolinização manual consistiu no isolamento de ramos férteis com sacos de voile, sendo os botões em pré-ântese autopolinizados no

dia seguinte ao início da ântese. Nós colocamos manualmente pólen de uma flor no estigma da mesma flor, friccionando as anteras deiscuentes nos estigmas com pinças. Em seguida, para a polinização cruzada manual cobrimos os ramos férteis, emasculamos os botões florais e os polinizamos no dia seguinte. Nesse experimento, flores doadoras de pólen foram coletadas em agrupamentos de plantas sobre rochas diferentes dos agrupamentos receptores, na proporção de 1:1. Para testar a existência de agamospermia, emasculamos botões em pré-ântese ($n = 30$) e isolamos os ramos com sacos de voile.

Observação dos visitantes florais

Para observação e frequência de visitantes florais, assumimos cada agrupamento de *Apinagia* sobre uma rocha ou mancha isolada como indivíduo, em função da dificuldade em determinar plantas individuais nestas espécies. Nós observamos visitas em três indivíduos focais por espécie. Durante as sessões de observação, registramos: o tipo, o período, a duração e o comportamento de visita dos visitantes florais, bem como suas interações com indivíduos da mesma ou de outras espécies visitantes. Estudamos o comportamento dos visitantes florais *in situ* e com fotografias durante período diurno, das 5:00 a.m. as 17:00 p.m. Com auxílio de rede entomológica capturamos 10 espécimes de cada espécie visitante e posteriormente montamos à seco para identificação e inspeção dos locais de deposição de pólen sob estereomicroscópio. Os espécimes-testemunho foram depositados na coleção entomológica do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco.

Análises estatísticas

Para testar nossas hipóteses (i) e (ii), assumimos sucesso reprodutivo como número de óvulos com tubos polínicos penetrados e sementes formadas. Nós utilizamos a ANOVA one-way para verificar

diferenças no seed-set entre os experimentos do sistema reprodutivo e de polinização. Antes disso, testamos todos os valores para a presença de outliers com o teste de Grubbs para outliers (Burke 2001). Nós utilizamos o teste T ou o teste de Mann-Whitney, quando os dados foram paramétricos ou não, para analisar diferenças no número de óvulos penetrados por tubos polínicos entre os tratamentos (Zar 1996). Utilizamos o ambiente R Development Core Team (2012) para as análises estatísticas.

Resultados

Biologia floral

O desenvolvimento dos botões e a ântese transcorreram de maneira semelhante entre as três espécies de *Apinagia*. A ântese iniciou entre 5:00 e 6:00 a.m. e, durante este período, já observamos reação estigmática ao H_2O_2 e ao Permanganato de Potássio. Botões em pré-ântese e flores logo após a abertura apresentaram anteras adjacentes, tornando-se perpendiculares aos filetes durante a ântese (Fig. 2A). A deiscência das anteras e liberação do pólen ocorreu cerca de duas a três horas após iniciada a ântese. A densidade das flores por 0.10 m^2 foi de: 57.6 ± 29 (22–140, $n = 60$) para *A. aff. glaziovii*; 64 ± 32 (11–133, $n = 30$) em *A. riedelii* e 59.3 ± 29 (14–154, $n = 47$) em *Apinagia* sp. Na maioria das flores, houve autopolinização espontânea com o alongamento do filete que permitiu que anteras ultrapassassem a base dos estigmas (Fig. 2e₂). Flores de filetes curtos “brevistaminadas” (Fig. 2c-d₁), virtualmente incapazes de atingir os estigmas (Fig. 2e₁), ocorreram em menor frequência. Entre 15 e 25 dias após a senescência floral, a deiscência longitudinal das cápsulas se iniciou, e as sementes foram liberadas.

Observação dos visitantes florais

As observações de visitantes florais totalizaram 72 h (24 h por espécie) e registramos 17 morfoespécies pertencentes a quatro ordens; Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Odonata (Tabela 1, Fig. 3). A frequência de visitas diferiu (Fig. 4), sendo *T. spinipes* o visitante mais frequente em *A. aff. glaziovii* ($\chi^2 = 365.257$, $df = 5$, $p < 0.001$), Diptera sp. ($\chi^2 = 123.58$, $df = 8$, $p < 0.001$) em *A. riedelii*, enquanto *Tabanus* sp. ($\chi^2 = 41.81$, $df = 7$, $p < 0.001$) teve predominância em *A. sp.* O período de maior frequência de visitas foi o início da manhã (Fig. 4), embora notamos que as *M. domestica*, *Tabanus* spp. e *Telebasis* spp. permaneciam parte do tempo imóveis sobre as flores. Observamos que *T. spinipes* e as espécies de Coccinellidae e Erotylidae se deslocavam ativamente sobre as flores, inclusive contatando abdome e pernas dianteiras, impregnadas de pólen, com os estigmas das flores. Em ocasião do pouso e durante interações agonísticas, *Telebasis* spp. provocavam estímulos mecânicos nas flores, causando deslocamento secundário de grãos de pólen até flores próximas.

Experimentos do sistema de polinização

Verificamos elevada formação de frutos (>76%) em todos os experimentos sobre o sistema de polinização nas espécies de *Apinagia* estudadas (Tabela 2), sem diferença entre os tratamentos. Houve diferença na produção de sementes apenas entre os experimentos emasculados (exclusão de insetos e emasculação exposta) e os demais tratamentos, incluindo o controle (*A. aff. glaziovii* $H = 323$, $df = 3$, $p < 0.001$; *A. riedelii* $H = 246$, $df = 3$, $p < 0.001$; *A. sp.* $H = 356.7$, $df = 3$, $p < 0.001$).

Experimentos do sistema reprodutivo

Observamos crescimento de tubos polínicos nos pistilos cruzados e autopolinizados a partir de 24 h após a polinização (Fig. 5), embora não tenha havido diferença estatística no número de óvulos entre os tratamentos (24 h; $W = 53$, $p = 0.8306$. 48 h; $W = 53.5$, $p = 0.8067$). Nos tratamentos do

sistema reprodutivo e no controle, as espécies de *Apinagia* apresentaram elevada produção de frutos, acima de 60%, não diferindo significativamente. Frutos agamospérmicos se desenvolveram, porém estas cápsulas não formaram sementes (Tabela 3), uma vez que todos os óvulos abortaram. No número de sementes produzidas, não encontramos diferença significativa entre os tratamentos, nem entre eles e o controle. Houve também diferença significativa na formação natural de sementes entre os anos de 2007 a 2012 em *A. aff. glaziovii* ($F = 15.89$, g.l. = 5, $p < 0.001$) e *A. riedelii* ($F = 22.25$, g.l. = 5, $p < 0.001$) e ($H = 281.8$, g.l. = 3, $p < 0.001$) de 2008 a 2011 para *A. sp.* (Fig. 6).

Discussão

Nossos resultados de produção de sementes nos experimentos emasculados, sem diferença significativa (Tabela 1), aliada a ausência de apomixia (Tabela 2), sugerem a atuação do vento no sucesso reprodutivo das *Apinagia* estudadas. A elevada densidade das flores que encontramos, juntamente aos atributos palinológicos; grãos esferoidais, dimensões entre 13-16 μm e numerosos (Passarelli et al. 2002; Sobral-Leite et al. dados não publicados), suportam essa hipótese. Embora contrastantes ao esperado para Podostemaceae neotropicais dos gêneros *Apinagia*, *Mourera* e *Rhyncholacis*, gêneros atribuídos como melitófilos (Gessner and Hammer 1962; Grubert 1974; Rutishauser 1997; Rutishauser and Grubert 2000) estudos recentes suportam a ocorrência de sistemas de polinização ecologicamente flexíveis nessa família (Philbrick and Novelo 1998; Gupta and Sehgal 2009; Sobral-Leite et al. 2011, submetido). Em flores emasculadas e expostas de *Marathrum rubrum* Novelo & Philbrick, C.T., Philbrick and Novelo (1998) obtiveram produção de sementes entre 3.7% (0–31.5%) e 10.7% (0–57.2%), indicando fluxo aéreo de pólen inter-flores. Sobral-Leite et al. (submetido) encontraram razões estigma-pistilo em *Apinagia richardiana* entre 35-50%. Posteriormente, experimentos emasculados e isolados de insetos feitos nesta espécie, produziram sementes em proporções bem semelhantes as encontradas em *Marathrum rubrum*.

Caracteres florais análogos, e.g. elevada razão estigma-pistilo, ampla superfície receptiva para captura de grãos de pólen, são apresentados por angiospermas anemófilas típicas como Poaceae e Cyperaceae (Whitehead 1969; Faegri and Pijl 1979; Regal 1982; Culley et al. 2002).

Embora Diptera sp.2 e *Tabanus* sp. tenham sido os visitantes mais freqüentes (Fig. 4B-C), as observações de comportamento indicam pouca atuação destes insetos como polinizadores. O pólen encontrado externotribicamente nos Coleoptera das famílias Coccinellidae e Erotylidae, além de em *Trigona spinipes*, aliado ao comportamento de forrageio são indícios mais consistentes de seus papéis como polinizadores. Hymenopteras são frequentemente citados como visitantes florais (Gessner and Hammer 1962; Grubert 1974; Rutishauser 1997; Rutishauser and Grubert 2000), e mesmo polinizadores efetivos em Podostemaceae (Sobral-Leite et al. 2011, submetido), mas o registro de Coleoptera é raro (Hauman 1948; Léonard 1993). Em *Leiothylax quangensis* Warming (Podostemaceae), das quedas Tshopo, no Zaire, besouros *Torridincola rhodesica* Steffan (Torridincolidae, Coleoptera) foram considerados polinizadores efetivos (Léonard 1993). Embora estes registros sejam interessantes, não há indícios que demonstrem a necessidade de vetores bióticos especializados em Podostemaceae. Diferentemente de outras famílias de angiospermas aquáticas como Alismataceae (Vieira and Lima 1997) e Limnocharitaceae (Carvalho and Schlindwein 2011), Podostemaceae não apresenta quaisquer barreiras de acesso ao pólen aos visitantes. A ampla gama de insetos de partes bucais curtas e pouco especializados que encontramos (Fig. 3), alofílicos (*sensu* Faegri and Pijl 1979), corrobora essa afirmação. As diferenças na produção de sementes no controle entre os anos (Fig. 6), por sua vez, sugere que os vetores de pólen, bióticos ou abióticos tenham constâncias ou disponibilidade variável no ambiente. Em casos extremos de autogamia, como em plantas cleistogâmicas, a produção de sementes, em geral, apresenta quantidades estáveis ao longo do tempo (Faegri and Pijl 1979).

Embora tenhamos verificado autofertilização, a ausência de diferença entre os tratamentos do sistema reprodutivo e os morfos florais “brevistaminados” impossibilitados de se autofecundar (Fig. 2e₂), sugerem a adoção de ECM por estas hidrófitas. Semelhantemente aos resultados obtidos

aqui, Sobral-Leite et al. (submetido), encontraram evidências da adoção de ECM em *A. richardiana*. Em *Mourera fluviatilis* do NE do Brasil, Sobral-Leite et al. (2011) encontraram morfos florais de estames curtos, juntamente a maior sucesso reprodutivo em xenogamia. Por sua vez, Tavares (1997) comenta a existência intraespecífica de formas florais de estames curtos e longos, principalmente entre *Apinagia* e *Rhyncholacis* da Amazônia, sugerindo utilização de ECM mais ampla em Podostemaceae. Autocompatibilidade e autogamia sempre foram atribuídas como predominantes em macrófitas aquáticas (Les, 1988; Philbrick and Les 1996), incluindo Podostemaceae (Mukkada 1969; Khosla et al. 2000, 2001; Gupta and Sehgal 2009; Sehgal et al. 2009). ECMs são amplamente registradas entre angiospermas (Goodwillie et al. 2005; Zipperle et al. 2011), principalmente em formas terrestres, a exemplo de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) (Meléndez-Ramírez et al. 2004). Em hidrófitas, os poucos registros de ECMs parecem estar relacionados a monoícia e a sistemas cleisto-chasmógamos (Ernst-Schwarzenbach 1956; Sculthorpe 1967; Barrett et al. 1993; Zipperle et al. 2011). Para a monóica marinha *Zostera noltii* Hornem (Zosteraceae), a análise multilocus revelou que 20 a 30% das sementes eram oriundas de cruzamentos, enquanto que a geitonogamia foi a forma mais freqüente de autopolinização (Zipperle et al. 2011). Espécimes cultivados de *Ottelia ovalifolia* (R.Br.) Rich. (Hydrocharitaceae), produtores regulares de flores aéreas e melitófilas no verão, durante a primavera e o outono produziam flores cleistógamas submersas (Ernst-Schwarzenbach 1956; Sculthorpe 1967). Desse modo, nosso registro de ECM em espécies de *Apinagia* representa um dos poucos reportados para hidrófitas hermafroditas de flores chasmógamas a partir de evidências experimentais.

Estrategistas de cruzamento misto se beneficiam da garantia reprodutiva da autopolinização e da manutenção de níveis de variabilidade genética em oportunidades eventuais de cruzamento (Goodwillie et al. 2005). Para estas espécies plantas, ECMs podem ser interpretadas como respostas adaptativas a ambientes cuja oferta de vetores bióticos seja variável (Kalisz and Vogler 2003; Goodwillie et al. 2005), como ocorre nos ambientes aquáticos (Les 1988; Philbrick and Les 1996). Entretanto, entre as lacunas de conhecimento sobre os mecanismos reprodutivos em plantas

aquáticas estão as informações sobre os sistemas de cruzamentos (Barrett et al. 1993). Em suma, corroboramos nossas três hipóteses e concluímos; (1) A produção de sementes em flores emasculadas e isoladas de insetos, reforçam a atuação do vento no sistema de polinização das *Apinagia* estudadas. (2) As espécies de *Apinagia* são polinizadas por insetos alofílicos generalistas. (3) Ausência de diferença no crescimento de tubos polínicos e a prolífera produção de sementes em autopolinização e xenogamia, indicam ausência de mecanismos de autoincompatibilidade nestas espécies. (4) O acompanhamento da produção natural de sementes e sua variação anual sugere oferta sazonal diferencial de vetores, possivelmente influenciando no sucesso reprodutivo. (5) a adoção de ambofilia, aliada a indicações de ECM, sugerem a estratégias reprodutivas múltiplas (ERM) adotadas por estas hidrófitas para produção de sementes.

Agradecimentos

Somos gratos a M.Sc. P. Gomes (UNESP), R. Carvalho (UFPE) e F. Silva (UFRPE) pelo auxílio na confecção das pranchas e a Dra A.S. Tavares (UFSC) pela identificação das espécies de *Apinagia*. Agradecemos ainda a M.Sc. P. Gomes (UNESP) pelo auxílio com as análises estatísticas e ao Dr. M. Guerra (UFPE) pela utilização do microscópio de fluorescência. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao qual somos gratos pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor (CNPq, processo 140933/2009-3) e de produtividade em pesquisa a última autora (CNPq, processo 305068/2008-3).

Referências

Atluri JB, Ramana SPV, Reddi CS (2004) Explosive pollen release, wind-pollination and mixed mating in the tropical tree *Shorea robusta* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae). Curr. Sci. 86:1416–1419

- Barrett, SCH, Eckert DG, Husband BC (1993) Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany* 44:105–145
- Burke S (2001) Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. *LC GC Europe Online Supplement* 5:19–24
- Cook CDK (1990) *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands
- Carvalho AT, Schlindwein C (2011) Obligate association of an oligolectic bee and a seasonal aquatic herb in semi-arid north-eastern Brazil. *Biol. J. Linn. Soc.* 102(2):355–368
- Cruden RW (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32–46
- Culley TM, Weller SG, Sakai AK (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* 17:361–369
- Dobson HEM, Raguso RA, Knudsen JT, Ayasse M (2005) Scent as an attractant. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC (Eds.), *Practical Pollination Biology*. Enviroquest Ltda Press, CA, pp. 197–230
- Ernst-Schwarzenbach M (1956) Kleistogamie und Antherenbau in der Hydrocharitaceen – Gattung *Ottelia*. *Phytomorphology* 6:296–311
- Faegri K, Pijl van Der (1979) *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford, UK
- Galen C, Plowright RC (1987) Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Can. J. Bot.* 65:107–111
- Gessner F, Hammer L (1962) Ökologisch-physiologisch Untersuchungen an den Podostemaceen des Caroni. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* 47:497–541
- Goodwillie C, Kalisz S, Eckert, CG (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:47–79
- Grubert M (1974) Podostemaceen-Studien. Teil 1. Zur Ökologie einiger venezolanischer Podostemaceen. *Beitr. Biol. Pflanz.* 50:321–391

- Gupta CK, Sehgal A (2009) Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae; Tristichioideae). *Aquat. Bot.* 91:51–56.
- Haumann L (1948) Podostemaceae. Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi. Spermatophytes. Vol.I: 219–226. Brussels: I.N.E.A.C.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1985) Atlas Nacional do Brasil: região Nordeste. IBGE, Rio de Janeiro, BR
- ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco (2012) Precipitation dates. Available at <http://www.itep.br/LAMEPE.asp> (accessed July 2009)
- Kalisz S, Vogler DW (2003) Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84:2928–2942
- Khosla, Shivanna KR, Mohan Ram HY (2000) Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* 67:143–154
- Khosla C, Shivanna KR, Mohan Ram HY (2001) Cleistogamy in *Griffithella hookeriana* (Podostemaceae). *S. Afr. J. Bot.* 67:320–324
- Gupta KC, Sehgal A (2009) Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae; Tristichioideae). *Aquat. Bot.* 91:51–56
- Koi S, Kita Y, Hirayama Y, Rutishauser R, Huber KA, Kato M (2012) Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Bot. J. Linn. Soc.* 169:461–492
- Kono M, Tobe H (2007) Is *Cycas revoluta* (Cycadaceae) wind-or insect-pollinated? *Am. J. Bot.* 94:847–855
- Les DH (1988) Breeding systems, population structure, and evolution in hydrophilous Angiosperms. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75:819–835
- Léonard J (1993) Etude phytosociologique des chutes de la Tshopo (Kisangani: Zaire). *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* 62:283–347

- Martin FW (1959) Standing and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34:125–128
- Meléndez-Ramírez V, Parra-Tabla V, Kevan PG, Ramírez-Morillo I, Harries H, Fernández-Barrera M, Zizumbo-Villareal D (2004) Mixed mating strategies and pollination by insects and wind in coconut palm (*Cocos nucifera* L. (Arecaceae): importance in production and selection. *Agric. Forest Entomol.* 6:155–163
- Mukkada AJ (1969) Some aspects of the morphology, embryology and biology of *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. *New Phytol.* 68:1145–1158
- Okada H, Kato M (2002) Pollination systems inferred from pollen-ovule ratios of some species of Podostemaceae. *Acta Phytotax. Geobot.* 53:51–61
- Passarelli L, Girarde MSB, Tur NM (2002) Palynology of South América Podostemaceae. I. *Apinagia* Tul. *Grana* 41:10–15
- Philbrick CT (1984) Aspects of floral biology, breeding system, seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Syst. Bot.* 9:166–174
- Philbrick CT, Les DH (1996) Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience* 46:813–826
- Philbrick CT, Novelo AR (1998) Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* 62:199–206
- Philbrick CT, Bove CP, Stevens HI (2010) Endemism in Neotropical Podostemaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 97:425–456
- R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Radford AE, Dickinson WC, Massey JR, Bell CR (1974) *Vascular Plant Systematics*. Harper & Row Publishers, New York, USA
- Regal P (1982) Pollination by wind and animals: ecological and geographic patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:497–524

- Robinson I (1924) Die Färbungsreaktion der Narbe, Stigmatochromie, als morpho-biologische Blütenuntersuchungsmethode. Sitzungsberichte Akad. Wiss. Wien, Math., Abt. 133:180–213
- Rutishauser R (1997) Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquat. Bot.* 57:29–70
- Rutishauser R, Grubert M (2000) Developmental morphology of *Apinagia multibranchiata* (Podostemaceae) from the Venezuelan Guyanas. *Bot. J. Linn. Soc.* 132:299–323
- Sehgal A, Sethi M, Mohan Ram HY (2009) Development of the floral shoot and pre-anthesis cleistogamy in *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 159:222–236
- Sculthorpe MAO (1967) *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. Edward Arnold, London
- Sobral-Leite M, Siqueira Filho JA, Erbar C, Machado IC (2011) Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family? *Aquat. Bot.* 95:77–87
- Sobral-Leite M, Siqueira Filho JA, Erbar C, Machado IC (submetido) Anthecology and breeding system of *Apinagia richardiana* (Tul.) van Royen (Podostemaceae): mixed mating strategies in a Neotropical riverweed. *Annals of Botany* xxx:xxx–xxx
- Stelleman P (1984) Reflections on the transition from wind pollination to ambophily. *Acta Bot. Neerl.* 33:497–508
- Tavares AS (1997) Podostemaceae de alguns rios de água preta do Estado do Amazonas. Ph.D. Thesis, Universidade do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, BR
- Tippery NP, Philbrick CT, Bove CP, Les DH (2011) Systematics and phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Syst. Bot.* 36:105–118
- Went FAFC (1926) Untersuchungen über die Podostemaceen III. *Verhandl. Konink. Akad. Wetensch. Amsterdam* 25:1–59
- Whitehead D (1969) Wind pollination in the angiosperms: evolutionary and environmental considerations. *Evolution* 23:28–35

- Van Royen P (1951) The Podostemaceae of the new world. Part I. Meded. Bot. Mus. Herb. Rijks Univ. Utrecht 107:1–150
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro
- Vieira MF, Lima NA de S (1997) Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). Aquat. Bot. 58(2):89–98
- Zapata TR, Arroyo, MTK (1978) Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. Biotropica 10(3):221–230
- Zar JH (1996) Biostatistical Analysis, Third edition. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA
- Zipperle AM, Coyer JA, Reise K, Stam WT, Olsen JL (2011) An evaluation of small-scale genetic diversity and the mating system in *Zostera noltii* on an intertidal sandflat in the Wadden Sea. Ann. Bot. 107:127–133

Tabela 1 – Ordens, famílias e espécies de visitantes florais de *A. aff. glaziovii*, *A. riedelli* e *Apinagia* sp.

Ordem/família/espécie	<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i>	<i>Apinagia</i> <i>riedelli</i>	<i>Apinagia</i> sp.
Coleoptera			
Coccinellidae	•	•	•
Erotylidae			•
Coleoptera 1		•	
Diptera			
Muscidae			
<i>Musca domestica</i> LINNAEUS		•	•
Tabanidae			
<i>Tabanus</i> sp.	•	•	•
Diptera 1	•		•
Díptera 2		•	
Hymenoptera			
Apidae			
<i>Apis mellifera</i> (Lepeletier, 1836)		•	•
<i>Augochlora</i> sp.		•	•
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	•		•
Odonata			
Coenagrionidae			
<i>Telebasis</i> sp. 1	•	•	
<i>Telebasis</i> sp. 2	•	•	

Tabela 2. Produção de frutos e sementes (% , medidas de tendência central e amplitude) dos experimentos do sistema de polinização, controle e análises estatísticas dos dados obtidos (Kruskal-Wallis test, com $\alpha = 5\%$) de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. Houve diferença na produção de sementes entre os experimentos emasculados e os não emasculados e o controle para todas as espécies; *A. aff. glaziovii* $H = 323$, $df = 3$, $p < 0.001$; *A. riedelii* $H = 246$, $df = 3$, $p < 0.001$; *Apinagia* sp. $H = 356.7$, $df = 3$, $p < 0.001$.

Species/treatment	<i>n</i>	Fl/Fr	% Fr/seed-set *	Seed-set ($\bar{x}$) (Q_1 – Q_3)/R
<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i>				
Insect exclusion (emasculated)	51	69/57	82.6/35.2	126(53–203) ^a /4–375
Insect exclusion (not emasculated)	29	33/28	84.8/75.5	285.5(261.7–331) ^b /135–470
Insect and wind (spontaneous self-pollination)	30	30/28	93.3/75.7	322(268.2–362.2) ^b /28–428
Exposed emasculation	30	37/32	86.5/8.9	17(9.7–52.7) ^a /3–120
Control [†] (natural pollination)	32	38/30	78.9/90.3	351(299–412) ^b /150–492
<i>Apinagia riedelii</i>				
Insect exclusion (emasculated)	40	43/35	81.4/33.8	119(69.5–197) ^a /19–279
Insect exclusion (not emasculated)	31	35/29	82.8/77.3	277(241–402) ^b /5–453
Insect and wind (spontaneous self-pollination)	32	40/30	75/63.80	256(202.5–335.7) ^b /9–419
Exposed emasculation	30	30/30	100/27.8	97(33.5–147) ^a /8–330
Control [†] (natural pollination)	32	36/30	83.3/90.8	356.5(326.5–400.5) ^b /287–438
<i>Apinagia</i> sp.				
Insect exclusion (emasculated)	40	41/34	82.9/23.1	84.5(51–157) ^a /7–273
Insect exclusion (not emasculated)	50	50/50	100/47.5	205(190.5–232) ^b /55–340
Insect and wind (spontaneous self-pollination)	57	63/61	96.8/51.5	238(186–269) ^b /30–374
Exposed emasculation	32	39/30	76.9/6.4	16.5(9.5–30.5) ^a /2–147
Control [†] (natural pollination)	32	43/35	81.4/54.9	249(208–307) ^b /23–392

*Based on mean of ovules: *A. riedelii* (396), *A. aff. glaziovii* (388), and *A. sp.* (441).[†]2011.

Tabela 3. Produção de frutos e sementes (%), medidas de tendência central e amplitude) dos experimentos do sistema reprodutivo, controle e análises estatísticas dos dados obtidos (ANOVA one-way test, com $\alpha = 5\%$) de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. Diferentes letras mostram diferença significativa.

Species/treatment	<i>n</i>	Fl/Fr	% Fr/seed-set *	Seed-set ($\bar{x}$) (Q ₁ –Q ₃)/R
<i>Apinagia</i> aff. <i>glaziovii</i>				
Manual self-pollination	64	64/60	93.7/59.88	243.5(162.25–293) ^a /65–414
Manual cross-pollination	60	60/52	86.6/57.18	219.5(133–311.7) ^a /62–402
Agamospermy	32	35/21	60/0	0
Control [†] (natural pollination)	30	33/30	90.9/90.34	351(299–412) ^a /150–492
<i>Apinagia riedelii</i>				
Manual self-pollination	36	36/36	100/73.46	319(207–376.5) ^a /8–449
Manual cross-pollination	34	46/42	91.3/74.05	321(229.25–356.75) ^a /68–478
Agamospermy	30	34/34	100/0	0
Control [†] (natural pollination)	32	36/30	83.3/90.80	356.5(326.5–400.5) ^a /287–438
<i>Apinagia</i> sp.				
Manual self-pollination	62	65/58	89.2/47.4	226(110.25–286.75) ^a /12–396
Manual cross-pollination	30	39/35	89.7/43.8	193(45.5–301.5) ^a /21–481
Agamospermy	43	45/32	71.1/0	0
Control [†] (natural pollination)	42	45/35	77.7/54.9	219(133–311.7) ^a /62–402

*Based on mean of ovules: *A. riedelii* (396), *A. aff. glaziovii* (388), and *A. sp.* (441).[†]2011.

Fig. 1. **A.** Distribuição de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp., localidades na região Sudeste de acordo com Van Royen (1951) e no Nordeste do Brasil. **B.** Nordeste do Brasil; **C.** Áreas de estudo de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. no estado de Pernambuco.

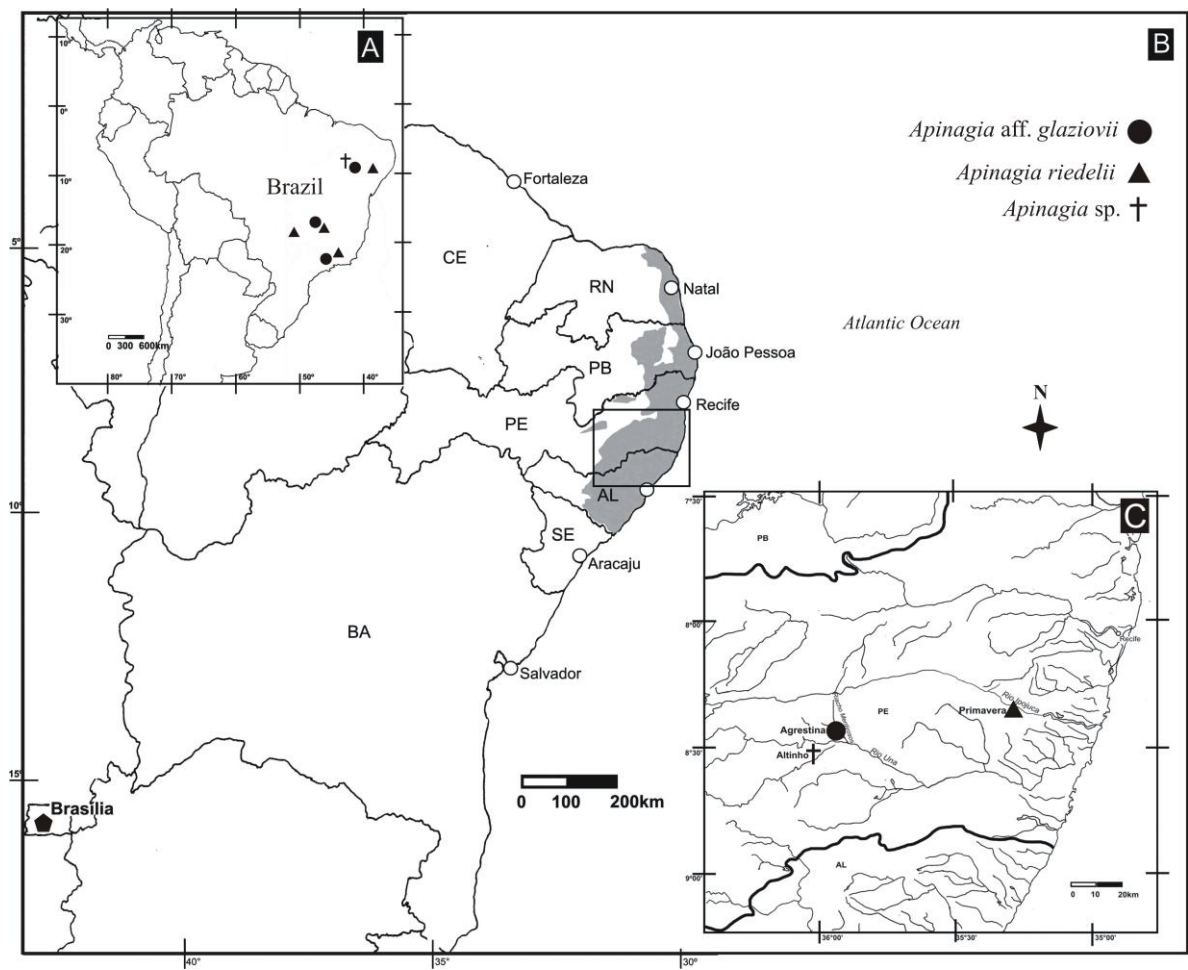


Fig. 2. Diagramas de seqüência de ântese de (A) *Apinagia* aff. *glaziovii*, (B) *A. riedelii* e (C) *Apinagia* sp. (a.) Botão floral envolvido pela espatela (sp.). (b.) Após a ruptura da espatela em função do alongamento do pedicelo (p). (c₁.) Flor iniciando a ântese, evidenciando afastamento entre lobos do estigma. Neste morfo floral, os filetes (f) não alongam. (c₂.) Flor iniciando a ântese, evidenciando afastamento entre lobos do estigma e início do alongamento do filete (f). (d₁.) Flor com estigmas estendidos. (d₂.) Flor com estigmas estendidos. (e₁.) morfo floral de filetes curtos, cujas anteras não atingem o nível dos estigmas. (e₂.) morfo floral de filetes longos, cujas anteras tocam os estigmas, possibilitando autopolinização em final de ântese. (f.) Cápsula recém-formada. (g.) Cápsula deiscente com valvas persistentes. Barra de escala = 1 mm.

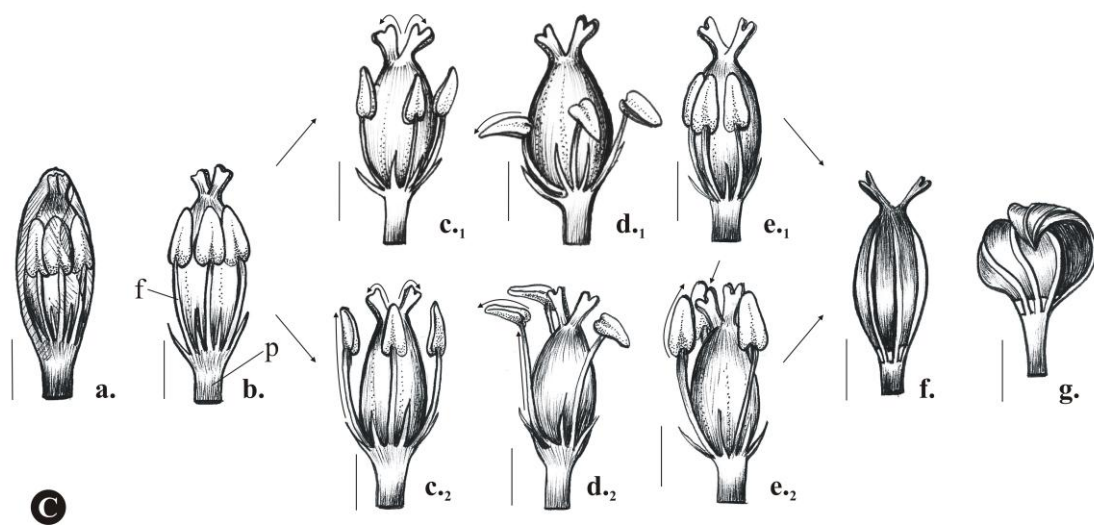
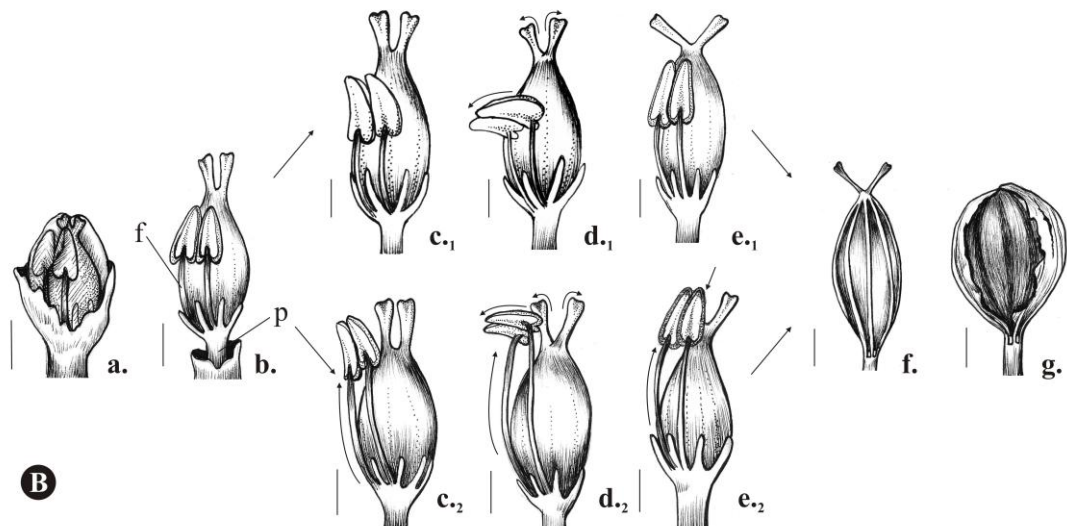
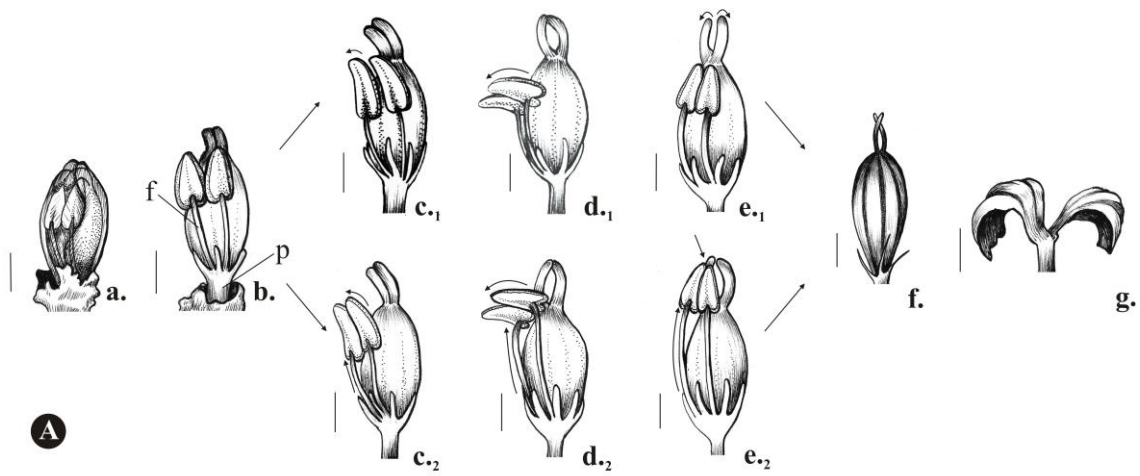


Fig. 3. Visitantes florais de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. (A) *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Hymenoptera: Apidae), (B) *Coccinellidae* sp.1 (Coleoptera), (C) *Musca domestica* LINNAEUS (Diptera: Muscidae), (D) *Tabanus* sp.1 (Diptera: Tabanidae), (E) *Diptera* sp.1 e (F) *Telebasis* sp.1 (Odonata: Coenagrionidae). Barra de escala = 20 mm

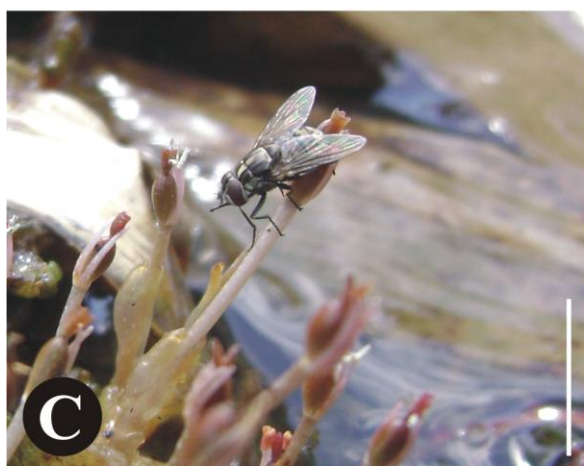


Figura 4. Disponibilidade polínica (A) e frequências dos visitantes florais de (B) *Apinagia* aff. *glaziovii*, (C) *A. riedelii* e (D) *Apinagia* sp. Houve diferença significativa na frequência de visitas, sendo *T. spinipes* mais freqüente em *A. aff. glaziovii* ($\chi^2 = 365.257$, $df = 5$, $p < 0.001$), *Diptera* sp. ($\chi^2 = 123.58$, $df = 8$, $p < 0.001$) em *A. riedelii* e *Tabanus* sp. ($\chi^2 = 41.81$, $df = 7$, $p < 0.001$) em *Apinagia* sp.

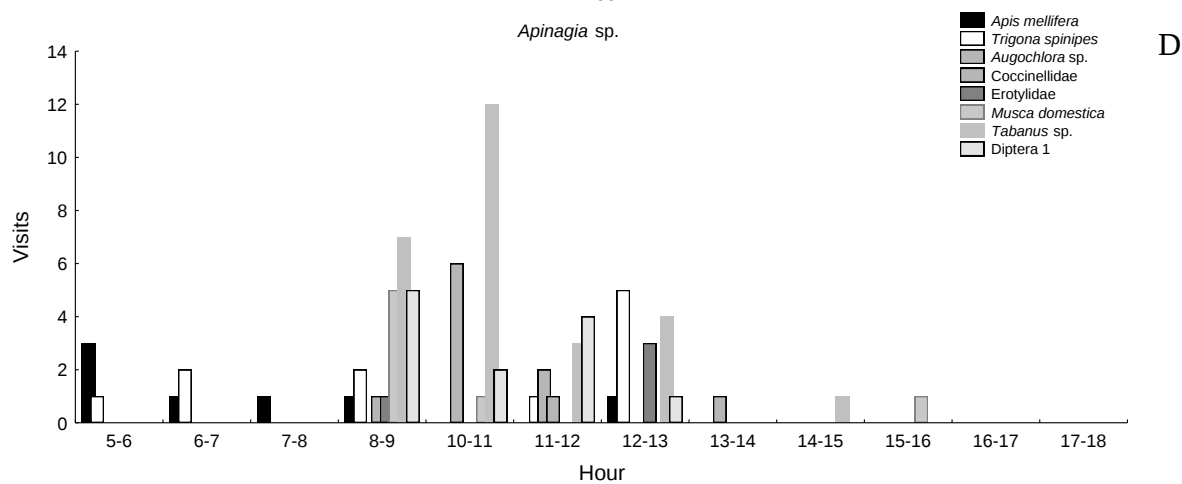
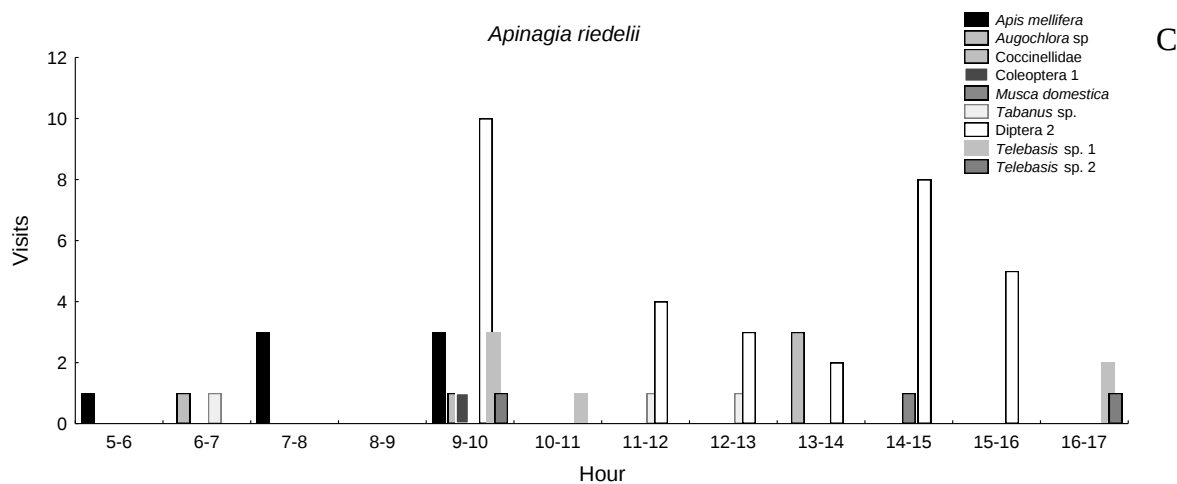
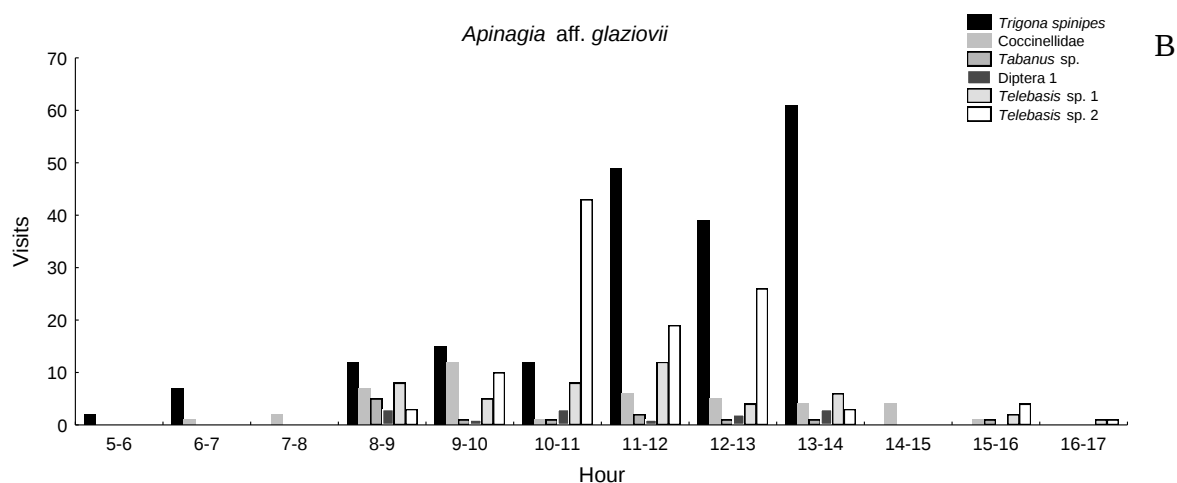
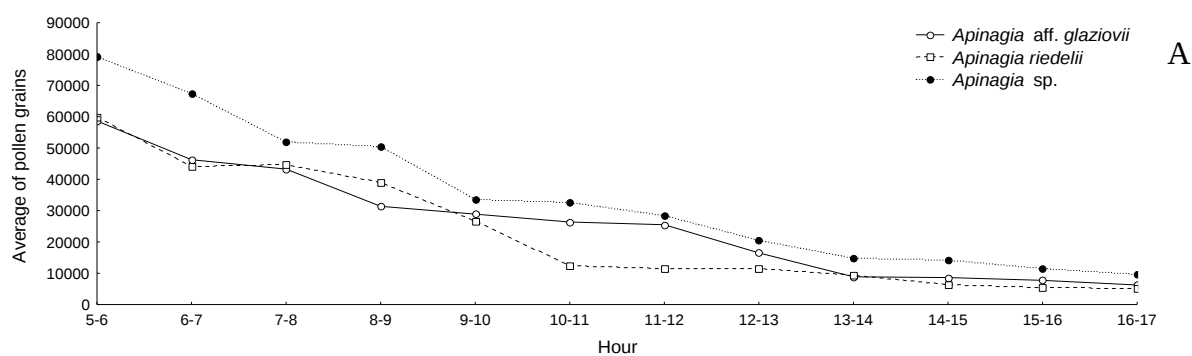
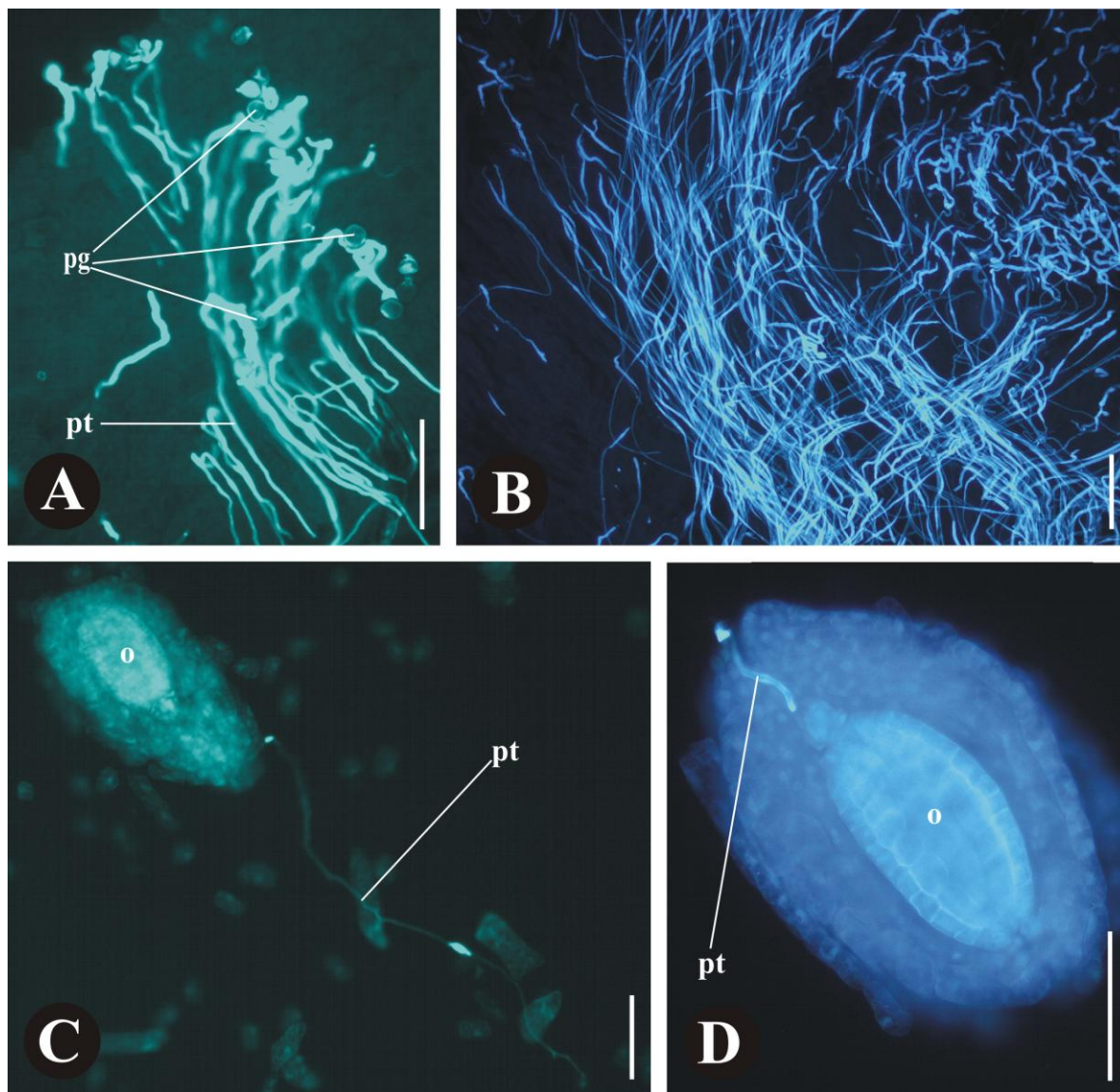


Fig. 5. Grãos de pólen e tubos polínicos de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. em microscopia de fluorescência. (A) Grãos de pólen (pg) e tubos polínicos (pt) no estigma 24 h depois da autopolinização manual em *A. aff. glaziovii* (magnificação 20 x). (B) Tubos polínicos resultantes de autopolinização manual 24 h, ao longo do estigma (magnificação 20 x) em *Apinagia* sp. Barra de escala = 100 µm. (C) Tubo polínico (pt) resultante de polinização cruzada manual 24 h, penetrando o óvulo (o) em *A. glaziovi* (magnificação 10 x). (D) Tubo polínico (pt), resultante de autopolinização manual 72 h, penetrando o óvulo (o) em *A. riedelii* (magnificação 20 x).



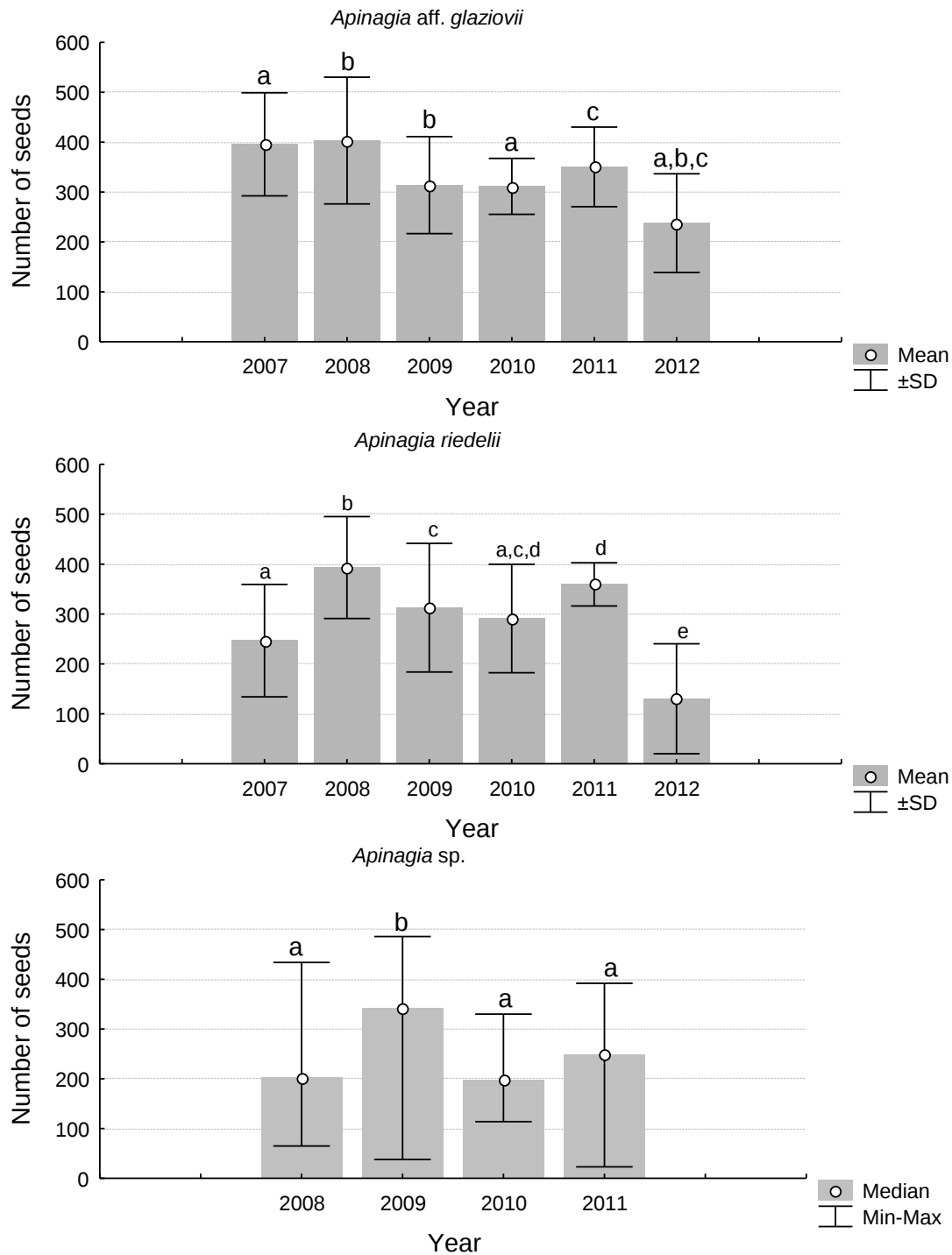


Fig. 6. Variação no seed-set e análises estatísticas dos dados obtidos (ANOVA ou Kruskal-Wallis test, com $\alpha = 5\%$) do controle (natural pollination) de *Apinagia* aff. *glaziovii*, *A. riedelii* e *Apinagia* sp. (A) *Apinagia* aff. *glaziovii* ($F = 15.89$, g.l. = 5, $p < 0.001$), (B) *A. riedelii* ($F = 22.25$, g.l. = 5, $p < 0.001$) e (C) *Apinagia* sp. ($H = 281.8$, g.l. = 3, $p < 0.001$). Diferentes letras mostram diferença significativa.

Capítulo 4

Antecologia, sistema de cruzamento e avaliação em médio prazo do
sucesso natural de *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng.
(Podostemaceae: Tristichoideae)

Manuscrito a ser submetido ao periódico “Plant Biology”

**Antecologia, sistema de cruzamento e avaliação em médio prazo do sucesso natural de
Tristicha trifaria (Bory ex Willd.) Spreng. (Podostemaceae: Tristichoideae)**

Marcelo Sobral-Leite¹, Claudia Erbar², Isabel Cristina Machado¹

a. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901. E-mail: msobralleite@yahoo.com.br

b. Universität Heidelberg, Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Im Neuenheimer Feld 360, 69120 Heidelberg, Germany.

RESUMO

Dados sobre produção natural de frutos e sementes, assim como suas variações em gradientes temporais e espaciais, podem ser indicativos de tipos de sistemas reprodutivo e de polinização em angiospermas. Elevadas taxas de produção de frutos e sementes em angiospermas aquáticas, por exemplo, apontam predomínio da autogamia em seus sistemas reprodutivos. *Tristicha trifaria* é uma reófito neotropical amplamente distribuída, cujas investigações indicam autopolinização espontânea, conjuntamente a anemofilia. Desse modo, investigamos seus atributos florais e experimentalmente seu sistema reprodutivo, testando duas hipóteses: (i) *T. trifaria* apresenta mais óvulos penetrados em polinizações autógamas e (ii) os tubos polínicos de autogamia atingem os óvulos em menos tempo que os de xenogamia nesta espécie. O alongamento significativo ($p < 0.01$) dos filetes, possibilitando autopolinização espontânea no final de ântese e a ausência de visitantes florais, evidenciam a autogamia como principal sistema reprodutivo da espécie. Seus atributos anemófilos; estames laterais, ampla superfície de receptividade estigmática e grãos de pólen pequenos, secos e esferóides mostram também a possível ocorrência de alogamia mediada pelo vento. Por outro lado, o crescimento de tubos polínicos sem diferença entre pistilos cruzados e autopolinizados, sugere a ausência de mecanismos de autoincompatibilidade. A variação interanual e interpopulacional na produção de sementes, no entanto, indicam que a disponibilidade de vetores de pólen pode influenciar seu sucesso reprodutivo, não sendo totalmente autógama.

Palavras-chave: reófitas; biologia reprodutiva; autofertilização; papilas estigmáticas; anemofilia; sistemas mistos de cruzamento; Floresta Atlântica

INTRODUÇÃO

Dados sobre produção natural de frutos e sementes, assim como suas variações ao longo de gradientes temporais e espaciais, podem fornecer indicativos de que tipos de sistema reprodutivo e de polinização atuam em espermatófitas (Cruden 1977; Faegri & Pijl 1979; Wu & Jain 1980). Taxas elevadas de produção de frutos e sementes em angiospermas aquáticas, por exemplo, são indicativas do predomínio da autogamia em seus sistemas reprodutivos (Sculthorpe 1967; Philbrick & Les 1996). Por outro lado, baixa produtividade de sementes em espécies autocompatíveis, mas não autopolinizadas, sugerem falha nos mecanismos de interação com polinizadores bióticos (Faegri & Pijl 1979; Wu & Jain 1980).

Podostemaceae é composta por hidrófitas sésseis em rochas e troncos submersos (Sculthorpe 1967), que vicejam apenas ecossistemas lóticos de ampla flutuação sazonal do nível das águas (Van Royen 1951; Tippery *et al.* 2011). Representada por cerca de 54 gêneros e 300 espécies intertropicais (Koi *et al.* 2012), o centro de diversidade dessa família está nos neotrópicos com cerca de 35 gêneros e 135 espécies (Philbrick *et al.* 2010; Tippery *et al.* 2011). Podostemaceae *sensu strictu* compreende as subfamílias, Podostemoideae Engler e Tristichioideae Engler (Van Royen 1951; Philbrick 2004). A última é caracterizada pelo perianto trilobado ou pentalobado, ovário bi ou trilocular e estames de um a três, ou raramente entre cinco e 25 (Van Royen 1951; 1953; Philbrick 2004). Já tépalas reduzidas e flores solitárias ou agrupadas inseridas em spatelas caracteriza Podostemoideae que engloba a maioria das espécies (Van Royen 1951; Philbrick 2004). *Tristicha*, e *Weddellina* (gênero monoespecífico - *W. squamulosa* Tul.) são os únicos representantes da subfamília Tristichioideae nos neotrópicos (Van Royen 1953). O primeiro gênero apresenta duas espécies: *T. trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. nativa da América tropical, África, Madagascar e ilhas Mascarene; e *T. australis* C. Cusset & G. Cusset, restrita a Austrália (Cook 1990).

Pesquisas sobre os sistemas reprodutivos, ocorrência de autocompatibilidade e mecanismos de polinização ainda são incipientes em Podostemaceae (Cook 1988; 1990; Philbrick & Novelo 1998). Entretanto, se reconhece que o ciclo reprodutivo destas reófitas é determinado pelo nível das

águas dos rios (Philbrick & Novelo 1995). Na estação chuvosa elas permanecem submersas, apenas em desenvolvimento vegetativo (Philbrick & Novelo 1995). Durante a vazante, na estação seca, estas hidrófitas desenvolvem suas flores e emergem, possibilitando a atuação de agentes polinizadores bióticos, abióticos ou autopolinização em meio aéreo (Willis 1902; Van Royen 1951; Sobral-Leite *et al.* 2011).

Inferências sobre os mecanismos de polinização e sistemas reprodutivos em Podostemoideae evidenciam ampla variação; de cleistogamia facultativa e sistemas mistos de cruzamento mediado por abelhas (Philbrick 1981; Philbrick & Novelo 1998; Okada & Kato 2002; Sobral-Leite *et al.* 2011, submetido), a anemofilia e ambofilia (Accorsi 1944; Philbrick & Novelo 1998; Sobral-Leite *et al.* 2011, submetido). Em Tristichoideae, observações *in situ* (Accorsi 1944; Philbrick & Novelo 1997), evidências morfológicas e anatômicas (Jäger-Zürn 1997), razão pólen óvulo (Okada & Kato 2002) e estudos de caso (Gupta & Sehgal 2009) sugerem autogamia e anemofilia como predominantes. Para *T. trifaria*, investigações em campo e análises morfológicas indicam autopolinização espontânea como modo mais atuante (Accorsi 1944; Jäger-Zürn 1997; Philbrick & Novelo 1997), embora a ocorrência conjunta de anemofilia tenha sido levantada (Jäger-Zürn 1997; Philbrick & Novelo 1997).

Desse modo, nossos objetivos foram inferir sobre o sistema de polinização de *T. trifaria* do NE do Brasil a partir dos atributos florais e investigar experimentalmente seu sistema reprodutivo. Para tanto, analisamos a morfometria e merísticas dos botões, flores e ramos férteis e testamos duas hipóteses: (i) *T. trifaria* apresenta mais óvulos penetrados em polinizações autógamas e (ii) Os tubos polínicos de autogamia atingem os óvulos em menos tempo que os de xenogamia nesta espécie. Discutimos ainda o papel desses atributos, comparando com outras Podostemaceae e demais famílias de angiospermas em geral.

MATERIAL E MÉTODOS

Características da espécie

Tristicha trifaria é uma reófito submersa fixa amplamente distribuída na região neotropical formadora de extensos estandes subaquáticos (Fig. 1A) em rios de águas oligotróficas que drenam em florestas tropicais. É comumente encontrada associada a outras Podostemaceae sincronopátricas, e.g. *Apinagia richardiana* (Tul.) P.Royen, *A. riedelii* (Bong.) Tul. e *Mourera fluviatilis* Aubl., assim como com *Egeria densa* Planch (Hydrocharitaceae) e *Potamogeton* spp. (Potamogetonaceae).

Área de estudo

Os sítios de ocorrência da espécie nos quais estudamos se localizam no Domínio da Floresta Atlântica Brasileira, setor ao norte do rio São Francisco (Fig. 1B), correspondendo ao subtipo vegetacional; Floresta Ombrófila Aberta Submontana (IBGE 1985; Veloso *et al.* 1991). O clima local é tropical quente e úmido com temperatura média anual em torno de 22-24 °C com quatro a cinco meses de estação seca entre outubro e fevereiro e chuvosa de março a setembro (IBGE 1985) com precipitação pluviométrica anual média de 1300 mm (ITEP 2012).

Conduzimos observações e amostragens *in loco* entre outubro e janeiro de 2005 a 2011 nos rios: Ipojuca, município de Primavera (8°19'S to 35°21'W, 129 m a.s.l.) e Pirangi, município de Maraial (8°47'S to 35°49'W, 212 m a.s.l.), ambos localizados no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil (Fig. 1B e C), distando cerca de 72 km um do outro. No rio Pirangi, estudamos a população de *T. trifaria* próxima às corredeiras Caldeirão da Nêga e no rio Ipojuca estudamos a população próxima à cachoeira do Urubu. Tombamos os espécimes-testemunho das populações estudadas no Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (UFP 41738 e 41924).

Morfologia e biologia floral

Em cada localidade, enumeramos todos os indivíduos presentes numa transecção de 10 m x 1 m e sorteamos entre 40 e 60 indivíduos férteis por localidade para verificar se existe correlação entre o número de flores e o tamanho do ramo. Acondicionamos individualmente as amostras de botões, flores, frutos e ramos, fixamos em etanol 70% para posterior medição com o auxílio de paquímetro

digital e contagem do número de flores em laboratório. Calculamos a razão estigma-pistilo dividindo a altura do estigma sobre a altura total do pistilo da mesma flor. Com essa última medida, saberíamos quanto equivale o estigma em altura em relação ao total do pistilo (Sobral-Leite *et al.* submetido). Registramos cor, possíveis áreas com osmóforos (*in loco*), dimensões, número e disposição das peças florais. Estimamos o número de grãos de pólen utilizando microscópio óptico e câmara de Neubauer (Maêda 1985). Para calcular a razão pólen-óvulo (Cruden 1977), utilizamos 30 botões florais ($n = 30$ indivíduos) em pré-ântese. Para estimar a viabilidade do pólen seguimos a técnica de coloração do citoplasma com carmim acético a 2% (Radford *et al.* 1974), utilizando pólen de dez botões em pré-ântese ($n = 10$ indivíduos). Testamos no campo as possíveis áreas de concentração de osmóforos em 30 flores ($n = 30$ indivíduos), no início e durante a ântese, imergindo essas flores em solução aquosa de Vermelho Neutro (1:1000) por duas horas, seguindo protocolo de Vogel (1963). Em seguida as lavamos em água corrente, observamos e fotografamos. Adicionalmente para verificar emissão de odor, acondicionamos 30 flores ($n = 30$ indivíduos) em um recipiente de vidro opaco e hermeticamente fechado, aberto após duas horas (Dobson *et al.* 2005).

Para as análises em MEV, botões e flores foram desidratados em dimetoximetano, secos até o ponto crítico, utilizando CO₂ líquido, montados em stubs de alumínio, e metalizados com ouro. Posteriormente, examinamos esse material em microscópio eletrônico de varredura (AMR 1200B, Leitz, Alemanha; software: Sistema de Processamento de Imagem Digital 2.6), no Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Alemanha.

Visitantes florais, sistema reprodutivo e amostragem do controle

Para observação e análise da frequência de visitantes florais, assumimos cada agrupamento de *T. trifaria* sobre uma rocha isolada como indivíduo, em função da dificuldade em determinar plantas individuais nesta espécie. Nós observamos visitas em dois indivíduos focais por localidade. Durante as sessões de observação, registramos: o tipo, o período, a duração e o comportamento de visita dos

visitantes florais, bem como suas interações com indivíduos da mesma ou de outras espécies visitantes. Estudamos o comportamento dos visitantes florais *in situ* e com fotografias durante período diurno, das 5:00 a.m. as 17:00 p.m. Com auxílio de rede entomológica capturamos 10 espécimes de cada espécie visitante e posteriormente montamos à seco para identificação e inspeção dos locais de deposição de pólen sob estereomicroscópio. Os espécimes-testemunho foram depositados na coleção entomológica do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco.

Para amostragem do controle (polinização natural) e dos indivíduos utilizados nos experimentos do sistema reprodutivo, em cada localidade instalamos uma transecção de 30 m x 5 m, dentro da qual enumeramos 100 indivíduos e sorteamos entre 30 e 60 por localidade. No caso do controle, mantivemos as plantas sorteadas no campo expostas a todos os possíveis vetores de pólen e as acompanhamos semanalmente até a formação dos frutos. Posteriormente, amostramos de um a três frutos por planta e os acondicionamos individualmente em tubos de Eppendorf de 2 ml com etanol 70%. As sementes de cada fruto foram uniformemente distribuídas em lâminas histológicas com duas gotas de ácido láctico e glicerol (3:1). Contamos as sementes sob estereomicroscópio, usando papel milimetrado e contador manual. Calculamos a razão semente-óvulo a partir da divisão do número de sementes de cada fruto individual sobre a média de óvulos por ovário e seguimos Cruden (1977) para o cálculo do índice de polinização cruzada (IPC).

Para análise do sistema reprodutivo assumimos como medida de sucesso o número de óvulos penetrados por tubos polínicos em cada tratamento. Em campo, acondicionamos coletivamente indivíduos em flor em placas de Petri contendo ágar a 1% separadas em três grupos; autopolinização espontânea, autopolinização manual e polinização cruzada manual. Conduzimos as placas ao laboratório para as posteriores polinizações controladas. Na autopolinização manual colocamos o pólen de uma flor no estigma da mesma flor, friccionando as anteras deiscentes nos estigmas com o auxílio de pinças. Para a polinização cruzada manual, emasculamos os botões florais e os polinizamos no dia seguinte. Nesse experimento, as flores doadoras de pólen foram

oriundas de agrupamentos sobre rochas diferentes dos agrupamentos receptores, na proporção de 1:1. Efetuamos 30 autopolinizações manuais e 30 polinizações cruzadas manuais e coletamos 10 pistilos por tratamento em três diferentes horários: 24, 48 e 72 h, pós-polinização. Na autopolinização espontânea, marcamos o pedicelo das flores e as retiramos após transcorrido o tempo correspondente ao tratamento. Posteriormente, acondicionamos as flores polinizadas em tubos de Eppendorf com AFA (álcool - formalina - ácido acético), preparamos o material de acordo com Martin (1959), e o observamos sob microscopia de fluorescência. Nós contamos os primeiros 50 óvulos de cada ovário, registrando quanto à presença ou não de tubos polínicos em cada óvulo.

Análises estatísticas

Para testar nossas hipóteses, inicialmente, verificamos a presença de outliers nos dados com o teste de Grubbs para outliers (Burke 2001). Após esse procedimento, utilizamos a ANOVA one-way ou o teste de Kruskal-Wallis para verificar diferenças no número de óvulos penetrados por tubos polínicos entre os tratamentos do sistema reprodutivo. Para verificar diferenças entre os anos e localidades dos controles utilizamos a ANOVA two-way. Usamos o teste T (ou o teste de Mann-Whitney) para verificar diferenças na morfometria das estruturas florais entre botões e flores em final de antese e a correlação de Spearmann na detecção de correspondência entre tamanho do talo e número de flores (Zar 1996). Utilizamos o ambiente R Development Core Team (2012) para efetuar as análises estatísticas supracitadas.

RESULTADOS

Morfologia e biologia floral

Os botões de *T. trifaria* se desenvolveram ao longo de toda extensão dos ramos (Figuras 2B e C), permanecendo protegidos até a pré-ântese por duas brácteas involucrais que formam a Estrutura de Cúpula. A flor de *T. trifaria* é zigomorfa e hermafrodita com altura média de 11.2 mm (± 1.85 mm, $n = 30$, Tabela 1) e coloração verde-clara a vinácea nos estigmas e pedicelo (Figuras 2C). Ocorreu

alongamento do pedicelo entre os botões em pré-ântese e as flores, havendo diferença no comprimento daquela estrutura ($U = 0.00$, $p < 0.001$) entre estas duas fases. Esse alongamento (Figura 3A) possibilitou a abertura da “Estrutura de Cúpula” (Figura 2C) e a exposição da flor. A ântese iniciou entre 5:00 e 5:30 a.m. e durou cerca de 12 h. A flor de *T. trifaria* (Figuras 2B e C) foi actinomorfa, hermafrodita com perigônio de três tépalas que envolvem o ovário globóide, súpero, trilocular e tricarpetal, sendo o androceu formado por um estame (Figuras 2C e 4A). Semelhantemente ao pedicelo, verificamos o alongamento do filete entre os botões em pré-ântese e as flores (Figura 3B), com diferença de comprimento daquela estrutura ($U = 14.00$, $p < 0.001$) entre estas fases florais. Os grãos de pólen foram mônades esferoidais tricolpadas com exina espinhosa (Figura 4C) com viabilidade de 94% ($\pm 4\%$, $n = 10$) na fase de pré-ântese. Os três lobos estigmáticos que formam o estigma foram repletos de papilas ao longo de toda sua extensão (Figura 4B). Estes lobos apresentaram reações de receptividade simultaneamente logo após a abertura das tépalas e antes da deiscência da antera, evidenciando protoginia breve. As áreas coradas pelo Vermelho Neutro foram as brácteas, as tépalas e a antera (Figura 5). Houve correlação entre o número de flores produzidas e as dimensões dos ramos férteis ($r^2 = 0.34$, $p = 0.001$), com os ramos maiores portando mais flores que os menores (Figura 6). Entre 15 e 20 dias após a senescência, os frutos do tipo cápsula, iniciaram deiscência longitudinal e as sementes foram liberadas. No diagrama (Figura 7) ilustramos a sequência de desenvolvimento da flor, dos botões em pré-ântese a formação do fruto.

Visitantes florais, sistema reprodutivo e amostragem do sucesso natural

As observações de visitantes florais totalizaram 48 h, sendo que nenhum visitante foi observado nas flores de *T. trifaria* em ambas as localidades durante o período de estudo. O crescimento de tubos polínicos nos pistilos manualmente cruzados e autopolinizados e de autopolinização espontânea ocorreu a partir de 24 h após a polinização (Figuras 8A–B). Não detectamos diferença no número de óvulos penetrados entre os tratamentos (24 h; $H = 3.6862$, g.l. = 2, $p = 0.1587$. 48 h; $F = 1.5789$,

g.l. = 2, $p = 0.2462$. 72 h; $H = 0.7868$, g.l. = 2, $p = 0.6747$). A média de razão pólen óvulo de *T. trifaria* foi de 57 ± 34.9 (Tabela 2). A de produção de sementes dos controles diferiu entre anos ($F=18.8$, g.l.=5, $p<0.001$) e entre as localidades ($F=35$, g.l.=5, $p<0.001$) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O alongamento dos filetes, possibilitando autopolinização espontânea, evidencia a importância da autogamia como componente no sistema reprodutivo de *T. trifaria*. Este mecanismo tem sido registrado para outras espécies de Podostemaceae (Philbrick 1981; Philbrick & Novelo 1998; Gupta & Sehgal 2009; Sobral-Leite *et al.* 2011) e parece ser favorecedor de autopolinização (Sobral-Leite *et al.* 2011, submetido). Nossos dados de IPC para a espécie, por outro lado, foram discrepantes com a cleistogamia esperada por Cruden (1977), e em relação a avaliação dos atributos florais e análise dos tubos polínicos (Tabela 3; Figura 8). Para Cruden (1977), espécies com valores de razão pólen-óvulo inferiores a log 4.7 (IPC 0), seriam cleistogâmicas, embora tal sistema reprodutivo não tenha sido registrado em *T. trifaria*. A comparação com o sistema de razão pólen-óvulo de Okada & Kato (2002) para Podostemaceae, no entanto, parece ser mais condizente ao que encontramos. Dentro dos valores médio e de amplitude superior para essa variável (Tabela 2), *T. trifaria* se classificada como autógama, sem distinção entre obrigatória ou facultativa (Okada & Kato 2002). Lloyd & Schoen (1992) explicam que em plantas autógamas facultativas, como *T. trifaria*, independente se iniciais ou tardias, a manutenção da ântese possibilita a recepção de grãos de pólen alógamos. Embora *T. trifaria*, apresente micrósporos já desenvolvidos quando os óvulos ainda estão na forma anátropa (Jäger-Zürn 1997), nossos dados morfológicos e observações de ântese floral (Figura 5) indicam a ocorrência de autogamia tardia (*sensu* Lloyd & Schoen 1992) na espécie. O crescimento de tubo polínico, sem distinção entre os tratamentos cruzados e autopolinizados, por sua vez, nos mostra a atuação de um sistema misto de cruzamento (Atluri *et al.* 2004; Goodwillie *et al.* 2005), em *T. trifaria*. Em espécies ECM, a produção de frutos e sementes pode ser advinda de diferentes balanços entre autopolinizações e polinizações cruzadas mediadas biótica ou

abioticamente (Atluri *et al.* 2004; Goodwillie *et al.* 2005; Gupta & Sehgal 2009). Evidências da ocorrência de sistemas mistos tem sido crescentemente levantadas entre representantes da família (Philbrick & Novelo 1998; Gupta & Sehgal 2009; Sobral-Leite *et al.* 2011). No entanto, a preponderância de vetores bióticos no componente alógamo do sistema foi registrada apenas na Podostemoideae *Mourera fluviatilis* Aubl. (Sobral-Leite *et al.* 2011). Para Tristichoideae, a alogamia do sistema misto foi atribuída a ocorrência de anemofilia por meio de evidências morfológicas e de razão pólen-óvulo em *Indotristicha ramosissima* (Gupta & Sehgal 2009). Contudo, mesmo diante da ausência de evidências experimentais, os atributos anemófilos em *T. trifaria*, como estames laterais (Figuras 1C e 3A), ampla superfície de receptividade estigmática (Figura 3B) e grãos de pólen pequenos (Figura 3C) secos e em mônades esferoidais (Whitehead 1969; Culley *et al.* 2002) indicam que essa alogamia possivelmente é mediada pelo vento. A este respeito, Accorsi (1944), excluindo a hidrofilia na espécie, comentou que sua polinização possivelmente se dá pelo ar, pois a alta densidade de flores, fortes ventos e a posição das anteras, permitem a ocorrência de anemofilia. A partir de observações *in situ* (Philbrick & Novelo 1997), argumentaram que *T. trifaria*, assim como outras Podostemaceae encontradas no México, parecem ter na anemofilia seu sistema de polinização primário. A ausência de insetos polinizadores sobre os ramos férteis destas espécies (Philbrick & Novelo 1997) corroboram nossas observações de visitantes florais em *T. trifaria* e reforçam a função do vento em seu sistema alógamo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. J. Campelo e familiares pelo apoio nos trabalhos de campo, a Msc. P. Gomes (UNESP) pelo auxílio na confecção das pranchas e análises estatísticas, a R. Carvalho (UFPE) pelo diagrama de sequência de antese. Somos gratos também ao Dr. M. Guerra (UFPE) pela cessão do microscópio de fluorescência e a Ms. H. Meda (Universidade de Heidelberg, Alemanha) pela ajuda na captura das imagens em MEV. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao qual somos gratos pela concessão da bolsa de

estudos ao primeiro autor (CNPq, processo 140933/2009-3) e de produtividade em pesquisa a última autora (CNPq, processo 305068/2008-3).

REFERÊNCIAS

- Accorsi W.R. (1944) Contribuição para o estudo biológico das Podostemaceae do Salto de Piracicaba I. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, **1**, 50–106.
- Atluri J.B., Ramana S.P.V., Reddi C.S. (2004) Explosive pollen release, wind-pollination and mixed mating in the tropical tree *Shorea robusta* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae). Current Science, **86**, 1416–1419.
- Burke S. (2001) Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. LC GC Europe Online Supplement, **5**, 19–24.
- Cook C.D.K. (1988) Wind pollination in aquatic Angiosperms. Annals of the Missouri Botanical Garden, **75**, 768–777.
- Cook C.D.K. (1990) Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- Cruden R.W. (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution, **31**, 32–46.
- Culley T.M., Weller S.G., Sakai, A.K. (2002) The evolution of wind pollination in angiosperms. Trends in Ecology and Evolution, **17**, 361–369.
- Dobson H.E.M., Raguso, R.A., Knudsen, J.T., Ayasse, M. (2005) Scent as an attractant. In: Dafni A.; Kevan P.G., Husband B.C. (Eds.) Practical Pollination Biology. Enviroquest Ltda Press, Canadian, pp. 197–230.
- Galen C., Plowright R.C., (1987) Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. Canadian Journal of Botany, **65**, 107–111.
- 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 Ecology, Evolution and Systematics, **36**, 47–79.

- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (1985) Atlas Nacional do Brasil: região Nordeste. IBGE, Rio de Janeiro, Brazil.
- ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco, 2012. Precipitation dates. Available at <http://www.itep.br/LAMEPE.asp> (accessed July 2012).
- Koi S., Kita Y., Hirayama Y., Rutishauser R., Huber K.A., Kato M. (2012) Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **169**, 461–492.
- Gupta K.C., Sehgal A. (2009) Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae; Tristichioideae). *Aquatic Botany*, **91**, 51–56.
- Jäger-Zürn I. (1997) Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichioideae). *Aquatic Botany*, **57**, 151–182.
- Lloyd D.G., Schoen D.J. (1992) Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 358–369.
- Maêda J.M. (1985) Manual para uso de Câmara de Neubauer para contagem de grãos de pólen em espécies florestais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- Martin F.W. (1959) Standing and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, **34**, 125–128.
- Okada H., Kato M. (2002) Pollination systems inferred from pollen-ovule ratios of some species of Podostemaceae. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, **53**, 51–61.
- Philbrick C.T. (1981) Some notes regarding pollination in a New Hampshire population of *Podostemum ceratophyllum* Michx (Podostemaceae). *Rhodora*, **83**, 319–321.
- Philbrick C.T. (2004) Podostemaceae (River-Weed family). In: Smith N., Mori S.A., Henderson A., Stevenson D.W., Heald S.V. (Eds.) *Flowering Plants of Neotropics*. Princeton University Press, Princeton and Oxford, United Kingdom, pp. 302–304.
- Philbrick C.T., Les D.H. (1996) Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience*, **46**, 813–826.

- Philbrick C.T., Novelo A.R. (1995) New world Podostemaceae: Ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia*, **47**, 210–222.
- Philbrick C.T., Novelo A.R. (1997) Ovule number, seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquatic Botany*, **57**, 183–200.
- Philbrick C.T., Novelo A.R. (1998) Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany*, **62**, 199–206.
- Philbrick C.T., Bove C.P., Stevens H.I. (2010) Endemism in Neotropical Podostemaceae. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **97**, 425–456.
- R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radford A.E., Dickinson W.C., Massey J.R., Bell C.R. (1974) *Vascular Plant Systematics*. Harper & Row Publishers, New York, United States.
- Robinsohn I. (1924) Die Färbungsreaktion der Narbe, Stigmatochromie, als morpho-biologische Blütenuntersuchungsmethode. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-naturwissenschaftliche Classe. Abteilung*, **133**, 180–213.
- Sobral-Leite M., Siqueira Filho J.A., Erbar C., Machado I.C. (2011) Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family? *Aquatic Botany*, **95**, 77–87.
- Sobral-Leite M., Siqueira Filho J.A., Erbar C., Machado I.C. (submetido) Anthecology and breeding system of *Apinagia richardiana* (Tul.) van Royen (Podostemaceae): mixed mating strategies in a Neotropical riverweed. *Annals of Botany*, **xxx**, xxx–xxx.
- Tippery N.P., Philbrick C.T., Bove C.P., Les, D.H. (2011) Systematics and phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany*, **36**, 105–118.
- Whitehead D. (1969) Wind pollination in the angiosperms: evolutionary and environmental considerations. *Evolution*, **23**, 28–35.

- Willis J.C. (1902) Studies in the morphology and ecology of Podostemaceae of Ceylon and India. *Annals of Royal Botanical Garden, Peradeniya*, **1**, 268–465.
- Wu L., Jain S. (1980) Self-fertility and seed-set in natural populations of *Anthoxanthum odoratum* L. *Botanical Gazette*, **141**, 300–304.
- Vogel S. (1963) Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung. Über Bau und Funktion der Osmophoren. *Akad. Wiss. Literatur. Math-Naturwiss. Kl*, **10**, 600–763.
- Van Royen P. (1951) The Podostemaceae of the new world. Part I. *Mededeelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijks Universiteit te Utrecht*, **107**, 1–150.
- Van Royen P. (1953) The Podostemaceae of the new world. Part II. *Acta Botanica Neerlandica*, **2**, 1–20.
- Veloso H.P., Rangel-Filho A.L.R., Lima J.C.A. (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro, Brazil.
- Zar J.H. (1996) *Biostatistical Analysis*, Third edition. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River, New Jersey, United States of America

Tabela 1. Morfometria (média±desvio padrão/amplitude) de flores, frutos, grãos de pólen por flor e razão pólen-óvulo de *Tristicha trifaria*.

Character	<i>n</i>	($\bar{x} \pm SD/R$)
Fertile branch	91	17.5 ± 9.30/4.29–44.71
Spathella	30	2.28 ± 0.38/1.46–3.19
Flower	30	11.2 ± 1.85/6.98–15.4
Pistil	30	2.07 ± 0.30/1.51–2.54
Ovary	30	1.50 ± 0.20/1.03–1.82
Stigmatic lobe	30	0.61 ± 0.21/0.25–1.14
Stamen	30	2.38 ± 0.37/1.61–3.2
Anther	30	0.78 ± 0.16/0.47–1.06
Length in mm.		

Tabela 2. Merística (média±desvio padrão/amplitude) de flores, frutos, grãos de pólen por flor e razão pólen-óvulo de *Tristicha trifaria*.

Character	<i>n</i>	($\bar{x} \pm \text{SD/R}$)
Flowers/branch	91	5.74 ± 3.7/1–21
Pollen grains/flower	30	2.229 ± 1109/625–5.000
Pistil-stigma ratio	30	0.29 ± 0.09/0.13–0.51
Ovules/ovary ^a	30	41.7 ± 8.30/30–58
Ovules/ovary ^b	55	56.1 ± 9.06/37–74
Pollen-ovule ratio	30	57 ± 34.9/12–156
Seed [†] -ovule ratio ^a	12	0.25 ± 0.16/0.05–0.53
Seed [†] -ovule ratio ^b	22	0.19 ± 0.17/0.04–0.62

^aMaraial. ^bPrimavera. 2011[†]

Tabela 3. Variação na produção de sementes dos controles de *Tristicha trifaria* do Nordeste do Brasil de 2005 a 2011 nos rios Ipojuca e Pirangi e análises estatísticas dos dados obtidos (Kruskal-Wallis test, com $\alpha = 5\%$). Houve diferença significativa no número de sementes entre os controles de anos diferentes dentro da mesma localidade ($F=18.8$, g.l.=5, $p<0.001$) e entre as localidades ($F=35$, g.l.=5, $p<0.001$). Diferentes letras mostram diferença significativa.

Control(Year)	Site ($\bar{x} \pm SD/R$)				
	Primavera		Maraial		
	<i>n</i>		<i>n</i>		<i>p</i>
2005	35	$35.2 \pm 16.1/1-54$	16	$49.2 \pm 9.8/23-67$	ns
2006	23	$57.22 \pm 14.4/16-74$	24	$33.7 \pm 5.2/18-41$	0.001
2007	23	$36.5 \pm 11.02/8-48$	30	$38.2 \pm 11/19-64$	ns
2008	28	$8.6 \pm 9.4/1-35$	21	$18.9 \pm 8.5/5-33$	ns
2009	23	$34.6 \pm 13.8/4-57$	20	$10.25 \pm 8.74/1-31$	0.001
2010	21	$29.9 \pm 10.8/1-43$	18	$19.9 \pm 9.2/8-41$	ns
2011	35	$52.8 \pm 8.25/37-69$	18	$10.7 \pm 6.2/2-22$	0.001

Figura 1. A. Distribuição de *Tristicha trifaria*. B. Nordeste do Brasil; C. Áreas de estudo de *Tristicha trifaria* no rio Pirangi, trecho do Município de Maraial, e rio Ipojuca, trecho do município de Primavera, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

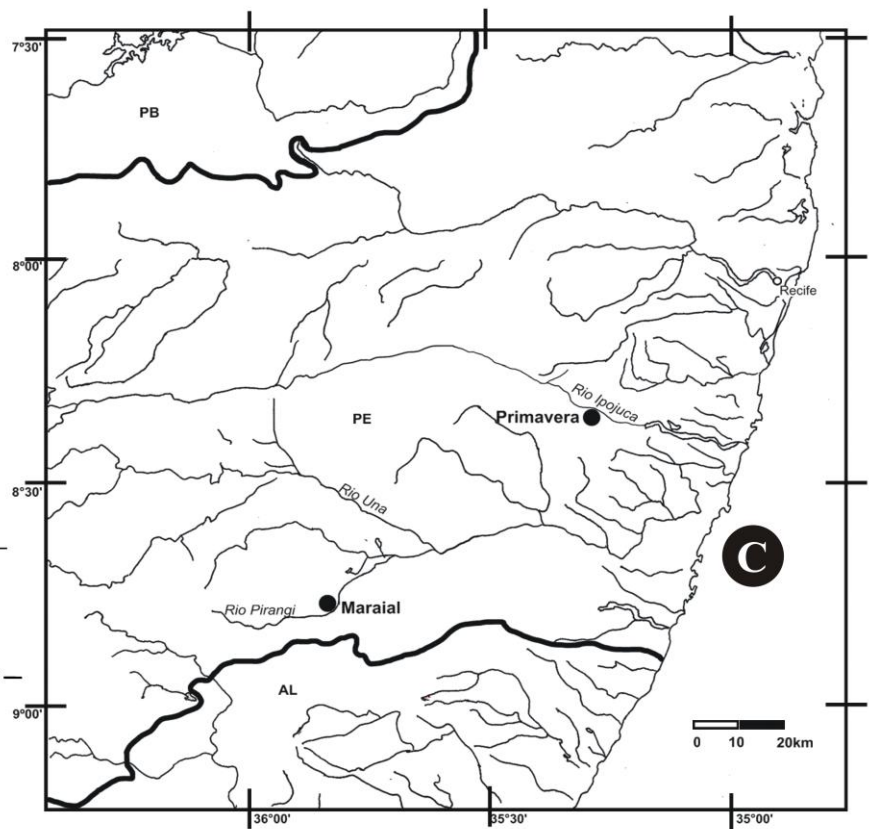
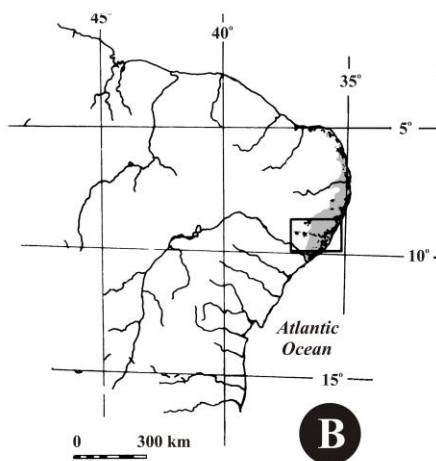
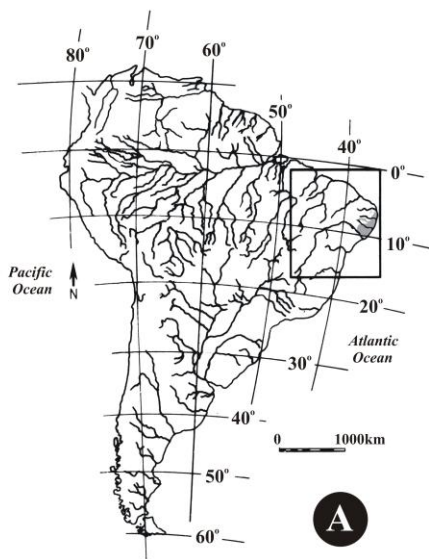


Figura 2. Trecho do habitat, ramo fértil com flores e detalhes da flor de *Tristicha trifaria*. (A) Estandes subaquáticos de *T. trifaria* no rio Ipojuca (setas brancas), próximo à cachoeira do Urubu. Barra de escala = 50 cm. (B) Ramo fértil emerso no rio Pirangi, no qual podem ser vistos flores (setas brancas), ramos (sh) e folhas (lf). Barra de escala = 1 cm. (C) Flor de *T. trifaria* em detalhe, mostrando o estame (stm), estigma trilobado (sti), ovário (o), as tépalas (te), pedicelo (pe), Estrutura de Cúpula (br) e a base do ramo de onde orinou-se a flor (sh). Barra de escala = 0.5 cm.



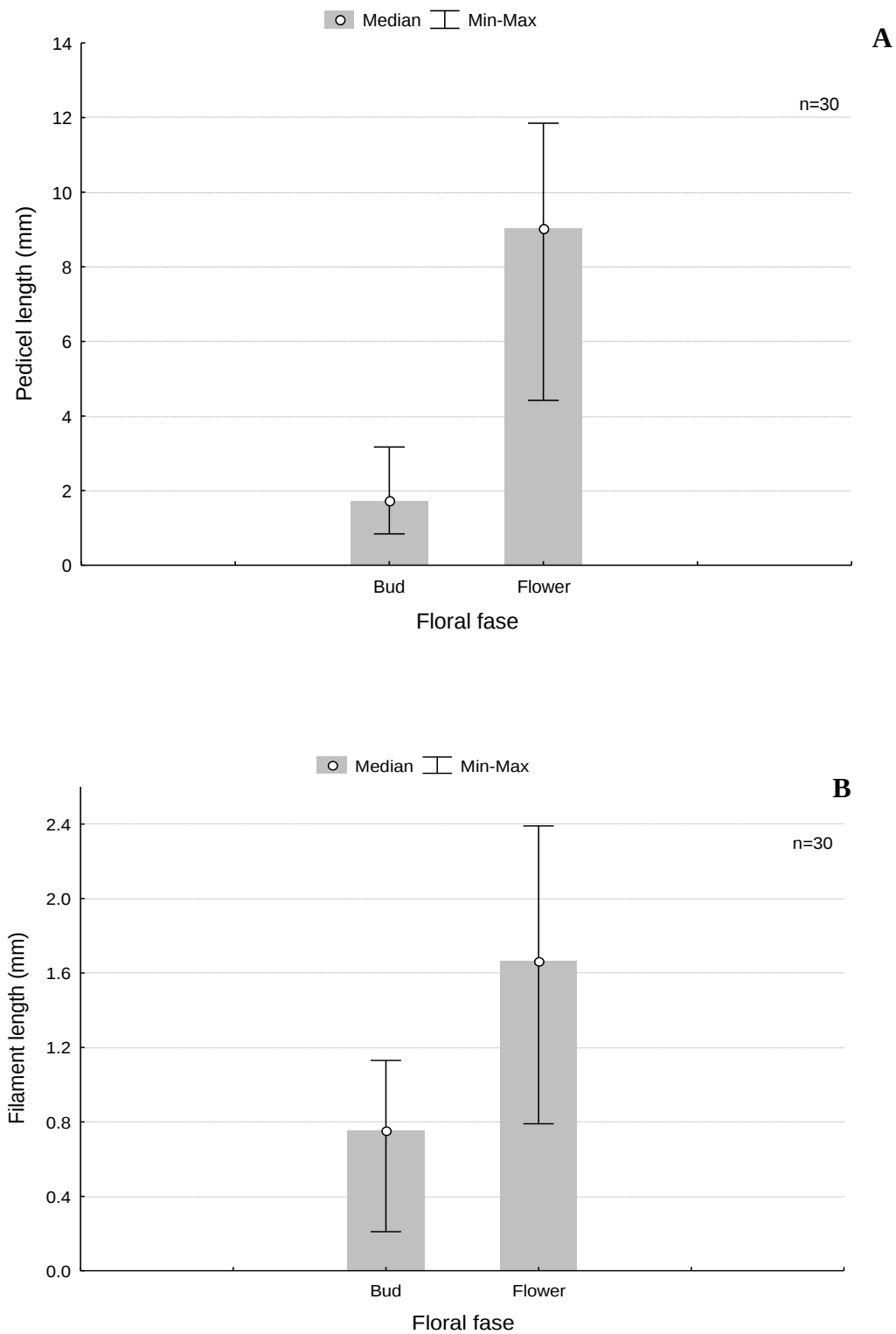


Figura 3. Comparação entre alturas de pedicelos e filetes de botões e flores em final de ântese de *Tristicha trifaria*. (A) Altura do pedicelo de botões e flores de *T. trifaria* diferiram significativamente entre estas fases florais ($U = 0.00$, $p < 0.001$). (B) Comparação entre altura dos filetes de botões e flores de *T. trifaria* com diferenças entre as fases florais ($U = 14.00$, $p < 0.001$).

Figura 4. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das flores e estruturas florais; estigmas, papilas estigmáticas e grãos de pólen de *Tristicha trifaria*. (A) Flor de *T. trifaria* mostrando antera (a), filete (f), estame (stm), estigmas (sti), ovário (o) e tépalas (te). Barra de escala = 400 μm . (B) Detalhe do estigma (sti) evidenciando amplas superfícies recobertas por papilas estigmáticas de *T. trifaria*. Barra de escala = 50 μm . (C) Grãos de pólen de *T. trifaria* esferoidais em mônades tricolpadas. Barra de escala = 20 μm .

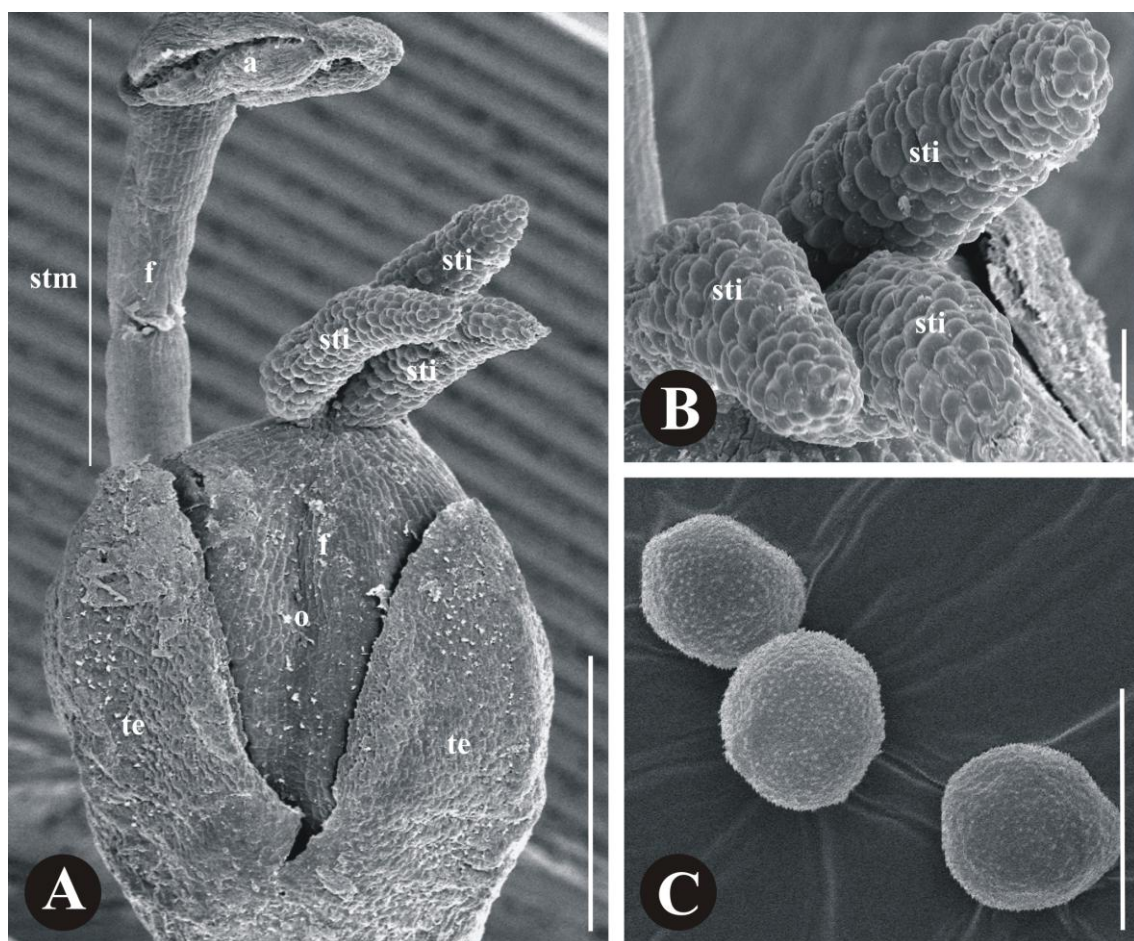


Figura 5. Áreas coradas pelo Vermelho Neutro (setas) na flor de *Tristicha trifaria*. Antera (a), tépalas (te) e brácteas (br).



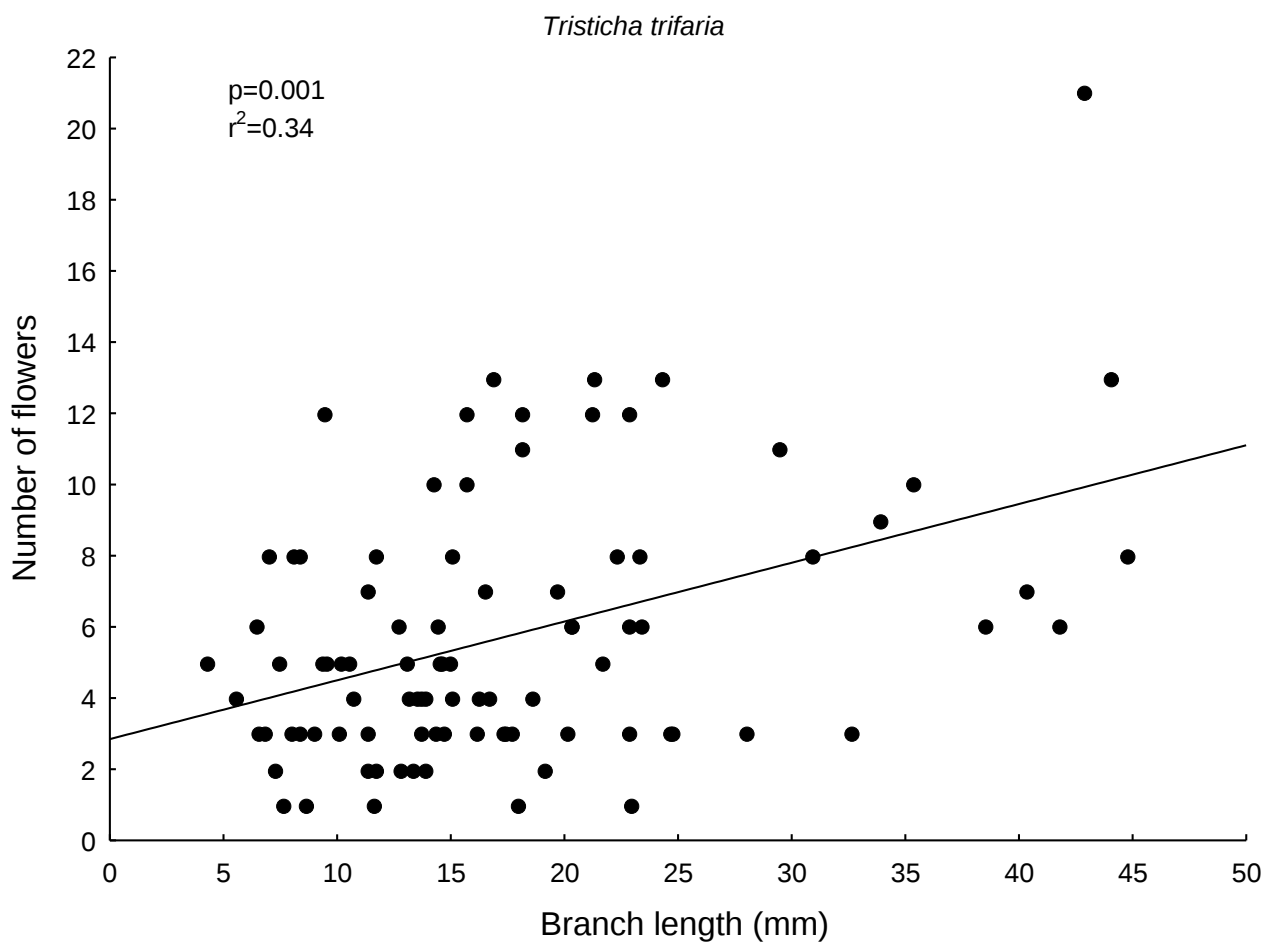


Figura 6. Correlação positiva e significativa ($n = 91$, $r^2 = 0.34$, $p = 0.001$) entre número de flores e o comprimento dos ramos em *Tristicha trifaria*.

Fig. 7. Diagrama de seqüência de ântese de *Tristicha trifaria*. (A) Botões envolvidos pelas Estruturas de Cúpula. (B) Início do alongamento dos pedicelos (p) e emergência das flores. (C) Flores após a abertura das tépalas, iniciando a ântese, evidenciando o alongamento dos filetes e a liberação dos estames (stm). (D) Flores em ântese; com anteras (a) sobre os estigmas em função do alongamento dos filetes (f). (E) Flores em final de ântese, evidenciando as anteras tocando os estigmas trilobados. (F) Cápsula recém formada. (G) Cápsula deiscente com valvas persistentes. Barras de escala = 0.5 mm.

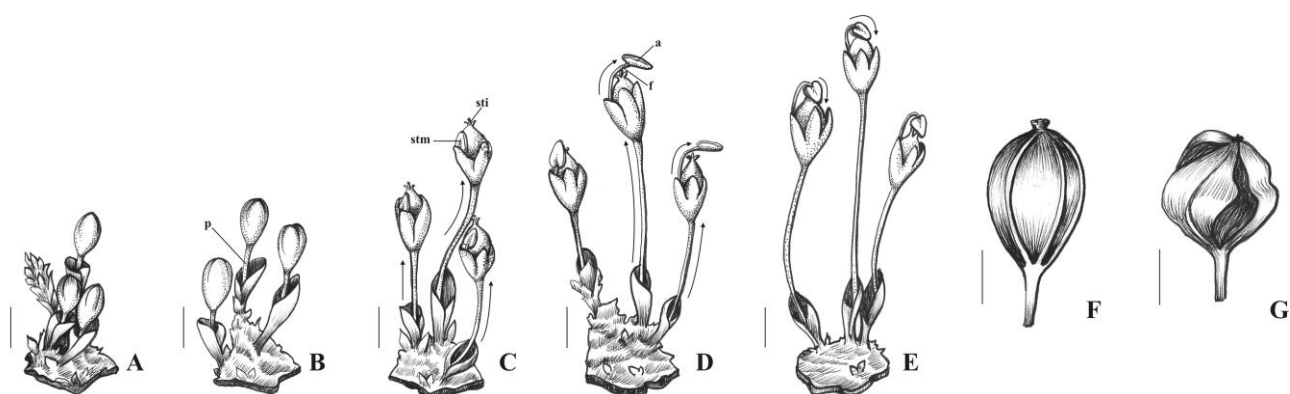
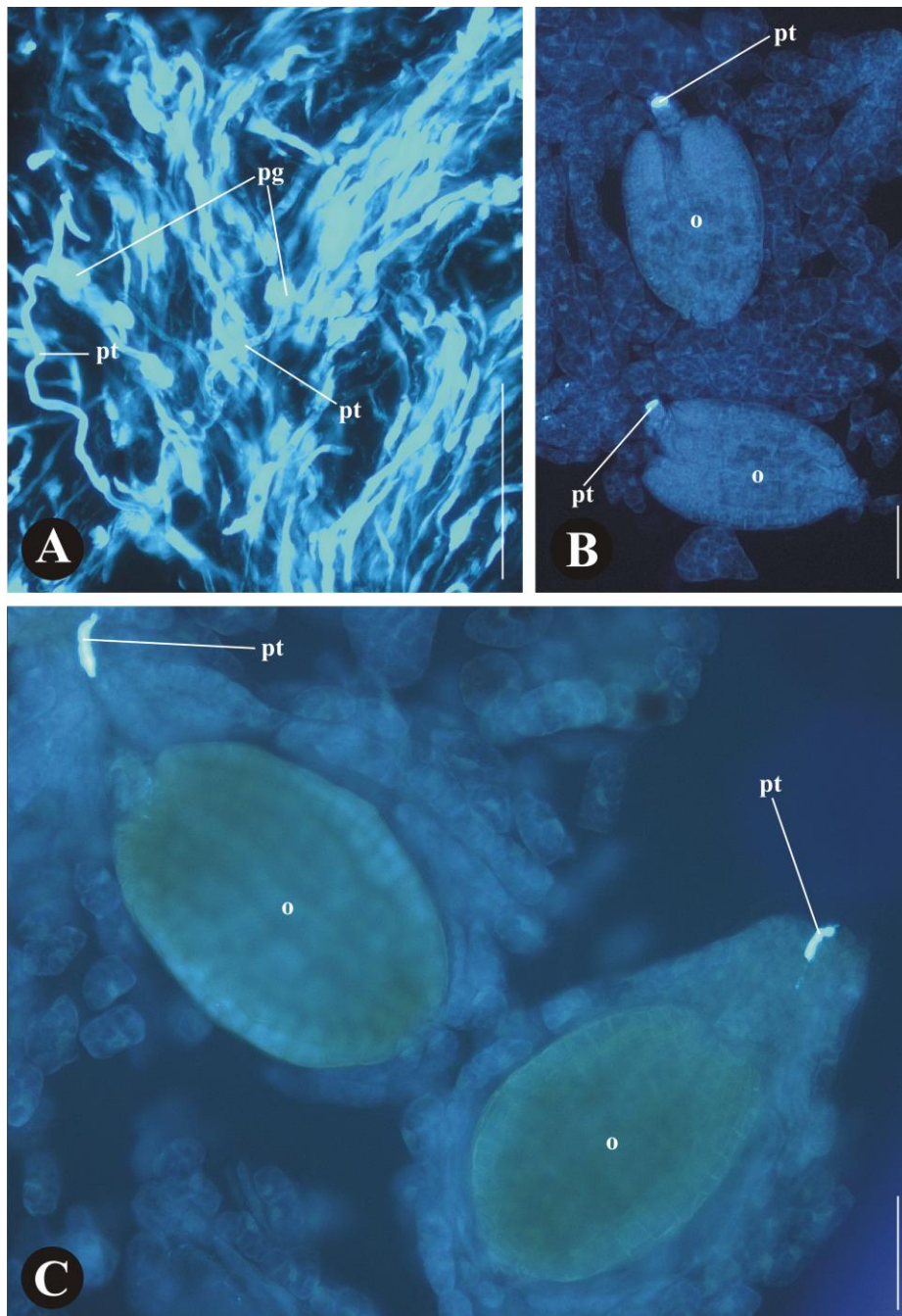


Fig. 8. Micrografias de fluorescência de grãos de pólen e tubos polínicos de *Tristicha trifaria*. (A) Grãos de pólen (pg) e tubos polínicos (pt) no estigma 24 h após a autopolinização manual. (B) Tubos polínicos (pt) resultantes de autopolinização manual 24 h, penetrando os óvulos (o). (C) Tubo polínico (pt) resultante de polinização cruzada manual 24 h, penetrando os óvulos (o). Barras de escala = 100 μ m.



Capítulo 5

Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis*
(Podostemaceae): Pollination by bees and xenogamy in a predominantly
anemophilous and autogamous family?

Artigo publicado no periódico “Aquatic Botany”



Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): Pollination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family?

Marcelo Sobral-Leite^{a,*}, José Alves de Siqueira Filho^b, Claudia Erbar^c, Isabel Cristina Machado^a

^a Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Avenida Professor Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Universidade Federal do Vale do São Francisco, Centro de Referência para a Recuperação de Áreas Degradadas da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco-CRAD/UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, BR 407, km 12, lote 543, Distrito de Irrigação Senador Nilo Coelho, 56.300-990 Petrolina, Pernambuco, Brazil

^c Universität Heidelberg, Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Im Neuenheimer Feld 360, 69120 Heidelberg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2010

Received in revised form 15 March 2011

Accepted 25 March 2011

Available online 4 April 2011

Keywords:

Anemophily

Entomophily

Allogamy

Aquatic plant

Atlantic Rain Forest

Lotic habitat

ABSTRACT

The Podostemaceae are sessile hydrophytes restricted to habitats with waterfalls and seasonal flow variability. *Mourera fluviatilis* belongs to the family and has a disjunct distribution in the Amazon and northeastern Brazil. The following hypotheses were tested: (i) both autogamy and anemophily act on the pollination system of *M. fluviatilis*, and (ii) the highest reproductive success is achieved by cross-pollination. Natural populations were monitored in the rivers Pirangi and Ipojuca, northeastern Brazil. Floral visitors are the polylectic bees *Apis mellifera*, *Trigona spinipes* (Apidae), *Augochlora* sp. and *Augochloropsis* sp. (Halictidae), though only the latter three are effective pollinators. In experiments on the reproductive system and pollination there was a high percentage of fruit formation (>86%), both in treatment and control plants. Although the index of self-incompatibility is 0.86, there was a significant difference in the number of seeds produced among reproductive system treatments, and xenogamy produced more seeds. There was no significant difference in the number of penetrated ovules between control and manual cross-pollination (xenogamy) treatments, 24 h after pollination. However, there were differences among treatments, 48 h after pollination, except for the control and xenogamy treatments. The pollen tubes from cross-pollination treatments usually penetrate the micropyle in shorter time and in higher quantity. We found differences among pollination experiments, except for the control and non-emasculated treatments, and between emasculated treatments. In spite of the ambiguity of floral attributes (pedicel, filaments and anthers colors, sweet odor, reduced perianth, absence of nectar, small and dry pollen grains), wind pollination is less important for this species; what predominates instead are first allogamy mediated by bees and second self-pollination at the end of anthesis.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The family Podostemaceae is composed of sessile hydrophytes attached to rocks, also known as haptophytes (Sculthorpe, 1967). They are restricted to lotic habitats and waterfalls, in rivers where the water level fluctuates seasonally (Van Royen, 1951), and comprises about 48 genera and 280 species (Ameka et al., 2003; Philbrick, 2004). It has a pantropical distribution, but the Neotropics are the main centre of speciation and diversity of this family, where 135 species occur (Philbrick et al., 2010). The genus *Mourera* comprises eight species in Brazil, Colombia, the Guianas, Suriname, and Venezuela. In Brazil this genus is found in the northern, north-

eastern and central regions (Van Royen, 1953; Tippery et al., 2011). *Mourera fluviatilis* Aubl. is the most widespread species of the genus, with a disjunct distribution in the Amazon and northeastern Brazil (Fig. 1A). In northeastern Brazil there are relict populations in the Pernambuco Endemism Centre (Fig. 1B) and in the Atlantic Forest within the Caatinga Domain.

The reproductive cycle in Podostemaceae is determined by the water level of the river, because during the rainy season these macrophytes remain submerged, in vegetative growth (Philbrick and Novelo, 1995). During the dry season, with low flow, plants emerge and expose their flowers to potential pollinators (Willis, 1902; Van Royen, 1951). Knowledge on reproductive systems and pollinators is still poor in the family (Cook, 1988, 1990; Philbrick and Novelo, 1998; Cook and Rutishauser, 2007).

According to Rutishauser (1997) many Neotropical species, especially from the genera *Apinagia*, *Mourera* and *Rhyncholacis*,

* Corresponding author. Fax: +55 8121268348.

E-mail address: msobralleite@yahoo.com.br (M. Sobral-Leite).

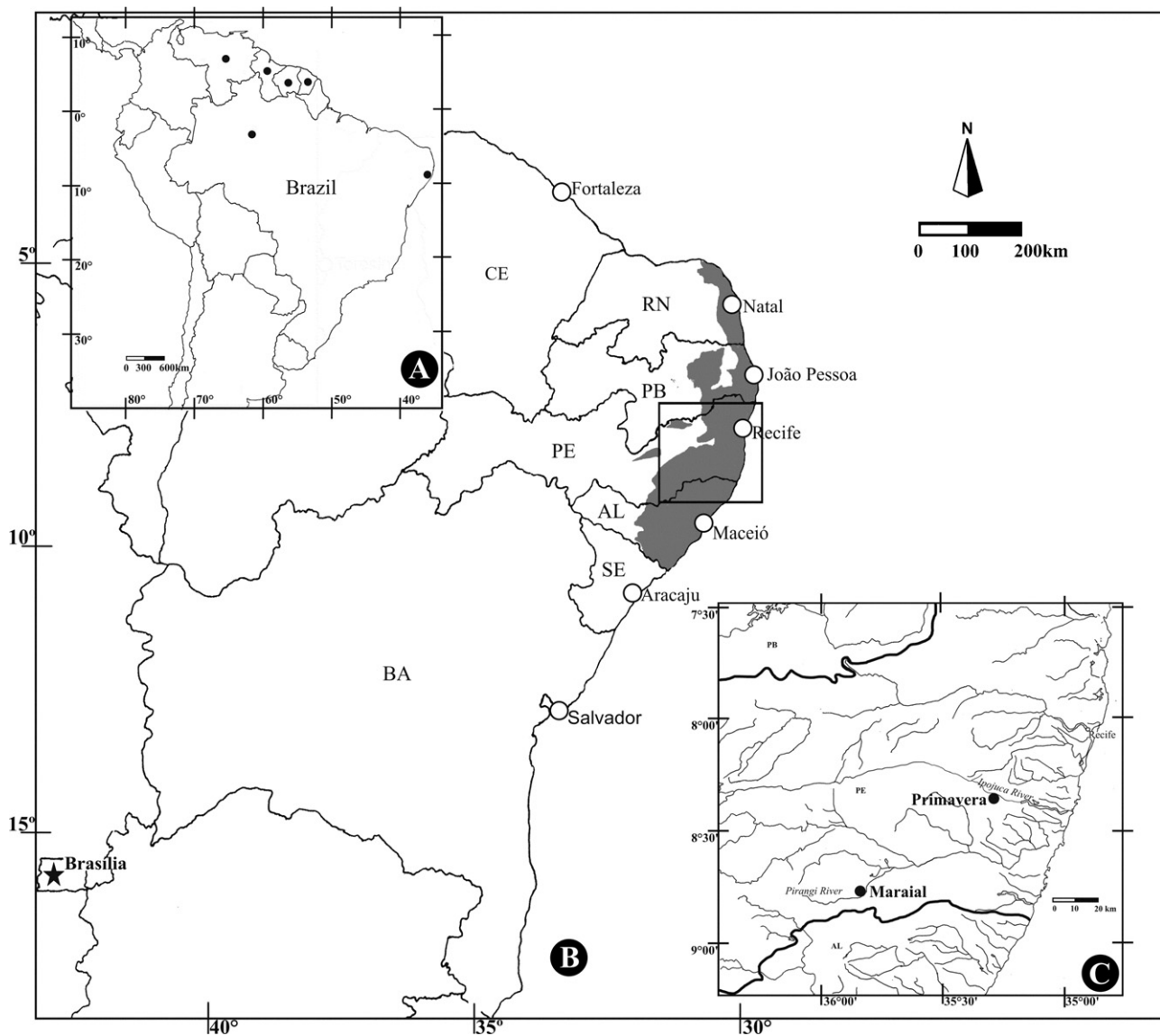


Fig. 1. (A) Disjunct distribution of *Mourera fluviatilis* in the Amazon and in northeastern Brazil (●), localities in the Amazon following Van Royen (1953) and in northeastern Brazil. (B) Pernambuco Endemism Centre (dark areas). (C) Study areas of *M. fluviatilis* in the rivers Pirangi, Maraial municipality, and Ipojuca, Primavera municipality, state of Pernambuco, northeastern Brazil (●).

have entomophilous characteristics: a variable number of stamens, brightly colored filaments and pedicels, floral odor and visitor insects. However, inferences on the pollination mode based on flower morphology, number and arrangement of floral parts (e.g. Philbrick, 1981; Philbrick and Bogle, 1988; Khosla and Moham Ram, 1993), dimensions, structure of pollen grains and pollen-ovule ratio (e.g. Bezuidenhout, 1964; Lobreau-Callen et al., 1998; Okada and Kato, 2002; Cook and Rutishauser, 2007), as well as case studies (see Philbrick, 1984; Philbrick and Novelo, 1998; Khosla et al., 2000, 2001; Khosla and Sehgal, 2009), suggest the predominance of autogamy, and anemophily as the main pollination system.

Nevertheless, in the literature there are many records of bees visiting flowers of Podostemaceae, including *M. fluviatilis* (e.g. Went, 1926; Gessner and Hammer, 1962; Grubert, 1974; Tavares, 1997; Okada and Kato, 2002), suggesting a possible allogamy by biotic vectors. However, the lack of frequency data and of systematic behavioral observations of flower visitors in those studies makes it difficult to determine the role of these insects as pollinators or pollen robbers. Mukkada (1969) suggested for *Dalzellia zeylanica* (Gardner) Wight (Podostemaceae) the occur-

rence of a pollination system including insects and wind as pollen vectors.

In this work, in order to clarify issues about the pollination and reproductive system of *M. fluviatilis*, and more broadly, on the anthecology of the Podostemaceae, we tested two hypothesis: (i) that both autogamy and anemophily act on the pollination system of *M. fluviatilis*, and (ii) that the highest reproductive success in the species is achieved by cross-pollination. We also discuss the role of floral traits and entomophily in pollination and the reproductive system of *M. fluviatilis*, comparing it with other Podostemaceae.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study areas are located in the Pernambuco Endemism Centre (Fig. 1B) considered one of the most important endemism centers of South America for sheltering rare species, including relic populations of species with disjunct distribution in the Amazon and northeastern Brazil (Leme and Siqueira-Filho, 2006). The regional

climate is tropical, hot and humid with an annual average temperature around 22–24°C, four to five months of dry season between October and February and a rainy season from March to September (IBGE, 1985). The annual average rainfall is 1300 mm (ITEP, 2009). We carried out field observations between August and December from 2004 to 2007 in the rivers Pirangi, Maraiá municipality (8°47'S to 35°49'W, 212 m a.s.l.), and Ipojuca, Primavera municipality (8°19'S to 35°21'W, 129 m a.s.l.). Both are located in the state of Pernambuco (Fig. 1C), northeastern Brazil, about 72 km apart from each other. In the River Pirangi, we studied *M. fluviatilis* populations of three localities nearby the waterfalls “Caldeirão da Nêga” and in the River Ipojuca, we studied the population of “Urubu” waterfalls, making a total of 960 h of field work. Vouchers from both populations were deposited in the Herbarium Geraldo Mariz at Universidade Federal de Pernambuco, Brazil (UFP 41724, 41741, 51416 and 51436).

2.2. Morphology and floral biology

Using individuals of all study areas, we recorded: the color of flowers, emission of odor, possible location of osmophores, time of beginning and duration of anthesis, dimensions and arrangement of floral parts, as well as pollen availability.

We took measurements from flowers with a digital caliper. Stigmatic receptivity was tested in the field with potassium permanganate (Robinson, 1924) and hydrogen peroxide (Galen and Plowright, 1987), and observed under a hand lens. We estimated the number of pollen grains per anther using an optical microscope and a Neubauer chamber (Maêda, 1985). For calculating the pollen-ovule ratio (Cruden, 1977) we used floral buds ($n = 10$ individuals) in pre-anthesis fixed in 70% ethanol. To estimate pollen viability we used the cytoplasm staining technique with 1.2% acetic-carmin (Radford et al., 1974) using the pollen of 10 floral buds ($n = 10$ individuals) in pre-anthesis phase. To estimate the variation in pollen availability we collected and analyzed 10 flowers at different times: 3, 6, 9 and 12 h after the beginning of anthesis. The stamens were placed in Eppendorf tubes with 1 ml of lactic acid and glycerol (3:1), and the number of pollen grains was estimated later in a Neubauer chamber (Maêda, 1985). We determined in the field the sites of scent emission in 30 flowers ($n = 30$ individuals) in the beginning of and during the anthesis, using neutral red (Vogel, 1963). At the same time, we placed 10 flowers ($n = 10$ individuals) in a hermetically sealed dark glass recipient, which was opened after 2 h (Dafni et al., 2005) to analyze the emission of scent. For the morphometric and morphological analyses of *M. fluviatilis* pollen we used acetylated grains following Erdtman (1969). The morphometric data comprised 25 measures for the polar and equatorial diameters of pollen grains from 25 flowers ($n = 25$ individuals).

For SEM studies, buds were dehydrated in dimethoxymethane, critical-point dried using liquid CO₂, mounted on stubs, coated with gold and studied in a scanning electron microscope (AMR 1200B, LEITZ, Germany; software: Digital Image Processing System 2.6), at the Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften, Biodiversität und Pflanzensystematik, Germany.

2.3. Flower visitors, pollination and reproductive systems

We observed visits to about 100 inflorescences in a group of focal plants. During the observation sessions we recorded the type, time, duration and the behavior of flower visitors, as well as their interactions with individuals of the same or other species. We studied the behavior of flower visitors based on observations *in situ* and photographs during daytime, from 5:00 to 17:00. With an insect net we captured five specimens of each visitor species and then mounted them dry for identification and inspection of pollen deposit sites under a hand lens and a stereomicroscope. Voucher specimens

were deposited in the collection of the Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva at the Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

In order to test which vectors pollinated *M. fluviatilis* – wind, insects or both – we carried out four experiments in the field using wooden grids (50 cm × 15 cm × 15 cm) placed over the inflorescences tested. For the experiments of insect exclusion with non-emasculated and emasculated flowers, we covered the wooden grids with a 0.5 mm mesh screen, to prevent the access of flower visitors, but not wind flow. This protocol allowed determining how much of the seed production was due to pollen brought by the wind and how much was due to wind and self-pollination, in case it occurred. In the experiment of exclusion of wind and insects we replaced the screen for voile, with a 0.02 mm mesh, preventing the passage of both wind and insects. We also used exposed emasculated flowers, whose tepals were also removed, in order to test how much of the seed production resulted from pollen brought by the wind or by insects, even if those flowers did not have parts that are attractive to insects (stamens and tepals). The control consisted of marking, observing and tracking randomly selected individuals, which were kept exposed to all possible pollen vectors.

In order to analyze the reproductive system we carried out field experiments of manual self-pollination, cross-pollination and checked for agamospermy (Radford et al., 1974). The index of self-incompatibility (ISI) was calculated following Zapata and Arroyo (1978), and the outcrossing index (OCI) followed Cruden (1977). Manual self-pollination consisted of isolating the flower stalks with voile bags, and then to self-pollinate the pre-anthesis floral buds, on the day after onset of anthesis. We manually placed the pollen of one flower on the stigma of the same flower by rubbing the dehiscent anthers on the receptive areas of the stigma with tweezers. Then, for cross-pollination we covered the flower stalks, emasculated floral buds and submitted flowers to pollination on the following day. In this experiment, pollen-donor flowers were collected from plants from another area, in the proportion 1:1. In order to test for the existence of agamospermy, buds in pre-anthesis were emasculated and the inflorescences were isolated with voile bags. At the same time, we analyzed the growth of pollen tubes in order to evaluate self-incompatibility mechanisms and growth speed. We performed 30 pollinations for the treatments manual self-pollination, cross-pollination and control ($n = 30$ individuals per treatment, $n_{total} = 90$ individuals). We collected 10 pistils per treatment at three different times: 8, 24 and 48 h after pollination. The pistils were placed in Eppendorf tubes with FAA (formaldehyde–acetic acid–alcohol) for posterior analysis. Pistil preparation followed Martin (1959), and observations were made under a fluorescence microscope. We counted the first 200 ovules in each ovary, recording the presence or absence of pollen tubes in each one.

In all experiments on pollination and reproductive systems, we marked between 30 and 100 randomly selected individuals, and we used one to three flowers per individual for each treatment. In all experiments we discarded unused floral buds without damaging the inflorescence. We monitored the fruit set weekly, and placed them into 2-ml Eppendorf tubes with 70% ethanol. We counted seeds under a stereomicroscope using graph paper and a manual counter. The seeds of each fruit were uniformly distributed on microscope slides with two drops of a lactic acid and glycerol solution (3:1).

To test our hypotheses, we assume that reproductive success is measured by number of seeds produced, and ovules with pollen tubes. We used a Kruskal–Wallis test or ANOVA one-way, according to the normality and homoscedasticity of the data. Before that, all the values were tested for the presence of outliers, which could interfere with the interpretation of the results, with the Grubbs test and Chi-squared test for outliers (Burke, 2001). We used a

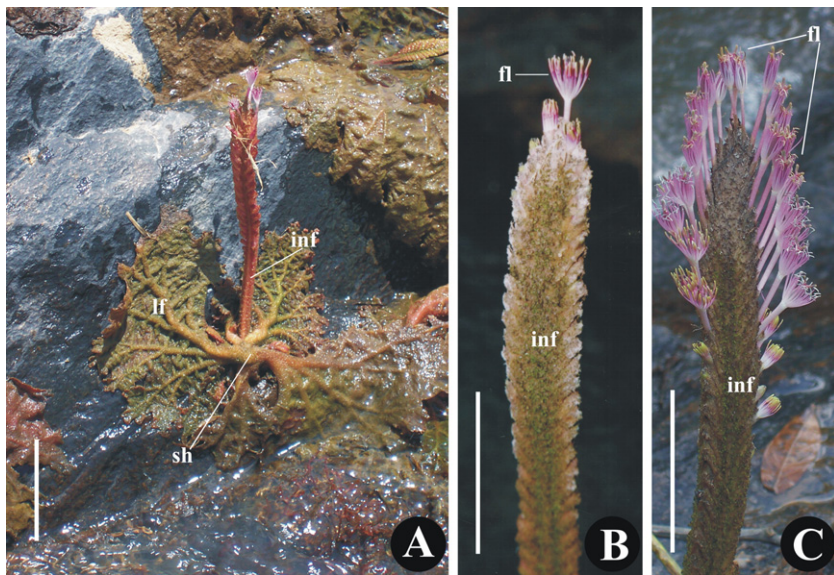


Fig. 2. Habit, body of the plant, and sequence of flower opening of *Mourera fluviatilis*. (A) Parts of the vegetative and reproductive body of the plant; inflorescence (inf), leaf (lf) and vegetative shoot (sh) of a specimen attached to a granitic rock at the dry riverbed of the Ipojuca River. Scale bar = 10 cm. (B) Inflorescence (inf), showing a basipetal sequence of flower opening (fl). Scale bar = 5 cm. (C) Inflorescence (inf) during dry season, showing many flowers (fl). Scale bar = 5 cm.

Mann–Whitney test to analyze differences in the morphometry of flowers and in the number of ovules penetrated in the experiments of pollen tubes (Zar, 1996). We used the package **R Development Core Team (2010)** for statistical analysis.

3. Results

3.1. Morphology and floral biology

The individuals of *M. fluviatilis* (Fig. 2A) had between one and fifteen inflorescences ($n = 30$) with a color that varies between light grey and maroon shades, showing a basipetal sequence of flower opening (Fig. 2B and C). The floral bud is enclosed by the bract of the inflorescence and by an elliptical, cylindrical or irregular-shaped spathe, whose function is to protect the floral bud from water and from mechanical shocks before the anthesis. When the flower was fully developed, the spathe also encloses the base of the pedicel. In the floral bud, the pedicel is white to pink-colored, and in the flower it varies from dark pink to lilac-colored, with difference in average length of the pedicel ($U = 9, p = 0.0001$) between these floral phases (Table 1). Anthesis lasted from 12 to 18 h and started at different times of the day. Most flowers opened at 5:00 a.m., whereas some opened later during the day until sunset. The flowers that started the anthesis at sunset were receptive around 5:00 a.m. of the following day, remaining open for additional 4–6 h.

The analyzed flowers of *M. fluviatilis* were actinomorphic, hermaphrodite, with a perigone formed by 8–15 tepals with the same color as the pedicel, and triangular or lanceolate-shaped. The ovary was superior, bilocular and of a subcylindrical or elliptical shape. It was greenish-grey at the base, changing to dark pink as it reaches the stigmatic lobes, and returns to grey next to the receptive areas of the stigma. The pistil had two cylindrical styles (Fig. 3A), pressed against each other in the floral buds, but separated in the flowers in anthesis by an average distance of 1.67 ± 0.79 mm ($n = 37$). The stigmatic papillae were located at the apex of each style (Fig. 3B and C) and were receptive after the rupture of the spathe, before the dehiscence of the anthers; thus the species was classified as protogynous.

The androecium was constituted of 23–32 stamens, arranged in two whorls, complete or not, in which the outer stamens alternate

with the tepals. Filaments were pink and reach an average length of 7.86 ± 0.98 mm ($n = 110$). The anthers were sagittate. Those of the outer whorls had a longitudinal (Fig. 3D) and introrse dehiscence, whereas the anthers from the inner whorl were extrorse. The anthers changed from yellow to white during the dehiscence. In floral buds and flowers in the beginning of anthesis, anthers were in an upward position, moving to a position perpendicular to the filaments during the anthesis. The pollen grains were spheroidal, in tricolpate monads with spiny exine (Fig. 3E) and their release occurred between two and a half and three hours after the beginning of the anthesis. The pollen viability was 98.2% ($n = 10$).

In most flowers, the anthers overtoped the stigmas, 1.08 ± 0.53 mm ($n = 20$), enabling spontaneous self-pollination at the end of anthesis. However, some flowers in the same inflorescence exhibited a lower androecium; this discrete herkogamy was characterized by an average height difference between the structures of 1.57 ± 0.69 mm ($n = 37$). The flowers emitted a light and sweet odor, perceptible only during the first hours of anthesis. The parts stained by neutral red included tepals, spathe and the anterior and apical extremities of anthers (Fig. 4).

The shriveling of the filaments and tepals, the complete dehiscence of anthers, the absence of pollen, and the slight swelling and appearing of longitudinal veins on the ovary, marked the beginning of the flower's senescence. The ovary started resembling a fruit from three to five days after the beginning of the senescence. Dried and twisted filaments, tepals and stigmatic lobes can remain in the septicidal-capsule fruit. Between 20 and 25 days after floral senescence, the longitudinal dehiscence of fruits started and seeds were released. Further details on floral morphology and on the sequence of anthesis from the floral bud to the formation and dehiscence of the capsule are shown in Fig. 5.

3.2. Flower visitors, pollination and reproductive systems

Observations of flower visitors totaled 90 h, and four bee species were recorded; two from the family Apidae, *Apis mellifera* (Lepelletier, 1836) and *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793), and two Halictidae, belonging to the genera *Augochlora* and *Augochloropsis* (Fig. 6). Bees *A. mellifera* (Fig. 6A) arrived first, around 5:00 a.m., when they reached the inflorescence alone or in groups of up to 12 individuals. After a quick exploratory flight, they landed on stamens

Table 1Morphometric and meristic data of flowers and fruits, pollen grains per anther, pollen grains per flower and pollen–ovule ratio of *M. fluviatilis*, northeastern Brazil.

Character	n	Mean $\pm$ standard deviation	Range
Bud pedicel	31	5.16 $\pm$ 2.32	1.68–12.31
Flower	20	26.90 $\pm$ 7.58	15.45–40.12
Stamens for flower	20	26.2 $\pm$ 1.44	23–32
Tepals for flower	20	11.85 $\pm$ 1.59	8–15
Flower pedicel	40	16.5 $\pm$ 3.85	7.38–23.84
Distance between stigmatic lobes	37	1.67 $\pm$ 0.79	0.32–3.55
Pollen grain polar diameter ^a	25	15.38 $\pm$ 0.77	13.75–17.5
Pollen grain equatorial diameter ^a	25	15.35 $\pm$ 0.86	12.5–17.5
Pollen grains for flower	10	368.625 $\pm$ 76803.4	221.250–462.500
Pollen grains for anther	260	14.177 $\pm$ 4352.5	2500–36.250
Ovules for ovary	10	2281.4 $\pm$ 236.6	1739–2549
Pollen–ovule ratio	10	161.4 $\pm$ 27.488	99–193
Hercogamy	37	1.57 $\pm$ 0.69	0.23–2.86
Capsule	50	25.83 $\pm$ 8.44	12.66–40.57

Length in mm.

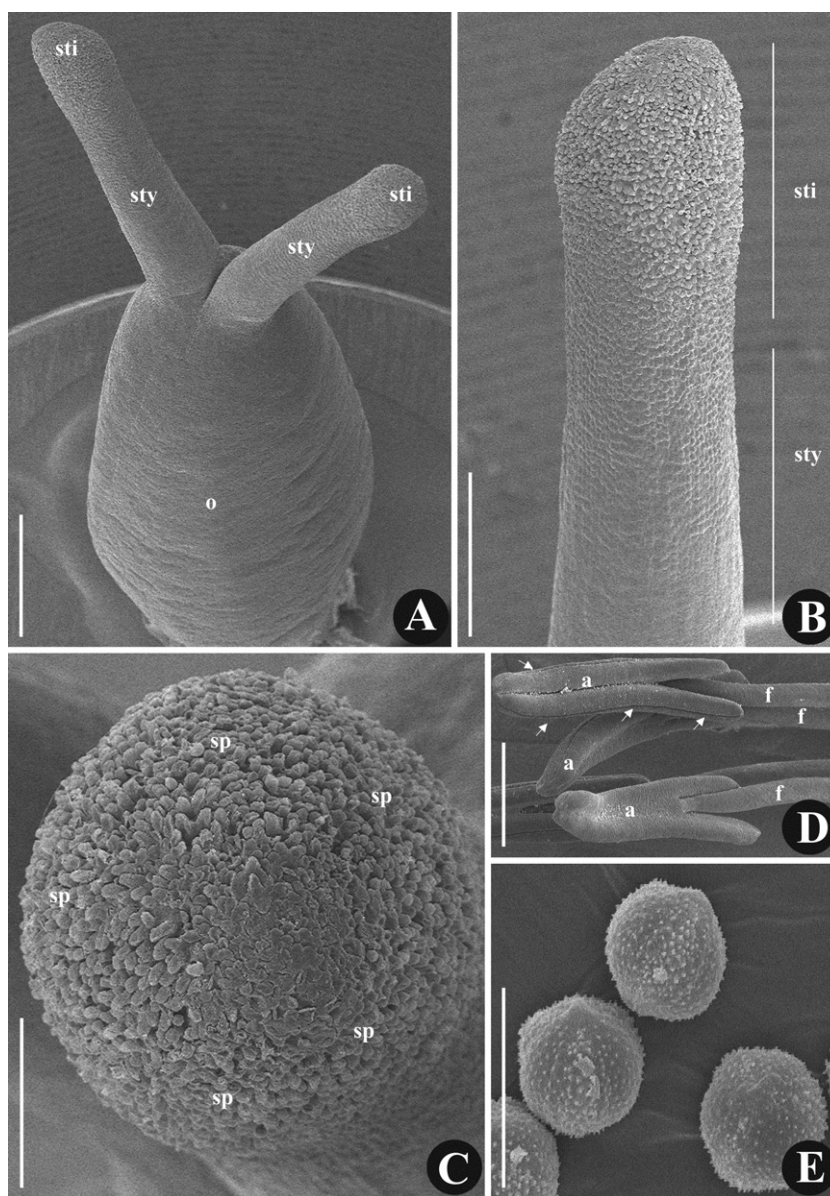
^a Length in μm .

Fig. 3. Scanning electron microscopic (SEM) pictures of the pistils, stamens and pollen grains of *Mourera fluviatilis*. (A) Pistil in evidence, showing the ovary (o) with two styles (sty) and the stigmatic receptive area, located at the apex of the styles (sti). Scale bar = 1 mm. (B) Detail of the style (sty), showing the receptive area (sti) on top. Scale bar = 500 μm . (C) Stigmatic receptive area at the apex of the stigma with the stigmatic papillae (sp). Scale bar = 300 μm . (D) Stamens showing details of filaments (f), anthers (a) and the longitudinal slit through which the pollen grains are released (white arrows). Scale bar = 1 mm. (E) Pollen grains in tricolpate monads. Scale bar = 20 μm .

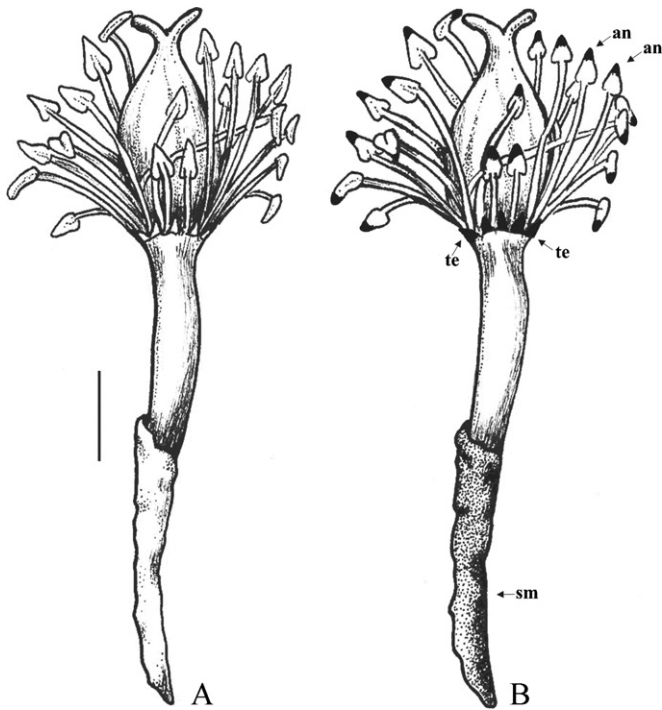


Fig. 4. Comparative diagram among flowers of *Mourera fluviatilis*, showing areas stained with neutral red. (A) Whole flower. (B) Flower after staining with neutral red; in evidence the sites of osmophore concentration; an = anther tips (black arrows), te = tepals (black arrows) and sm = membranaceous spathe (black arrow). Scale bar = 10 mm.

and moved in circular movements around the androecium. Their visits on each flower lasted from 10 to 20 s, and groups remained in the same foraging area from 10 to 15 min. *A. mellifera* frequently robbed flowers whose anthers did not start dehiscence yet, forcing the anthers to open with their mandibles and forelegs, and collecting still damp pollen. Pollen was usually deposited in the corbiculae of their hind legs.

T. spinipes (Fig. 6B) was active around 7:00 a.m. in groups of up to eight individuals. Its behavior when approaching flowers and foraging for pollen was similar to *A. mellifera*, differing in visiting time in 1 or 2 min per flower. *T. spinipes* touched stigmatic receptive areas while moving, just after pollen collection. However, it was rarely seen moving to a flower on another plant, remaining on the same inflorescence before abandoning the site. Additionally to collecting pollen, *T. spinipes* destroyed tepals, anthers and filaments, leaving some plants with only the pistil.

Differently from the first two species, *Augochlora* sp. (Fig. 6C) foraged for pollen alone. Its activity on flowers started around 7:00 a.m., when it landed on stamens without a previous exploratory flight. *Augochlora* sp. remained from 30 to 40 s on each flower and then went not only to other flowers of the same inflorescence, but also to flowers of other individuals. Pollen grains deposited all over the bee's body, mainly on the abdomen and hindlegs, were frequently seen attaching to the stigmatic receptive areas while the bee was moving.

Augochloropsis sp. (Fig. 6D) was found in pairs or in groups of up to five individuals on the same inflorescence. It started collecting pollen around 7:00 a.m. and, like *Augochlora* sp., reached the flowers without making an exploratory flight, and remained on them between 10 and 15 s. *Augochloropsis* sp. exhibited exploratory behavior, moving around all anthers of the same flower and around flowers of the same inflorescence, then going to nearby inflorescences and accumulating a considerable amount of pollen in the scopae. However, *Augochloropsis* sp. was observed deposit-

ing pollen on the stigmatic receptive areas of *M. fluviatilis*. The flowers visits of all bees took place throughout the day during the whole flowering season, though most visits were recorded during the morning (Fig. 7). We did not record bee visits to *M. fluviatilis* individuals at places with excessively turbulent waters; it seems like bees avoided those plants.

We observed a high rate of fruit set (over 86%) in all experiments on the pollination system of *M. fluviatilis* (Table 2), with no significant difference among treatments. However, there was a difference in seed set among pollination experiments ($H = 157$, $df = 4$, $p < 0.001$), except among the control, exclusion of wind/insect and insect exclusion (non-emasculated), and between insect exclusion (emasculated) and emasculated non-bagged. Based on the examination of 35 control dried inflorescences, we observed that 55 proximal floral buds did not start anthesis, remaining inside the spathe. These floral buds were analyzed and we observed that three of them (5%) had seeds, evidence of cleistogamy. Those buds, one with 20 seeds and two with one seed each, exhibited an average percentage of success of 0.30% on seed set.

There was a profuse growth of pollen tubes in the pistils submitted to cross- and self-pollination treatments, collected 24 h after pollination (Fig. 8A and B). However, only cross-pollination and control exhibited ovules penetrated by pollen tubes at that period, and did not differ between each other ($U = 42$, $p = 0.52$). In manual self-pollination, pollen tubes penetrated the ovules only 48 h after pollination (Fig. 9), and the treatments of that period differed significantly ($H = 8.8$, $df = 2$, $p = 0.009$), except for the control and manual cross-pollination treatment. The ovules of manual self-pollination exhibited less pollen tubes than other treatments. *M. fluviatilis* exhibited high success in fruit set, over 88% in all treatments and in controls, showing no significant difference. Agamosperous fruits developed, but these capsules did not form seeds (Table 3), because all ovules aborted. The index of self-incompatibility for *M. fluviatilis* was 0.86 and the average value for the pollen-ovule ratio was 161 ± 27 ($n = 10$). In the reproductive system, we found significant differences in seed-set among the treatments manual self-pollination and manual cross-pollination, and also among manual self-pollination and control ($F = 10$, $df = 2$, $p < 0.001$), with no difference between control and manual cross-pollination (Table 3).

4. Discussion

Brightly colored pedicels and filaments and emission of sweet odor in *M. fluviatilis* are melittophilous attributes (Faegri and van Der Pijl, 1979; Proctor et al., 1996), confirmed by the observation of bees visiting these flowers. Although the emission of floral odors in the Podostemaceae was reported for the genera *Apinagia*, *Mourera* and *Rhyncholacis* (e.g. Went, 1926; Gessner and Hammer, 1962; Grubert, 1974; Tavares, 1997), only Tavares (1997) confirmed it by detecting areas with osmophores using neutral red in *Rhyncholacis hydrochichorium* Tul. The stained areas in *R. hydrochichorium* followed the same pattern observed in flowers of *M. fluviatilis*, suggesting that these areas might have an analogous distribution in species of this family that emit floral odors.

Although all bees visiting *M. fluviatilis* can act as pollinators, the behavior and the site of pollen deposition suggest that *Augochlora* sp., *Augochloropsis* sp. and *T. spinipes* are effective pollinators, whereas *A. mellifera* is an occasional pollinator and sometimes a pollen robber. Although the Halictidae and *T. spinipes* induce a geitonogamy, their foraging behavior, especially that of *Augochlora* sp. and *Augochloropsis* sp. suggest promotion of high rates of xenogamy in *M. fluviatilis*. Species of *Trigona*, *Tetragona* and *Melipona* (Apidae) are frequent visitors of Neotropical Podostemaceae (see Went, 1926; Gessner and Hammer, 1962; Grubert, 1974; Tavares, 1997; Okada and Kato, 2002). All

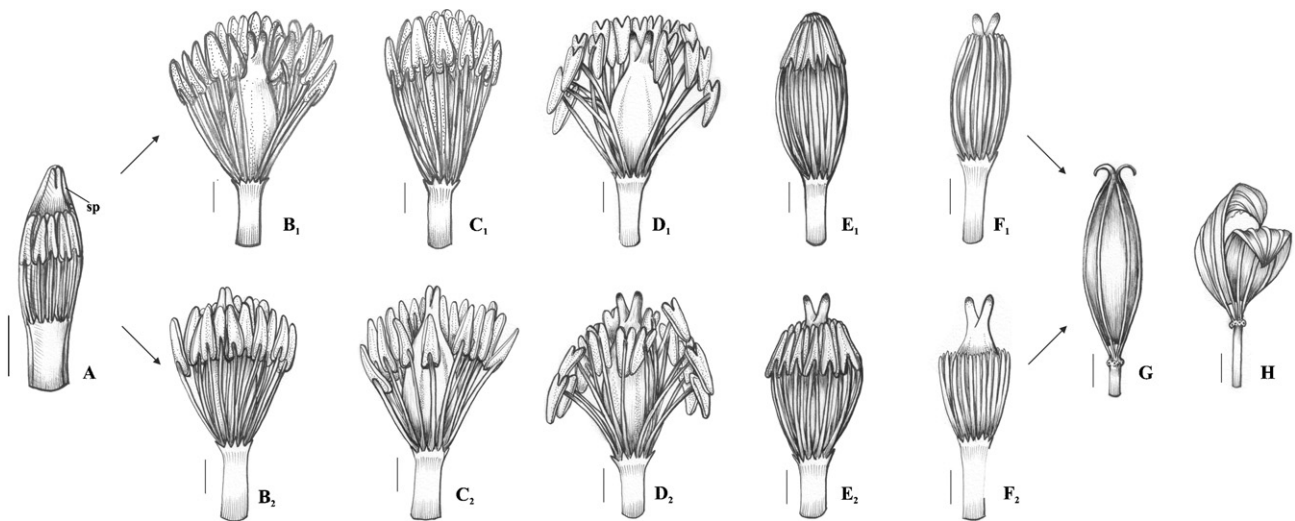


Fig. 5. Diagram of sequence of anthesis and flowers with different height of androecium (B_1 to F_1 , higher androecium flowers and B_2 to F_2 , lower androecium flowers) of *M. fluviatilis*. (A) Floral bud enclosed by spathe (sp) in both floral types. (B) Floral bud after rupture of the spathe at the beginning of anthesis. (C) Flowers at the beginning of anthesis. (D) Flowers in anthesis; with spreading styles and stigmas. (E) Flowers at end of anthesis. (F) Flowers in senescence with stamens without anthers. (G) Newly formed capsule. (H) Dehiscent capsule, with both valves equal and persistent. Scale bar = 5 mm.

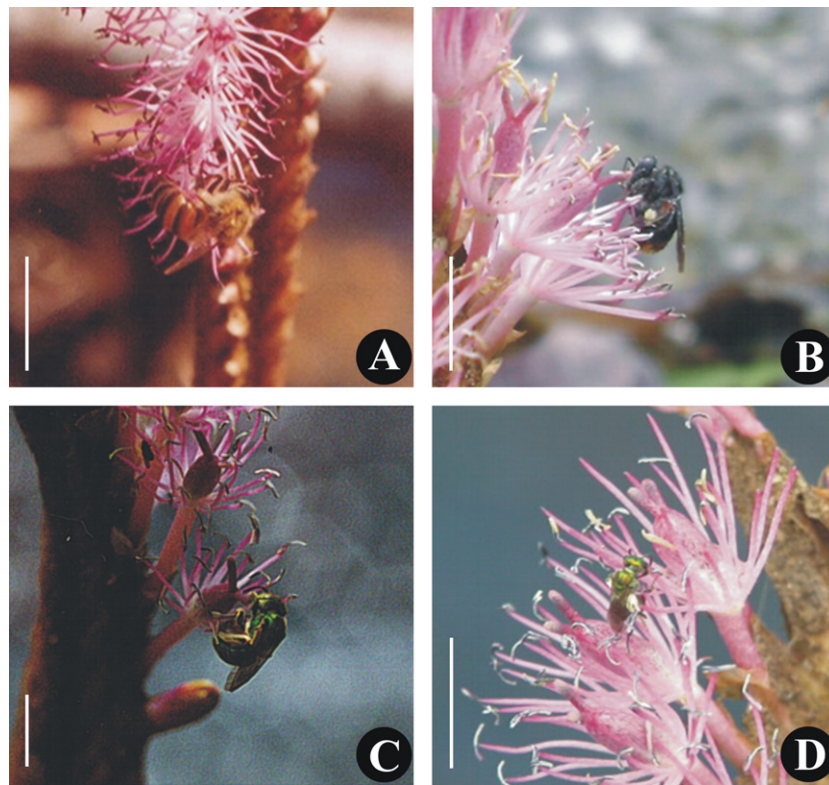


Fig. 6. Flower visitors of *Mourera fluviatilis* in the rivers Pirangi and Ipojuca, northeastern Brazil. (A) *Apis mellifera* (Lepelletier, 1836) (Apidae). (B) *Trigona spinipes* (FABRICIUS, 1793) (Apidae). (C) *Augochloropsis* sp. (Halictidae). (D) *Augochlora* sp. (Halictidae). Scale bar = 1 cm.

Podostemaceae cited in these studies exhibit open flowers with exposed sexual organs and accessible pollen, with no adaptations to specific visitors. Flowers with such attributes, known as allophilic (Faegri and van Der Pijl, 1979), are easily visited by non-specialized insects with short mouthparts, such as the bees observed on *M. fluviatilis*.

Characters such as reduced perianth, absence of nectar, as well as small and dry pollen grains, considered as anemophilous (Whitehead, 1969; Stebbins, 1970; Regal, 1982), are also attributes of the flowers of *M. fluviatilis*. Nevertheless, we suggest that, these

anemophilous traits may only play a minor role in pollen flow between flowers. Our pollination experiments suggest that the number of seeds formed by wind pollination is low and might be considered as stochastic events (Table 2). Moreover, the lack of differences between the pollination experiments neither did support a significant role of wind pollination for *M. fluviatilis*. Tavares (1997) concluded that the long-pedicel flowers with glabrous stigmas of the Neotropical Podostemaceae are not adapted to receive pollen transported by wind; thus these traits suggest entomophily or autogamy. In typically anemophilous plants the

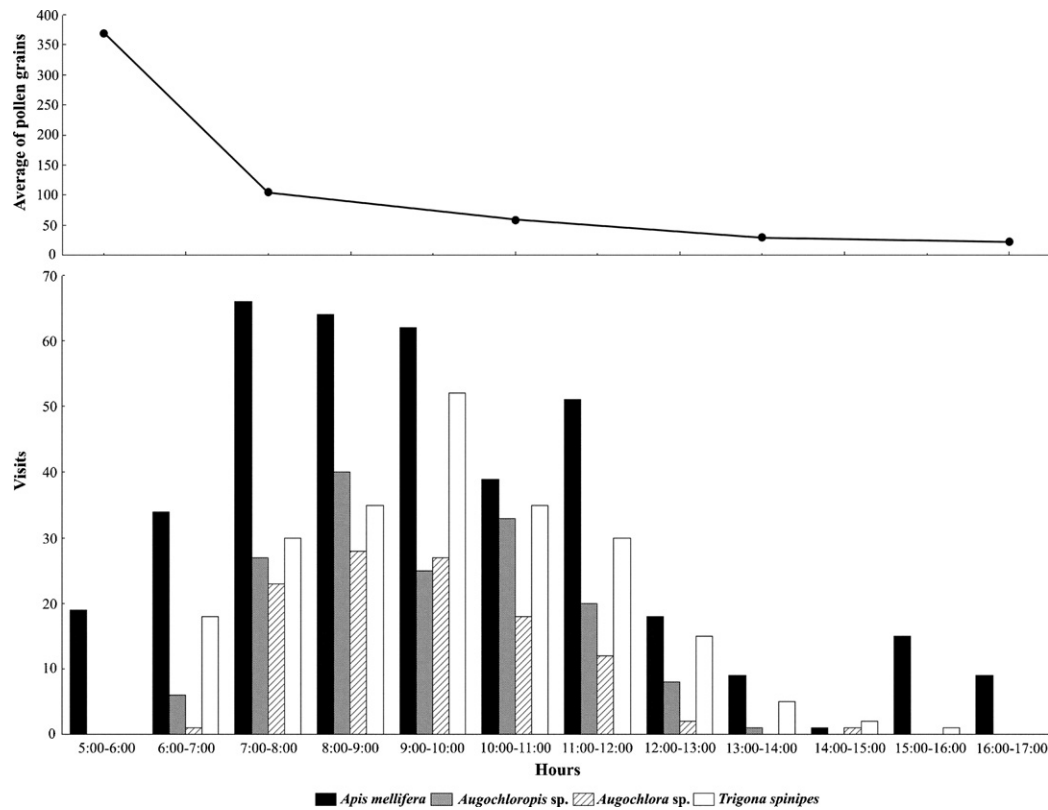


Fig. 7. Frequency of flower visitors and pollen availability of *Mourera fluviatilis* in the River Pirangi, northeastern Brazil.

Table 2

Fruit and seed-set (% measure of central tendency and range) in the experiments of pollination system, control and statistical analysis of the obtained data (Kruskal–Wallis test, with $\alpha = 5\%$) of *M. fluviatilis*, northeastern Brazil. There was a significant difference among treatments ($H = 157$, $df = 4$, $p < 0.001$), except between control and wind/insect exclusion, control and insect exclusion (non-emasculated) and between insect exclusion (emasculated) and emasculated not bagged, which did not show differences. Different letters show statistical significance.

Treatment	n	Flowers/fruits	Fruit/seed-set* Success%	Seed-set Median (Q1–Q3)/range
Insect exclusion (emasculated)	37	37/32	86.5/2.46	7 (3–15) ^b /1–28
Insect exclusion (not emasculated)	100	106/100	94.3/45.26	988.5 (649.8–1368) ^a /189–2081
Insect and wind (spontaneous self-pollination)	45	51/47	92.1/33.16	748.5 (580.8–905.0) ^a /155–1463
Emasculated not bagged	33	33/33	100/0.37	5 (3–12) ^b /1–27
Control (natural pollination)	60	80/74	92.5/41.18	1242 (931–1387) ^a /339–1741

* Based on mean of ovules (2281).

Table 3

Fruit and seed-set (% measure of central tendency and range) in the experiments of reproductive system, control and statistical analysis of the obtained data (ANOVA one-way test, with $\alpha = 5\%$) of *M. fluviatilis*, northeastern Brazil. There was a significant difference in the number of seeds produced between manual cross-pollination and manual self-pollination ($F = 10$, $df = 2$, $p < 0.001$). Different letters show statistical significance.

Treatment	n	Flowers/fruits	Fruit/seed-set* Success%	Seed-set Mean ($\pm$ standard deviation)/range
Manual self-pollination	60	65/61	93.8/40.58	925.6 (± 338.8) ^b /192–1670
Manual cross-pollination	51	60/53	88.3/47.36	1080 (± 269.7) ^a /417–1584
Agamospermy	46	50/46	92/0	0
Control (natural pollination)	60	80/74	92.5/41.18	1190 (± 317.4) ^a /339–1741

* Based on mean of ovules (2281).

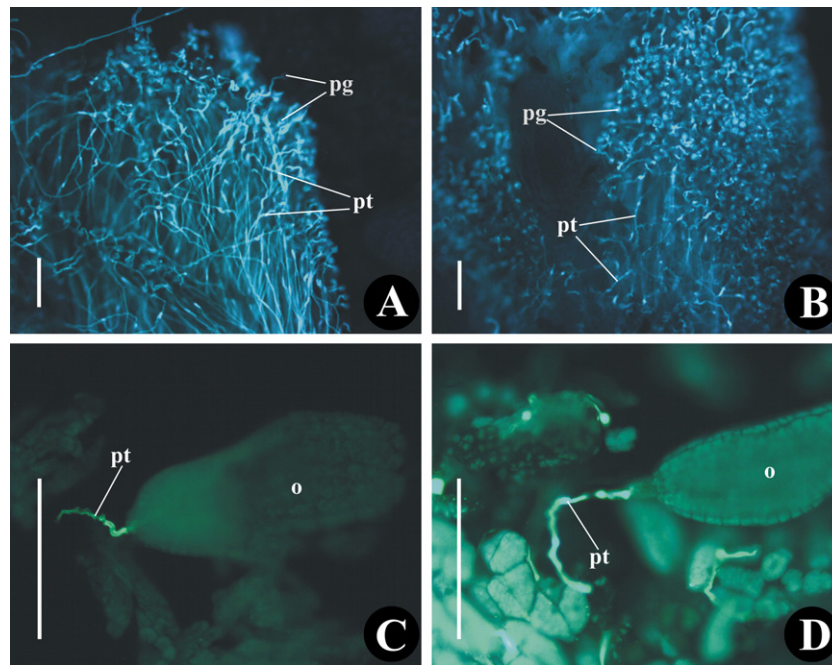


Fig. 8. Pollen tubes of *Mourera fluviatilis* in fluorescence microscopy. (A) Pollen grains (pg) and pollen tubes (pt) in the stigma, 24 h after manual self-pollination (magnification 10 $\times$). (B) Pollen grains (pg) and tubes (pt) in the stigma, 24 h after cross-pollination (magnification 10 $\times$). (C) Pollen tube (pt) resulting from cross-pollination 24 h, penetrating the ovule (o) (magnification 20 $\times$). Scale bar = 100 μ m. (D) Pollen tube (pt) resulting from manual self-pollination 48 h, penetrating the ovule (o) (magnification 20 $\times$).

stigmatic surface usually exhibits structural projections that maximize pollen grain capture (Whitehead, 1969; Stebbins, 1970). These structures are lacking in *M. fluviatilis*, and the sites with stigmatic papillae are restricted to the apex of each style (Fig. 3B and C), clearly hindering the capture of pollen grains transported by wind.

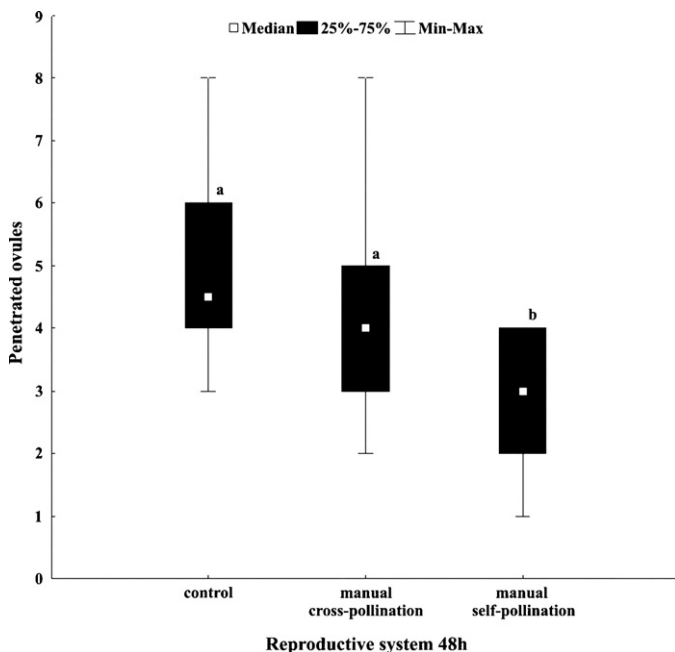


Fig. 9. Counting of the first 200 penetrated ovules of *Mourera fluviatilis* and statistical analysis of the obtained data (Kruskal–Wallis tests, $\alpha = 5\%$). Comparison of penetration of pollen tubes between control ovules, and ovules resulting from manual cross-pollination and manual self-pollination, 48 h after pollination. There was a significant difference between treatments ($H = 8.8$, $df = 2$, $p = 0.009$), except for control and manual cross-pollination, which were not different from each other. Different letters show statistical significance.

Faegri and van Der Pijl (1979) and Proctor et al. (1996) explained that even in species with a zoophilic syndrome, stochastic pollen transfer by wind that successfully reaches the stigma occurs occasionally.

Apart from the small role of the wind as a pollen vector of this species, the low amount of seed set in the experiment with exposed emasculated flowers may be explained by the decrease in attractiveness of emasculated flowers to pollinator bees. Since the stamens are the most conspicuous floral parts of *M. fluviatilis*, their removal reduced floral attractiveness and significantly affected the reproductive success of this species. Rutishauser and Grubert (1994) mentioned that, similarly to other angiosperms such as Myrtaceae and Mimosoideae, *M. fluviatilis* shows brush-flowers, whose attractiveness has focused on stamens. However, biotic transport of pollen among flowers, as well as self-pollination at the end of the anthesis, seemed to be more feasible events in the pollination system of this species. The occurrence of self-pollination in *M. fluviatilis* is indicated by the high seed-set in the absence of pollinators, on the wind pollination and insect exclusion (non-emasculated) treatments (Table 2). The presence of floral morphs, whose length of stamens enables self-pollination (Fig. 5E1), supports these results. Considerable morphological plasticity of the flowers of *M. fluviatilis*, from the Venezuelan Amazon, was found by Rutishauser and Grubert (1994). These authors found a different number of stamens (16–20) and tepals (14–40), compared with our results (Table 1). These observations suggest a wide variation in floral traits, that may affect the attractiveness to pollinators among different localities. In scenarios unfavorable to bee visits, such as in turbulent river parts, probably self-pollination at the end of anthesis is the only option that would ensure reproduction in *M. fluviatilis*.

The high fruit set rate observed in *M. fluviatilis* is common in other Podostemaceae (see Philbrick, 1984; Philbrick and Novelo, 1997, 1998; Khosla et al., 2000, 2001). In this species it is probably related to an efficient performance of pollination agents, to self-compatibility and to autogamy. Jäger-Zürn (1997) cited that seed set of *Weddellina squamulosa* Tul. frequently reaches 100%

probably due to its floral morphology favorable to autogamy and self-compatibility, though Rutishauser (1997) commented on the possibility of bee visits to flowers of this species. In *Podostemum ceratophyllum* A. Michaux, Philbrick (1984) observed the occurrence of autogamy and cleistogamy. In *Marathrum rubrum* Novelo and Philbrick, experimental evidences with lower seed set in xenogamy, suggest the autogamy as the main component of the reproductive system (Philbrick and Novelo, 1998). Khosla et al. (2000) and Khosla and Sehgal (2009) observed a predominance of autogamy in *Polypleurum stylosum* (Wight) Hall. and in *Indotristicha ramosissima* (Wight) van Royen, respectively; whereas *Griffithella hookeriana* (Tul.) Warm. and *Hydrobryopsis sessilis* (Willis) Engl. exhibited exclusively cleistogamy (Khosla et al., 2001; Sehgal et al., 2009). The cleistogamy observed by us in *M. fluviatilis* was also registered by Rutishauser and Grubert (1999) in populations of this species in the Venezuelan Amazon. According to those authors, only the proximal floral buds of the inflorescence could be cleistogamous. Although the reason for this pattern still needs to be discovered, we noticed that the ratio between the floral buds that produced seeds and the number of seed produced indicate that cleistogamy is a rare event in the studied populations.

Autogamy, including cleistogamy, is frequent in other Podostemaceae species and in the other families of aquatic phanerogams (Sculthorpe, 1967; Philbrick, 1988; Philbrick and Les, 1996), explained as a response to the availability of pollinators (Lloyd and Schoen, 1992; Stebbins, 1957; Cruden, 1977) or to ecological pressures that compromise chasmogamy (Sculthorpe, 1967; Philbrick and Les, 1996; Mohan Ram and Sehgal, 2001). Lloyd and Schoen (1992) explain that autogamous species may have a high fruit set, followed by a low seed set. The low energetic cost associated with the production of flowers that are unattractive to pollinators can explain the high fruit formation; since the energy spared could be allocated to fructification (Bawa and Beach, 1981; Lloyd and Schoen, 1992). However, we observed in *M. fluviatilis* agamospermous capsules carrying only aborted ovules. Similar to other Neotropical Podostemaceae (Accorsi, 1951; Grubert, 1991). Philbrick (1984) noticed that the formation of capsules in *P. ceratophyllum* occurs independently of these capsules having seeds, and their maturation seems to be related only to desiccation mechanisms.

Values of the outcrossing index (*sensu* Cruden, 1977) point out that *M. fluviatilis* is facultatively autogamous. However, based on the set of reproductive attributes, we believe it is actually facultatively xenogamous. Cruden (1977) states that in facultatively autogamous species the relative importance of autogamy and xenogamy is inverted. Facultatively autogamous plants tend to self-pollinate at first, whereas the exposure of the receptive stigma to pollinators takes place afterwards. Facultatively xenogamous species would be primarily cross-pollinated, protandrous, self-incompatible, and would need pollen vectors. The exceptions, here including *M. fluviatilis*, are self-compatible, protogynous species, whose pollinators show no fidelity (Cruden, 1977). Based on observations of flower visitors and on comparative results of the pollen-ovule ratio among Podostemaceae species, Okada and Kato (2002) reached similar conclusions about the reproductive system of *M. fluviatilis*.

In short, we confirm our two hypotheses, that both – autogamy and anemophily – do occur, but the latter is probably less important, and secondly we conclude that self-pollination is less successful than cross-pollination in *M. fluviatilis*.

Acknowledgements

We thank Msc. P. Gomes (UNESP) and R. Carvalho (UFPE) for help with the confection of some plates; Dra. A.S. Tavares (UFSC) for taxonomic confirmation of the *Mourera* species, and Msc. A.

Carvalho (UFPB) for identifying of the bee species. We also thank Msc. P. Gomes (UNESP) for her help with the statistical analysis; Dr. Jan Vermaat and an anonymous reviewers gave constructive criticism on the manuscript, and National Council for Research and Development (CNPq) for partial financial support.

References

- Accorsi, W.R., 1951. Contribuição para o estudo biológico e ecológico das Podostemaceae do Salto de Piracicaba III. An. Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz 8, 747–768.
- Ameka, G.K., Clerck, G.C., Pfeifer, E., Rutishauser, R., 2003. Development morphology of *Ledermannia bowlingii* (Podostemaceae) from Ghana. Plant Syst. Evol. 237, 165–183.
- Bawa, K.S., Beach, J.H., 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. Ann. Missouri Bot. Gard. 68, 254–274.
- Bezuidenhout, A., 1964. The pollen of African Podostemaceae. Pollen et Spores 6, 463–478.
- Burke, S., 2001. Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods. LC GC Europe Online Supplement 5, 19–24.
- Cook, C.D.K., 1988. Wind pollination in aquatic Angiosperms. Ann. Missouri Bot. Gard. 75, 768–777.
- Cook, C.D.K., 1990. Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands.
- Cook, C.D.K., Rutishauser, R., 2007. Podostemaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.), The Families and Genera of Vascular Plants, vol. 9. Springer, Berlin, DE, pp. 304–344.
- Cruden, R.W., 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31, 32–46.
- Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C., 2005. Practical Pollination Biology. Enviroquest Ltda Press, Canada.
- Erdtman, G., 1969. Handbook of Palynology. Hafner Publishing, New York, USA.
- Faegri, K., van Der Pijl, 1979. The Principles of Pollination Ecology. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Galen, C., Plowright, R.C., 1987. Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. Can. J. Bot. 65, 107–111.
- Gessner, F., Hammer, L., 1962. Ökologisch-physiologische Untersuchungen an den Podostemaceen des Caroni. Int. Rev. Gesamten Hydrobiol. 47, 497–541.
- Grubert, M., 1974. Podostemaceen-Studien. Teil 1. Zur Ökologie einiger venezolanischer Podostemaceen. Beitr. Biol. Pflanz 50, 321–391.
- Grubert, M., 1991. Ecología de fanerógamas de saltos tropicales adaptadas en forma extrema. Natúra 91, 54–61.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1985. Atlas Nacional do Brasil: região Nordeste. IBGE, Rio de Janeiro.
- ITEP – Instituto de Tecnologia de Pernambuco, 2009. Precipitation dates. Available at <http://www.itep.br/LAMEPE.asp> (accessed August 2009).
- Jäger-Zürn, I., 1997. Embryological and floral studies in *Weddellia squamulosa* Tul. (Podostemaceae Tristichioideae). Aquat. Bot. 57, 151–182.
- Khosla, C., Mohan Ram, H.Y., 1993. Morphology of flower, fruit and seed in *Polypleurum stylosum*. Aquat. Bot. 46, 255–262.
- Khosla, C., Sehgal, A., 2009. Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae; Tristichioideae). Aquat. Bot. 91, 51–56.
- Khosla, C., Shivanna, K.R., Mohan Ram, H.Y., 2000. Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). Aquat. Bot. 67, 143–154.
- Khosla, C., Shivanna, K.R., Mohan Ram, H.Y., 2001. Cleistogamy in *Griffithella hookeriana* (Podostemaceae). S. Afr. J. Bot. 67, 320–324.
- Leme, E.M.C., Siqueira-Filho, J.A., 2006. A Mata Atlântica: aspectos gerais. In: Siqueira-Filho, J.A., Leme, E.M.C. (Eds.), Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste – biodiversidade, conservação e suas bromélias. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro, BR, pp. 47–79.
- Lobreaux-Callen, D., LeThomas, A., Suarez-Cervera, M., 1998. Caractères ultrastructuraux du pollen de quelques Podostémales. Affinités avec les Rosidae évoluées. C. R. Acad. Sci. 321, 335–345.
- Lloyd, D.G., Schoen, D.J., 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. Int. J. Plant Sci. 153, 358–369.
- Maêda, J.M., 1985. Manual para uso de Câmara de Neubauer para contagem de grãos de pólen em espécies florestais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Martin, F.W., 1959. Standing and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Tech. 34, 125–128.
- Mohan Ram, H.Y., Sehgal, A., 2001. Biology of Indian Podostemaceae. Phytomorphology Golden Jubilee Issue, 361–391.
- Mukkada, A.J., 1969. Some aspects of the morphology, embryology and biology of *Terniola zeylanica* (Gardner) Tulasne. New Phytol. 68, 1145–1158.
- Okada, H., Kato, M., 2002. Pollination systems inferred from pollen-ovule ratios of some species of Podostemaceae. Acta Phytotax. Geobot. 53, 51–61.
- Philbrick, C.T., 1981. Some notes regarding pollination in a New Hampshire population of *Podostemum ceratophyllum* Michx (Podostemaceae). Rhodora 48, 319–321.
- Philbrick, C.T., 1984. Aspects of floral biology, breeding system, and seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). Syst. Bot. 9, 166–174.
- Philbrick, C.T., 1988. Reproductive biology of freshwater aquatic Angiosperms: an introduction. Ann. Missouri Bot. Gard. 75, 739–740.
- Philbrick, C.T., Bogle, A.L., 1988. A survey of floral variation in five populations of *Podostemum ceratophyllum* Michx Podostemaceae. Rhodora 90, 113–121.

- Philbrick, C.T., 2004. Podostemaceae (River-Weed family). In: Smith, N., Mori, S.A., Henderson, A., Stevenson, D.W., Heald, S.V. (Eds.), *Flowering Plants of Neotropics*. Princeton University Press, Princeton and Oxford, UK, pp. 302–304.
- Philbrick, C.T., Les, D.H., 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience* 46, 813–826.
- Philbrick, C.T., Novelo, A.R., 1995. New world Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* 47, 210–222.
- Philbrick, C.T., Novelo, A.R., 1997. Ovule number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquat. Bot.* 57, 183–200.
- Philbrick, C.T., Novelo, A.R., 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquat. Bot.* 62, 199–206.
- Philbrick, C.T., Bove, C.P., Stevens, H.I., 2010. Endemism in neotropical Podostemaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 97, 429–460.
- Proctor, M., Yeo, P., Lack, A., 1996. *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Portland, OR, USA.
- R Development Core Team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R., Bell, C.R., 1974. *Vascular Plant Systematics*. Harper and Row Publishers, New York, USA.
- Regal, P., 1982. Pollination by wind and animals: ecological and geographic patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13, 497–524.
- Robinsohn, I., 1924. Die Färbungsreaktion der Narbe, Stigmatochromie, als morphobiologische Blütenuntersuchungsmethode. *Sitzungsberichte Akad. Wiss. Wien, Math., Abt.* 133, 180–213.
- Rutishauser, R., 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquat. Bot.* 57, 29–70.
- Rutishauser, R., Grubert, M., 1994. The architecture of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae). I. Mature structures and leaf development. *Bot. Helv.* 104, 179–194.
- Rutishauser, R., Grubert, M., 1999. The architecture of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae): developmental morphology of inflorescences, flowers and seedlings. *Am. J. Bot.* 86, 907–922.
- Sculthorpe, M.A., 1967. *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. Edward Arnold, London, UK.
- Sehgal, A., Sethi, M., Moham Ram, H.Y., 2009. Development of the floral shoot and pre-anthesis cleistogamy in *Hydrobryopsis sessilis* (Podostemaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 159, 222–236.
- Stebbins, G.L., 1957. Self fertilization and population variability in the higher plants. *Am. Nat.* 91, 337–354.
- Stebbins, G.L., 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in Angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1, 307–326.
- Tavares, A.S., 1997. Podostemaceae de alguns rios de água preta do Estado do Amazonas. Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, Brasil.
- Tippery, N.P., Philbrick, C.T., Bove, C.P., Les, D.H., 2011. Systematics and phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Syst. Bot.* 36, 105–118.
- Van Royen, P., 1951. The Podostemaceae of the new world. Part I. *Meded. Bot. Mus. Herb. Rijks Univ. Utrecht* 107, 1–150.
- Van Royen, P., 1953. The Podostemaceae of the new world. Part II. *Acta Bot. Neerl.* 2, 1–20.
- Vogel, S., 1963. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung. Über Bau und Funktion der Osmophoren. *Akad. Wiss. Literatur. Math-Naturwiss. Kl* 10, 600–763.
- Whitehead, D., 1969. Wind pollination in the angiosperms: evolutionary and environmental considerations. *Evolution* 23, 28–35.
- Went, F.A.F.C., 1926. Untersuchungen über die Podostemaceen III. *Verhandl. Konink. Akad. Wetensch. Amsterdam* 25, 1–59.
- Willis, J.C., 1902. Studies in the morphology and ecology of Podostemaceae of Ceylon and India. *Ann. Roy. Bot. Gard., Peradeniya* 1, 268–465.
- Zapata, T.R., Arroyo, M.T.K., 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10, 221–230.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, Third edition. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River, NJ, USA.

Resumo

Plantas aquáticas apresentam diversos mecanismos de reprodução, devido às suas múltiplas origens evolutivas. Elas permeiam em um gradiente desde a mais simples estratégia de propagação à mecanismos altamente sofisticados de mutualismo. Dentro desse grupo, Podostemaceae diferencia-se pela plasticidade morfo-estrutural que lhe confere extrema adaptabilidade a ambientes inóspitos para a maioria das angiospermas. Elas crescem em rios de cachoeiras e correntezas rápidas, respondendo pela produção do carbono autóctone e manutenção da biota associada. Do ponto de vista da reprodução, Podostemaceae estão entre as aquáticas menos conhecidas. A maioria das informações é de referências clássicas e baseadas em características morfológicas das flores. Logo, nosso objetivo foi descrever a antecologia de *Apinagia* spp., *Mourera fluviatilis* e *Tristicha trifaria*; os mecanismos de polinização e os sistemas de cruzamento, em rios associados à Floresta Atlântica Nordeste. A tese está dividida em seis partes. Na primeira, apresentamos uma revisão sobre o atual estado de conhecimento a cerca da reprodução sexuada de Podostemaceae. No segundo capítulo, nos detivemos em verificar se os caracteres morfológicos de *Apinagia* spp. podem trazer inferências sobre seus sistemas reprodutivo e de polinização. No terceiro capítulo, estudamos experimentalmente em campo os sistemas reprodutivos e de polinização de três espécies do gênero *Apinagia*. O quarto capítulo trata de um estudo de caso com *Tristicha trifaria*, uma espécie amplamente distribuída nos neotrópicos. E no sexto e último, eu apresento um estudo de caso de *Mourera fluviatilis*, espécie com distribuição disjunta amazônico-nordestina. Com meus dados, verifiquei que Podostemaceae apresentam diferentes estratégias reprodutivas entre espécies e dentro da mesma espécie. Dentro do grupo que estudei, registrei: alogamia mediada por insetos e por vento (*Mourera fluviatilis*, *Apinagia* spp.) e autogamia como principal sistema reprodutivo (*Tristicha trifaria*). A maioria de suas espécies possuem atrativos para e visitantes florais (*Mourera fluviatilis*, *Apinagia* spp.) ou são estritamente autopolinizadas (*Tristicha trifaria*); ou ainda usam esta última estratégia como mecanismo de polinização “tardia” (*Mourera fluviatilis*, *Apinagia* spp.). Nas espécies estudadas observei papel relevante do vento como vetor de polinização, mesmo naquelas cujas flores são visitadas por insetos. Observei ainda uma associação entre esses resultados descritos e muitas das características morfológicas e apresento e discuto quais seriam melhores preditores morfológicos das estratégias de reprodução na família. Todos esses meus dados sustentam a variabilidade de estratégias reprodutivas encontradas em Podostemaceae, indicando ainda que ambofilia seja estratégia relevante no grupo.

Palavras – chave: reófitas; ecologia da polinização; ambofilia; estratégias de cruzamento misto; autogamia.

Abstract

Aquatic plants have several mechanisms of reproduction, due to its multiple filogenetic origins. They permeate in a gradient from simplest propagation strategy to highly sophisticated mutualism. In this group, Podostemaceae differentiates itself by morpho-structural plasticity which gives it extreme adaptability to harsh environments for most of angiosperms. They growing in waterfalls and running waters answered by autochthonous carbon production and maintenance of associated biota. About reproduction, Podostemaceae are the least known between aquatic plants. Many date is based on classical references and morphological features of flowers. Therefore, our objective was to describe the Anthecology of *Apinagia* spp., *Mourera fluviatilis*, and *Tristicha trifaria*; pollination mechanisms and breeding systems, in rivers associated with the Northeastern Atlantic Forest. This thesis is divided into six parts. At first, we present an overview of the current state of knowledge about the sexual reproduction of Podostemaceae. In the second chapter, I checked if the morphological characters of *Apinagia* spp. can make inferences about their breeding systems and pollination. In the third chapter, we study experimentally in the field the breeding and pollination systems of three species of the genus *Apinagia*. The fourth chapter is a case study with *Tristicha trifaria*, a species widely distributed in the neotropics. And the sixth and last, I present a case study of *Mourera fluviatilis* species with disjunct distribution Amazonian-Northeast. With my data, I found that Podostemaceae have different reproductive strategies between species and within the same species. Within the group I studied, I recorded: outcrossing mediated by insects and wind (*Mourera fluviatilis*, *Apinagia* spp.) and autogamy was the main breeding system (*Tristicha trifaria*). Most species have have flower attractive to visitors (*Mourera fluviatilis*, *Apinagia* spp.); or are strictly self-pollinated (*Tristicha trifaria*); or still use the latter strategy as "latter" pollination mechanism (*Mourera fluviatilis*, *Apinagia* spp.). In the species studied role watched as the wind vector pollination, even those whose flowers are visited by insects. Still observed an association between these results and described many of the morphological and present and discuss what would be best predictors of morphological reproductive strategies in the family. My all these data support the variability of reproductive strategies found in Podostemaceae, further indicating that ambophily strategy is relevant in this group.

Key – words: reophytes; pollination ecology; ambophily; Mixed mating systems; autogamy.

Apêndices

Normas das Revistas



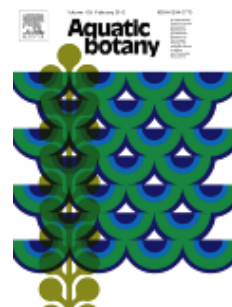
AQUATIC BOTANY

An International Scientific Journal dealing with Applied and Fundamental Research on Submerged, Floating and Emergent Plants in Marine and Freshwater Ecosystems

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.3



ISSN: 0304-3770

DESCRIPTION

Aquatic Botany is concerned with fundamental studies on structure, function, dynamics and classification of **plant-dominated aquatic communities** and **ecosystems**, as well as molecular, biochemical and physiological aspects of **aquatic plants**. It is also an outlet for papers dealing with applied research on plant-dominated aquatic systems, including the consequences of disturbance (e.g. transplantation, influence of herbicides and other chemicals, thermal pollution, biological control, grazing and disease), the use of aquatic plants, conservation of resources, and all aspects of aquatic plant production and decomposition.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Aquatic Botanists, Marine and Freshwater Ecologists.

IMPACT FACTOR

2011: 1.516 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

ABSTRACTING AND INDEXING

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
BIOSIS
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
EMBiology
Ecological Abstracts
Ecology Abstracts
Fisheries Review
Freshwater and Aquaculture Contents Tables
Marine Science Contents Tables
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

J.E. Vermaat, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, Netherlands, **Email:** jan.vermaat@falw.vu.nl
E.M. Gross, University of Lorraine, Metz, France, **Email:** gross5@univ-lorraine.fr

Honorary Editor:

G. Bowes, University of Florida, Gainesville, FL, USA

Consulting Editor:

C. den Hartog, Nijmegen, Netherlands

Editorial Advisory Board:

J. Armstrong, Hull, UK
S. Beer, Tel Aviv, Israel
I. Blindow, Kloster, Germany
H. Brix, Aarhus, Denmark
J.W. Eaton, Liverpool, UK
S. Hilt, Berlin, Germany
M.J.M. Hootsmans, Nieuwegein, Netherlands
D.H. Les, Storrs, CT, USA
S.C. Maberly, Ambleside, UK
N. Marba, Esporles (Iles Balears), Spain
M.F. Pedersen, Roskilde, Denmark
G. Peralta Gonzalez, Puerto Real Cadiz, Spain
T. Riis, Risskov, Denmark
F.T. Short, Durham, NH, USA
B.K. Sorrell, Aarhus, Denmark
J. Terrados, Esporles, Spain
J.E. Titus, Binghamton, NY, USA
T. Wernberg, Crawley, WA, Australia

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Aquatic Botany is concerned with fundamental studies on structure, function, dynamics and classification of plant-dominated aquatic communities and ecosystems, as well as molecular, biochemical and physiological aspects of aquatic plants. It is also an outlet for papers dealing with applied research on plant-dominated aquatic systems, including the consequences of disturbance (e.g. transplantation, influence of herbicides and other chemicals, thermal pollution, biological control, grazing and disease), the use of aquatic plants, conservation of resources, and all aspects of aquatic plant production and decomposition.

Types of paper

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor

Regular papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or appropriate critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief.

Authors are encouraged to place all species distribution records in a publicly accessible database such as the national Global Biodiversity Information Facility (GBIF) nodes (www.gbif.org) or data centers endorsed by GBIF, including BioFresh (www.freshwaterbiodiversity.eu)"

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review.

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqbot/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and e-mail addresses of 4 potential referees.

Page charges

Aquatic Botany has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required, no longer than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text:

All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed chronologically.

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Stewart, D.A., Agnew, D., Boyd, R., Briggs, R., Toland, P., 1993. The derivation of changes in Nephrops per unit effort values for the Northern Ireland fishing fleet. *Fish. Res.* 17, 273-292.

b. For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical

Roberts, R.J., 1993. Ulcerative dermal necrosis (UDN) in wild salmonids. In: Bruno, D.W. (Ed.), *Pathological conditions of wild salmonids*. *Fish. Res.* 17, 3 14.

c. For books

Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials*. Elsevier, Amsterdam.

d. For multi-author books

Bucke, D., 1989. Histology. In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. Wiley, New York, pp. 69-97.

In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see <http://www.elsevier.com/googlemaps>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader© version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional reprints can be ordered on a reprint order form which will be sent to the corresponding author of the accepted article by the publisher.

Author's discount

Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

PLANT BIOLOGY

Author Guidelines

Downloads: Copyright Assignment Form, Colour Work Agreement Form, Page Charge Form.

Supplementary Material: Authors are encouraged to provide additional information as supplementary material that will be accessible online. Please identify the supplementary material as such in the manuscript.

Editorial Policy

Plant Biology publishes research results from all fields of plant science. Manuscripts must be of general interest, not only addressed to a specialized readership. The journal encourages publications with an interdisciplinary approach.

Plant Biology accepts

1. Problem-oriented original research papers (maximum 9000 words)
2. Problem-oriented short research papers (maximum five printed pages)
3. Concise review articles
4. Acute views, i.e., comments on actual problems and provocative opinion articles.

Purely descriptive papers will not be accepted. The Editors welcome contributions from all over the world.

Submission of Manuscripts

Please submit your manuscript online at ScholarOne Manuscripts (*Plant Biology* no longer accepts submissions made by post or e-mail).

To submit a manuscript through ScholarOne Manuscripts, please follow these instructions:

1. If you do not yet have an account, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/plabio> and click on 'Create Account'. You will then be sent a password by e-mail. If you already have an account, enter your user ID and password and click on 'Log In'. (Note: if necessary you can change your password under 'Edit My Account'.)
2. On the welcome page, click on 'Corresponding Author Center'.
3. You then reach the 'Author Center Dashboard', click on the star icon for manuscript submission.
4. Follow the steps 1-7 until manuscript submission is completed. The main document including title, abstract, key words (MS Word file), tables (MS Word files) and figures (*.eps, *.tif or *.jpg files) are loaded onto the system as individual files. The text should be written double spaced and with line numbering. (Note: you may also interrupt the online submission and continue at a later time.) Authors are encouraged to provide additional information as Supporting Information that will be accessible online.
5. **Fast-Track Publication:** *Plant Biology* offers special handling of manuscripts that have been rejected from very high-level journals. Authors are encouraged to enclose the original manuscript, the reviews plus the comments from the editor, and the revised manuscript of previously reviewed manuscripts to expedite their handling as your manuscript may be accepted based on the previous reviews. Please also include a letter with a point by point response to the concerns raised by the reviewer(s). You will receive a final decision from the Managing Editor within a few days of submitting manuscripts with reviews.

6. Authors should address the following points in their cover letter. 1. What are the aims and hypothesis of their paper?; 2. What new achievements or innovations do they present?; 3. What is the general significance of their paper and why is it timely?

7. Submission of your manuscript will be confirmed by an e-mail that will give you the 'Manuscript ID Number'. Please refer to this number in all correspondence with the editorial office. With your submission, you guarantee that all co-authors agree with the submission of the manuscript. Should you encounter difficulties submitting a manuscript to ScholarOne Manuscripts, please contact the editorial office by e-mail at annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone ++49(0)761/203-8300. Help is also available on the introductory page of ScholarOne Manuscripts in the form of an 'Online User's Guide'. To access the guide, click on 'Get Help Now' in the top right-hand corner.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Conditions for Publication

Research papers may be submitted that have not been published previously, even as a summary. Concise presentation is required. Although the non-specialist reader should be kept in mind when abstracts, introductions and discussions are written, lengthy review type introductions and speculative discussions should be avoided. Experimental methods should be explained in detail except for standard procedures. Diffuse and repetitive style should be avoided. Illustrations and tables should be limited to the truly essential material.

Plant Biology preferentially publishes **short research papers** (five printed pages maximum) that will be reviewed with high priority.

Concise review articles that synthesize the state of the art in an original way are highly desirable for this journal.

Acute views contributions should contain brief comments on an actual problem.

CrossCheck for plagiarism: All submissions will be run through CrossCheck to identify any plagiarism. If an author is found to have plagiarized all or parts of his or work, the author's institute will be notified of the breach of scientific conduct.

New: Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscripts professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Length of Papers

Papers should not exceed 8 printed pages or 9,000 words. One printed page in the journal (without figures and tables, with about 3 subheads and paragraphs) usually contains roughly 6200 characters. The number of figures plus tables should not exceed 9. Appendices will be published

as Supporting Information rather than in the main text.

References: About 40 to 50 references usually fill one printed page.

Page Charges: Original research papers longer than the guidelines given above when in proof are subject to a page charge at a rate of €125 per page above the 8-page limit (first 8 pages are free of charge). An invoice will be sent to authors for these charges upon print publication of their article. Invited and review articles are excluded from this rule.

Arrangement

Research papers

Title page: The first page of each paper should indicate: The title, the authors' names and affiliations, a short title for use as running head, the name, address, e-mail address, phone and fax number of the corresponding author, and 3 to 7 keywords.

Abbreviation: List with abbreviations where appropriate.

Abstract: The abstract must not exceed 250 words. It should include the hypothesis, explain the novelty of the work, and what it adds to the body of scientific knowledge.

The following sections cover the usual contents: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References (see below), Tables (see below), Figure legends (see below), Illustrations (see below).

In Materials and Methods, Results and Discussion subheadings are possible. If an author chooses to combine sections Results and Discussion, an additional section Conclusions can be added, but this must be brief.

Concise review articles

Choose subheadings as appropriate but do not use a numbering system. Title page, Key words, Abstract and other items as for full length papers.

Tables

Tables must be serially numbered in Arabic numerals and each must carry a brief descriptive heading. Tables reproduced from other publications must state their precise source. Only signs that can be typeset should be used in the tables and legends. Please provide Tables in Word and include them at the end of the manuscript after the References, each on a separate page. Refrain from using both tables and graphs to demonstrate the same results.

Figures and Graphics

Electronic artwork

It is essential that all artwork is provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Post-script (EPS) format and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Please do not embed any tables and/or figures in the text document.

If you should encounter difficulties upon submitting figures and graphics, please contact the editorial office by e-mail under annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone under ++ 49/(0)761/203-8300.

Colour illustrations: Authors are required to cover the cost of colour printing. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. Colour printing costs €300 per article + VAT. Please supply colour work as eps, tiff or jpg files. The colour work form can be downloaded as a PDF from the internet. [To download PDF

files you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://get.adobe.com/uk/reader>.

All completed forms should be addressed to the Production Editor at the following address:

Plant Biology
Wiley-Blackwell
9600 Garsington Road,
Oxford, OX4 2DQ
UK

Please address any queries in relation to colour reproduction to plb@wiley.com.

References

The list of references must include all (but no additional) references quoted. Arrange references alphabetically according to author name, not chronologically. The name of the journals containing the cited papers should be given in full. Town/city and country names should be provided for non-journal refs.

Each article reference should be given as in the following example:

Alfano J.R., Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annual Review Phytopathology*, **42**, 385–414.

Books or other non-serial publications which are quoted in the references must be cited as follows:

Gage J.D., Tyler P.A. (1991) *Deep-sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep-sea Floor*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 504 pp.

Lester R.N., Hasan S.M.Z. (1991) Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. In: Hawkes J.G., Lester R.N., Nee M., Estrada N. (Eds), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew; London, UK: 369–387.

Articles not yet published may only be cited if they have definitely been accepted for publication. They must be denoted by the expression 'in press'.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Units

Plant Biology will follow the system of SI units (Système International d'Unités). Within a given paper chosen units must be uniform.

Abbreviation

Note that common abbreviations can be used without explanation. Others must be explained. In case of doubt always give an explanation. Use FW = fresh weight and DW = dry weight.

Scientific Names

Scientific names should be cited in their complete form when first mentioned with genus - species - authority - cultivar (cv.) or subspecies (ssp.) where appropriate. Latin names should be underlined or typed in *italics*. Subsequently the generic names should be abbreviated, but avoid confusion: e.g. use *A. comosus* if the only genus with a first letter A in your paper is *Ananas*; but use unambiguous abbreviations if you have more than one genus with the same first letter, e.g. *Ananas comosus*, *Aechmea nudicaulis* = *A. comosus*, *Ae. nudicaulis*, etc. Common names of organisms must be accompanied by the correct scientific name when first mentioned. For rare or exotic

genera it may be useful to give the name of the family and/or higher taxon in brackets when first mentioned.

Copyright

Authors will be required to assign copyright of their paper to the German Botanical Society, Royal Botanical Society of the Netherlands and Blackwell Publishing. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright should tick box 3 on the form). Download the Copyright Assignment Form [here](#). The publishers will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce their contributions to the journal.

Reprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. The corresponding author will be asked to provide up to seven email addresses for early distribution of a PDF offprint by the publisher. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for the printed offprints to take up to 8 weeks to arrive after publication of the journal. For further information please contact C.O.S. Printers PTe Ltd, 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; E-mail: offprint@cosprinters.com.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, the Publisher will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible after the final decision about publication.

Production

You will receive a proof of your article approximately 4 weeks after acceptance. The proof will contain instructions on how to return corrections and answers to the queries listed at the end of the proof. Please note that the journal does not accept e-annotated PDFs. Please submit hand-written or typed modifications only.

Last update: February 2013

***Oecologia* Author Instructions – General**

Instructions for authors at Springer.com do not include all formatting expectations for *Oecologia* submissions. *Oecologia*'s Editors-in-Chief have combined all of Springer's instructions along with their additional detailed expectations into two user-friendly files; "*Oecologia* Author

Instructions – General" and "*Oecologia* Author Instructions – Figures". Please prepare submissions to *Oecologia* according to the instructions in these two files. Submissions that do not follow these guidelines may be returned to authors or their review may be delayed.

[Aims and scope](#)

[Legal and ethical requirements](#)

[Manuscript submission and preparation](#)

[Manuscript contents](#)

[After acceptance](#)

[Aims and scope](#)

Oecologia publishes innovative ecological research of general interest to a broad international audience. We publish several types of manuscripts in many areas of ecology:

Categories:

Concepts, Reviews and Synthesis

Views and Comments

Methods

Physiological ecology – Original research

Behavioral ecology – Original research

Population ecology – Original research

Plant-animal interactions – Original research

Community ecology – Original research

Ecosystem ecology – Original research

Global change ecology – Original research

Conservation ecology – Original research

Special Topic

In general, studies that are purely descriptive, mathematical, documentary, and/or natural history will not be considered.

In the *Concepts, Reviews and Syntheses* section, we seek papers on emerging issues in ecology, especially those that cross multiple boundaries in ecology, provide synthesis of important bodies of work or delve into new combinations of theory and observations with the potential to create new paradigms or challenge existing paradigms. These papers are usually invited, but we welcome unsolicited contributions. In the *Views and Comments* section we seek short papers with the intent to provide contrary and/or broader perspectives on papers recently published in *Oecologia*. Alternatively, pairs of short papers which present opposing views on a topic of high interest in the ecological research community will be published in this section, with the intent to stimulate open debate. In both cases, the papers must be relatively short (up to 5 printed pages in

Oecologia Author Instructions – General, Page 2 the case of opposing view pairs of papers, or up to 3 printed pages in the case of comments on previously-published work), and to contain not only an opinion or criticism on methods or statistics, but also relevant data or original analyses that support the opposing view or comment. Manuscripts or letters intended for the Views and Comments section will be reviewed by one of the Editors-in-Chief and a Handling Editor in the field appropriate to the submission. *Special Topics* are a collection of integrated papers on a critical topic of broad interest. Proposals for Special Topics should be submitted to one of the Editors-in-Chief. *Methods* are papers that outline new approaches that address standing questions in the discipline. *Original Research* papers are published by subject; they provide the core of our journal and represent original investigations that offer new insights into ecological systems.

Legal and ethical requirements

Submission of a manuscript implies that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or thesis); that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Declaration of authorship. Authorship means holding responsibility for a written piece of text or artwork. In science, it implies personal involvement in the design, conduct and reporting of new research. An author must have participated in the research, understand the data and the text, and be able to present the contents to others. Principles of authorship are sometimes neglected, leading to questionable assignment of authorship and diminution of the credit for those who deserve authorship.

Providing funds, supervising or hosting researchers, belonging to a research consortium, attending a meeting or a workshop, offering access to samples, organisms or sites, providing technical assistance or preparation of diagrams and tables deserve appropriate acknowledgement, but do not commonly entitle one to authorship. Exceptions are contributions that involve highly technical skills (methodology) or intellectual input (e.g. statistical expertise) that was key to the final product.

All *Oecologia* submissions are required to include a declaration of authorship, including submissions with a single author. The declaration must include an explanation of the contribution or activity of each author to the final product. Submit the declaration of authorship as a footnote on the manuscript title page, using capital initials of authors. When two or more authors share the same initials spell out the last (or middle) name of each to distinguish them. Please follow the format of the following examples:

For manuscripts with a single author, please use the following statement:

In addition,

- Plagiarism will not be tolerated. All text should represent contributions of the authors unless material is quoted and attributed to its original source. Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers.

- All animal experiments must have been conducted in conformity with the “Guiding principles in the care and use of animals” approved by the Council of the American Physiological Society. Evidence of the adherence to these principles should be apparent
 - All human studies must have been performed in accordance with the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki and reviewed by the appropriate ethics committee. The text should clearly state that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects should be omitted.
 - Authors must include a declaration that experiments comply with the current laws of the country in which the experiments were performed
 - Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.
- The Editors-in-Chief reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned requirements. The author(s) will be held responsible for false statements or for failure to fulfill the above-mentioned requirements.

Manuscript submission

Authors must submit their articles to "Oecologia" online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing, review and publication time. After passing a pre-review assessment for journal eligibility by an Editor-in-Chief and a Handling Editor, submitted manuscripts are subject to peer review and copy editing. Please log directly onto the link below and upload your manuscript following the on-screen instructions. For the review process, the manuscript may be submitted as one single file (PDF, Microsoft Word or Rich Text Format with embedded illustrations, tables, etc.). If the manuscript is accepted, original files (not pdf or html) of the final version of the manuscript must be uploaded for production. Online appendices (Electronic Supplementary Material, ESM) must be submitted in a separate file. There is a total file size limit of 60 MB for a manuscript submission, including ESM. If ESM (e.g., video) exceeds this size, please contact the appropriate Editor-in-Chief directly.

Submit Online

Manuscript preparation

- The length of articles should not exceed 10 printed pages (equivalent to approximately 35 submitted pages) including all references, tables, figures, and figure legends. Views and Comments submissions must be limited to 3 to 5 printed pages. One printed page corresponds to approximately 3 submitted pages, 850 words text, or 3 illustrations with their legends, or 55 references. There will be a charge of 100 €, plus 19% VAT, for each page exceeding this limit. Editors typically return manuscripts prior to review that are likely to exceed the page limit.
- Manuscripts must be written in English and double-spaced throughout (including references) with at least 2.5 cm (1 inch) margins. Please write in the active voice using the past tense only for methods and results sections.
- Page numbers are optional but should not be included on tables and figures. Pages in Electronic Supplementary Material (ESM) should be numbered separately.
- Line numbers are required and should run consecutively throughout the text, from the abstract through the figure legends. Do not number lines in tables, figures or ESM.
- Use a normal, plain font (e.g. Times New Roman) for text. Genus and species names should be in italics. The common names of organisms should not be capitalized
- Abbreviations should only be used for terms repeated at least 3 times. Abbreviations

should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

- Format dates as day-month-year with months abbreviated: e.g., 01-Jan-2008
- Use the equation editor of a word processing program or MathType for equations. (Note: If you use Word 2007, do not create equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.) Symbols for parameters should be *italicized*.
- Report values in equations, tables, figures and statistics with the number of digits that matches the precision of the data.
- Please always use Unicode (<http://www.unicode.org>) font for non-Roman characters. Use internationally accepted signs and symbols following the Standard International System of Units (SI, <http://physics.nist.gov/cuu/Units/units.html>) throughout the manuscript (in the text, tables and figures). Avoid complex units wherever possible (e.g. use “no. m⁻²” instead of “no. per 16 m²”). Units should use exponent notation and avoid multiplication and division symbols (e.g., “*”, “/”, “x”): i.e., “no. m⁻²” and not no./m²).
- Footnotes should not be used, except on the title page or in Tables.
- For indents, use tab stops or other commands, not the space bar.

Manuscript contents (in order)

- **Title page** The title should be concise and informative and less than 200 characters. Short titles (< 15 words) are best and are more often cited. The concept, problem or hypothesis to be tested should be clear from the title. The use of full taxonomic names in the title is discouraged; no taxonomic authorities should appear in titles. On the title page, include name(s) of author(s), the affiliation(s) of the author(s), and the e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author. A [declaration of authorship](#) is required to be included as a footnote on the title page.
- **Abstract** The abstract should start with theory -based objectives or hypotheses, end with explicit conclusions, and should not exceed 250 words in length. Refrain from giving detailed methods; in most cases the technique becomes obvious by the way results are reported. Avoid writing “is discussed” or “needs further research”, and instead end with a conclusive statement of how the work has furthered our ecological understanding. The abstract should not contain any undefined abbreviations or literature references.
- **Key words** Five key words should be supplied, indicating the scope of the paper and not repeating terms already used in the title. Each keyword should not contain more than two compound words, preferably only one.
- **Introduction**
- **Materials and methods** Some submissions, such as reviews, may depart from the typical format of Methods-Results-Discussion.
- **Results** Avoid “Results are shown in Figure 3”. Instead, say for example, Biodiversity declined with the addition of nitrogen (Fig. 3).” Be specific: e.g., “positively correlated” instead of “correlated”. Refer to magnitudes of effects (e.g. give effect sizes and confidence intervals) rather than just *P*-values.
- **Discussion**
- **Acknowledgements** Please keep this section as short as possible. Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. Compliance with

ethical standards may be stated in the cover letter rather than the acknowledgements section.

• **References** Literature citations in the text should be ordered chronologically and indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first author should be named, followed by "et al." For example, "Carlin (1992), Brooks and Carlin (2004, 2005), Jones et al. (2007) demonstrated..." OR "... well studied (Carlin 1992; Brooks and Carlin 2004, 2005; Jones et al. 2007)". References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references. References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Alphabetize the list of references by the last names of the first author of each work. If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of each reference. Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations (www.issn.org/2-22661-LTWAonline.php).

Reference examples:

Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Savidge WB, Blair NE (2004) Patterns of intramolecular carbon isotopic heterogeneity within amino acids of autotrophs and heterotrophs. *Oecologia* 139:178-189 doi: 10.1007/s00442-004-1500-z

Chapter in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers

Hobson KA (2003) Making migratory connections with stable isotopes. In: Berthold P, Gwinner E, Sonnenschein E (eds) *Avian migration*. Springer, Berlin, pp 379-391

Book: name and initial(s) of all authors; year; title; edition; publisher; place of Publication Körner C (2003) *Alpine plant life*, 2nd edn. Springer, Berlin

Theses: name and initial(s) of author; year; type (e.g., "Master thesis" or "PhD dissertation"); department; institution; place of publication.

Wilson JA (2004) *Habitat quality, competition and recruitment processes in two marine gobies*. PhD dissertation, Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

• **Tables** Each table should be submitted on a separate page, with the title (heading) above the table. Tables should be understandable without reference to the manuscript text. Restrict your use of tables to essential material. All tables must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Provide dimensions or units for all numbers. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading. Tables will be

printed with horizontal separation lines only (one below the table's header, one below the column headers, and one at the end of the table); no vertical lines will be printed. Use tab stops to align columns and center numbers around decimals when appropriate. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). The number of decimals presented should be sensible and match the precision of the data. Acceptable file formats for tables include Microsoft Word (.doc), Rich Text Format (.rtf) and Excel (.xls).

- **Figure legends** All figure legends (captions) should be assembled onto a separate page(s) preceding the figures. Each caption should be brief but sufficient to explain the figure without reference to the text. All figures must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Please [click here](#) for journal-specific instructions and examples.

- **Figures** Each figure should appear on a separate page, with its figure number but without the figure legend. Figure preparation is critical. Please [click here](#) for journal-specific instructions and examples.

- **Electronic Supplemental Material (ESM)** ESM are on-line appendices and may consist of information that is more convenient in electronic form (e.g. sequences, spectral data); large quantities of original data that relate to the manuscript (e.g. maps, additional tables and illustrations); and any information that cannot be printed (animations, video clips, sound recordings). Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. Figures embedded within the ESM text are fine. If spreadsheets are to be interactive, they should be submitted as .xls files (Microsoft Excel), otherwise submit as PDF. Always use MPEG-1 (.mpg) format for audio, video and animation. It is possible to submit multiple files in a .zip or .gz file. Name the ESM files consecutively, e.g. "ESM3.mpg". ESM must be numbered and referred to as "Online Resource". The manuscript text must make specific mention of the ESM material as a citation, similar to that of figures and tables, e.g., ". . . as shown in the animation (Online Resource 3)". ESM is not subject to copyediting and will be published as received from the author. Authors should format the ESM material exactly as they want it to appear; manuscript title, authors, and contact information for the corresponding authors should be included. Do not include line numbers. ESM will be available in color at no additional charge. Reference to ESM will be included in the printed version.

[After acceptance](#)

- **Proofs of accepted manuscripts** The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Authors of manuscripts accepted for publication are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content (e.g. new results, corrected values, title and authorship) are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office that handled the review before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum which will be hyperlinked to the paper. ESM will not be included in proofs (because ESM is not copy edited and will be made available exactly as it was provided by the authors).

- **Copyright Transfer Statement** If a manuscript is accepted after review the "Copyright Transfer Statement" must be signed and returned to the publisher prior to publication. Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. See Springer's "[Instructions for Authors](#)" for more information.
- **Online First** Accepted papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.
- **Reprints** Twentyfive reprints (offprints) of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs.
- **Springer Open Choice** In addition to our traditional publication process, Springer also provides an alternative open-access publishing option: *Springer Open Choice*. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, and in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before free access publication. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author [Springer Open Choice](#)

The Botanical Review

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

These guidelines are intended to increase the uniformity of manuscripts and will speed the editorial and review process. Authors are encouraged to contact the Editor (*The Botanical Review*, The NYBG Press, The New York Botanical Garden, Bronx, NY 104585126, U.S.A.; dws@nybg.org and jrunyon@nybg.org) whenever a contribution has some special requirement that is not discussed in the following guidelines.

GENERAL:

Legal requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain **permission** from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

SUBMISSIONS:

Manuscripts must be received in final form, fully revised and checked for typographical and other errors. Articles are obtained primarily by invitation. However, unsolicited submissions will be considered for publication.

Articles should be submitted in electronic form and sent to botrev@nybg.org.

The corresponding author will be asked to sign the Copyright Transfer form upon submission via Online Submission system. By signing the form, the corresponding author agrees that (1) the manuscript is authors' original research; (2) the manuscript has not been published elsewhere; (3) if accepted by *Botanical Review*, author will not publish it again elsewhere; (4) all coauthors are aware of, and agree with publication in *Botanical Review*; (5) the publication becomes property of the New York Botanical Garden Press; (6) payment for reprints/pdfs will be promptly made.

Submit your manuscript assembled in the following sequence:

Title page.—Title, author(s), address(es), running head. The **title page** should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Table of Contents.—Capitalize all proper nouns. Do not include page numbers. Make sure the entries agree **exactly** with headings in the text. Primary entries in the

Contents are preceded by a roman numeral; secondary entries, with a capital letter; tertiary entries, with an Arabic numeral; and quaternary entries, with a lowercase letter.

Keywords.— Please provide 4 to 6 **keywords** which can be used for indexing purposes.

Abstract.— Please provide an **abstract** of 100 to 150 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. Authors must provide an abstract in English and are urged to provide a translation into at least one other appropriate language (e.g., German, French, Spanish, Russian). The Abstract is given a primary heading numbered "I." here and in the Table of Contents.

Text.— See the guidelines below.

Acknowledgments.— Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References.—See the guidelines below.

Captions.—See the guidelines below.

Text footnotes.—See the guidelines below.

Tables.—Place each table on a separate page or in a separate file. See the guidelines below.

Appendix tables.—If present, place each appendix table on a separate page or in a separate file. See the guidelines below.

Illustrations.—See the guidelines below.

TABLES AND FIGURES

All tables and illustrations must be cited in numerical sequence in the text (Table I, Table II, etc.; Fig. 1, Fig. 2, etc.).

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table heading. The table title should explain clearly and concisely the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Figures

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each figure, please supply a figure caption.
- Identify all elements found in the figure in the caption.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the caption.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size. All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Line drawings should have a minimum resolution of 1200 dpi. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication. If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

If **Electronic supplementary material** (ESM) is submitted, it will be published as received from the author in the online version only. ESM may consist of:

- information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings
- information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- large original data, e.g. additional tables, illustrations, etc.
- If supplying any ESM, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., ". . . as show in Animation 3.").

For details on formats and other information, please follow the hyperlink to the specific instructions for electronic supplementary material on the right.

FOOTNOTES

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

TEXT

To expedite reviews and publication of your manuscript please follow these steps:

- A wide range of submission file formats is supported, including: Word, WordPerfect, RTF, TXT, TIFF, GIF, JPEG, EPS, LaTeX2E, TeX, Postscript, PICT, Excel, Tar, Zip and Powerpoint. PDF is not an acceptable file format.
 - Prepare your manuscript with single line spacing; use a normal, plain font (e.g. 10-point Times Roman) for text; and use the automatic page numbering function to number the pages. Do not use the field functions. Use tab stops or other commands for indents – not the space bar. Use the equation editor or MathType for equations. Note: If you use Word 2007, do not create equations with the default equation editor, but use MathType instead. Save your file in two formats: doc and rtf. Do not submit docx files.
- Headings, numbering.** Primary headings should be preceded by a roman numeral; secondary headings, with a capital letter; tertiary headings, with an arabic numeral; and quaternary headings, with a lowercase letter. Please use no more than three levels of displayed headings.

Terminology. Genus and species names should be in *italics*. The common names of animals should not be capitalized.

Abbreviations and acronyms. Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. Do not use a period after abbreviations for units of measure (e.g., mm, km, m).

SI units, numbers. Please always use internationally accepted signs and symbols for units, **SI units**.

Citations. Each item listed in the References must be cited in the text, the captions, the tables, or the appendixes, and vice versa. Citations in the text, the captions, the tables, or the appendixes must match those in the References (dates and spellings), and vice versa. Check spelling and dates, as well as diacritical marks in foreign language citations.

Examples of literature cited in the text, the captions, the tables, or the appendixes:

- For 1 author or editor: Knapp (2002) or (Knapp, 2002).
- For 2 authors or editors: Orndorff and Lang (1981) or (Orndorff & Lang, 1981).
- For 3 or more authors or editors, name only the first author or editor, followed by "et al.": Nixon et al. (1994) or (Nixon et al., 1994). All authors' or editors' names should appear in the References.
- For several different works in one citation, arrange the works **in alphabetical order or chronological order consistently** throughout the article, and use "a," "b," etc. for multiple works by the same author(s) or editor(s): (Baetke et al., 1978; Levin, 1965a, 1965b, 1965c, 1967; McHale & Alston, 1955) or (McHale & Alston, 1955; Levin, 1965a, 1965b, 1965c, 1967; Baetke et al., 1978).
- In press: Tretyn (in press) or (Tretyn, in press). If two or more works by the same author(s) or editor(s) are in press, use "a," "b," etc. to distinguish them.
- In preparation: Young (in prep.) or (Young, in prep.). If two or more works by the same author(s) or editor(s) are in preparation, use "a," "b," etc. to distinguish them.
- Unpublished research and personal communications may be cited in the text but should not included in the References: (P. Endress, unpubl.) or (P. Endress, pers. comm.).

REFERENCES

- Verify all entries against sources, especially journal titles, accents, diacritical marks, and spelling in languages other than English.
- List works by the same author(s) chronologically, beginning with earliest date of publication.
- Cite references in alphabetical order by the surname of the first author. (Multiauthored references are listed in alphabetical order of authors.)
- Cite references by a single author before multiauthored references by same author.
- Multiauthored references with two authors should be listed before other multiauthored references with 3 or more authors.
- Use a long dash when the authors are the same as in the immediately preceding citation.
- "In press" citations must have been accepted for publication; give name of journal or publisher.
- Insert a space after each initial of an author's name, following volume numbers, and between the colon following volume number and page numbers.
- Write journal names and book titles in full, without abbreviation.
- Titles of books are written in lower case except the first word and proper nouns and as required in original language of titles.

Samples of References

Journal Articles

Bernal, R., Jr. 1989. Proposal to conserve *Bactris ciliata* (R. & P.) C. Martius (Palmae). *Taxon* 38: 520–522.

de Nevers, G. 1988. *Bactris divisicupula* and *Bactris fuscospina* reexamined. *Annals of*

the Missouri Botanical Garden 75: 1151–1152.

Stevenson, D. W. & K. J. Norstog. 1999. Pubescence of cycad pinnae. *Opera Botanica* 58: 435–469.

———, ———, & D. V. Molsen. 1996. Midribs of cycad pinnae. *Brittonia* 48: 67–74.

Turrill, N. L., D. K. Evans & F. S. Gilliam. 1994. Identification of West Virginia members of the *Dentaria* complex (Brassicaceae) using above-ground morphological characters. *Castanea* 59: 22–30.

Series

Glassman, S. 1972. A revision of B. E. Dahlgren's index of American palms.

Phanerogamarum Monographiae. 6: 1–294.

Edited Series

Brotherus, V. F. 1925. *Cryphaea*. In: A. Engler (ed.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, ed. 2, 11: 77–80. Wilhelm Englemann, Leipzig.

Fryxell, P. A. 1988. A synopsis of the neotropical species of *Triumfetta* (Tiliaceae) L. Pp. 167–192. In: P. Matthew & M. Sivadasan (eds.), *Diversity and taxonomy of tropical flowering plants*. Mentor Books, Calicut, India.

Robbins, R. L. 2001. Sapindaceae. In: W.D. Stevens, C. Ulloa Ulloa, A. Pool & O. M. Montiel, (eds.), *Flora de Nicaragua. Angiospermas: Pandanaceae-Zygophyllaceae*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 85(3): 2307–2332.

Series (single author)

Burret, M. 1933–1934. *Bactris* und verwandte Palmengattungen. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 34: 167–184 [1933], 185–253 [1934].

Book

Wallace, A. 1853 [1854]. *Palm trees of the Amazon and their uses*. Van Hoorst, London.

AFTER ACCEPTANCE

Upon **acceptance** of your article you will receive a link to the special Springer web page with questions related to:

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

[Springer Open Choice](http://springer.com/openchoice) [http://springer.com/openchoice]

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the New York Botanical Garden (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice License.

Color in Print

Online publication of **color illustrations** is free of charge. For color in the print version,

authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Online First

The article will be published **online** after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

<http://www.springer.com/journal/12229>

<http://www.springer.com/journal/12229>

The Botanical Review

Editor-in-Chief: D.W. Stevenson

ISSN: 0006-8101 (print version)

ISSN: 1874-9372 (electronic version)

Journal no. 12229

<http://www.springer.com/journal/12229>