



Programa Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica)

Características reprodutivas de três espécies neotropicais de Podostemaceae e suas implicações filogenéticas



INARA CAROLINA DA SILVA

Rio de Janeiro

2014

Características reprodutivas de três espécies neotropicais de Podostemaceae e suas implicações filogenéticas

INARA CAROLINA DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas – Botânica, do
Museu Nacional, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários para obtenção de
título de Mestre em Ciências
Biológicas (Botânica).

Orientadoras: Dra. Claudia Petean Bove

Dra. Cristiana Koschnitzke

Rio de Janeiro

2014

S586

Silva, Inara Carolina da.

Características reprodutivas de três espécies neotropicais de Podostemaceae e suas implicações filogenéticas / Inara Carolina da Silva.– Rio de Janeiro, 2014.

71 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadoras: Claudia Petean Bove
Cristiana Koschnitzke

1. Plantas aquáticas - Reprodução. 2. Podostemaceae. 3. Cladística. I. Bove, Claudia Petean. II. Koschnitzke, Cristiana. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV. Museu Nacional. IV. Título.

CDD 583.22

INARA CAROLINA DA SILVA

Orientadoras: Dra. Claudia Petean Bove

Dra. Cristiana Koschnitzke

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Aprovada por:

Prof^a. Dra. Claudia Petean Bove (Presidente)

Prof^a. Dra. Ana Tereza Araújo Rodarte

Prof. Dr. José Alves de Siqueira Filho

Prof^a. Dra. Heloísa Alves de Lima Carvalho

Prof^a. Dra. Ivonne SanMartin-Galardo

Rio de Janeiro

2014

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta onde não conhecem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Dedico este trabalho à minha mãe Conceição e
William pelo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, amor, misericórdia e também pela proteção no trabalho de campo.

À toda a minha família, incluindo o William Batista, pelo carinho compreensão e apoio. Em especial agradeço à minha mãe, Conceição, pois sem ela não estaria onde cheguei.

Às minha orientadoras Claudia Petean Bove e Cristiana Koschnitzke pela confiança que depositaram em mim, pois trabalhar com as pequeníssimas flores de Podostemaceae não seria uma tarefa fácil. Agradeço também pelos ensinamentos, pela amizade e pelas muitas broncas merecidas.

Às amigas Livia Ferreira e Yasmin Canalli pelo companheirismo, por não me deixarem desanimar e também por estarem comigo nos momentos de sufoco.

Aos amigos Andreia Donza e Filipe Gomes por terem me ensinado a utilizar o programa Mesquite, pelas dicas sobre filogenia e pelos momentos de descontração.

Ao amigo Thiago Freitas pela ajuda na estatística e pelos papos divertidíssimos.

Aos amigos Ludmilla Andrade, Tamara Andrade e Arthur Loureiro que me ajudaram no trabalho de campo.

Aos pais da Yasmin Canalli, Tereza e Vanderlei, que nos levaram ao campo quando foi necessário.

Aos Motoristas do Setor de transporte da UFRJ/MN, apesar dos contratempos, foram muito úteis durante os trabalhos de campo.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Couri e MSc. Francisco de A. Rodrigues Júnior do Departamento de Entomologia do Museu Nacional/UFRJ pela identificação dos dípteros.

Ao Welliton José da Silva pela identificação das diatomáceas.

Ao pessoal da Pousada Minha Casa que nos permitiram montar um mini laboratório em suas dependências e também por servir um pão francês quentinho e muito gostoso todos os dias no café da manhã.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao CNPq pela financiamento das viagens de campo.

E a todos que de alguma forma contribuíram na minha formação e para elaboração deste trabalho.

RESUMO

Podostemaceae são ervas aquáticas que habitam rios de corredeiras e cachoeiras. Apesar de sua diversidade relativamente alta comparada com outras famílias aquáticas, a biologia reprodutiva e a fenologia na família é pouco conhecida, sendo que o sinal filogenético deste tipo de dado nunca foi investigado. O objetivo deste trabalho foi estudar a biologia reprodutiva de três diferentes espécies filogeneticamente distantes e avaliar se caracteres reprodutivos podem ser informativos em estudos filogenéticos em Podostemaceae. O estudo foi realizado nos Municípios de Macaé e Silva Jardim (Rio de Janeiro) em 2012 e 2013. Foram levantados 39 caracteres relacionados com a morfologia floral, biologia reprodutiva, polinização e fenologia. As três espécies estudadas apresentam flores solitárias, zigomorfas e pediceladas, não apresentam odor perceptível ao olfato humano e os frutos iniciam deiscência por volta de um mês depois do final da antese. A floração e frutificação em *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum* são anuais. *Lophogyne lacunosa* apresenta características que favorecem tanto a autopolinização como a polinização pelo vento. *Podostemum weddellianum* apesar de não apresentar características de flores polinizadas por moscas tem como seu polinizador (eventual) *Syllimnophora* sp. As flores de *Tristicha trifaria* apresentam características que favorecem a autopolinização. A autopolinização pode ocorrer no botão em *Podostemum weddellianum* e durante os primeiros estágios da antese em *Lophogyne lacunosa* e *Tristicha trifaria*. Flores abertas em períodos diferentes, a extensa longevidade floral e a protoginia incompleta podem ser estratégias para maximizar a polinização cruzada. Nas espécies estudadas a autogamia é o principal sistema reprodutivo. Em *Podostemum weddellianum* e *Lophogyne lacunosa* existe um sistema reprodutivo misto (autogamia e xenogamia). *Lophogyne lacunosa* também apresenta apomixia, sendo este o primeiro relato para Podostemaceae. Os caracteres considerados filogeneticamente informativos foram: proporção pólen/óvulo, dicogamia, autopolinização, fases da autopolinização, polinização por moscas, por abelhas, pelo vento e partenocarpia. A otimização dos estados dos caracteres na filogenia da família possibilitou o reconhecimento de algumas plesiomorfias e apomorfias, entretanto é necessária a investigação de maior número de espécies para a obtenção de hipóteses mais robustas da evolução de caracteres reprodutivos na família.

Palavras-chave: Reprodução, Podostemaceae, filogenia, caracteres informativos.

ABSTRACT

Podostemaceae are aquatic herbs that inhabit river rapids and waterfalls. Despite its relatively high diversity compared with other aquatic families, reproductive biology and phenology in the family is poorly known and its phylogenetic signal never has been investigated. The aim of this work was the reproductive biology of three phylogenetically distant species to assess whether reproductive characters may be phylogenetically informative in Podostemaceae. This study was conducted in Macaé and Silva Jardim (Rio de Janeiro) in 2012 and 2013. Thirty nine characters from flower morphology, reproductive biology, pollination, and phenology were investigated. The three analyzed species have solitary pedicellate, zygomorphic flowers with no perceptible odor to human olfaction. The fruit dehiscence starts around a month after the end of anthesis. Flowering and fruiting in *Lophogyne lacunosa* and *Podostemum weddellianum* are annual. *Lophogyne lacunosa* has characteristics that favor both self-pollination and wind pollination. Although the flowers of *Podostemum weddellianum* has no features of pollination by flies it has *Syllimnophora* sp. as its (possible) pollinator. The flower of *Tristicha trifaria* has characteristics that favor self-pollination. Self-pollination can occur in the bud of *Podostemum weddellianum* and during the early stages of anthesis in *Lophogyne lacunosa* and *Tristicha trifaria*. Flowers open at different hours, extensive floral longevity and incomplete protogyny may be strategies to maximize cross-pollination. In the species studied autogamy is the main reproductive system. In *Podostemum weddellianum* and *Lophogyne lacunosa* have a mixed mating system (autogamy and xenogamy). *Lophogyne lacunosa* also present apomixis, being the first report to Podostemaceae. The characters considered phylogenetically informative were: pollen/ovule proportion, dichogamy, self-pollination, self-pollination stages, fly pollination, bee pollination, wind pollination and parthenocarpy. The optimization of the reproductive biology characters states revealed some plesiomorphies and apomorphies, but the study of more species is required to obtain a more robust hypothesis on the evolution of reproductive biology evolution in the family.

Keywords: Reproduction, Podostemaceae, Informative characters, phylogeny.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Caracterização da família e espécies estudadas	1
1.2. Posicionamento taxonômico e relações filogenéticas	7
1.3. Fenologia e biologia reprodutiva de Podostemaceae	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3. RESULTADOS	18
3.1. Morfologia floral, Biologia reprodutiva e Polinização	18
3.2. Sistema reprodutivo.....	27
3.3. Fenologia	30
3.4. Caracteres informativos	35
4. DISCUSSÃO	50
4.1. Morfologia floral, Biologia reprodutiva e Polinização	50
4.2. Sistema reprodutivo.....	54
4.3. Fenologia	57
4.4. Aspectos taxonômicos, biologia reprodutiva e evolução de estados caracteres de Podostemaceae.....	59
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies utilizadas para a elaboração da matriz de caracteres e suas respectivas bibliografias	17
Tabela 2. Resultado dos tratamentos de sistema reprodutivo realizados em <i>Lophogyne lacunosa</i>	27
Tabela 3. Quantidade de frutos partenocárpicos nos tratamentos	28
Tabela 4. Resultado do tratamento controle para as espécies estudadas	29
Tabela 5. Resultado do teste de correlação de Spearman entre floração e frutificação com a precipitação e temperatura média em Aldeia Velha	31
Tabela 6. Resultado do teste de correlação de Spearman entre floração e frutificação com a precipitação e temperatura média em Frade	33
Tabela 7. Lista com os 39 caracteres reprodutivos e levantado a partir da reprodução em Podostemaceae.....	35
Tabela 8. Lista de caracteres reprodutivos e seus respectivos estados de caráter em Podostemaceae.....	36
Tabela 9. Matriz com os dados reprodutivos.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lophogyne lacunosa</i>	3
Figura 2. Esquema de <i>Lophogyne lacunosa</i>	3
Figura 3. <i>Podostemum weddellianum</i>	5
Figura 4. Esquema de <i>Podostemum weddellianum</i>	5
Figura 5. <i>Tristicha trifaria</i>	6
Figura 6. Esquema de <i>Tristicha trifaria</i>	6
Figura 7. Cladograma das espécies de Podostemaceae	8
Figura 8. Cladograma das espécies neotropicais de Podostemaceae	9
Figura 9. Mapa das regiões hidrográficas do Rio de Janeiro	12
Figura 10. Detalhe do mapa com as áreas de estudo	12
Figura 11. Rochas ensacadas nos experimentos de <i>Lophogyne lacunosa</i>	15
Figura 12. Flor de <i>Lophogyne lacunosa</i> com anteras iniciando torção	20
Figura 13. Flor de <i>Lophogyne lacunosa</i> sem as anteras	20
Figura 14. Flor de <i>Podostemum weddellianum</i> recém-aberta	22
Figura 15. Flor de <i>Podostemum weddellianum</i> com andropódio em 45°	22
Figura 16. <i>Syllimnophora</i> sp.	23
Figura 17. <i>Syllimnophora</i> sp. sobre as flores de <i>Podostemum weddellianum</i>	24
Figura 18. Fruto de cleistogamia de <i>Podostemum weddellianum</i>	24
Figura 19. Flor de <i>Tristicha trifaria</i> 24 horas depois da abertura da flor.....	26
Figura 20. Flores de <i>Tristicha trifaria</i> com as anteras abertas	26
Figura 21. Frutos de <i>Lophogyne lacunosa</i>	28
Figura 22. Distribuição da precipitação e temperatura para as áreas de estudo	30
Figura 23. Gráfico do percentual de intensidade de Fournier para <i>Lophogyne lacunosa</i> em Aldeia Velha	32
Figura 24. Gráfico do percentual de intensidade de Fournier para <i>Podostemum weddellianum</i> em Aldeia Velha	32
Figura 25. Gráfico do percentual de intensidade de Fournier para <i>Lophogyne lacunosa</i> em Frade	34

Figura 26. Gráfico do percentual de intensidade de Fournier para <i>Podostemum weddellianum</i> em Frade	34
Figura 27. Árvore de consenso da filogenia de espécies de Podostemaceae	39
Figura 28. Otimização do caráter proporção pólen/óvulo (P/O)	41
Figura 29. Otimização do caráter dicogamia	42
Figura 30. Otimização do caráter flores odoríferas	43
Figura 31. Otimização do caráter polinização por abelhas.....	44
Figura 32. Otimização do caráter polinização por moscas.....	46
Figura 33. Otimização do caráter polinização pelo vento	47
Figura 34. Otimização do caráter autopolinização	48
Figura 35. Otimização do caráter autopolinização	49
Figura 36. Otimização do caráter partenocarpia.....	50

1. INTRODUÇÃO

O método filogenético para reconstrução do estado ancestral pode utilizar qualquer característica hereditária. Embora os dados moleculares sejam mais comumente empregados, pode ser utilizado outras fontes de informação taxonômica incluindo as morfológicas, fisiológicas e ecológicas, como por exemplo, dados obtidos da biologia reprodutiva (Amorim 2002).

Atualmente, muitos trabalhos que enfocam estudos de biologia reprodutiva e filogenia são realizados a partir de estudos filogenéticos pré-existentes, no qual os polinizadores e/ou sistemas reprodutivos são posicionados na hipótese das relações filogenéticas, revelando assim a história evolutiva desses eventos reprodutivos (e.g. Pérez *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2007; Fleming *et al.* 2009; Ollerton *et al.* 2009; Alcantara & Lohmann 2010; Smith 2010). Entretanto, outros estudos utilizam as características reprodutivas na elaboração de filogenias, empregando caracteres como presença de cleistogamia, geitonogamia e características da antese (Eckenwalder & Barret 1986; Johnson *et al.* 1998; Philbrick & Les 2000; Ribeiro 2007).

1.1 Caracterização da família e das espécies estudadas

Podostemaceae são ervas aquáticas, anuais ou perenes, com estruturas vegetativas altamente modificadas, cuja interpretação entre caule, folha e raiz, em muitos casos, é complexa (Philbrick 1984). Elas são encontradas aderidas firmemente ao substrato rochoso em rios encachoeirados e quedas d'água por uma estrutura chamada de háptera (Philbrick 1984), por tricomas adesivos e pela associação com cianobactérias, que através de seu biofilme formam uma superfície aderente (Jäger-Zürn & Grubert 2000). As estruturas vegetativas encontram-se submersas durante a estação chuvosa e quando o nível d'água baixa, na estação seca, as plantas ficam expostas e inicia-se o ciclo reprodutivo (Rutishauser 1997; Cook & Rutishauser 2007).

A família está essencialmente distribuída nas regiões tropicais, sendo representada por 49 gêneros e ca. 280 espécies, dentre as quais muitas são endêmicas e restritas a pequenas áreas geográficas (Cook & Rutishauser 2007). O Brasil apresenta

16 gêneros e 87 espécies, das quais 53 são endêmicas, distribuídas em cinco domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (Bove 2013).

As flores de Podostemaceae são bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, sésseis ou pediceladas, solitárias ou dispostas em inflorescências, com botões nus ou protegidos por uma estrutura membranosa não vascularizada, a espatela. O perianto é composto por tépalas, às vezes fixas em apenas um lado da flor e variando em número. Os estames podem ser de um a numerosos, livres, às vezes unidos na base ou apenas dois sobre um andropódio. As anteras são rimosas, introsas ou raramente extrosas com grãos de pólen liberados em mônades, díades ou raramente em tétrades. O ovário é súpero, bicarpelar ou tricarpelar, uni a trilocular com placentação axial e óvulos bitegmentados. O fruto é do tipo cápsula septicida com duas ou três valvas iguais ou desiguais, onde uma ou mais são persistentes. As sementes possuem uma camada externa mucilaginosa e não há formação de endosperma (Cook & Rutishauser 2007).

Lophogyne lacunosa (Gardner) C. P. Bove & C. T. Philbrick (Figuras 1 e 2), único representante do gênero, é endêmica do domínio Mata Atlântica, restrita aos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Bove *et al.* 2013). Frequentemente é frequentemente encontrada em simpatria com *Podostemum weddellianum* (Tul.) C. T. Philbrick & Novelo (Bove *et al.* 2011). Suas flores são solitárias, pediceladas e com espatela. O perianto é formado por 2-5 tépalas, lineares ou filiformes. Os estames variam de 1-4, dispostos lateralmente e os grãos de pólen são liberados em mônades, díades ou tétrades. O gineceu apresenta dois estigmas planos e livres com margem irregularmente dentada. O fruto é uma cápsula 6-costada com duas valvas iguais persistentes (Bove *et al.* 2011).

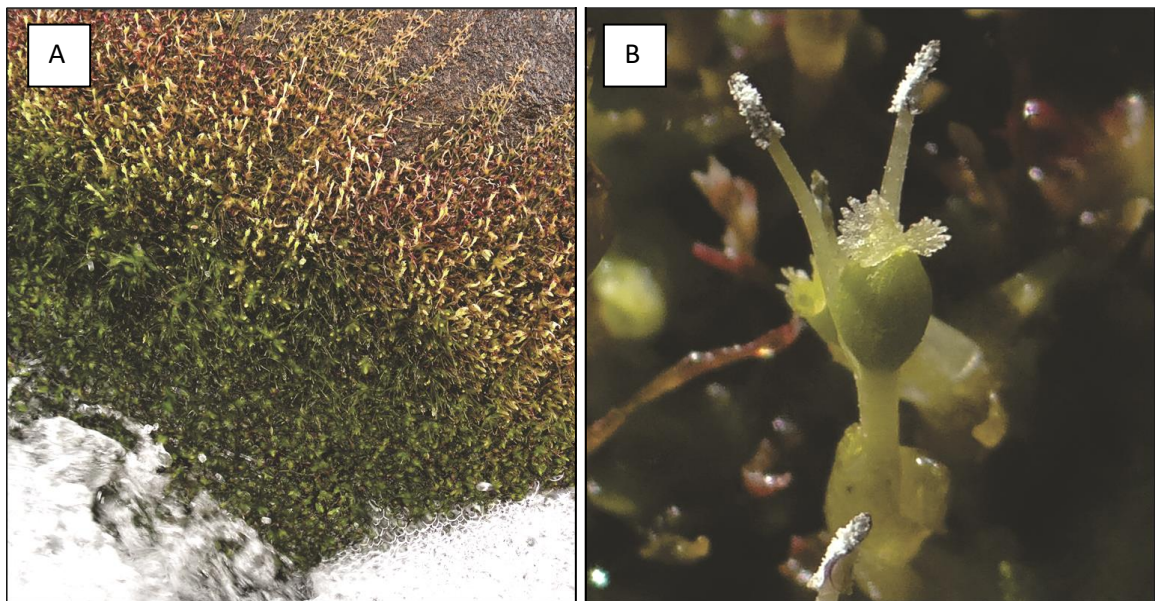


Figura 1. *Lophogyne lacunosa*: (A) Hábito; (B) Flor comas anteras abertas e estigmas receptivos.

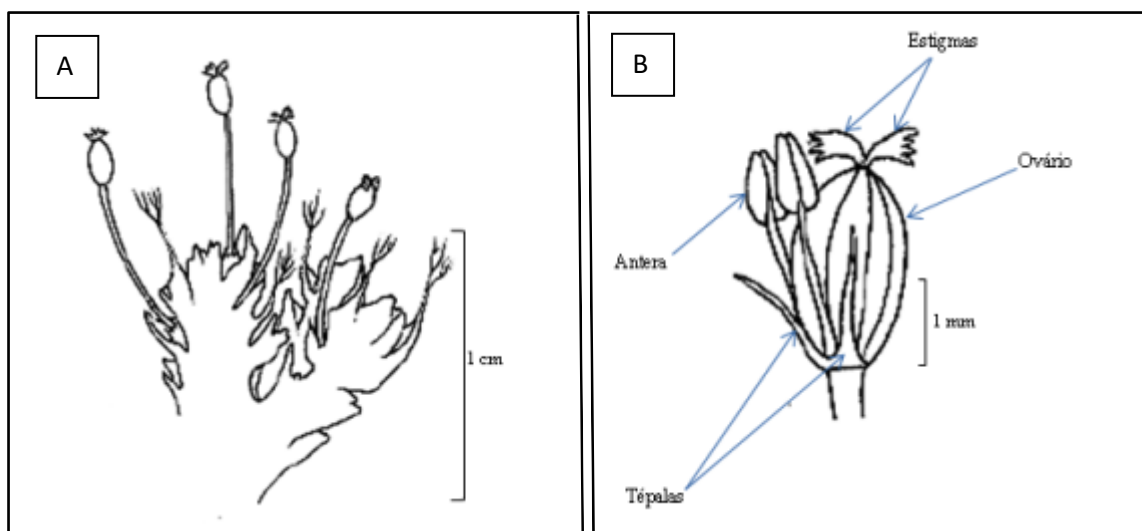


Figura 2. *Lophogyne lacunosa*: (A) Detalhe do talo com algumas flores; (B) Flor. Modificado de Cook & Rutishauser (2007).

Podostemum weddellianum (Tul.) C. T. Philbrick & Novelo (Figuras 3 e 4) é uma espécie endêmica do Brasil, com distribuição geográfica um pouco mais ampla que *Lophogyne lacunosa*. Ocorre nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Philbrick & Novelo 2004), no Cerrado e Mata Atlântica (Bove 2013). Suas flores são solitárias, pediceladas e com espatela. O perianto é formado por duas tépalas lineares, dispostas lateralmente ao andropódio, podendo ocorrer mais uma tépala entre os filetes. Dois estames se apresentam sobre um andropódio (Philbrick & Novelo 2004). O pólen é uma díade, fortemente coesa, podendo ocorrer também uma pseudomônade, formada pela degeneração de um dos grãos da díade (Sá-Haiad *et al.* 2010, Marinho 2013). O gineceu apresenta dois estigmas sésseis, livres, subdivididos em 3-9 lobos com muitas papilas. O fruto é uma cápsula lisa com duas valvas desiguais, sendo a menor caduca (Philbrick & Novelo 2004). *Podostemum weddellianum* apresenta corpos silicosos na espatela, tendo como finalidade proteção contra fatores bióticos e abióticos (Sá-Haiad *et al.* 2010).

Tristicha trifaria (Bory ex Willd.) Spreng. (Figuras 5 e 6) é a única espécie da família encontrada nos neo e paleotrópicos. No Brasil é encontrada em todos os domínios fitogeográficos (Bove 2013). Suas flores são solitárias, pediceladas, com três tépalas, livres ou unidas na base e sem espatela. Os estames variam de 1-3, dispostos lateralmente. O pólen é pantoporado e liberado em mônades. Apresenta três estigmas curtos e lineares, simples ou raramente bifurcados. O fruto é uma cápsula com deiscência por três valvas iguais (Royen 1954; Cook & Rutishauser 2007).

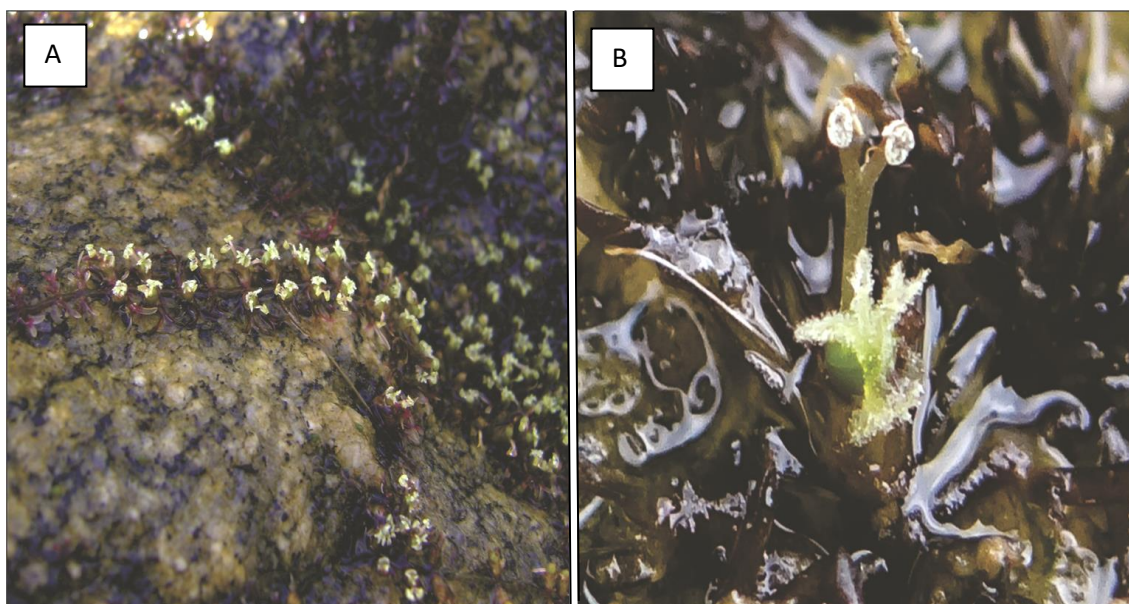


Figura 3. *Podostemum weddellianum*: (A) Ramo com flores, (B) Flor em antese.

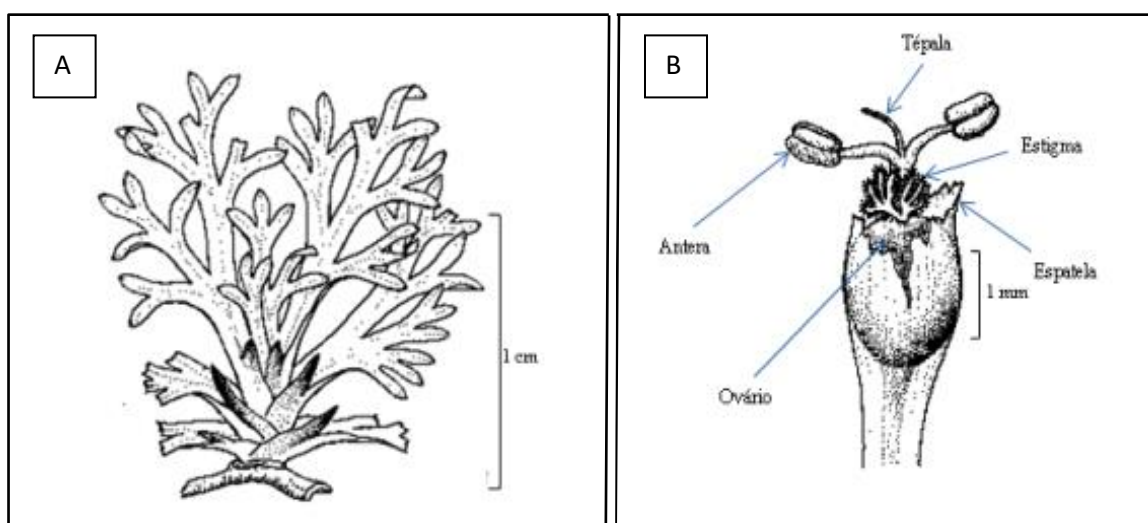


Figura 4. *Podostemum weddellianum*: (A) Hábito; (B) Flor. Modificado de Philbrick & Novelo (2004).

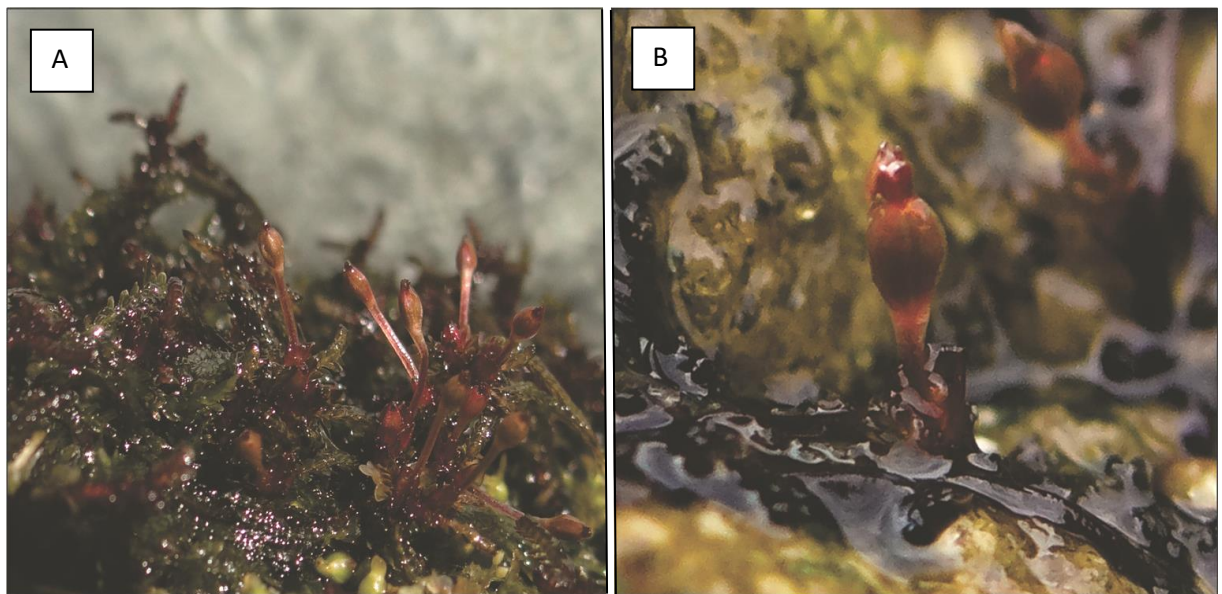


Figura 5: *Tristicha trifaria*: (A) Hábito; (B) Flor com a antera aberta.

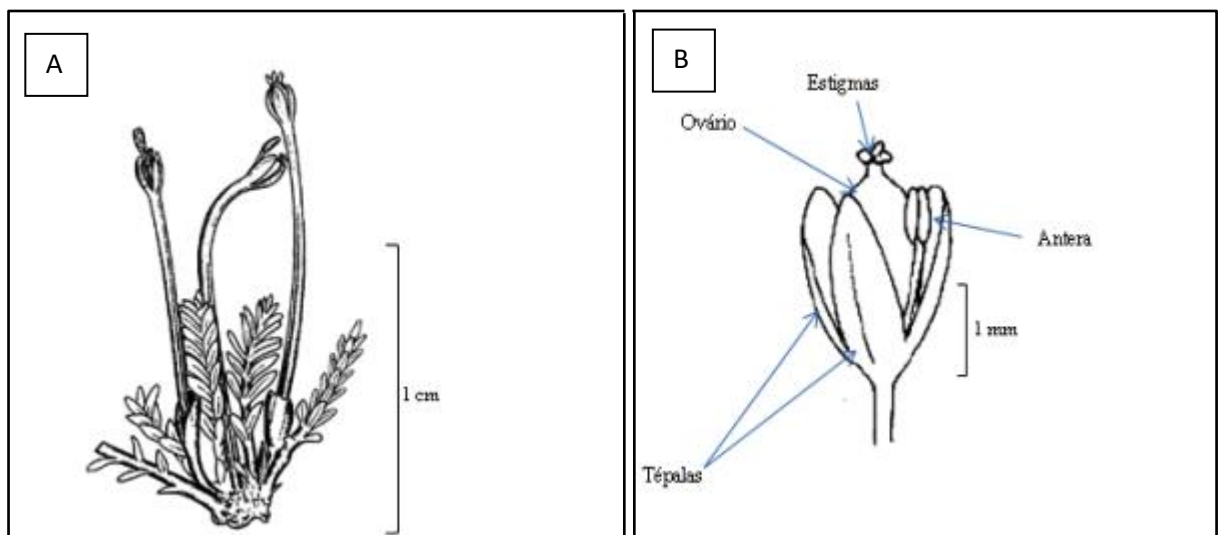


Figura 6. *Tristicha trifaria*: (A) Hábito; (B) Flor. Modificado de Tur (1997) e Cook & Rutishauser (2007).

1.2 Posicionamento taxonômico e relações filogenéticas

Podostemaceae pertence ao clado das Clusióides juntamente com Clusiaceae, Hypericaceae e Bonnetiaceae (Kita & Kato, 2001; Ruhfel *et al.* 2011), na ordem Malpighiales dentro das Rosídeas (APG III 2009). Ela é dividida em três subfamílias: *Tristichioideae* (dez espécies), *Weddellinoideae* (uma espécie) e *Podostemoideae* (cerca de 270 espécies). Esta subdivisão foi proposta por Engler (1930) e vem sendo confirmada pelos trabalhos de filogenia (Kita & Kato 2001; Ruhfel *et al.* 2011; Koi *et al.* 2012)

A subfamília *Tristichioideae*, onde *Tristicha trifaria* se insere, é a mais basal dentro da família Podostemaceae, sendo grupo irmão do clado formado por *Weddellinoideae* e *Podostemoideae* (Kita & Kato 2001). Análises filogenéticas mostram que *Podostemoideae* apresenta linhagens diferentes de acordo com a região geográfica, compreendendo três grupos: da África/Madagascar, da Ásia/Austrália e das Américas (Figura 7, Kita & Kato 2001). O gênero *Podostemum*, apesar de sua distribuição exclusivamente no Novo Mundo, apresenta maior relação filogenética com as espécies do clado africano (Velho Mundo) (Figura 7). *Podostemum* apresenta andropódio e pólen em díades que são características observadas mais comumente nos gêneros africanos (Cook & Rutishauser 2007, Ruhfel *et al.* 2011; Koi *et al.* 2012).

Segundo a análise filogenética de representantes neotropicais de *Podostemoideae*, fundamentada em dados moleculares (ITS, *rbcl*, *trnL*) e morfológicos realizada por Tippery *et al.* (2011), *Lophogyne lacunosa* está inserida no "clado J" (Figura 8), que, apesar de fortemente suportado, reúne espécies tradicionalmente reconhecidas em diversos gêneros e morfológicamente bem distintas. Até o momento este clado possui apenas sinapomorfias moleculares.

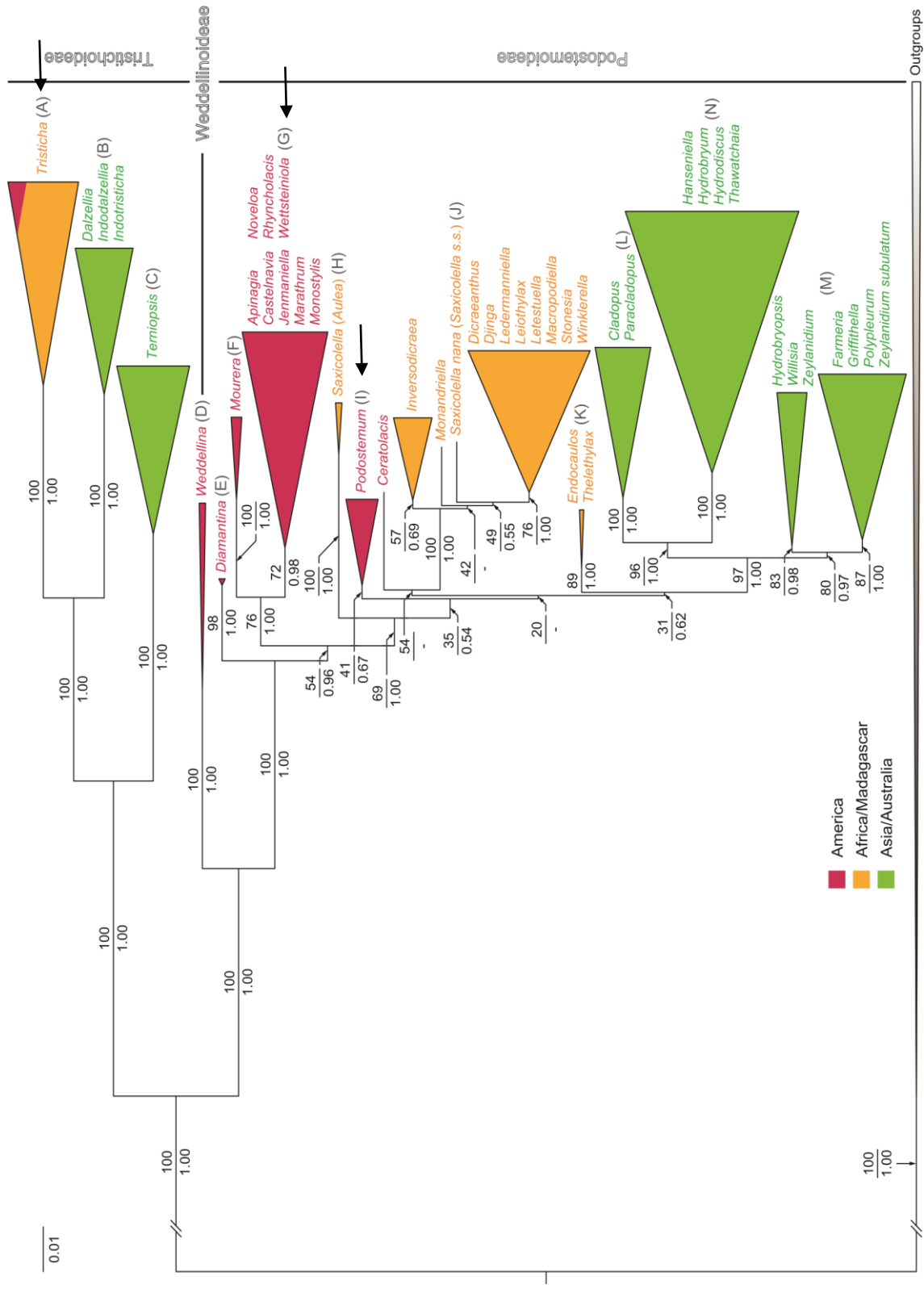


Figura 7: Relações filogenéticas de Podostemaceae segundo Koi et al. (2011). As setas indicam a posição filogenética das espécies aqui estudadas. Segundo os trabalhos de filogenia, *Lophogyne lacunosa* está inserida no clado G.

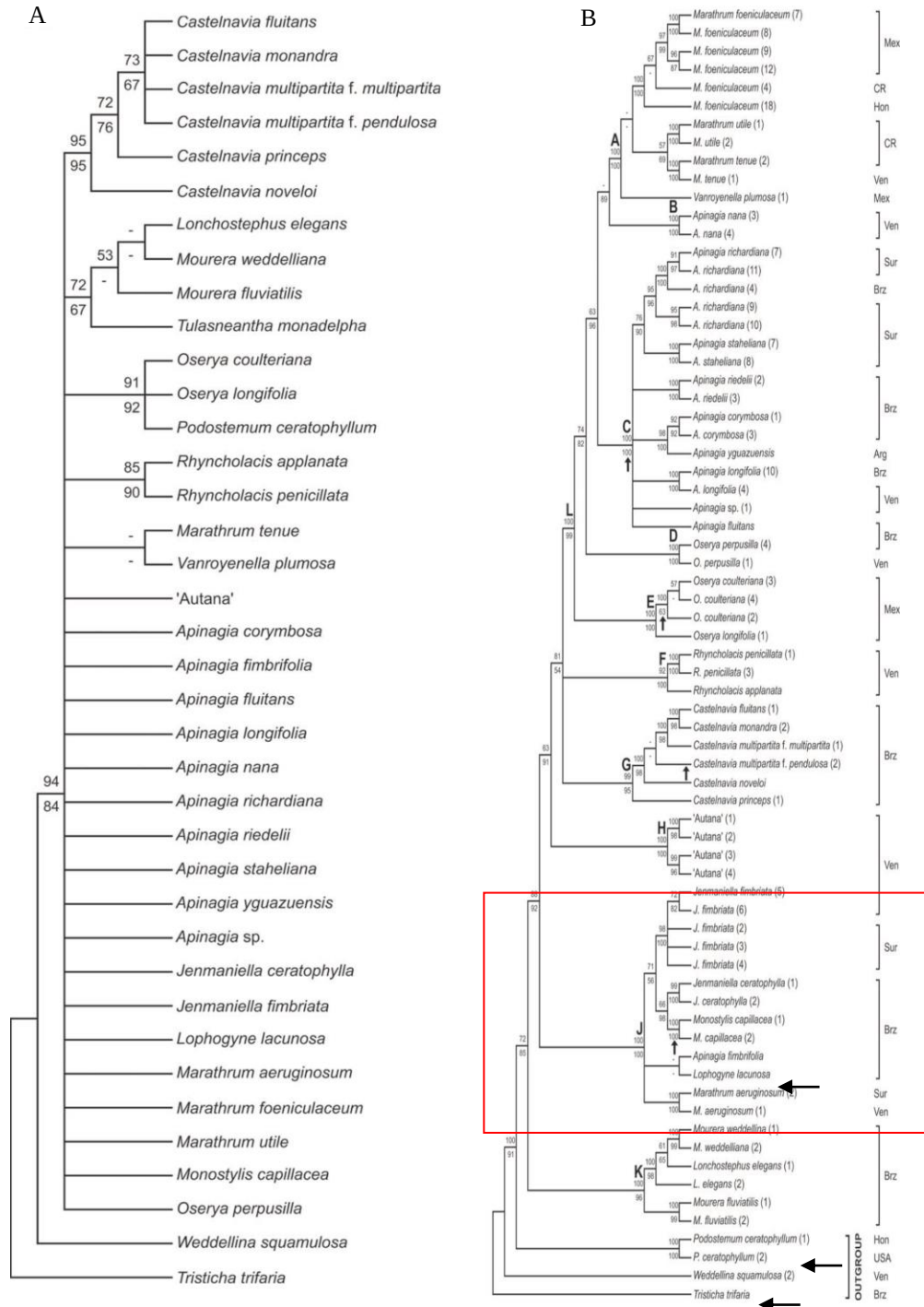


Figura 8. Relações filogenéticas de Podostemaceae neotropicais segundo Tippery *et al.* (2011). (A) Árvore de consenso com base em dados morfológicos e (B) Árvore de consenso com base em dados moleculares. Em destaque o clado J, no qual *Lophogyne lacunosa* está inserida. As setas indicam a posição filogenética das espécies aqui estudadas.

1.3 Fenologia e biologia reprodutiva de Podostemaceae

Dados fenológicos são relatados pontualmente em alguns estudos sobre a família. Muitos autores apenas informam o início e final de floração (Philbrick & Novelo 1998; Khosla *et al.* 2000; Okada & Kato 2002; Gupta & Sehgal 2009) e raramente o período de frutificação (Gupta & Sehgal 2009).

Em algumas espécies da subfamília *Podostemoideae* a abertura floral ocorre com a ruptura da espatela, devido ao alongamento do pedicelo (Philbrick 1984; Philbrick & Novelo 1998; Khosla *et al.* 2000; Sobral-Leite *et al.* 2011). O início da antese pode ocorrer pela manhã, como por exemplo em *Marathrum foeniculaceum* Humb. & Bonpl. ou ao longo do dia, como em *Mourera fluviatilis* Aubl. (Okada & Kato 2002). A duração da antese em *Podostemoideae* pode durar de poucas horas até quatro dias (Gupta & Sehgal 2009; Sehgal *et al.* 2010; Philbrick & Novelo 1998; Sobral-Leite *et al.* 2011).

Em algumas espécies de *Podostemoideae*, como *Marathrum foeniculaceum*, *Podostemum weddellianum* e *Hydrobryopsis sessilis* (Willis) Engl. as anteras tornam-se deiscentes no botão foral (Philbrick 1984; Philbrick & Novelo 1998; Philbrick & Novelo 2006; Sehgal *et al.* 2008; Sá-Haiad *et al.* 2010), e em outras depois da ruptura da espatela, como *Mourera fluviatilis* (Sobral-Leite *et al.* 2011). Em *Podostemum ceratophyllum* Michx. a autopolinização ocorre tanto no botão como durante a antese (Philbrick 1984). Após o pólen ser depositado no estigma, os tubos polínicos levaram entre 16 a 20 horas para alcançar os óvulos (Gupta & Shegal 2009; Khosla *et al.* 2000). Depois da fecundação ocorre a expansão do ovário, com a mudança de cor de verde para marrom (Philbrick & Novelo 1998; Khosla *et al.* 2000). Os frutos, em geral, tornam-se deiscentes entre duas a quatro semanas (Philbrick 1984; Okada & Kato 2002; Sobral-Leite *et al.* 2011).

Para a subfamília *Tristichoideae* observou-se em *Dalzelia zeylanica* (Gardn.) Wight e *Indotristicha ramosissima* (Wight) P. Royen que o início da antese pode ocorrer sincronicamente pela manhã e a deiscência da anteras nos primeiros estádios da antese (Gupta & Sehgal 2009; Sehgal *et al.* 2010).

A autopolinização espontânea na família é muito frequente devido à proximidade das anteras com os estigmas (Khosla *et al.* 2000). É provável que a maior parte das espécies de Podostemaceae seja autogâmica (Rutishauser 1997). Em algumas

espécies a autopolinização ocorre dentro botão floral (Okada & Kato 2002; Philbrick 1984; Kosla *et al.* 2000; Philbrick *et al.* 2006; Sehgal *et al.* 2010; Sá-Haiad *et al.* 2010), durante a antese (Okada & Kato 2002; Gupta & Sehgal 2009; Sehgal *et al.* 2010) ou no final desta (Sobral-Leite *et al.* 2011).

A quantidade de pólen e óvulos produzidos entre as espécies de Podostemaceae é bem variável: 608 a 18268 grãos de pólen e 11 a 314 óvulos (Philbrick & Novelo 1997; Okada & Kato 2002; Sehgal *et al.* 2010; Sobral-Leite *et al.* 2011). A proporção pólen/óvulo nas espécies varia de 0,96 a 2,75 (Okada & Kato 2002; Sehgal *et al.* 2010).

A polinização pelo vento é descrita como mais comum para a família (Philbrick 1984; Rutishauser 1997; Gupta & Sehgal 2009). Isto deve-se às estruturas florais bem expostas, estigmas papilosos, grãos de pólen leves e sem *polenkitt* (Philbrick 1984; Rutishauser 1997; Gupta & Sehgal 2009). A polinização biótica também pode ocorrer em algumas espécies dos gêneros *Apinagia* Tul., *Mourera* Aubl., *Rhyncholacis* Tul. e *Weddellina* Tul. Estes gêneros possuem flores com odor, coloração rosa ou lilás e numerosos estames, oferecendo pólen como recurso aos polinizadores que são abelhas das famílias Apidae e Halictidae (Okada & Kato 2002; Sobral-Leite *et al.* 2011).

O sistema reprodutivo foi estudado apenas para duas espécies: *Mourera fluviatilis* e *Marathrum foeniculaceum*, sendo ambas autocompatíveis e não apomíticas (Sobral-Leite *et al.* 2011; Luna *et al.* 2012).

Apesar da diversidade da família no Brasil, na área de biologia reprodutiva existe apenas um trabalho publicado sobre a espécie *Mourera fluviatilis* (Sobral-Leite *et al.* 2011)

O objetivo deste trabalho foi estudar a biologia reprodutiva de três espécies de gêneros distantes filogeneticamente da família Podostemaceae, a fim de avaliar se caracteres relativos aos processos reprodutivos podem ser informativos em estudos filogenéticos, além da busca por sinapomorfias não moleculares e hipóteses para a evolução de estados de caracteres reprodutivos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo abrangeu duas localidades no estado do Rio de Janeiro, onde *Lophogyne lacunosa*, *Podostemum weddellianum* e *Tristicha trifaria* ocorrem em simpatria (Figura 9): município de Silva Jardim, distrito de Aldeia Velha, no rio Aldeia Velha ($22^{\circ}26'52,95''\text{S}$, $42^{\circ}17'52,65''\text{W}$, 106m alt.) onde foi analisada apenas uma população, e município de Macaé, distrito de Frade, rio São Pedro (população A - $22^{\circ}14'24,73''\text{S}$, $42^{\circ}06'34,71''\text{W}$, 316m alt. e população B - $22^{\circ}14'14,55''\text{S}$, $42^{\circ}06'48,54''\text{W}$, 334m alt.). Na área de trabalho localizada no rio Aldeia Velha ao longo de uma das margens há mata ciliar e na outra uma pastagem. No Rio São Pedro, as margens são compostas por áreas de pasto. Entretanto existem áreas verdes bem próximas ao rio e alagados.

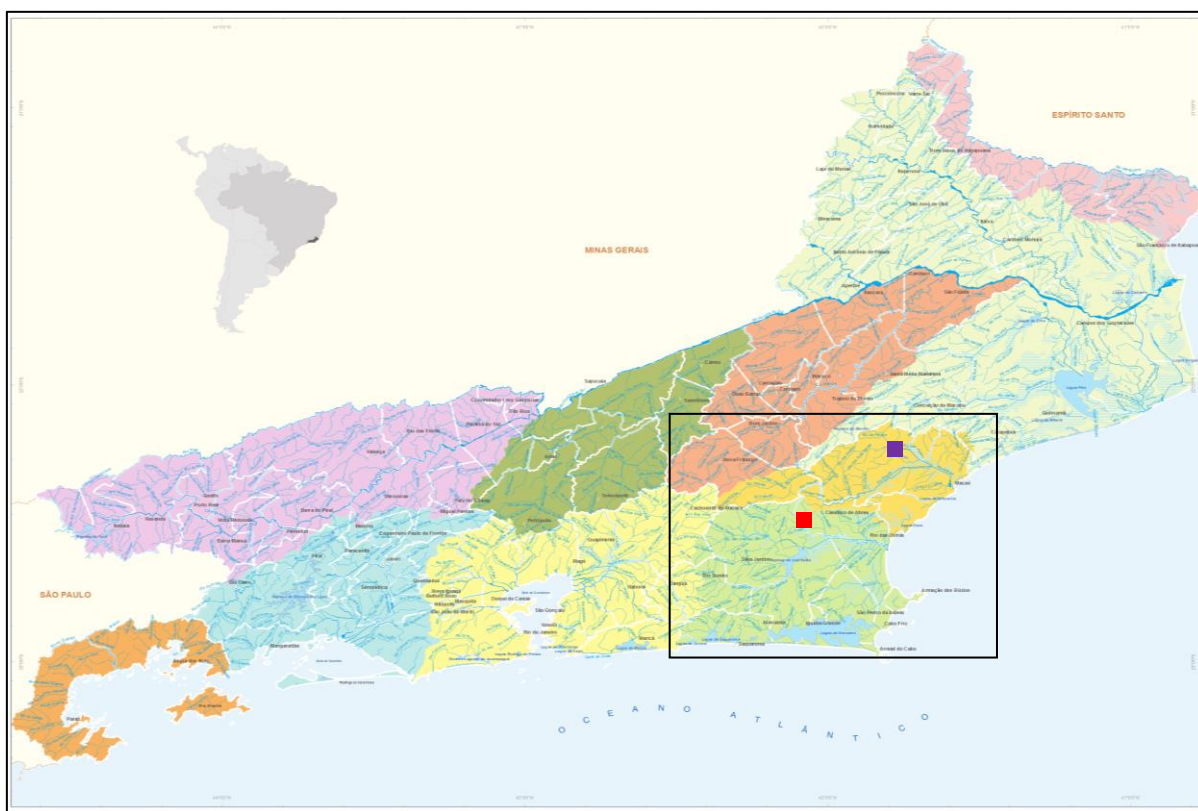


Figura 9. Mapa do Rio de Janeiro indicando as duas localidades de estudo: Aldeia Velha, Silva Jardim (Quadrado vermelho) e Frade, Macaé (Quadrado roxo). Fonte Secretaria Estadual do Ambiente (2008).

Foi determinado o horário do início e final da antese, longevidade e os estádios florais. A maioria dos frutos formados foi observada até a deiscência.

A receptividade do estigma foi testada com solução de peróxido de hidrogênio em 20 botões em pré-antese de cada espécie (Zeisler 1938). Para o cálculo de viabilidade polínica e proporção pólen/óvulo cada grão de pólen foi contado, inclusive no caso de espécies com pólen em tétrades e díades. Para estimar a viabilidade do pólen foram retirados os grãos de pólen de 30 botões em pré-antese de indivíduos distintos e colocados em uma lâmina com carmim acético (Radford *et al.* 1974). Foram contados 100 grãos de pólen por lâmina e calculada a porcentagem de grãos viáveis e inviáveis por botão em pré-antese. A proporção pólen/óvulo foi calculada de 10 botões em pré-antese, nos quais os grãos de pólen de uma antera foram contados e o valor multiplicado pelo número total de anteras, calculada a média e desvio padrão. Todos os óvulos de cada botão foram contabilizados sob microscópio estereoscópico, calculada a média e desvio padrão. O resultado da proporção pólen/óvulo foi obtido dividindo o número de grãos de pólen pelo de óvulos por flor, expresso em logaritmo e proporção (Cruden 1977). *Lophogyne lacunosa* apresenta flores com dois a quatro estames, no entanto, a primeira condição é a mais frequente, sendo esta utilizada para a contagem de pólen.

As observações dos visitantes florais iniciaram entre 6:00h - 8:00h e duraram até 15:30h. A quantidade total de horas de observação de visitantes florais foi de 22 horas para *Lophogyne lacunosa*, 29 horas para *Podostemum weddellianum* e 4 horas para *Tristicha trifaria*. Os visitantes foram capturados com vidros com tampa, observados sob microscópio estereoscópico e depois fixados em álcool 70%. Os insetos coletados foram identificados pela Prof^a. Dr^a. Márcia Couri e MSc. Francisco de A. Rodrigues Júnior do Departamento de Entomologia do Museu Nacional/UFRJ.

Para o estudo de polinização pelo vento foram dispostas 10 armadilhas formadas por lâminas com fita dupla face e estas foram colocadas sobre rochas próximas às plantas por 24 horas. Estas foram observadas em microscópio óptico e os grãos de pólen aderidos foram contabilizados. Foram montadas lâminas com pólen das espécies estudadas para comparação do pólen aderido nas armadilhas.

Para o estudo de sistema reprodutivo de *Lophogyne lacunosa*, devido às suas particularidades, os tratamentos que exigiram ensacamento foram realizados na rocha inteira com sacos plásticos de 100l e para segurá-los foram utilizadas quatro estacas de bambu ao redor da rocha (Figura 10). As rochas foram ensacadas antes da abertura das

flores e o ensacamento foi mantido até o final da antese. Foram realizados cinco tratamentos nos quais a emasculação foi feita nas flores recém abertas, pois as anteras ainda estavam fechadas. No tratamento de polinização cruzada, as flores da população A foram polinizadas com pólen das flores da população B. Depois de realizado o tratamento, os indivíduos foram ensacados. Na autopolinização manual, as flores foram emasculadas e os indivíduos ensacados. Nos indivíduos em que foram realizados os tratamentos de polinização cruzada e de autopolinização manual todas as flores que abriram depois do início dos experimentos foram marcadas e tiveram suas anteras e estigmas retirados, sendo realizado o tratamento de apomixia. O ensacamento foi mantido até o término dos experimentos. Foi realizado também o tratamento de emasculação aberta, onde as anteras foram retiradas e as flores deixadas sem ensacar. Para controle as flores foram apenas marcadas. Os frutos e as sementes resultantes dos tratamentos de sistema reprodutivo em *Lophogyne lacunosa* foram contabilizados. Para verificar se havia diferença estatística significativa entre a quantidade de sementes por tratamento foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.



Figura 11. Rochas ensacadas para experimentos de sistema reprodutivo realizados em *Lophogyne lacunosa* (Podostemaceae) na população A do Rio São Pedro em Frade, Rio de Janeiro, RJ, no mês de julho de 2012.

A quantidade de frutos formados e a taxa de formação de semente das três espécies foram comparadas apenas através do controle, pois *Podostemum weddellianum*

e *Tristicha trifaria* possuem dimensões muito reduzidas (< 5mm) o que inviabilizou a realização dos tratamentos de sistema reprodutivo. A maioria das sementes foram abertas para verificar se havia embrião.

A fenologia foi estudada apenas para *Podostemum weddellianum* e *Lophogyne lacunosa*, pois havia somente um indivíduo de *Tristicha trifaria* em Aldeia Velha e 12 em Frade. Para a realização do estudo fenológico foi fixada uma parcela de 5m no rio Aldeia Velha e São Pedro (população um). Todos os indivíduos expostos foram contados mensalmente, inclusive pode-se encontrar numa mesma rocha indivíduos tanto de *Podostemum weddellianum* e *Lophogyne lacunosa*. A esses indivíduos atribuiu-se a escala semi-quantitativa de 0 a 3 para presença de botão, flor, fruto (Fournier 1974). Os dados obtidos foram correlacionados com dados abióticos (precipitação e temperatura), obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) estação de Cordeiro (12 UTC) e Macaé (A608), com índice de correlação de Spearman.

Ao total foram estudados 16 indivíduos das duas espécies em Aldeia Velha e 43 indivíduos de *Lophogyne lacunosa* e 51 indivíduos de *Podostemum weddellianum* em Frade. Destes indivíduos atribuiu-se a escala semi-quantitativa de 0 a 3 modificada de Fournier (1974) para presença de botão, flor, fruto. Os dados do índice de Fournier foram correlacionados com dados abióticos (precipitação e temperatura), obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) da estação de Cordeiro (12 UTC), com índice de correlação de Spearman.

A fim de verificar se os dados da biologia reprodutiva são filogeneticamente informativos foi elaborada uma lista de caracteres a partir dos dados levantados neste trabalho e das bibliografia citadas na tabela 1. Foi elaborado um cladograma e uma matriz de caracteres reunindo apenas as espécies estudadas nos trabalhos mencionados acima e as espécies estudadas neste trabalho, respeitando as hipóteses filogenéticas para a família. Os caracteres foram discutidos a partir das filogenias propostas por Tippery *et al.* (2011), Ruhfel *et al.* (2011) e Koi *et al.* (2012). Os estados dos caracteres foram otimizados num cladograma simplificado através do programa Mesquite 2.7 (Maddison & Maddisson 2011), utilizando o método de parcimônia. Os dados foram classificados como informativos quando caracterizados como homologias e não influenciáveis por fatores ambientais. Os estados de caráter da proporção pólen/óvulo foram baseados nas categorias propostas por Cruden (1977).

Tabela 1. Espécies utilizadas para a elaboração da matriz de caracteres e suas respectivas bibliografias:

Espécies	Bibliografia
<i>Apinagia longifolia</i>	Okada & Kato (2002)
<i>Apinagia sp.1</i>	Okada & Kato (2002)
<i>Apinagia sp.2</i>	Okada & Kato (2002)
<i>Dalzellia zeylanica</i>	Seghal <i>et al.</i> (2010)
<i>Hydrobryopsis sessilis</i>	Seghal <i>et al.</i> (2009)
<i>Indotristicha ramosissima</i>	Gupta & Seghal (2009)
<i>Lophogyne lacunosa*</i>	Dados inéditos
<i>Marathrum foeniculaceum</i>	Philbrick & Novelo (1997); Philbrick & Novelo (1998) e Luna <i>et al.</i> (2012)
<i>Mourera fluviatilis</i>	Sobral-Leite <i>et al.</i> (2011)
<i>Podostemum ceratophyllum</i>	Philbrick & Novelo (2004) e Philbrick <i>et al.</i> (2006)
<i>Podostemum weddellianum*</i>	Philbrick & Novelo (2004), Philbrick <i>et al.</i> (2006) e Sá-Haiad <i>et al.</i> (2010)
<i>Polyleurum stylosum</i>	Khosla & Mohan Ram (1993) e Khosla <i>et al.</i> (2000)
<i>Rhyncholacis sp.1</i>	Okada & Kato (2002)
<i>Ryncholacis sp.2</i>	Okada & Kato (2002)
<i>Tristicha trifaria*</i>	Okada & Kato (2002)
<i>Weddellina squamulosa</i>	Jäger-Zürn 1997 e Grubert 1974

* Espécies estudadas neste trabalho.

3 RESULTADOS

3.1 Morfologia floral, Biologia reprodutiva e Polinização

Todas as espécies estudadas possuem flores pediceladas solitárias, zigomorfas, perianto formado por tépalas, ausência de odor perceptível ao olfato humano e frutos que iniciam deiscência por volta de um mês depois do final da antese.

Lophogyne lacunosa possui flores com pedicelo de $3,29 \pm 1,01$ mm e perianto formado por três tépalas esverdeadas filiformes. O androceu apresenta 2-4 estames dispostos lateralmente ao ovário com filetes de $2,53 \pm 0,55$ mm, 2-4 anteras triangulares de $1,94 \pm 0,6$ mm de comprimento. No botão em pré-antese a antera inicialmente é rosa escura e torna-se marrom ou preta nos últimos estádios da antese. O gineceu apresenta ovário elipsoide de $2,48 \pm 0,9 \times 1,14 \pm 0,34$ mm, dois estigmas de $2,48 \pm 0,9 \times 1,14 \pm 0,34$ mm que são brancos, sésseis, planos com margem irregularmente denteada e superfície granulosa. O fruto possui $3,03 \pm 0,43 \times 1,5 \pm 0,23$ mm e apresenta resquícios dos estigmas.

No botão em pré-antese de *Lophogyne lacunosa* as anteras estão indeiscentes e os estigmas estavam receptivos, caracterizando uma dicogamia (protoginia). A quantidade de pólen por flor foi de 13991 ± 2449 , de óvulos $261 \pm 70,65$ e a proporção pólen /óvulo de 53:1 (logaritmo 1,73) e a viabilidade polínica foi de 78%.

As flores de *Lophogyne lacunosa* iniciam antese em dois horários, pela manhã (entre 7:00 – 8:00h) e à tarde (13:00 – 14:30h), apresentam longevidade floral de cinco ou seis dias e possuem oito estádios de antese. No primeiro estágio o pedicelo se alonga ocasionando o rompimento da espatela, dando início à antese. Neste estágio as anteras continuam fechadas e bem próximas de um dos estigmas que estão recurvados. No segundo estágio, 3 horas depois da abertura da flor, o pedicelo alonga-se mais ($6,03 \pm 1,25$ mm), no entanto em 9% das flores observadas o pedicelo não cresce mais, e as anteras ainda se mantêm fechadas e inicia-se o crescimento dos filetes ($3,1 \pm 0,61$ mm). No terceiro estágio, 7 horas depois da abertura da flor, o pedicelo ($10,07 \pm 2$ mm) e os filetes ($3,77 \pm 1,1$ mm) continuam crescendo, distanciando as anteras dos estigmas, e as anteras se tornam deiscentes. Neste estágio as anteras estão posicionadas acima dos estigmas e pólen cai diretamente sobre eles promovendo a autopolinização espontânea. No quarto estágio, 24 horas depois da abertura da flor, as anteras começam a mudar de cor tornando-se rosa clara e ainda apresentam grande quantidade de pólen. O quinto

estádio, 48 horas depois da abertura da flor, as anteras ainda estão cor de rosa claro e apresentam uma pequena quantidade de pólen. O sexto estágio da antese, 72 horas após a abertura da flor, as anteras estão marrons, quase todo o pólen foi liberado e as anteras iniciam uma torção (Figura 12). No sétimo estágio, 96 horas depois a abertura da flor, as anteras estão totalmente espiralizadas e todo o pólen foi liberado. Em 36% das flores a espiralização das duas anteras de uma mesma flor pode ocorrer em tempos diferentes, logo, pode-se encontrar flores com uma antera espiralada e outra não. Neste estágio os estigmas estão amarelados bem distendidos, eretos e receptivos (Figura 13). No oitavo estágio, 120 horas depois da abertura da flor, as anteras caem e os estigmas estão marrons e não mais receptivos.

Foi observado uma espécie de *Syllimnophora* sp. (Diptera, Muscidae) sobre as partes vegetativas de *Lophogyne lacunosa*, sendo observada apenas uma vez sobre um dos estigmas.; por isso esta espécie não foi considerada polinizador de *Lophogyne lacunosa*. A polinização pelo vento ocorre em *Lophogyne lacunosa*, pois seus grãos de pólen foram encontrados em todas as armadilhas.

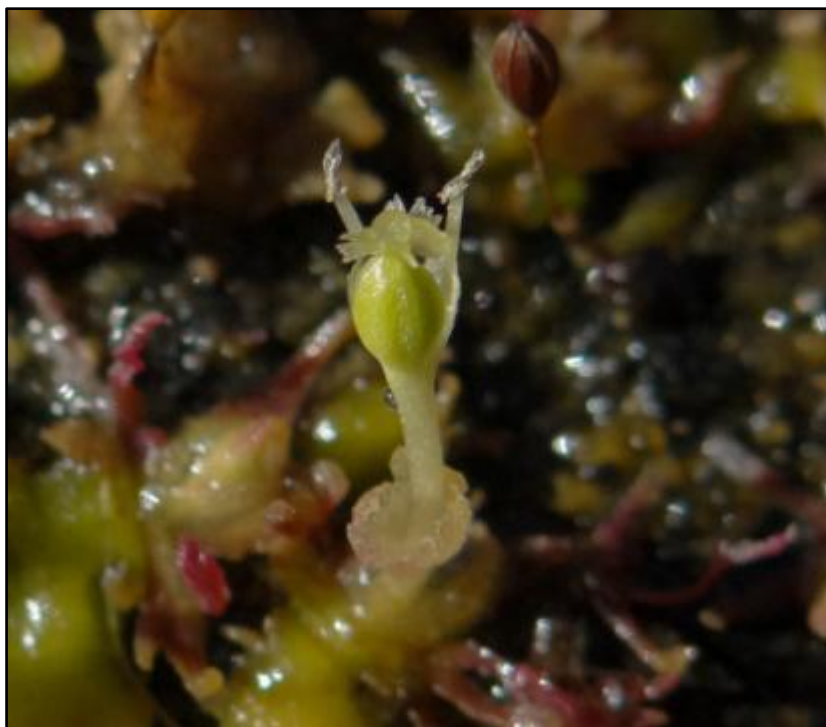


Figura 12. Flor de *Lophogyne lacunosa* no sexto estágio de antese: Flor de com anteras em início de torção apresentando pouco pólen.



Figura 13. Flor de *Lophogyne lacunosa* no sétimo estágio de antese: Flor com 96 horas após a abertura da flor, filetes persistentes sem anteras e estigmas.

Podostemum weddellianum possui flores com pedicelo de $0,92 \pm 0,15$ mm e perianto formado por duas tépalas esverdeadas filiformes, eventualmente mais uma entre os filetes. O androceu apresenta andropódio de $1,14 \pm 0,2$ mm, dois filetes de $0,36 \pm 0,10$ mm e duas anteras oblongas de $0,64 \pm 0,11$ mm de comprimento. No botão em pré-antese a antera inicialmente é branco-esverdeada e torna-se amarelada à marrom nos últimos estádios da antese. O gineceu apresenta ovário elipsoide de $1,10 \pm 0,18 \times 0,86 \pm 0,14$ mm, dois estigmas de $2,48 \pm 0,9 \times 1,14 \pm 0,34$ mm, sésseis, papilosos, brancos e divididos em até cinco lobos, sendo três a condição mais frequente. O fruto possui $1,33 \pm 0,2 \times 1,09 \pm 0,18$ mm.

No botão em pré-antese de *Podostemum weddellianum* as anteras estavam abertas e os estigmas receptivos. A autopolinização espontânea ocorre nesta fase devido a proximidade destas estruturas reprodutivas. As anteras e os estigmas estão disponíveis ao mesmo tempo, logo, não há dicogamia. A quantidade de pólen por flor foi de $750,4 \pm 341,48$, de óvulos $102 \pm 51,19$, a proporção pólen/óvulo de 7:1 (logaritmo 0,86) e viabilidade polínica foi de 68%.

As flores de *Podostemum weddellianum* iniciam antese em dois horários, pela manhã (entre 8:00 - 9:30h) e à tarde (entre 13:00 - 14:30h), apresentam longevidade floral de cinco ou seis dias e possuem sete estádios de antese. No primeiro estágio de antese, flor recém-aberta, o pedicelo se alonga e a espatela é rompida, expondo as estruturas reprodutivas que estão bem próximas entre si (Figura 14). No segundo estágio, 24 horas depois da abertura da flor, o pedicelo ($1,33 \pm 0,26$ mm) e o andropódio ($2,05 \pm 0,9$ mm) se alongam um pouco mais e o andropódio forma um ângulo de 45° com o ovário (Figura 15). No terceiro estágio, 48 horas depois da abertura da flor, o pedicelo ($1,76 \pm 0,82$ mm) e andropódio ($2,42 \pm 0,61$ mm) continuam crescendo, aumentando o ângulo para 90° . No quarto estágio, 72 horas depois da abertura da flor, uma ou ambas anteras podem destacar-se dos filetes e a que permanece na flor ainda apresenta um pouco de pólen, a flor ainda possui estigmas receptivos. No sexto estágio, 96 horas depois da abertura da flor, a antera remanescente cai e os estigmas estão amarelados, mas ainda receptivos. No sétimo estágio de antese, 120 horas depois da abertura da flor, os estigmas vão perdendo a receptividade até que fiquem marrons e ressecados.

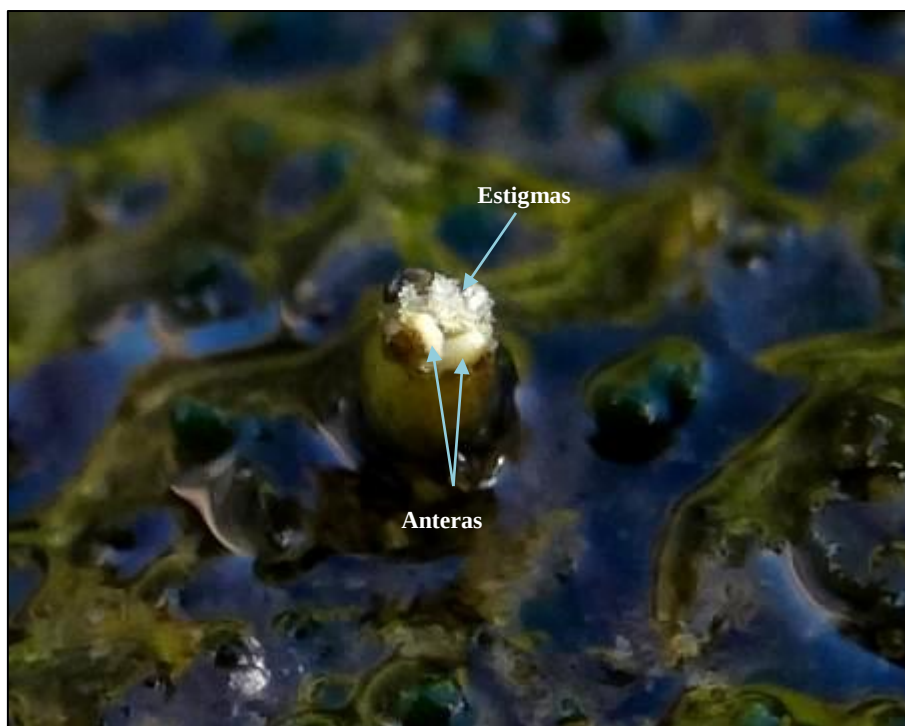


Figura 14. Flor de *Podostemum weddellianum* no primeiro estágio de antese: Flor recém aberta de evidenciando estigmas e anteras bem próximos.



Figura 15. Flor de *Podostemum weddellianum* no terceiro estágio de antese: Flor com andropódio em 45° evidenciando os estigmas bem distendidos, anteras totalmente abertas e distantes dos estigmas.

A mesma espécie de Diptera (*Syllimnophora* sp.) observada nas partes vegetativas de *Lophogyne lacunosa* foi observada em *Podostemum weddellianum* (Figura 16) andando por toda a planta, inclusive sobre as flores. Ao andar encostam tanto a parte de debaixo do abdômen como as pernas nas estruturas reprodutivas, possivelmente realizando polinização (Figura 17). Contudo, não foi encontrado pólen no corpo do indivíduo coletado. Foi observado algumas vezes *Syllimnophora* sp. introduzindo o aparelho bucal nas anteras que ainda tinham pólen, principalmente nas flores dos primeiros estádios da antese. A polinização pelo vento provavelmente não ocorre em *Podostemum weddellianum*, pois seus grãos de pólen não foram encontrados nas armadilhas.

Alguns botões de *Podostemum weddellianum* apresentaram estigmas e ovário marrons (Figura 18), e sementes com embrião. Tais características foram consideradas como evidências indiretas de cleistogamia.

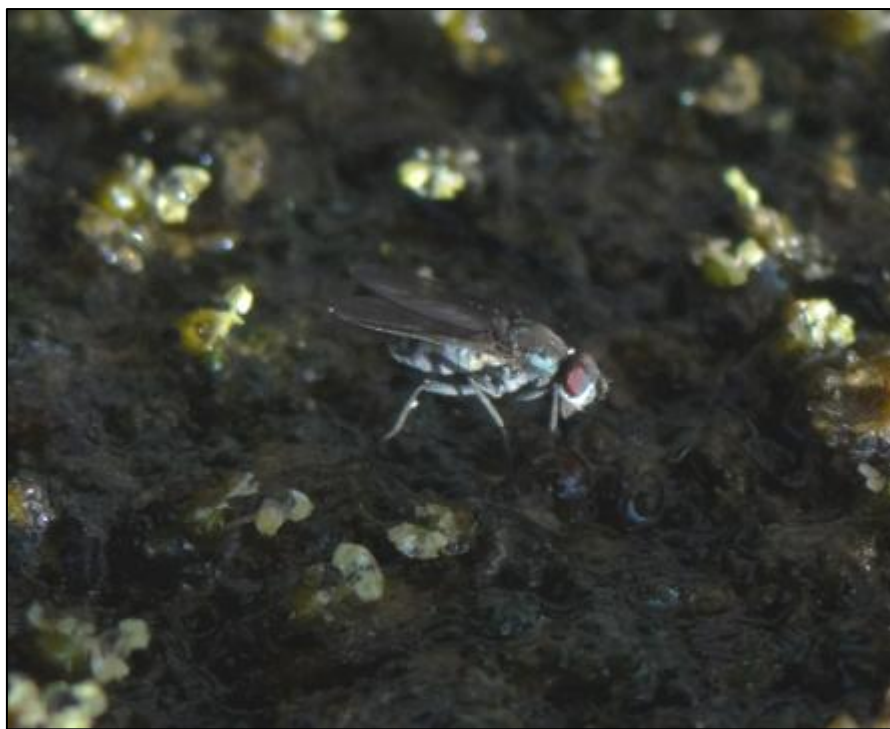


Figura 16. *Syllimnophora* sp. (Musidae) observado na parte vegetativa de *Podostemum weddellianum*.

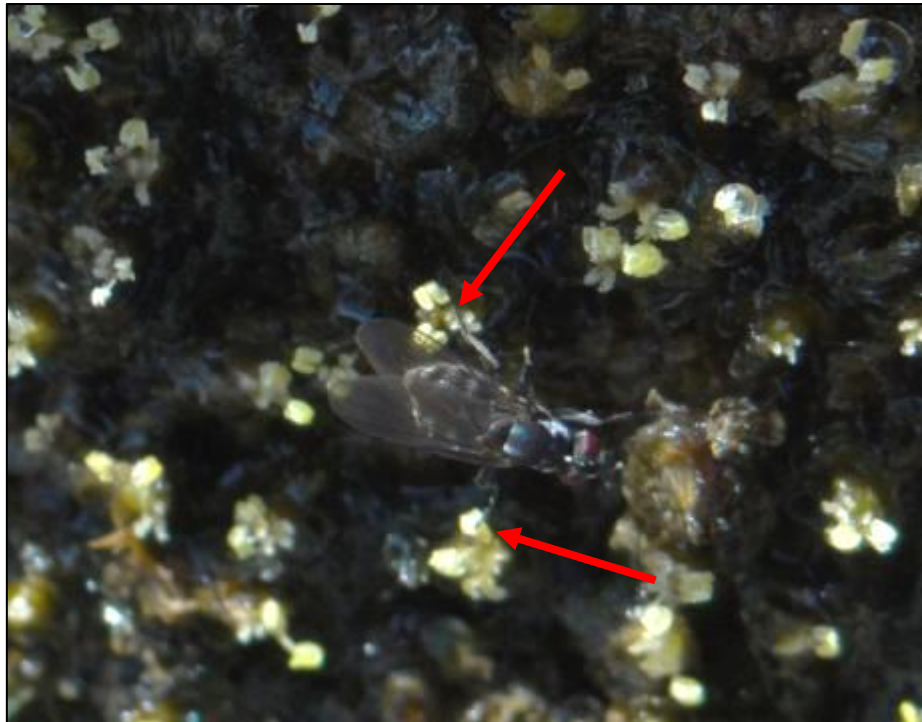


Figura 17. *Syllimnophora* sp. observado em *Podostemum weddellianum* com uma das pernas sobre um estigma e a outra sobre uma antera.



Figura 18. *Podostemum weddellianum*. Fruto proveniente de cleistogamia com a espátula intacta cobrindo o fruto.

Tristicha trifaria possui flores com pedicelo de $0,83 \pm 0,10$ mm e perianto formado por três tépalas lanceoladas e vináceas. O androceu apresenta um estame, disposto lateralmente ao ovário, com filetes de $0,50 \pm 0,06$ mm e duas anteras ovais ou elípticas de $0,5 \pm 0,06$ mm de comprimento, com conectivo espesso entre as tecas. No botão em pré-antese a antera inicialmente é vinácea e torna-se marrom nos últimos estádios da antese. O gineceu apresenta ovário elipsoide de $1,01 \pm 0,1$ x $0,80 \pm 0,13$ mm, estiletes curtos e três estigmas de $0,32 \pm 0,04$ mm de comprimento, vináceos, cilíndricos, com ápice arredondado e superfície papilosa. O fruto possui $1,34 \pm 0,13$ x $0,78 \pm 0,1$ mm e resquícios dos estigmas.

No botão em pré-antese de *Tristicha trifaria* as anteras estão indeiscentes, e os estigmas receptivos, caracterizando uma dicogamia (protoginia). A quantidade de pólen por flor foi de $325 \pm 121,98$, de óvulos $57 \pm 6,57$, a proporção pólen óvulo de 6:1 (logaritmo 0,75) e a viabilidade polínica foi de 89%.

As flores de *Tristicha trifaria* iniciam antese pela manhã, entre 8:00–10:00h, apresentam longevidade floral de cinco dias e possuem cinco estádios de antese. No primeiro estágio, flor recém aberta, ocorre um pequeno distanciamento das tépalas, expondo os estigmas. No segundo estágio, 24 horas depois do início da antese (Figura 19), o pedicelo ($1,54 \pm 0,47$ mm) e o filete ($0,76 \pm 0,16$ mm) crescem. No terceiro estágio, 48 horas após o início da antese, ocorre a abertura das anteras, o pedicelo ($2,18 \pm 0,71$ mm) e os filetes ($1,22 \pm 0,24$ mm) continuam crescendo e posicionam as anteras na altura dos estigmas, promovendo autopolinização espontânea. Em 25% das flores observadas as anteras podem ficar no mesmo nível dos estigmas (Figura 20), 60% ficam um pouco acima destes (Figura 20) e em 15% as anteras podem sofrer uma torção cobrindo os estigmas. Em todos os casos as anteras e os estigmas ficam muito próximos um do outro. No quarto estágio, 72 horas depois do início da antese, as tépalas e as anteras começam a entrar em senescência, tornando-se marrons. Ao final do quarto estágio a antera se destaca e os estigmas continuam receptivos. Durante o quinto estágio os estigmas perdem a receptividade e 120 horas depois do início da antese e a receptividade termina. De acordo com a morfologia, observações dos estádios da antese e armadilhas de pólen, *Tristicha trifaria* está adaptada a realizar autopolinização.

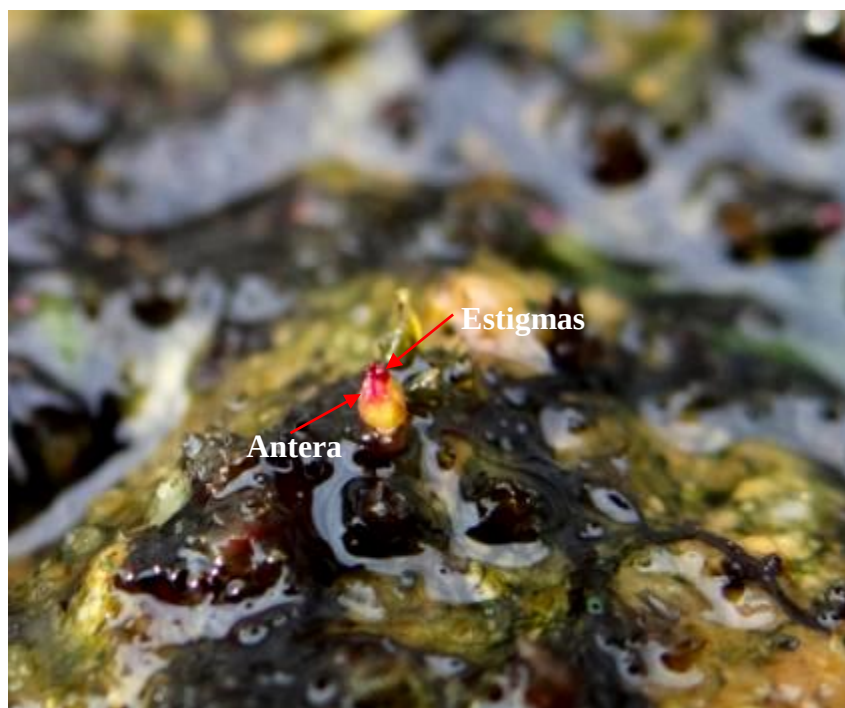


Figura 19. Flor de *Tristicha trifaria* no segundo estágio de antese. Flor aberta após de 24 horas evidenciando as anteras abaixo dos estigmas.



Figura 20. Flor de *Tristicha trifaria* no terceiro estágio de antese. Flores de com anteras abertas, evidenciando a antera no mesmo nível dos estigmas na flor em primeiro plano e ultrapassando-os na flor em segundo plano.

3.2 Sistema reprodutivo

Os resultados dos tratamentos do sistema reprodutivo de *Lophogyne lacunosa* mostram que ela é autocompatível e apomítica (Tabela 2). Os tratamentos de controle, polinização cruzada, autopolinização, apomixia e emasculação aberta (polinização cruzada natural) não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,5$).

Tabela 2. Resultado dos tratamentos de sistema reprodutivo realizados em *Lophogyne lacunosa* (Podostemaceae) em condições naturais.

Tratamento (n)	Frutos	Porcentagem de frutos	Média de Sementes/fruto (Mín- Máx)
Controle (20)	14	78%	141 (5-174)
Polinização cruzada (42)	24	57%	20 (1-126)
Autopolinização (22)	7	31%	16 (2-38)
Apomixia (26)	8	31%	62 (1 -133)
Emasculação aberta (51)	6	12%	23 (5-91)

Durante a coleta de dados sobre o sistema reprodutivo de *Lophogyne lacunosa* houve a formação de frutos partenocárpicos (Tabela 3). Estes frutos apresentaram as mesmas características de frutos, exceto pela ausência de sementes (Figura 21).

Tabela 3. Quantidade de frutos partenocárpicos formados nos tratamentos realizados em *Lophogyne lacunosa* (Podostemaceae).

Tratamento (n)	Frutos	Frutos partenocárpicos	Porcentagem de frutos partenocárpicos
Controle (20)	18	4	22%
Polinização cruzada (42)	36	12	33%
o (22)	10	3	30%
Apomixia (26)	16	8	50%
Emasculação aberta (51)	29	23	79%



Figura 21: Frutos de *Lophogyne lacunosa*. (A) Aspecto geral; (B) Corte longitudinal do fruto com sementes; (C) Corte longitudinal do fruto partenocárpico.

Lophogyne lacunosa, *Podostemum weddellianum* e *Tristicha trifaria* apresentaram valores distintos de frutos formados no controle, assim como, a quantidade de óvulos que se tornaram sementes (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado do tratamento controle para as espécies estudadas. (n= 20).

Espécies	Porcentagem de frutos	Média e desvio padrão de óvulos/ovário	Média e desvio padrão de sementes/fruto	Proporção semente/óvulo
<i>Lophogyne lacunosa</i>	78%	260 ±70,65	141 ±117,4	0,54
<i>Podostemum weddellianum</i>	100%	102 ±51,19	73 ±35,5	0,71
<i>Tristicha trifaria</i>	20%	57 ±6,57	15±1,83	0,26

3.3 Fenologia reprodutiva

Para Aldeia Velha e Frade no período estudo (maio/2012 a maio/2013) os meses com maior pluviosidade foram novembro e fevereiro e de menor junho e julho (Figura 22).

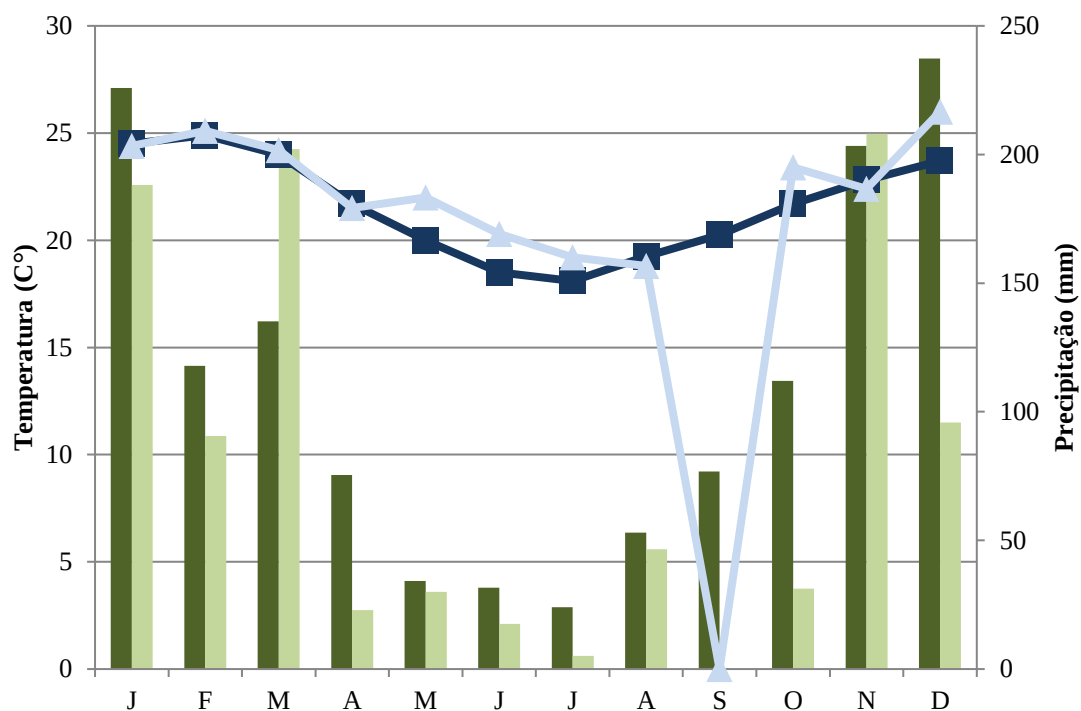


Figura 22. Dados meteorológicos para Aldeia Velha e Frade. Distribuição da precipitação média histórica (barras verde escura), temperatura média histórica (linha azul escura), precipitação durante os meses de estudo (barras verde clara) e temperatura média durante os meses de estudo (linha azul clara) na estação de Cordeiro (12 UTC).

* Não houve leitura de dados meteorológicos em setembro.

3.3.1 Fenologia de floração para Aldeia Velha (Silva Jardim)

Em Aldeia Velha, a floração e frutificação de *Lophogyne lacunosa* iniciaram em abril e terminaram em dezembro, ambas com o pico em setembro (Figura 23). A floração apresentou correlação negativa significativa com a precipitação e temperatura, já a frutificação teve correlação negativa significativa com a temperatura média (Tabela 5).

Para *Podostemum weddellianum* a floração iniciou no mês de abril e terminou em novembro, com pico de floração em junho (Figura 24). O período de frutificação iniciou em abril e terminou em dezembro, com pico em setembro (Figura 24). A floração apresentou correlação negativa significativa com a precipitação, já a frutificação teve correlação negativa significativa com a temperatura (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do teste de correlação de Spearman entre o Índice de Fournier com precipitação e temperatura média no período de 05/2012 - 05/2013 para *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum* em Aldeia Velha.

Dados abióticos	<i>Lophogyne lacunosa</i>		<i>Podostemum weddellianum</i>	
	Floração	Frutificação	Floração	Frutificação
Precipitação	-0,59	-0,44	-0,68	-0,51
Temperatura	-0,76	-0,75	-0,44	-0,66

* $P < 0,05$ = Valores significativos segundo o teste de correlação de Spearman. * Em negrito= valores significativos acima de 0,55.

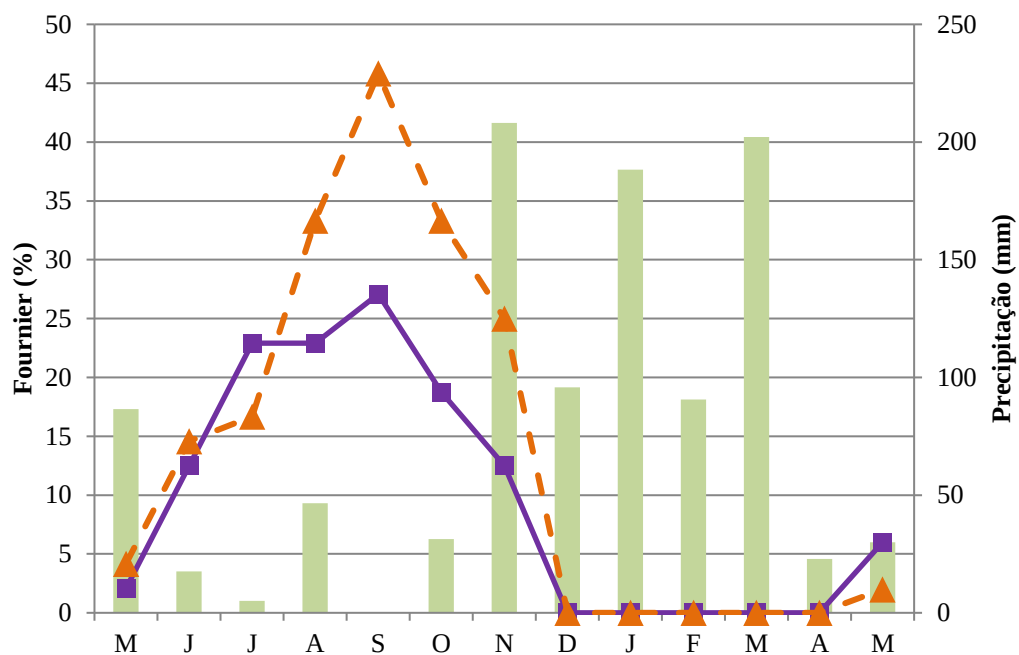


Figura 23. Percentual de intensidade de Fournier para floração (linha roxa) e frutificação (linha laranja) de *Lophogyne lacunosa* no período de maio/2012 a maio/2013 em Aldeia Velha comparado com a precipitação (barras verdes).

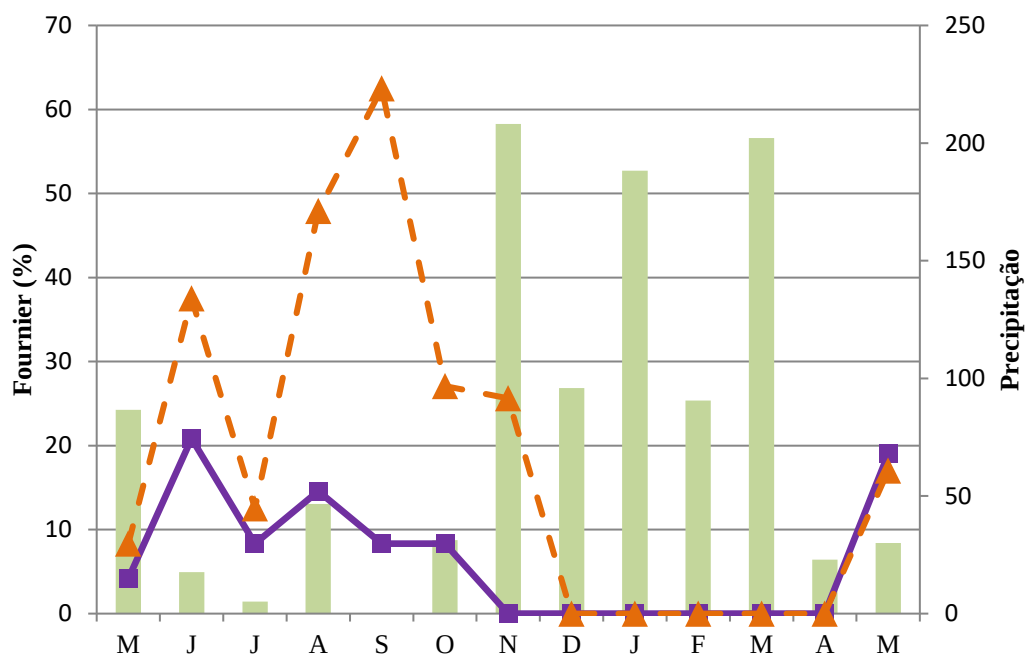


Figura 24. Percentual de intensidade de Fournier floração (linha roxa) e frutificação (linha laranja) de *Podostemum weddellianum* no período de maio/2012 a maio/2013 em Aldeia Velha comparado com a precipitação (barras verdes).

3.3.1 Fenologia de floração para Frade (Macaé)

Em Frade, a floração de *Lophogyne lacunosa* iniciou em abril e terminou em de novembro, com pico de floração em junho (Figura 25). O período de frutificação iniciou em maio e terminou em dezembro, com pico em julho (Figura 25). A floração e apresentou correlação negativa significativa com a precipitação e a temperatura, a frutificação teve correlação negativa significativa com a temperatura (Tabela 6).

Para *Podostemum weddellianum* a floração iniciou no mês de abril e terminou em outubro, com pico de floração em junho (Figura 26). O período de frutificação iniciou em abril e terminou em dezembro, com pico em julho e agosto (Figura 26). A floração e apresentou correlação negativa significativa com a precipitação e a temperatura, a frutificação teve correlação negativa significativa com a temperatura (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado do teste de correlação de Spearman do Índice de Fournier com precipitação e temperatura média no período de 05/2012 - 05/2013 para *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum* em Frade.

Dados abióticos	<i>Lophogyne lacunosa</i>		<i>Podostemum weddellianum</i>	
	Floração	Frutificação	Floração	Frutificação
Precipitação	-0,63	-0,61	-0,71	-0,46
Temperatura	-0,74	-0,80	-0,66	-0,73

* $P < 0,05$ = Valores significativos segundo o teste de correlação de Spearman. * Em negrito= valores significativos acima de 0,55.

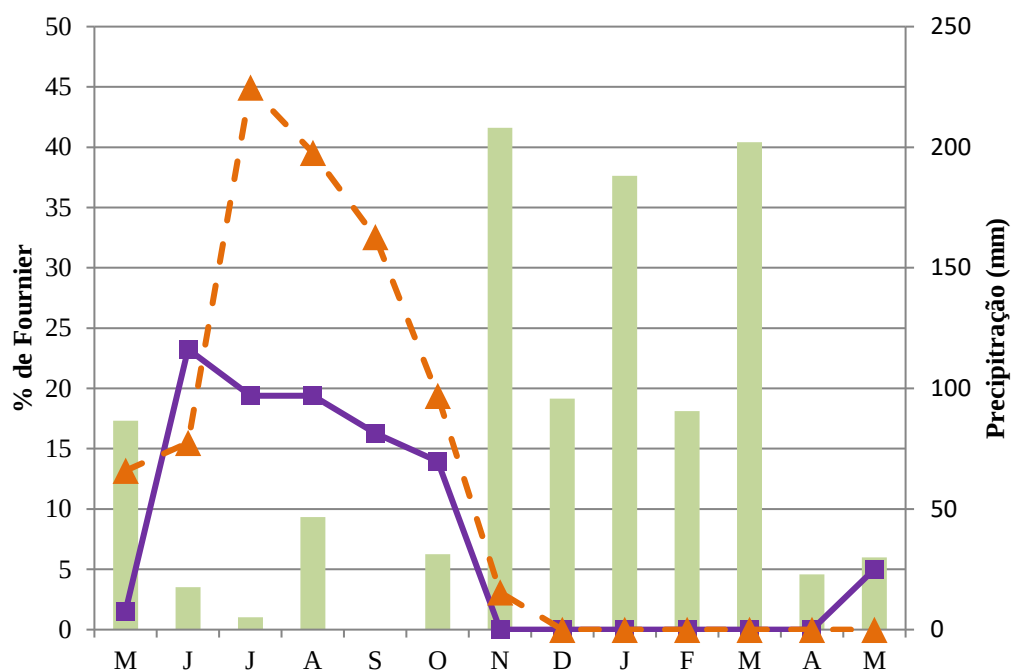


Figura 25. Percentual de intensidade de Fournier para floração (linha roxa) e frutificação (linha laranja) de *Lophogyne lacunosa* no período de maio/2012 a maio/2013 em Frade comparado com a precipitação (barras verdes).

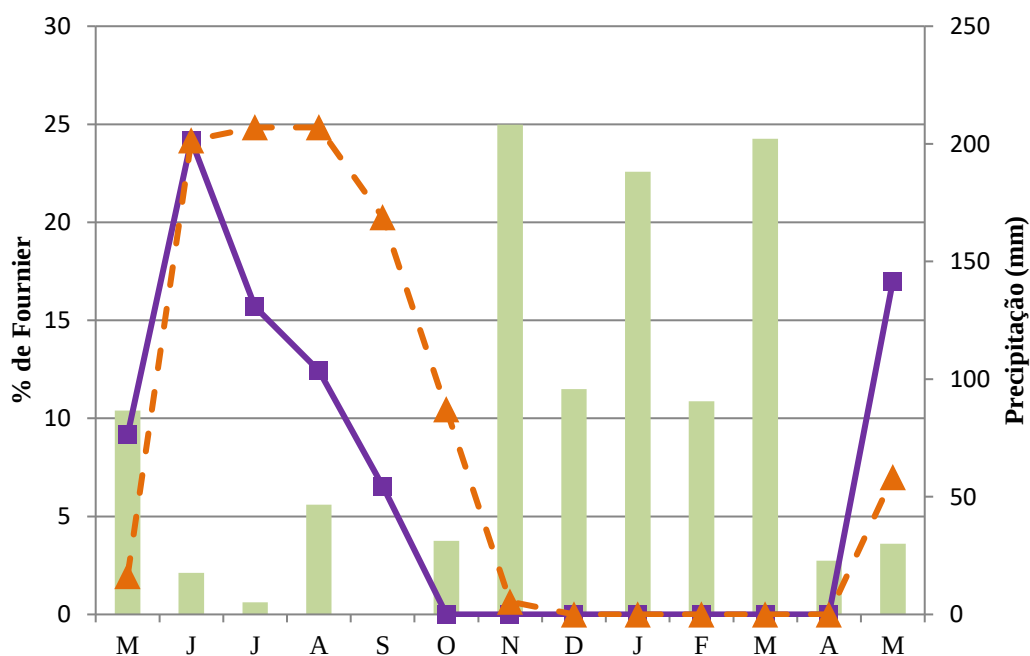


Figura 26. Percentual de intensidade de Fournier para floração (linha roxa) e frutificação (linha laranja) de *Podostemum weddellianum* no período de maio/2012 a maio/2013 em Frade comparado com a precipitação (barras verdes).

3.4 Evolução dos estados de caracteres de biologia reprodutiva em Podostemaceae

Foram analisados 39 caracteres reprodutivos (Tabela 7) nas espécies estudadas, sendo que apenas nove se mostraram informativos (Tabela 8 e 9).

Tabela 7. Lista de caracteres reprodutivos investigados em Podostemaceae.

Código	Caráter
1	Tépalas conspícuas
2	Flores solitárias
3	Simetria floral
4	Flores odoríferas
5	Número de estames
6	Estames coloridos (diferentes de verde)
7	Estaminódios
8	<i>Pollenkitt</i>
9	Estigmas papilosos
10	Papilas restritas a áreas do estigma
11	Estigmas coloridos (diferentes de branco ou branco-esverdeado)
12	Estigmas sobrepostos no botão
13	Quantidade de pólen/estame
14	Quantidade de óvulos/flor
15	Proporção pólen/óvulo
16	Duração da antese
17	Sincronia na abertura das flores
18	Horário de abertura das flores
19	Viabilidade polínica
20	Resquícios de estigma nos frutos
21	Estigmas receptíveis no botão
22	Torção da antera durante a antese
23	Anteras abertas dentro do botão
24	Pólen germina dentro da antera intacta
25	Dicogamia
26	Protoginia incompleta

27	Autopolinização
28	Fases da autopolinização
29	Polinização por abelhas
30	Polinização por moscas
31	Polinização pelo vento
32	Cleistogamia
33	Apomixia
34	Presença de costas nos frutos
35	Porcentagem de sementes/fruto
36	Tempo de maturação dos frutos
37	Partenocarpia
38	Tempo de floração
39	Tempo de frutificação

Tabela 8. Lista de caracteres reprodutivos informativos e seus estados de caráter.

Código	Caráter e estados
1	Proporção pólen/óvulo: (0) 0,73 a 1,43 (1) 1,49 a 2,21 (2) 2,22 a 2,86
2	Dicogamia: (0) Ausente (1) Protandria (2) Protoginia
3	Flores odoríferas: (0) Ausente (1) Presente
4	Polinização por abelhas: (0) Ausente (1) Presente
5	Polinização por moscas: (0) Ausente (1) Presente
6	Polinização pelo vento: (0) Ausente (1) Presente
7	Autogamia: (0) Ausente (1) Presente
8	Fases da autopolinização: (0) No botão (1) Nos primeiros estádios da antese (2) No final da antese (3) Não aplicável
9	Partenocarpia: (0) Ausente (1) Presente

Tabela 9. Matriz de táxons com os respectivos dados reprodutivos. ? = sem informação disponível.

	Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>Apinagia longifolia</i>	2	0	0	?	0	0	?	?	?
2	<i>Apinagia sp.1</i>	2	0	1	1	0	0	0	3	?
3	<i>Apinagia sp.2</i>	1	0	?	?	0	0	?	?	?
4	<i>Dalzellia zeylanica</i>	0	?	0	0	0	0	1	1	0
5	<i>Hydrobryopsis sessilis</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0
6	<i>Indotristicha ramosissima</i>	0	?	0	0	0	0	1	1	0
7	<i>Lophogyne lacunosa*</i>	1	2	0	0	0	1	1	1	1
8	<i>Marathrum foeniculaceum</i>	2	2	0	0	1	1	1	1	0
9	<i>Mourera fluviatilis</i>	2	2	1	1	0	1	1	2	1
10	<i>Podostemum ceratophyllum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
12	<i>Podostemum weddellianum*</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0
13	<i>Polypleurum stylosum</i>	2	1	0	0	0	0	1	1	0
14	<i>Rhyncholacis sp.1</i>	2	1	?	?	0	0	?	?	?
13	<i>Ryncholacis sp.2</i>	2	1	1	1	0	0	1	3	0
15	<i>Tristicha trifaria*</i>	0	2	0	0	0	0	1	1	0
16	<i>Weddellina squamulosa</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	0

*Espécies estudadas neste trabalho.

As espécies de Podostemaceae que possuem dados reprodutivos aqui obtidas ou de bibliografia na análise são apresentadas na árvore de consenso da filogenia segundo Tippersy *et al.* (2011), Ruhfel *et al.* (2011) e Koi *et al.* (2012) (Figura 27).

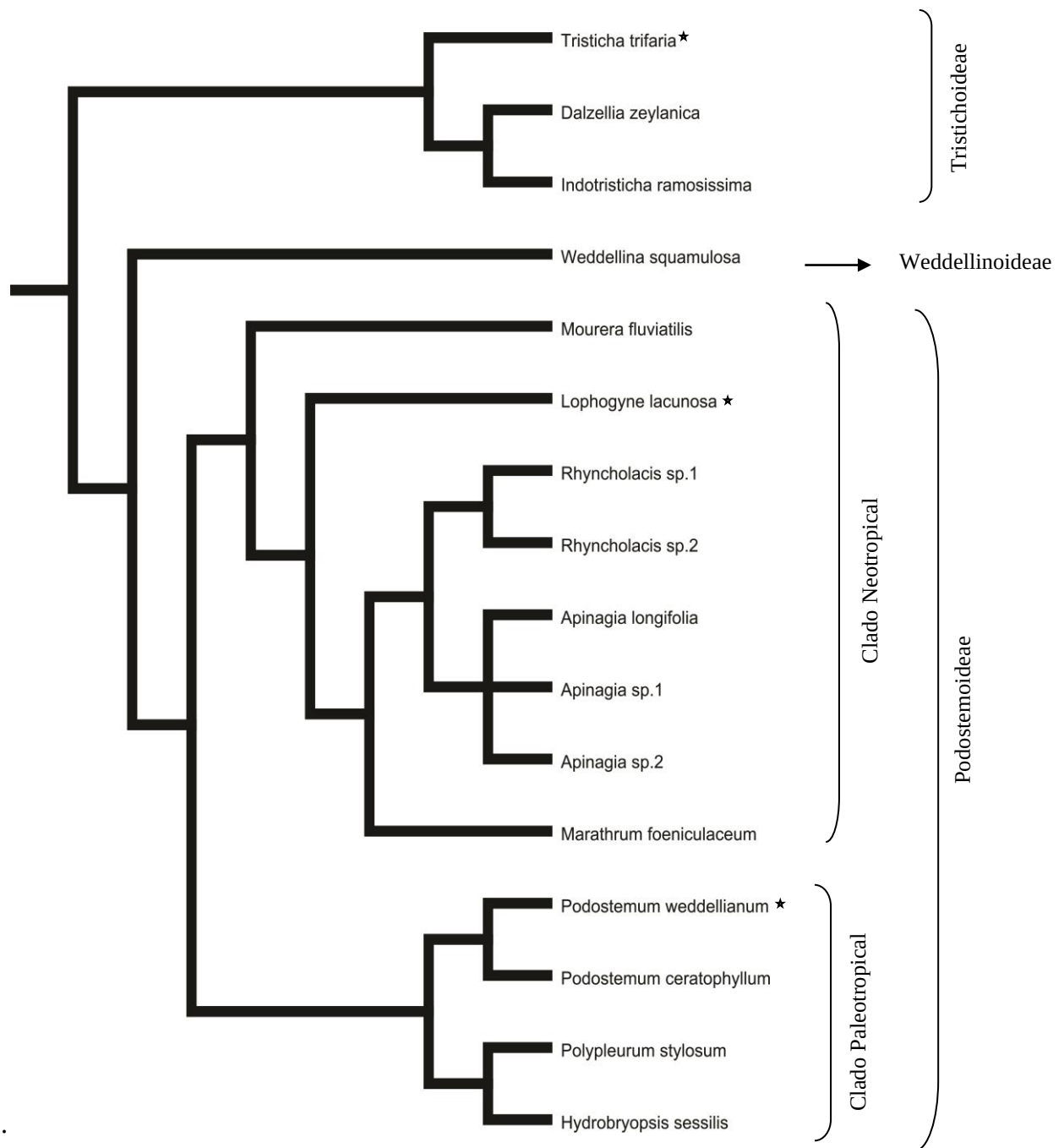


Figura 27: Árvore de consenso da filogenia de espécies de Podostemaceae segundo Tippersy *et al.* (2011), Ruhfel *et al.* (2011) e Koi *et al.* (2012), apenas com as espécies que possuem dados de biologia reprodutiva. *Espécies estudadas neste trabalho.

A proporção pólen/óvulo de 0,73 a 1,48 é compartilhada por todas as espécies analisadas da subfamília *Tristichoideae*, no entanto, não foi possível estabelecer se este é um estado plesiomórfico ou apomórfico para a família (Figura 28). É necessário investigar como este caráter se apresenta no grupo externo (*Hypericaceae*). Considerando a segunda hipótese (apomorfia), torna-se uma sinapomorfia para a subfamília *Tristichoideae*, surgindo independentemente no gênero *Podostemum*. Com relação aos estados 1,49 a 2,21 e 2,22 a 2,86 e também não foi possível estabelecer, de acordo com o método da parcimônia, qual dos dois estados teria surgido primeiro, entretanto, em se tratando de estados de caráter quantitativos, é mais lógico supor que o aumento da proporção seja a linha evolutiva seguida na família, com reversões independentes em *Lophogyne lacunosa*, *Apinagia* sp2 e *Hydrobryopsis sessilis*. O gênero *Podostemum* apresentou uma reversão para o estado de menor proporção, o que, neste momento, pode ser considerado uma sinapomorfia deste gênero dentro do clado das *Podostemoideae* paleotropicals.

A dicogamia está presente em *Tristichoideae*, *Weddellinoideae*, no clado das *Podostemoideae* neotropicais e em *Polypleurum stylosum* do clado das *Podostemoideae* paleotropicals (Figura 29). A protoginia é o estado plesiomórfico encontrado em *Tristichoideae* e no ancestral das *Podostemoideae*. A protandria é uma autapomorfia de *Weddellinoideae*, surgindo em *Apinagia* e *Rhyncholacis*. A ausência da dicogamia (protandria ou protoginia) pode ser uma sinapomorfia do clado paleotropical de *Podostemoideae*, com uma reversão em *Polypleurum stylosum*.

Flores sem odor é um estado de caráter compartilhado na subfamília *Tristichoideae*, no clado paleotropical de *Podostemoideae*, em *Lophogyne lacunosa* e em *Marathrum foeniculaceum*. No entanto não é possível estabelecer se é derivado ou não pela ausência de um grupo externo à família, assim como também não é possível reconhecer reversões. As flores odoríferas surgiram independentemente na subfamília *Weddellinoideae*, em *Mourera fluviatilis*, *Apinagia* e *Rhyncholacis* (Figura 30). Flores polinizadas por abelhas apresentam o mesmo padrão evolutivo das flores odoríferas (Figura 31).

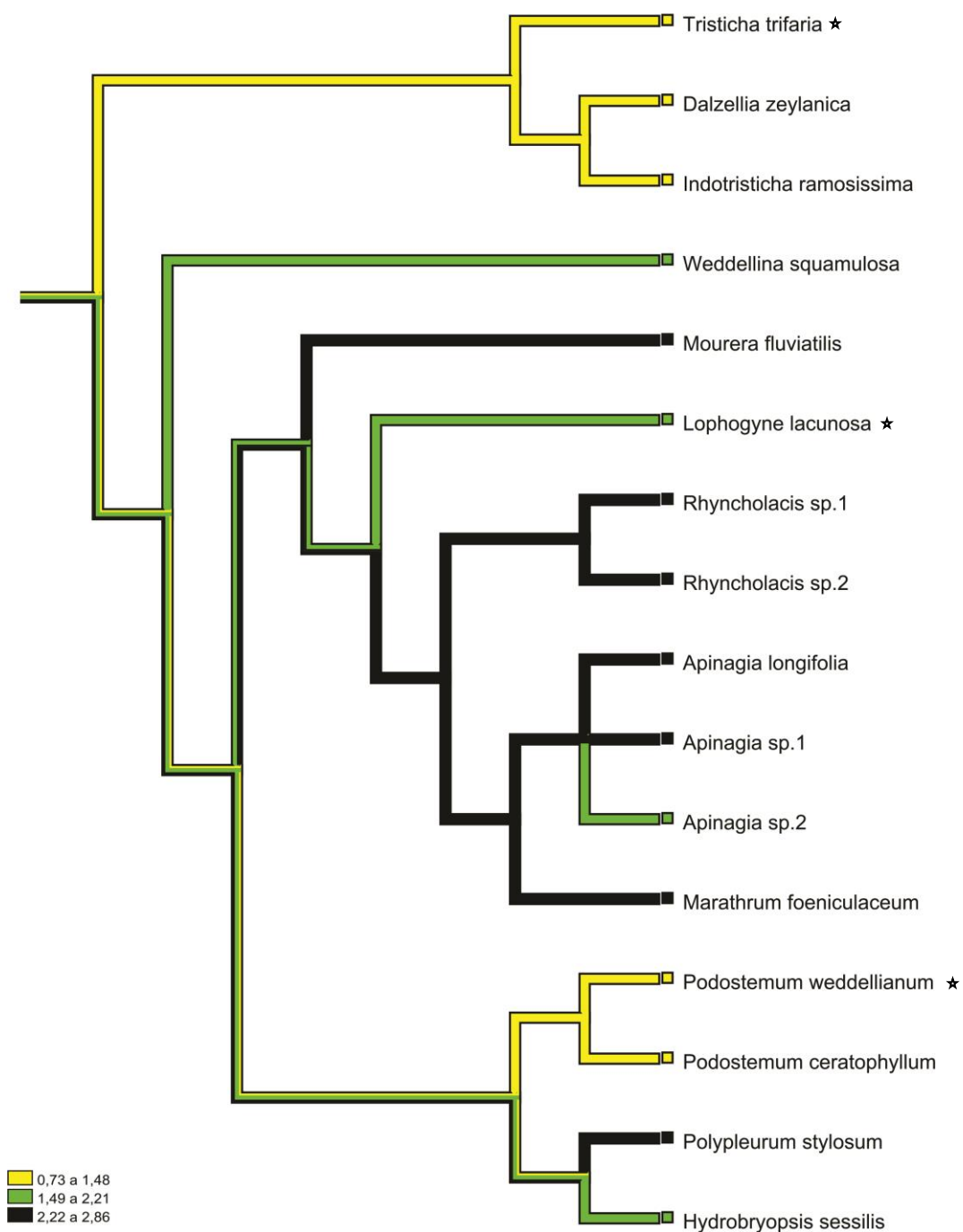


Figura 28: Otimização dos estados do caráter proporção pólen/óvulo na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★ Espécies estudadas neste trabalho.

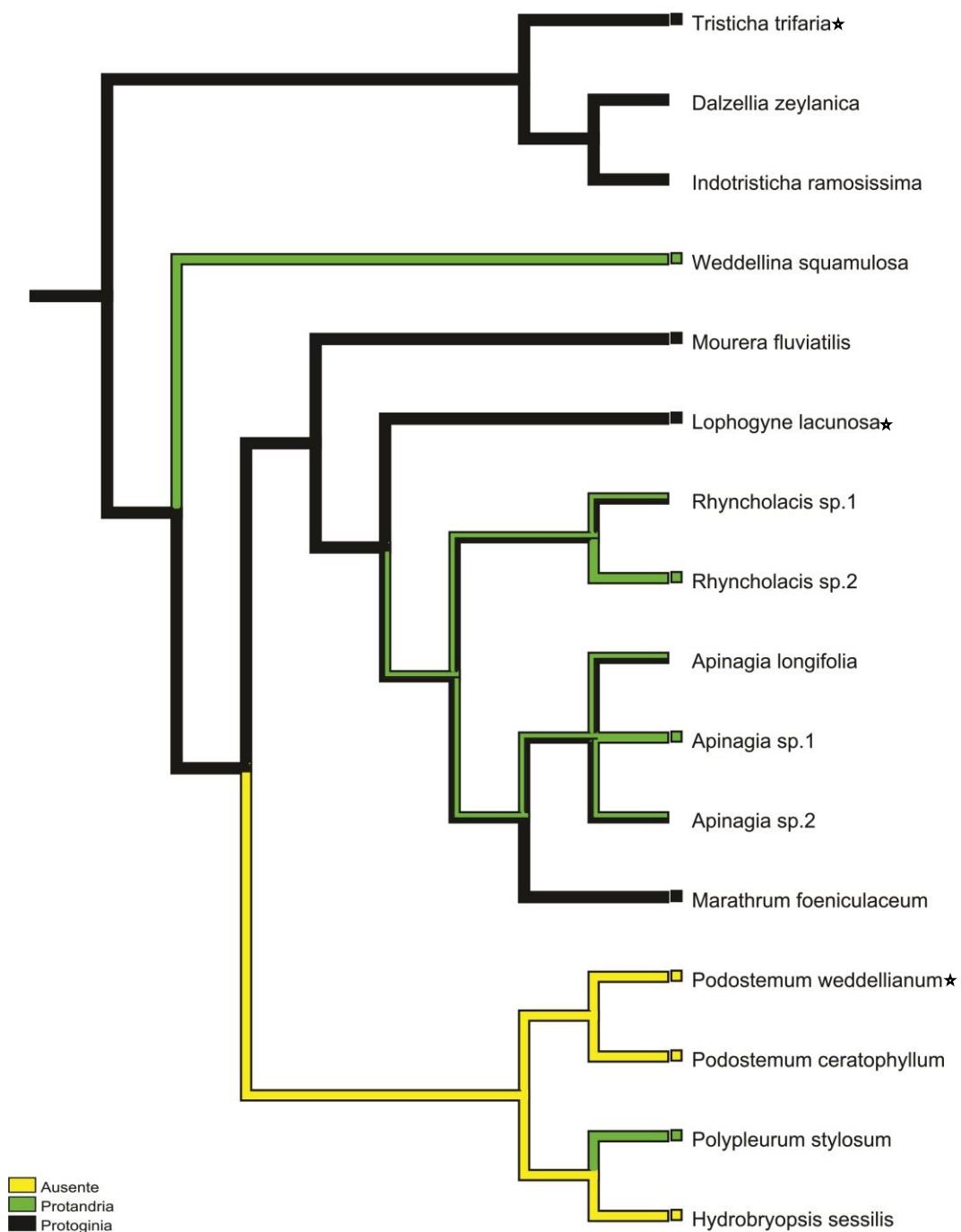


Figura 29: Otimização dos estados de dicogamia na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★Espécies estudadas neste trabalho.

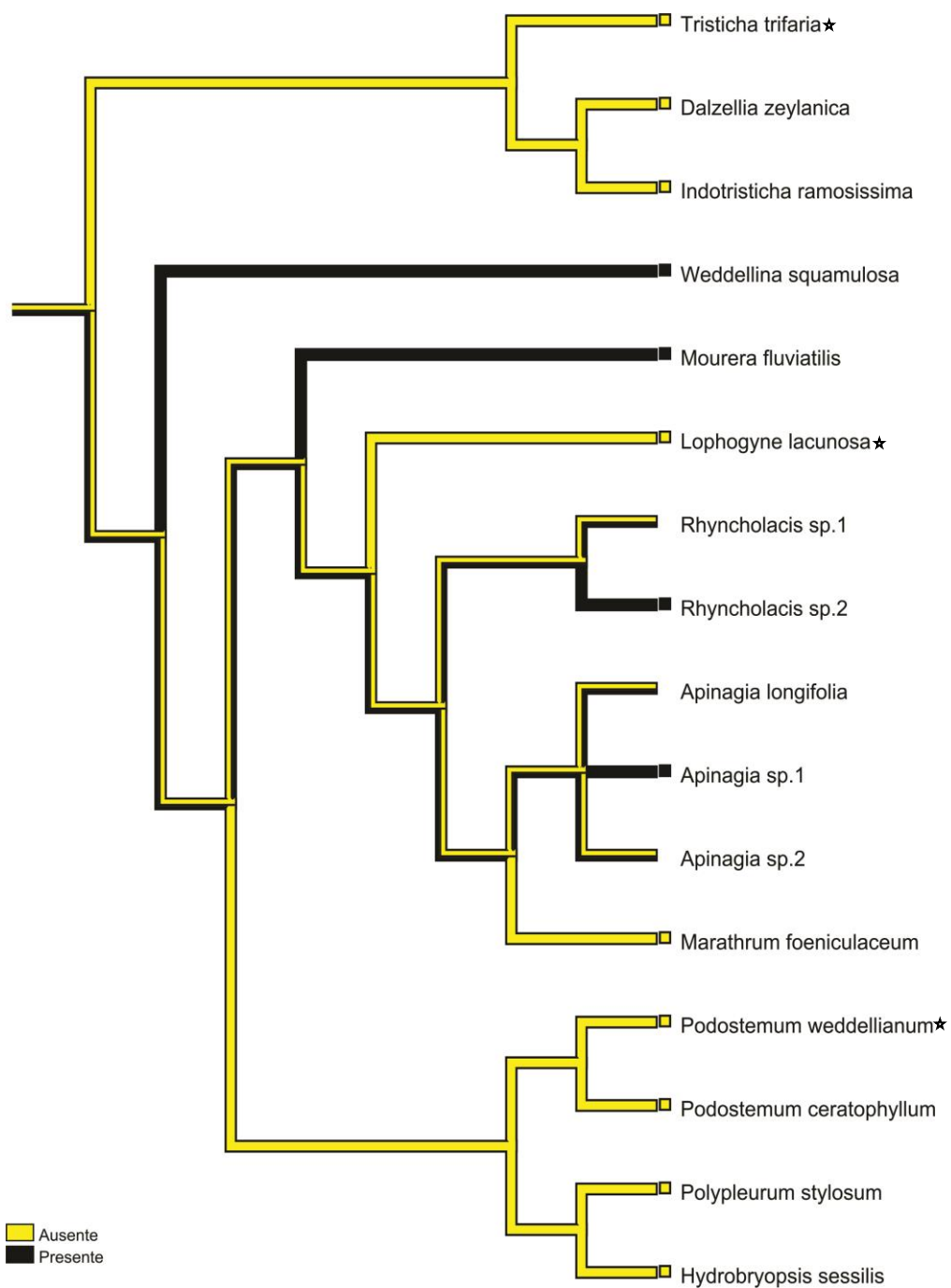


Figura 30: Otimização dos estados de flores odoríferas na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★ Espécies estudadas neste trabalho.

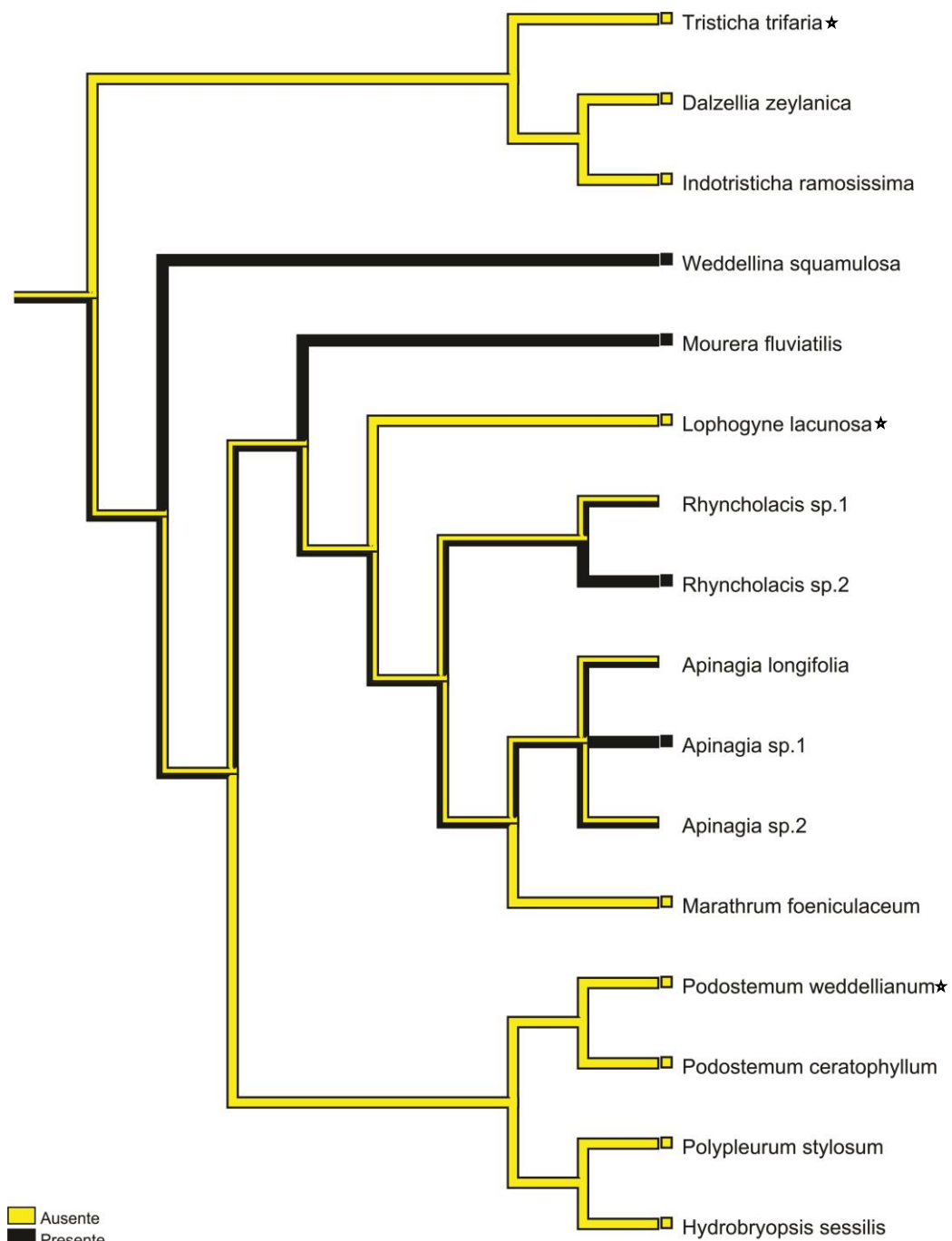


Figura 31: Otimização dos estados de flores polinizadas por abelhas na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★ Espécies estudadas neste trabalho.

A polinização por moscas aparece em apenas duas espécies distantes filogeneticamente (Figura 32).

As flores polinizadas pelo vento surgem como uma provável sinapomorfia do clado neotropical de *Podostemoideae*, com uma reversão em *Apinagia* sp1 e *Rhyncholacis* sp1 (Figura 33).

A autopolinização ocorre na maioria das espécies investigadas de Podostemaceae, exceto em *Apinagia* sp 1 e *Rhyncholacis* sp2 (Figura 34), sendo possível o seu reconhecimento como estado plesiomórfico dentro da família.

A autopolinização nos primeiros estádios da antese é o estado plesiomórfico para a família. A autopolinização no botão ocorre apenas no clado paleotropical de *Podostemoideae*, entretanto não é possível afirmar se é uma sinapomorfia com reversão em *Polypleurum stylosum* ou se este estado surgiu independentemente no gênero *Podostemum* e em *Hydrobriopsis sessilis*. A autopolinização no final da antese é um estado de caráter exclusivo de *Mourera fluviatilis* (Figura 35).

Os frutos partenocárpicos surgem nos grupos basais do clado neotropical de *Podostemoideae*, sendo a sua presença ou ausência em *Apinagia* e *Rhyncholacis* desconhecida. Desta forma, não é possível estabelecer se a ausência de partenocarpia em *Marathrum foeniculaceum* é uma reversão ou a permanência do estado plesiomórfico. No clado paleotropical de *Podostemoideae*, a partenocarpia surge independentemente em *Podostemum ceratophyllum* (Figura 36).

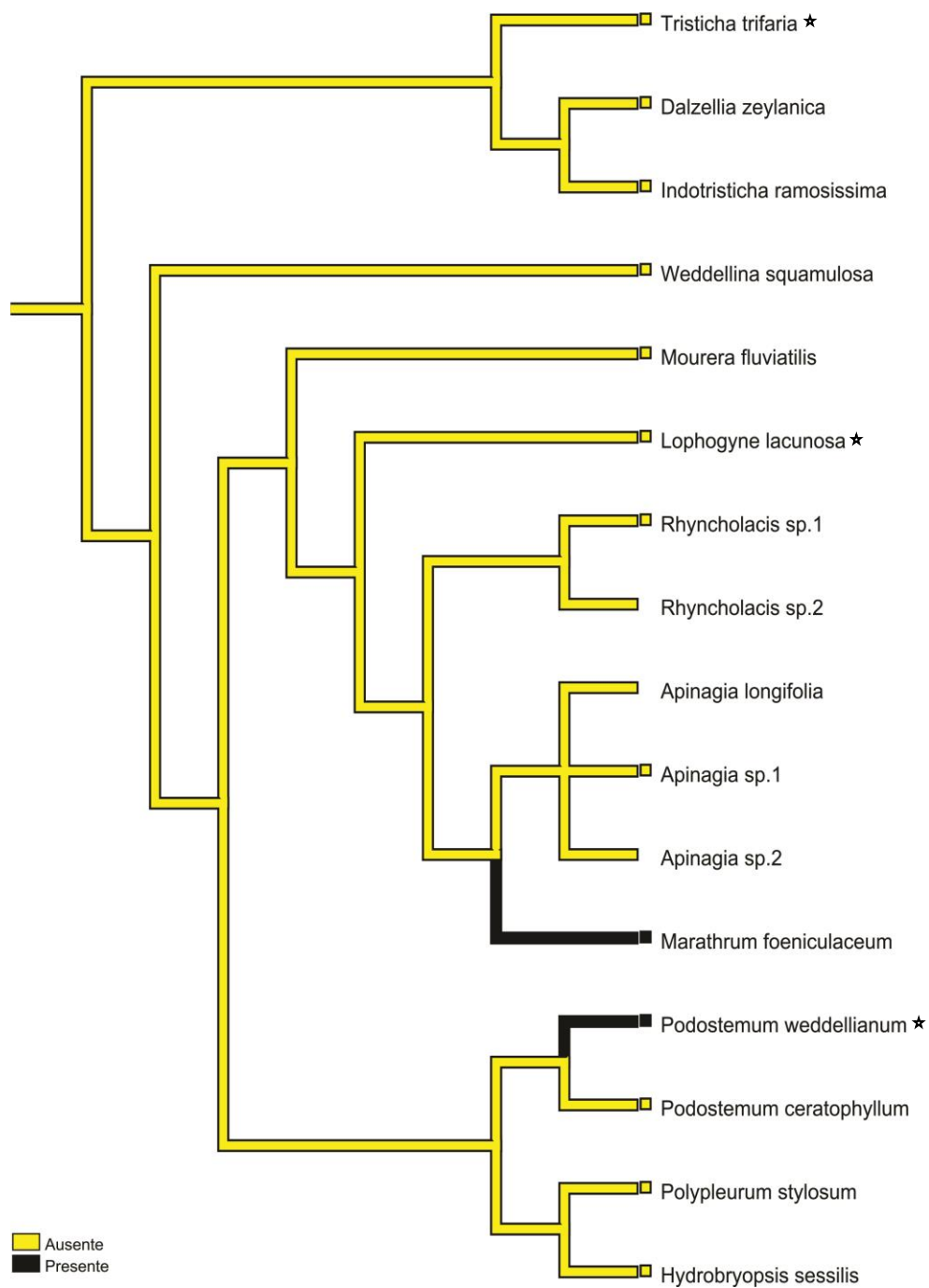


Figura 32: Otimização dos estados de flores polinizadas por moscas na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★ Espécies estudadas neste trabalho.

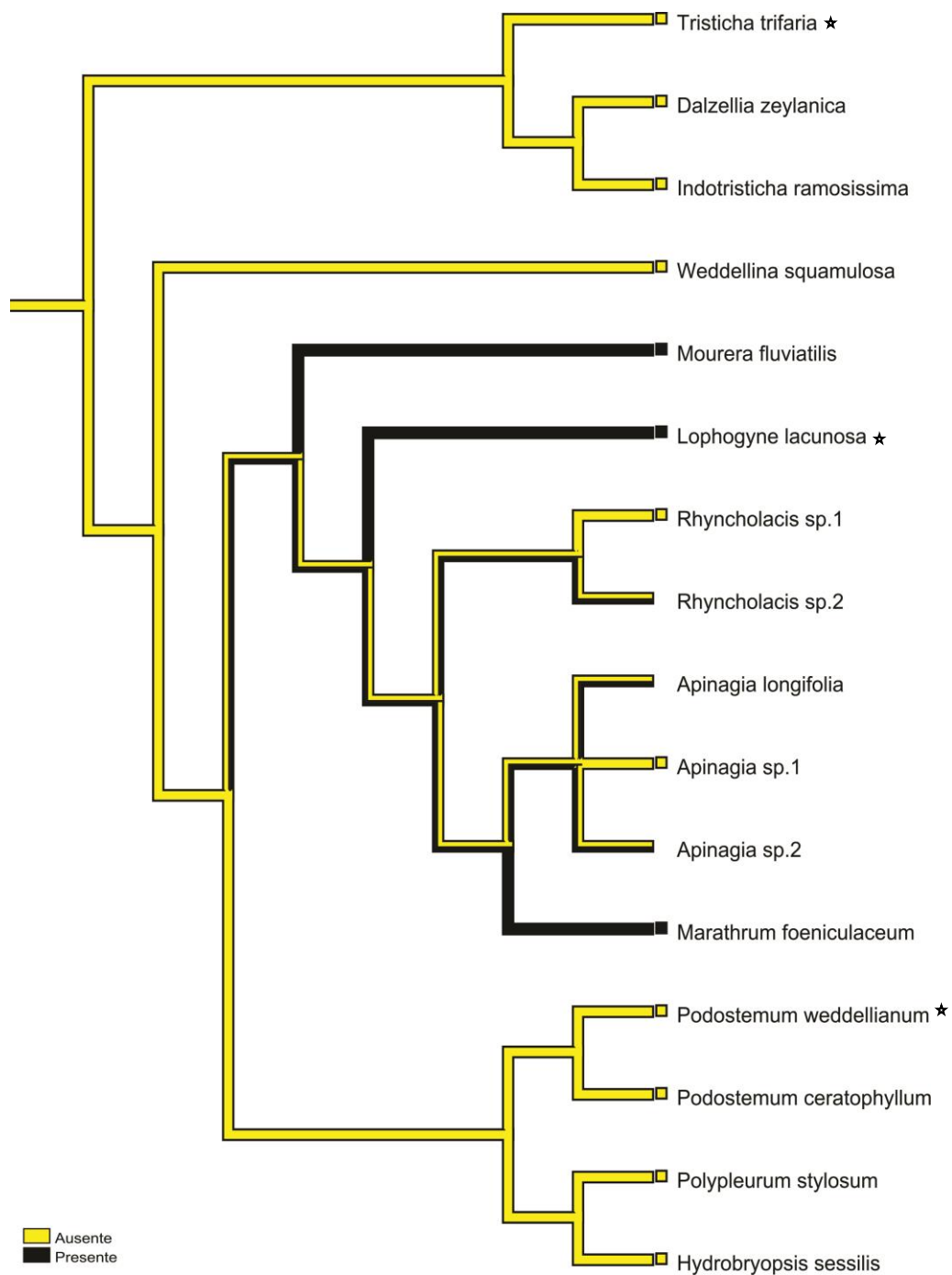


Figura 33: Otimização dos estados de flores polinizadas pelo vento na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★ Espécies estudadas neste trabalho.

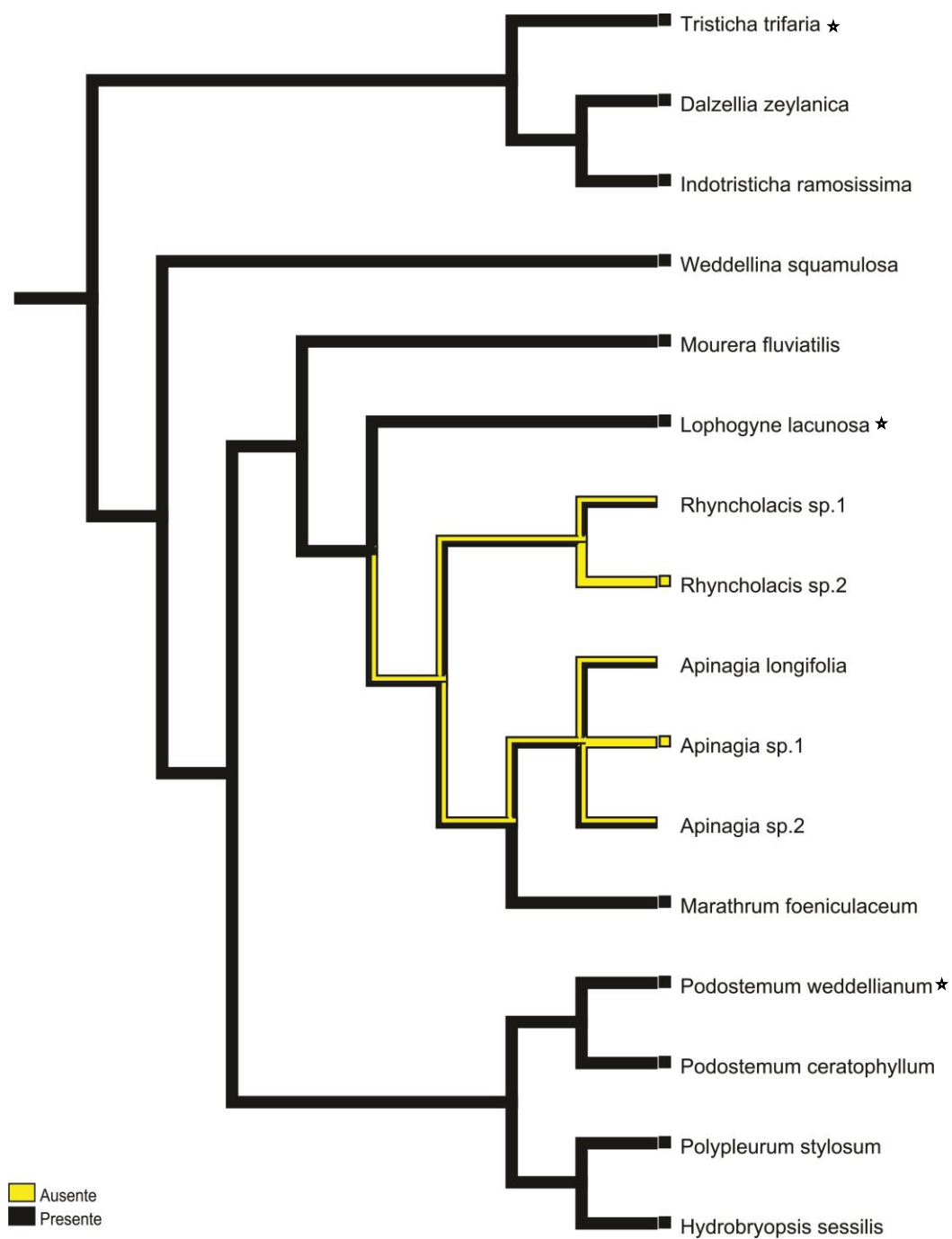


Figura 34: Otimização dos estados de autopolinização na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. *Espécies estudadas neste trabalho.

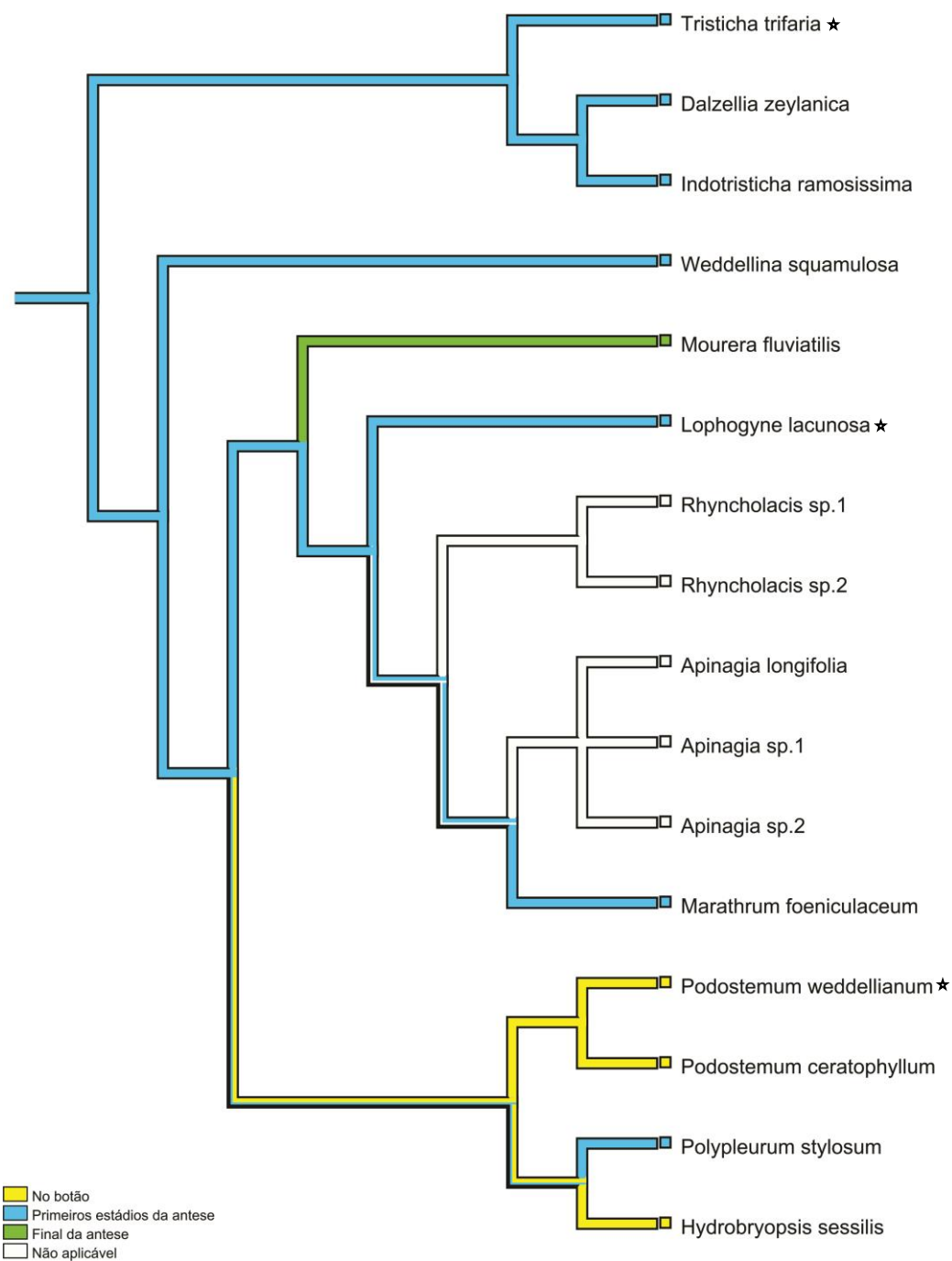


Figura 35: Otimização dos estádios da autopolinização na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★ Espécies estudadas neste trabalho.

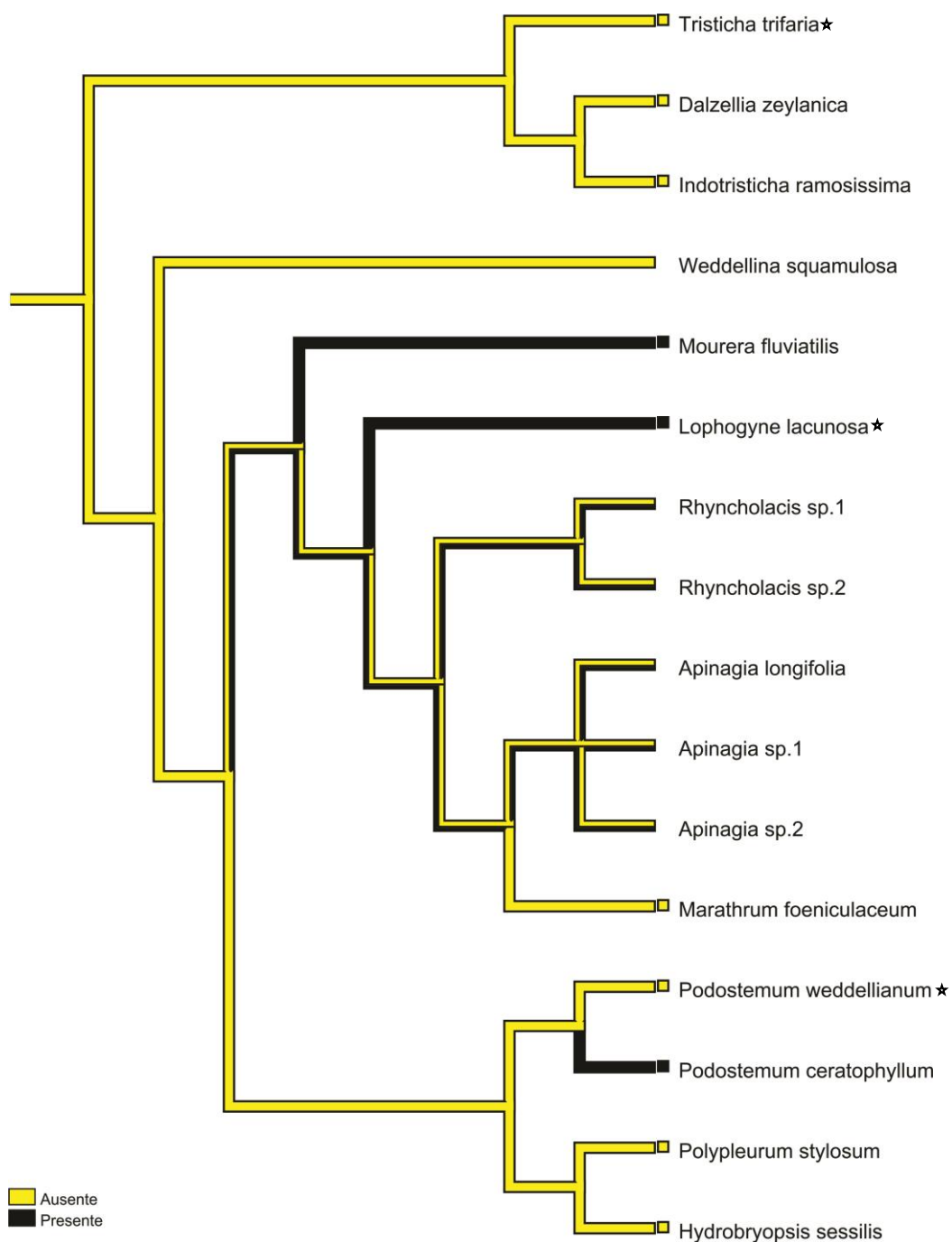


Figura 36: Otimização dos estados de partenocarpia na hipótese filogenética de Podostemaceae. Os terminais marcados com quadrado apresentam os estados de caracteres obtidos neste estudo e de bibliografia. ★Espécies estudadas neste trabalho.

4 DISCUSSÃO

4.1. Morfologia, Biologia floral e Polinizadores

As espécies de Podostemaceae apresentam uma morfologia vegetativa incomum, resultado de uma adaptação ao tipo de hábitat de forte pressão seletiva (corredeiras). Esta especialização vegetativa foi acompanhada pela redução floral e por outras características como cores esmaecidas (geralmente esverdeadas) e pólen como única fonte de recurso aos possíveis polinizadores (Sculthorpe 1966; Philbrick 1984; Philbrick 2004; Jäger-Zürn 1997).

De acordo com a bibliografia (e.g. Philbrick & Novelo 1997; Cook & Rutishauser 2007), muitas espécies são polinizadas pelo vento e uma pequena parte é polinizada por abelhas, tais afirmações, em alguns casos, são baseadas apenas na morfologia floral, utilizando as síndromes de polinização, características dos grãos de pólen e algumas observações esporádicas de campo. As síndromes de polinização (Faegri & van der Pijl 1980) inferem o polinizador através de características como formato das flores, cor, odor e horário de abertura. Embora os polinizadores possam ser deduzidos através da síndrome de polinização, deve-se ter muito cuidado ao seguir tal premissa, pois nem sempre é verificada esta relação (Xie *et al.* 2013).

Um exemplo desta situação ocorre na subfamília *Tristichioideae*. Segundo Cook & Rutishauser (2007) todas as espécies de *Tristichioideae* são polinizadas pelo vento. Entretanto os trabalhos de Gupta & Seghal (2009) Seghal *et al.* (2010) e Okada & Kato (2002) demonstram que *Dalzellia zeylanica* e *Indotristicha ramosissima* só realizam autopolinização. Em *Tristicha trifaria* as flores possuem tamanho muito reduzido (<5 mm), produzem uma pequena quantidade de pólen por flor (ca. 300) e as anteras estão extremamente próximas dos estigmas no momento de sua deiscência, desta maneira o pólen dificilmente seria removido pelo vento. Além disso, não foi encontrado o seu pólen nas armadilhas. Devido a tais características, *Tristicha trifaria* realiza autopolinização e não apresenta polinização pelo vento.

De acordo com Philbrick & Novelo (2004) as espécies de *Podostemum* Michx. estão adaptadas à autopolinização, visto que suas flores são inconspícuas e apresentam baixa proporção pólen/óvulo. A autopolinização é frequente em *Podostemum weddellianum*, uma vez que ela ocorre dentro do botão e também pela proximidade das

antras com os estigmas nos primeiros estádios da antese. No entanto, esta espécie apresenta *pollenkitt* (Marinho 2013) e um longo tempo de receptividade do estigma, o que favorece a polinização cruzada. O extenso tempo em que o estigma fica receptível, desde a fase de botão até mesmo após da liberação de todo o pólen, propicia a polinização cruzada. Já a presença de *pollenkitt*, cuja função é ajudar na adesão dos grãos de pólen ao corpo dos polinizadores, está associada à polinização entomófila (Endress 1994; Passi & Hesse 2005).

De acordo com as observações de campo, as flores de *Podostemum weddellianum* podem ser polinizadas, eventualmente, por uma espécie de *Syllimnophora* (Diptera). Os indivíduos de *Syllimnophora* sp. se deslocam sobre a parte vegetativa da planta tocando seu corpo e pernas nas antras e estigmas das flores, podendo realizar geitonogamia ou xenogamia. Algumas vezes foram observadas estas moscas introduzindo o aparelho bucal nas antras das flores nos primeiros estádios da antese, onde ainda havia uma quantidade razoável de pólen nas antras. Provavelmente *Syllimnophora* sp. visita as flores de *Podostemum weddellianum* para se alimentar de pólen. Os grãos de pólen são uma fonte de proteína consumida principalmente pelas fêmeas de alguns grupos de Diptera, cuja função é manter o bom funcionamento do aparelho reprodutivo (Hickman *et al.* 1995; Passi & Hesse 2005). Há relatos de moscas alimentando-se de pólen em três espécies do gênero *Marathrum* Bonpl. (Philbrick & Novelo 1997), os autores consideram estas moscas como polinizadores acidentais.

A polinização cruzada em *Lophogyne lacunosa* é realizada pelo vento e suas flores possuem características que otimizam a captura de pólen, como flores bem expostas e estigmas proporcionalmente grandes em relação ao tamanho das flores. Além destas características, o pólen de *Lophogyne lacunosa* foi encontrado nas armadilhas. A polinização pelo vento foi relatada para *Marathrum tenue* Liebm. e *Marathrum foeniculaceum* (citada em Philbrick & Novelo 1997 pelo sinônimo *M. rubrum* Novelo & C. T. Philbrick) e para *Marathrum plumosa* (Philbrick & Novelo 1998). Estas espécies apresentam pólen seco, sem *pollenkitt*, que é facilmente levado pelo vento (Philbrick & Novelo 1997; Philbrick & Novelo 1998). As flores de *Lophogyne lacunosa* também apresentam características que favorecem a autopolinização, como o posicionamento das antras acima dos estigmas durante a antese. Quando a deiscência das antras ocorre, o pólen cai diretamente sobre os estigmas receptivos realizando a autopolinização. Segundo Tavares (1997) espécies que apresentam poucos estames

localizados em um lado da flor têm favorecimento da autopolinização sobre a polinização cruzada. E, de fato, isto é observado nas espécies aqui estudadas.

O início da antese nas flores de Podostemaceae ocorre principalmente pela manhã e em apenas uma espécie, *Mourera fluviatilis*, as flores abrem ao longo do dia (Philbrick & Novelo 1998; Okada & Kato 2002; Gupta & Seghal 2009; Seghal *et al.* 2010; Sobral-Leite *et al.* 2011). No entanto em *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum*, observou-se que as flores iniciam antese em dois horários do dia, entre 7:00 - 10:00h e 13:00 - 14:30h, no período da manhã existe maior número de flores abertas: pela manhã são encontradas 78% e 86% para as duas espécies respectivamente. O fato das flores abrirem em tempos diferentes pode influenciar na quantidade de pólen disponível para a polinização cruzada, visto que uma flor que já liberou seu pólen pode receber pólen cruzado de outra flor em que as anteras acabaram de abrir.

Segundo Philbrick & Novelo (1997), Gupta & Seghal (2009), Seghal *et al.* (2010) e Sobral-Leite *et al.* (2011) a longevidade floral em Podostemaceae é de 4 a 6 horas até 3 a 4 dias. No entanto, todas as espécies aqui analisadas possuem 5 a 6 dias de longevidade floral. A senescência das flores pode ser desencadeada pela polinização ou ainda pela disponibilidade de água no solo (Jorgensen & Arathi 2013; Weber & Goodwillie 2013).

Em *Dalzellia zeylanica* e *Indotristicha ramosissima* é possível que a longevidade floral esteja relacionada com a polinização, pois suas flores duram apenas algumas horas e ficam senescentes logo após a polinização. Entretanto nas espécies estudadas a longevidade floral não é determinada pela polinização, pois esta ocorre no botão e nos primeiros estádios da antese. Nas espécies polinizadas pelo vento (e.g. *Marathrum foeniculaceum*) possuem longevidade floral mais extensa, do que aquelas polinizadas por abelhas (e.g. *Mourera fluviatilis*) (Philbrick & Novelo 1998; Sobral-Leite *et al.* 2011). A maior longevidade floral maximiza a captura de pólen proveniente de polinização cruzada e deve ser uma estratégia utilizada pelas flores de Podostemaceae que realizam polinização pelo vento ou têm polinizadores bióticos escassos ou ocasionais, como é o caso de *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum*.

Em *Lophogyne lacunosa* e *Tristicha trifaria* há uma separação temporal entre as fases masculina e feminina, na qual a feminina está disponível primeiro, entretanto há uma sobreposição entre estas fases. Trata-se de uma protoginia incompleta, na qual os

estigmas estão disponíveis antes da deiscência das anteras e se mantém assim durante a fase masculina (Lloyd & Webb 1986; Bertin & Newman 1993). Em Podostemaceae a protoginia foi relatada para *Marathrum foeniculaceum* e *Mourera fluviatilis* (Philbrick & Novelo 1998; Sobral leite *et al.* 2011). Contudo nestes trabalhos só é utilizado o termo protoginia, sem a menção se ela é completa ou incompleta. De acordo com a descrição da antese destas espécies, trata-se de uma protoginia incompleta. Este tipo de protoginia é uma forma de garantir a formação de sementes através da autopolinização caso ocorra alguma falha na polinização cruzada (Lloyd & Webb 1986). Segundo Philbrick & Novelo (2004) todas as espécies de *Podostemum* são protogínicas. Todavia em *Podostemum weddellianum* não há protoginia, pois as anteras e os estigmas estão disponíveis ao mesmo tempo, inclusive no botão jovem. Outro tipo de dicogamia, a protandria, ocorre em *Weddellina squamulosa* (Jüger-Ziirn 1997), em *Polypleurum stylosum* (Khosla *et al.* 2000), em uma espécie do gênero *Apinagia* e outra de *Rhyncholacis* (Okada & Kato 2002), apesar do termo protandria ter sido utilizado apenas para *Weddellina squamulosa*.

A moderada viabilidade polínica das espécies estudadas pode ser provocada pelos respingos frequentes de água e/ou umidade excessiva, depressão endogâmica (altas taxas de endogamia) ou pela presença de apomixia. A água, até mesmo a umidade, pode diminuir a viabilidade polínica, inclusive de plantas aquáticas que não são adaptadas à polinização pela água (Bassini *et al.* 1994; Philbrick & Les 1996; Mao & Huang 2009). Altas taxas de endogamia, cruzamento entre parentes e autogamia podem levar à perda de *fitness* masculino, causando baixa viabilidade polínica (Richards 1986). No caso de *Lophogyne lacunosa*, onde foi comprovada a presença de apomixia, é provável que ela seja a responsável pela baixa viabilidade. Segundo Goldenberg & Varassin (2001), que estudaram 13 espécies da Tribo *Miconieae* da família Melastomataceae, grupo amplamente conhecido por apresentar apomixia, foi observado que espécies apomíticas apresentam menor porcentagem de viabilidade do pólen do que espécies não apomíticas. Em espécies de *Hypericum* (Hypericaceae), grupo estreitamente relacionado com Podostemaceae, foi obtido resultado semelhante, com espécies apomíticas apresentando menor taxa de viabilidade polínica do que aquelas que se reproduzem sexualmente (Matzk *et al.* 2003).

Diferente das espécies aqui estudadas, algumas espécies de Podostemaceae apresentam alta viabilidade polínica (>95% de grãos de pólen viáveis) (Kosla *et al.*

2000; Gupta & Sehgal 2009; Sobral-Leite *et al.* 2011). *Mourera fluvitalis* apresenta flores em inflorescência com longo pedúnculo, o que as distancia da água, a taxa de autogamia é pequena e não apresentam apomixia (Sobral-Leite *et al.* 2011). Não é possível a comparação da viabilidade polínica relatada para *Polypleurum stylosum* (95%) (Kosla *et al.* 2000) com as espécies aqui estudadas devido aos diferentes métodos de coloração utilizados (reação fluorocromática e coloração por carmim acético, respectivamente). Em *Indotristicha ramosissima* e *Podostemum weddellianum* as informações existentes são insuficientes para explicar as diferenças entre a alta porcentagem de viabilidade das espécies citadas acima com as espécies aqui estudadas (Philbrick 1998; Gupta & Sehgal 2009).

4.2. Sistema reprodutivo

A autogamia está presente em *Lophogyne lacunosa*, *Podostemum weddellianum* e *Tristicha trifaria*. Tal fato já era esperado, uma vez que a autopolinização ocorre em *Dalzellia* (Sehgal *et al.* 2010), *Hydrobryopsis* (Sehgal *et al.* 2009), *Indotristicha* (Gupta & Sehgal 2009), *Marathrum* (Philbrick & Novelo 1998), *Mourera* (Sobral-Leite *et al.* 2011), *Podostemum* (Philbrick *et al.* 2006), *Polypleurum* (Khosla *et al.* 2000) e *Weddellina* (Jäger-Zürn); não ocorrendo apenas em espécies dos gêneros *Apinagia* e *Rhyncholacis* (Okada & Kato 2002). A autopolinização pode ser uma estratégia adaptativa quando há falhas ou falta de polinizadores no ambiente, sejam eles abióticos ou bióticos, sendo uma maneira de garantir a fixação de um genótipo mais bem adaptado a certas condições ambientais (Lloyd & Schoen 1992; Richards 1986).

A autopolinização espontânea em Podostemaceae pode ocorrer em três fases diferentes da flor: no botão em pré-antese, nos primeiros estádios da antese ou no final da antese. Nas espécies em que há polinização dentro no botão em pré-antese, como *Podostemum weddellianum*, *P. ceratophyllum* e *Hydrobryopsis sessilis*, foi observado tubo polínico nos estigmas de botões (Sá-Haiad *et al.* 2010; Philbrick *et al.* 2006; Sehgal *et al.* 2009). No botão de *Podostemum weddellianum* as anteras estão deiscentes e ficam extremamente próximas dos estigmas que já estão receptivos, promovendo autopolinização. A autopolinização dentro do botão parece ser um fator importante para a formação de sementes em *Podostemum ceratophyllum*, pois as flores que as anteras

abrem depois do rompimento da espatela o pólen é perdido e não há formação de sementes (Philbrick 1984). Entre os botões de *Podostemum weddellianum* analisados, alguns apresentaram anteras amareladas, estigmas marrons, ovário marrom e rígido e sementes com embrião em seu interior. Estas características foram consideradas como evidências indiretas de cleistogamia e que estes “botões” são, na verdade, frutos provenientes de uma flor que não abriu. A cleistogamia foi relatada para *Podostemum ceratophyllum*, *P. weddellianum* e *Hydrobryopsis sessilis* (Philbrick *et al.* 2006; Sá-Haiad *et al.* 2010; Sehgal *et al.* 2009, respectivamente). Nesta última, a autopolinização pode ocorrer dentro do botão com a espatela rompida ou não, neste caso a não abertura da flor deve-se à submersão das flores (Sehgal *et al.* 2000). Em plantas aquáticas geralmente a cleistogamia está relacionada com o nível da água (Sculthorpe 1966). Nos trabalhos que tratam sobre cleistogamia em Podostemaceae é utilizado o termo “cleistogamia pré-antese” (Philbrick *et al.* 1984; Philbrick *et al.* 2006; Sehgal *et al.* 2009). Lord (1982) define este tipo de cleistogamia como aquela onde a autopolinização ocorre dentro do botão, depois a flor abre e a antese é iniciada. Entretanto Culley & Klooster (2007) afirmam que a “cleistogamia pré-antese” nada mais é do que uma autopolinização de uma flor casmógama dentro do botão e por isso não pode ser classificada como um tipo de cleistogamia. A “cleistogamia pré-antese” foi utilizada equivocadamente nos trabalhos citados e não deve ser considerada um tipo de cleistogamia. É provável que o tipo de cleistogamia encontrada em *Podostemum ceratophyllum*, *Podostemum weddellianum* e *Hydrobryopsis sessilis* seja um caso de cleistogamia induzida; onde a não abertura da flor é influenciada diretamente pelo meio ambiente, resultando na formação de flores cleistógamas (Culley & Klooster 2007).

A autopolinização pode ocorrer também nos primeiros estádios da antese. As anteras de *Tristicha trifaria* quando abrem estão totalmente encostadas nos estigmas e por isso realizam autopolinização. Em *Dalzellia zeylanica* e *Indotristicha ramosissima* os filetes crescem e posicionam as anteras acima dos estigmas; no momento da deiscência das anteras, o pólen cai diretamente sobre os estigmas receptivos. Em nenhum momento da antese os estigmas e as anteras ficam encostados (Gupta & Sehgal 2009; Sehgal *et al.* 2010). Este último processo de autopolinização também ocorre em *Lophogyne lacunosa*.

A autopolinização no final da antese é relatada apenas para *Mourera fluviatilis*. Nas flores desta espécie as anteras ficam distantes dos estigmas, mas ao final da antese

eles se tocam e realizam autopolinização (Sobral-Leite *et al.* 2011). Segundo estes autores a autopolinização é uma forma de assegurar a formação de sementes nos espécimes que se encontram em trechos mais turbulentos do rio, onde as abelhas não conseguem chegar.

Lophogyne lacunosa apresenta alta taxa de frutificação, o que pode estar relacionado com a combinação de sistemas reprodutivos. Este fenômeno é conhecido como *mixed matting* ou sistema reprodutivo misto, sendo uma estratégia reprodutiva na qual flores hermafroditas realizam tanto autogamia como xenogamia (Goodwillie *et al.* 2005). Isto também foi observado em *Marathrum foeniculaceum* (Philbrick & Novelo 2004) e *Mourera fluviatilis* (Sobral-Leite *et al.* 2011), apesar destes autores não terem utilizado tal termo. Muitas plantas apresentam um balanço estratégico entre a autogamia e xenogamia, pois é um modo de assegurar a formação de sementes (Goodwillie *et al.* 2005). Além do mais, as sementes oriundas de xenogamia mantêm a variabilidade genética e aquelas geradas de autogamia fixam um genótipo mais bem adaptado para a situação vigente (Richards 1986), o que garante a perpetuação da espécie tanto para a estabilidade quanto para uma possível instabilidade do *status quo*. Existem três modos fundamentais de reprodução nas angiospermas: a xenogamia, autogamia e a reprodução assexuada (reprodução vegetativa e apomixia) (Richards 2003). Apesar da apomixia não ter sido incluída nas descrições de sistema reprodutivo misto, pode-se cogitar a sua inclusão, uma vez que a apomixia é um modo de reprodução. Em *Lophogyne lacunosa* existe a combinação de autogamia, xenogamia e apomixia, ressaltando que a apomixia existe, é provável que todos os resultados dos outros tratamentos apresentem sementes apomíticas.

A apomixia em *Lophogyne lacunosa* é provavelmente gametofítica e facultativa. Os apomíticos gametofíticos, na maioria das vezes, não são dependentes de polinização para iniciar a formação do embrião e geralmente é encontrado apenas um embrião por semente; enquanto os apomíticos esporofíticos, usualmente, são dependentes da polinização para o sucesso do embrião apomítico e são encontrados mais de um embrião por semente (Koltunow 1993; Grossniklaus *et al.* 2001; Koltunow & Grossniklaus 2003). Em *Lophogyne lacunosa* não se trata de uma apomixia esporofítica, pois os estigmas foram retirados, excluindo-se a possibilidade de polinização e também por ter sido observado apenas um embrião por semente. Nos tratamentos de apomixia nem todas as flores formaram frutos apomíticos, ou seja, é possível que a apomixia em

Lophogyne lacunosa não seja obrigatória. Os apomíticos facultativos retêm a capacidade de se reproduzir sexuadamente (Richards 1986), e isto é observado em *Lophogyne lacunosa*. Para a confirmação de qual é o mecanismo de apomixia nesta espécie são necessários estudos complementares, tais como os de ontogenia.

Frutos partenocárpicos apresentam a mesma aparência morfológica dos frutos normais; em geral não apresentam sementes, mas quando as possuem, são encontradas em número reduzido (Voraquaux *et al.* 2000). Das espécies estudadas apenas *Lophogyne lacunosa* formou frutos sem sementes ou partenocárpicos. Estes também foram encontrados em *Mourera fluviatilis*, resultantes de experimentos para testar agamospermia (Sobral-Leite *et al.* 2011) e em *Podostemum ceratophyllum*, resultantes de controles marcados (Philbrick 1998); entretanto estes frutos não foram denominados como partenocárpicos pelos autores. A partenocarpia é classificada em obrigatória ou facultativa (Voraquaux *et al.* 2000). Em *Lophogyne lacunosa* a formação de frutos partenocárpicos é obrigatória, visto que em todos os frutos resultantes do tratamento de sistema reprodutivo foram observados alguns frutos sem sementes, incluindo o controle.

A partenocarpia pode ocorrer quando há problemas na síntese de auxina e giberelina, na taxa de viabilidade polínica, na polinização ou fertilização ou devido condições ambientais, como falta de chuva (Jordano 1988; Gillaspay 1993; Zangerl *et al.* 1999; Voraquaux *et al.* 2000). Em *Lophogyne lacunosa* é possível que a formação de frutos partenocárpicos ocorra devido à baixa viabilidade polínica. A função ecológica da partenocarpia pode estar relacionada à herbivoria de frutos com e sem sementes ou com o aumento da atratividade de dispersores (Zangerl *et al.* 1999; Ramos-Ordoñez & Arizmendi 2011). Este não parece ser o caso de Podostemaceae, uma vez que os únicos relatos de herbivoria estão relacionados às partes vegetativas submersas, consumidas por algumas espécies de peixes (e.g. *Astyanax*, Characidae; Villela *et al.* 2002) e seus frutos secos deiscentes também não parecem ser atrativos a possíveis dispersores.

4.3 Fenologia

No que se refere a fenologia, os trabalhos de Podostemaceae em geral os trabalhos apenas informam o período de floração, frutificação e que a floração ocorre no período de estiagem, quando o nível do rio diminui e as plantas tornam-se expostas;

sendo este o fator determinante para a floração (Philbrick & Novelo 1997; Philbrick & Novelo 1998; Philbrick & Novelo 2004; Cook & Rutishauser 2007; Sobral-Leite *et al.* 2011). Entretanto, durante o mês de janeiro de 2012, antes do início dos estudos fenológicos, foi observado que alguns indivíduos de *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum* estavam expostos e não estavam em floração. Segundo os resultados do teste de correlação de Spearman a floração está relacionada à temperatura e precipitação, isto indica que fatores ambientais influenciam esta fenofase. É provável que o nível da água não seja o único fator responsável e sim um conjunto de fatores. O padrão de florescimento apresentado por *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum* pode ser considerado, segundo a classificação de Newstrom *et al.* (1994), como anual, pois ocorreu nos dois anos de estudo. Diferenças fenológicas foram observadas nas populações destas duas espécies nas duas localidades estudadas. Em geral, esta heterogeneidade está relacionada com diferenças entre microhabitats (Newstrom *et al.* 1994; Bencke & Morellato 2002; Dahlgren 2007).

Lophogyne lacunosa apresentou diferenças entre o final da floração e o início da frutificação entre as distintas localidades observadas. A floração durou nove meses em Aldeia Velha e oito meses em Frade. O mesmo ocorreu com o pico de floração: setembro em Aldeia Velha e junho em Frade. A floração em Aldeia Velha e Frade foi sincrônica, mas em meses diferentes: agosto, setembro e outubro em Aldeia Velha e julho em Frade. A frutificação durou nove meses em Aldeia Velha, com pico em setembro; enquanto em Frade durou oito meses com pico em julho.

Podostemum weddellianum apresentou diferença entre o final da floração entre as distintas localidades observadas. A floração durou nove meses em Aldeia Velha, enquanto em Frade durou oito meses. O pico de floração foi igual nas duas áreas de estudo, no mês de junho. A frutificação possui o mesmo tempo de duração nas duas populações, nove meses, e apresentou pico no mês de setembro em Aldeia Velha e no mês de junho a agosto em Frade.

Nas duas localidades a fenofase de floração em *Lophogyne lacunosa* e *Podostemum weddellianum* apresentaram correlação negativa significativa com a precipitação e a temperatura, enquanto a frutificação apresentou correlação negativa apenas com a temperatura. Nas duas espécies estudadas a floração ocorre no período de menor pluviosidade e de temperatura mais baixa.

4.4 Aspectos taxonômicos, biologia reprodutiva e evolução de estados caracteres de Podostemaceae

Os trabalhos de filogenia mais recentes para Podostemaceae confirmam a divisão em subfamílias realizada por Engler (1930) em *Tristichoideae*, *Weddellinoideae* e *Podostemoideae* (Kita & Kato, 2001; Rufhel *et al.*, 2011; Tippery *et al.* 2011; Koi *et al.* 2012). De maneira geral a biologia reprodutiva parece corroborar com esta divisão, principalmente em *Tristichoideae* e *Weddellinoideae*. Em nível de subfamília, Podostemaceae está bem resolvida, entretanto em níveis menores ainda há muito trabalho a ser realizado (Tippery *et al.* 2011). Como exemplo, se pode citar o clado de *Lophogyne lacunosa* que reúne espécies morfologicamente diversas e é suportado apenas por sinapomorfias moleculares (Tippery *et al.* 2011). Os dados da biologia reprodutiva parecem ser promissores na resolução deste e outros problemas. A apomixia relatada pela primeira vez em *Lophogyne lacunosa*, pode ser uma possível sinapomorfia para este grupo e por isso é importante investigar outras espécies do clado a fim de conhecer este caráter.

A biologia reprodutiva foi estudada para poucas espécies e na grande maioria dos trabalhos, os resultados foram baseados em observações esporádicas de campo ou trabalhos com apenas um foco como, por exemplo, a polinização ou proporção pólen/óvulo (Philbrick & Novelo 1997; Okada & Kato 2002; Philbrick *et al.* 2004). Alguns estudos sobre a ecologia e biologia reprodutiva de Podostemaceae podem ser também encontradas em trabalhos cujo foco é a taxonomia (Mukkada 1969; Tavares 1997; Philbrick & Novelo 2004). Estes estudos apresentam apenas uma ou poucas informações sobre a biologia reprodutiva e, em alguns casos, surgem afirmativas baseadas apenas na morfologia floral e observações esporádicas, sem a realização de experimentos que comprovem tais afirmativas. Esta situação faz com que estas espécies apresentem informações incompletas ou mal fundamentadas, o que dificulta qualquer trabalho que tente refazer a história evolutiva da biologia reprodutiva para a família ou reconhecer a importância desses caracteres para as hipóteses filogenéticas na família.

A presença de cleistogamia e torção das anteras durante a antese foram empregadas para a elaboração de hipótese filogenética em Pontederiaceae (Eckenwalder & Barret 1986) e a geitonogamia para o gênero *Callitriche* (Callitricaceae) (Philbrick & Les 2000). No caso de Podostemaceae os caracteres que se mostraram promissores, até

o momento, por sua diversidade interespecífica e estabilidade intraespecífica foram: proporção pólen/óvulo, dicogamia, aspectos da polinização (autopolinização, fases da autopolinização, polinização por moscas, por abelhas e pelo vento) e partenocarpia.

Em relação ao caráter proporção pólen/óvulo, o estado 0,73 a 1,48 ocorre nas espécies onde só há autogamia e nas espécies em que existe polinização dentro do botão, exceto em *Hydrobryopsis sessilis* (1,49 a 2,21). Os estados 1,49 a 2,21 e 2,22 a 2,86 parecem estar relacionados com a polinização por abelhas e pelo vento, ocorrendo em *Lophogyne lacunosa* (vento - p/o 1,49 a 2,21), *Marathrum foeniculaceum* (vento - p/o 2,21 a 2,86) e *Mourera fluviatilis* (abelhas+vento - p/o 2,21 a 2,86).

A protandria parece ter uma relação com a polinização por abelhas e ocorre em *Apinagia* sp. 1, *Rhyncholacis* sp.2 e *Weddellina squamulosa*. No entanto também ocorre em *Polyleptum stylosum*, que só realiza autopolinização. A protoginia está relacionada com a polinização pelo vento ocorrendo em *Lophogyne lacunosa*, *Marathrum foeniculaceum*, *Mourera fluviatilis*, excluindo-se *Tristicha trifaria* que aparentemente só realiza autopolinização.

Segundo Cook & Rutishauser (2007) poucas espécies de Podostemaceae realizam polinização por insetos (Cook & Rutishauser 2007). Todavia, esta afirmação não é corroborada pela bibliografia. Existe o mesmo número de espécies polinizadas por insetos (*Apinagia* sp. 1, *Marathrum foeniculaceum*, *Mourera fluviatilis*, *Podostemum weddellianum*, *Rhyncholacis* sp. 2 *Weddellina squamulosa*) pelo vento (*Marathrum foeniculaceum*, *Mourera fluviatilis*, *Lophogyne lacunosa*) somadas com as que só realizam autopolinização (*Dalzellia zeylanica*, *Indotristicha ramosissima*, *Tristicha trifaria*), sendo que duas das três espécies que são polinizadas pelo vento também são polinizadas por abelhas.

A polinização por abelhas e as flores odoríferas evoluíram conjuntamente. As flores que exibem este tipo de polinização possuem flores coloridas, apresentando as cores rosa, lilás ou branco (Okada & Kato 2002; Cook & Rutishauser 2007; Sobral-Leite *et al.* 2011). Outra característica também observada nestas flores é o grande número de estames e também a alta proporção pólen/óvulo (Gubert 1976; Okada & Kato 2002; Sobral-Leite *et al.* 2011).

A autopolinização ocorre em várias espécies de Podostemaceae, exceto em *Apinagia* e *Rhyncholacis*. É possível que outras espécies destes gêneros realizem autopolinização, uma vez que *Apinagia* e *Rhyncholacis* apresentam grande diversidade,

ca. 50 e 26 respectivamente (Cook & Rutishauser 2007) e apenas cinco foram analisadas. Em Podostemaceae a autopolinização pode ocorrer em três fases diferentes: no botão, primeiros estádios ou no final da antese. O estado de autopolinização nos primeiros estádios da antese é a condição plesiomórfica para a família, pois está presente em *Tristichioideae* e *Weddellinoideae*.

Em Podostemaceae existe uma combinação de sistemas de polinização entre as espécies, no qual, geralmente, a autopolinização é acompanhada da polinização por abelhas e/ou vento ou moscas. Em *Tristichioideae* não há relatos de qualquer tipo de polinizador abiótico ou biótico. Provavelmente o ancestral de Podostemaceae só realizava autopolinização, entretanto é necessário investigar no grupo externo (Hypericaceae) e aumentar o número de espécies estudadas em Podostemaceae para confirmar (ou não) esta hipótese. Em *Weddellinoideae* existe a combinação de autopolinização+polinização por abelhas. No clado de *Podostemoideae* neotropical ((*Mourera fluviatilis* (*Lophogyne lacunosa* ((*Rhyncholacis* sp. 1 + *Rhyncholacis* sp. 2) (*Apinagia longifolia* + *Apinagia* sp.1 + *Apinagia* sp.2) + *Marathrum foeniculaceum*)))) existe uma diversidade de polinizadores e de combinações entre os mesmos. Em *Mourera fluviatilis* observa-se a combinação de autopolinização+abelhas+vento; em *Lophogyne lacunosa*, autopolinização+vento e *Marathrum foeniculaceum*, autopolinização+moscas+vento. Em *Apinagia* e *Rhyncholacis* há relatos somente de polinização por abelhas. Todavia é provável que isto seja um resultado da pequena amostragem. No clado de *Podostemoideae* paleotropical ((*Podostemum weddellianum* + *Podostemum ceratophyllum*) + (*Polypleurum stylosum* + *Hydrobryopsis sessilis*)) somente *Podostemum weddellianum* apresenta a combinação de autopolinização + polinização por moscas, enquanto as outras espécies tem relatos somente de autopolinização.

A partenocarpia ocorre em *Mourera fluviatilis* e *Lophogyne lacunosa*, ambas do clado de *Podostemoideae* neotropical e só reaparece em *Podostemum ceratophyllum*. A presença de frutos partenocárpicos é uma condição apomórfica exclusiva de *Podostemoideae*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As três espécies estudadas apresentam flores solitárias, zigomorfas e pediceladas, não apresentam odor perceptível ao olfato humano. Os frutos iniciam deiscência por volta de um mês depois do final da antese. A floração e frutificação são anuais e provavelmente influenciadas por um conjunto de fatores (nível da água, precipitação e temperatura).

Lophogyne lacunosa apresenta características que favorecem tanto a autopolinização como a polinização pelo vento. *Podostemum weddellianum*, apesar de não apresentar características de flores polinizadas por moscas, tem como seu polinizador (eventual) *Syllimnophora* sp. *Tristicha trifaria* apresenta características que favorecem a autopolinização. A autopolinização pode ocorrer no botão em *Podostemum weddellianum* e durante os primeiros estágios da antese em *Lophogyne lacunosa* e *Tristicha trifaria*. Flores abertas em períodos diferentes, a extensa longevidade floral e a dicogamia (protoginia incompleta) podem ser estratégias utilizadas pelas espécies estudadas para maximizar a polinização cruzada.

Nas espécies estudadas a autogamia é o principal sistema reprodutivo. No entanto em *Podostemum weddellianum* e *Lophogyne lacunosa* foram evidenciada uma xenogamia, caracterizando um sistema reprodutivo misto. *Lophogyne lacunosa* além de apresentar autogamia e xenogamia também possui apomixia. Até o momento, a apomixia era desconhecida para a família Podostemaceae, sendo aqui relatada de forma inédita. Cabe a investigação de outras espécies, principalmente no clado em que *Lophogyne* está inserido, para averiguar se este caráter é uma sinapomorfia do clado ou uma autapomorfia do gênero.

São raros os dados referentes à biologia reprodutiva da família Podostemaceae, principalmente se levarmos em conta a sua diversidade, pois é o grupo de plantas aquáticas mais diverso do planeta. No entanto, esta ausência de dados não é uma exclusividade, muito grupos de Angiospermas necessitam de investigação neste aspecto. Por outro lado, as Podostemaceae têm particularidades exclusivas que justificam a priorização na investigação de sua biologia reprodutiva sobre outras Angiospermas: sua morfologia profundamente reduzida e especializada, aliada à plasticidade fenotípica (forma foliar e número de verticilos variáveis), limita, em grande parte, a utilização de dados morfológicos nas análises filogenéticas, o que não ocorre nos demais grupos.

Atualmente, alguns clados da família são reconhecidos apenas por dados moleculares, o que têm provocado a busca de novos caracteres. O trabalho aqui apresentado investigou a biologia reprodutiva de três espécies filogeneticamente distantes e não apenas reuniu os dados de outras espécies disponíveis na literatura, mas os analisou de forma criteriosa e discutiu termos da biologia reprodutiva utilizados inadequadamente ou não utilizados na bibliografia para a família. Foi apresentada pela primeira vez uma perspectiva evolutiva com base em hipóteses filogenéticas para os caracteres reprodutivos, de forma insipiente diante de tantas lacunas, é verdade, mas que revelou um caminho a ser seguido na continuidade da investigação. Neste estudo foram levantados 39 caracteres, sendo que nove se mostraram possivelmente informativos, ou seja, apresentaram diversidade e não são influenciáveis ou sofrem pequenas variações por fatores ambientais. Diante deste primeiro esboço é possível traçar os novos passos, ou seja, quais táxons e quais caracteres surtirão melhores resultados na busca de (sin)apomorfias para as Podostemaceae.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcantara S., Lohmann L. (2010) Evolution of floral morphology and pollination system in Bignonieae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany*, **97**, 782-796.
- Amorim D.S. (2002) *Elementos básicos de sistemática filogenética*. Ribeirão Preto: Editora Holos.
- Bassani M., Pacini, E., Franchi, G.G. (1994) Humidity stress responses in pollen of anemophilous and entomophilous species. *Grana*, **33**, 146-150.
- Bencke C.S.C., Morellato, L.P. C. (2002) Comparação entre dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica*, **25**, 269-275.
- Bove C.P. (2013) *Podostemaceae*. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB194>. Acesso em: 01 Fev. 2014
- Bove C.P., Philbrick C.T & Costa W.J.E. M. (2011) Taxonomy, distribution and emended description of the neotropical genus *Lophogyne* (Podostemaceae). *Brittonia*, **63**, 156-160.
- Cook C.D.K., Rutishauser R. (2007) Podostemaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer Verlag., **9**, 304–344.
- Costa F.G.C.M., Bove, C.P., Arruda R.C.O., Philbrick C.T. (2011) Silica bodies: little used characters in the systematic of Podostemaceae. *Rodriguésia*, **62**, 937-942.
- Culley T.M., Klooster M.R. (2007) The cleistogamy breeding system: A review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. *The Botanical Review*, **73**, 1-30.
- Cruden R.W. (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, **31**, 32-46.
- Eckenwalder J.E., Barret S.C.H. (1986) Phylogenetics systematic of Pontederiaceae. *Systematic Botany*, **11**, 373-391.

- Engler H.G.A., Prantl A.E. (1930) Podostemaceae: Die natürlichen Pflanzenfamilien, *Wilhelm Englemann Leipzig*, **18a**, 1-61.
- Endress P.K. (1994) *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. New York: Cambridge University Press.
- Faegri & van der Pijl (1980) The principles of pollination ecology. Londres: Pergamont.
- Fleming T.H., Geiselman C., Kress W. J. (2009) The evaluation of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, **104**, 1017–1043.
- Fournier L. A. O. (1974) Un método cuantitativo para la medición de las características fenológicas de los árboles tropicales. *Turrialba*, **24**, 422-423
- Gillaspy G., Ben-David H., and Gruisse W. (1993) Fruits: a developmental perspective. *The plant cell*, **5**, 1439-1451.
- Goodwillie C., Kalisz S., Eckert C.G. (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, Theoretical Explanations, and Empirical Evidence. *Annual Review of Ecology and Evolution Systematic*, **36**, 47-79.
- Goldenberg R. & Varassin I.G. (2001) Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **24**, 283-288.
- Grossniklaus U., Nogler, G.A., van Dijk, P.J. (2001) How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell*, **13**, 1491-1498.
- Gupta C.K., Sehgal A. (2009) Pollination biology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae: *Tristichoideae*). *Aquatic Botany*, **91**, 51-56.
- Grubert (1974) Untersuchungen über die Verankerung der Samen von Podostemonaceen. *International Review Hydrobiology*, **55**, 83–114.
- Hickman (1995) Pollen feeding by adults of the hoverfly *Melanostoma fasciatum* (Diptera: Syrphidae). *New Zealand Journal of zoology*, **22**, 387-392.
- Secretaria Estadual do Ambiente (2008). Regiões Hidrográficas do Rio de Janeiro Disponível em

- http://www.udop.com.br/download/mapas/bacias_hidrograficas/rj.pdf. Acesso em: 03 de abril de 2014.
- Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) 2013. <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em: 20 Jun. de 2013.
- Jäger-Zürn I., Grubert M. (2000) Podostemaceae depend on sticky biofilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. *International Journal of Plant Sciences*, **161**, 599-607.
- Jäger-Zürn I. (1997) Embryological and floral studies in *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae, Tristichoidae). *Aquatic Botany*, **57**, 151-182.
- Johnson S.D., Linder H.P., Steiner, K.E. (1998) Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae) *American Journal of Botany*, **85**, 402-411.
- Jorgensen R.; Arathi H.S.(2013) Floral longevity and autonomous selfing are altered by pollination and water availability in *Collinsia heterophylla*. *Annals of Botany*, **112**, 821-828.
- Jordano P. (1988) Polinización y variabilidad de la producción de semillas en *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **45**, 213-231.
- Kearns C.A., Inouye, D.W. (1993) *Techniques for pollination biologist*. Colorado: University Press of Colorado.
- Khosla C., Mohan Ram H.Y. (1993) Morphology of flower, fruit and seed in *Polypleurum stylosum*. *Aquatic Botany*, **46**, 255-262.
- Khosla C., Shivanna K.R., Mohan Ram H.Y. (2000) Reproductive biology of *Polypleurum stylosum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany*, **67**, 143-154.
- Koi S., Kita Y., Hirayama Y., Rutishauser R., Huber K.A., Kato M. (2011) Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **169**, 461–492.
- Kita Y., Kato, M. (2001) Intrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequences of the matK gene. *Plant Biology*, **3**, 156-163.

- Koltunow A.M. (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell*, **5**, 1425-1437.
- Koltunow A.M. & Grossniklaus U. (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annuals Review Plant Biology*, **54**, 547-74.
- Lloyd D.G., Schoen D.J. (1992) Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, **153**, 358-369.
- Lloyd D.G., Webb C.J. (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy, *New Zealand Journal of Botany*, **24**, 135-162.
- Lord (1982) Cleistogamy: A toll for the study of floral morphogenesis, functions and evolution. *The Botanical Review*, **47**, 421-442.
- Luna R., Guzmán-Merodio D., Núñez-Farfán J., Philbrick C.T., Collazo-Ortega M., Márquez-Guzmán J. (2012) Cross compatibility between *Marathrum rubrum* and *Marathrum schiedeanum* (Podostemaceae), two closely related species of the Pacific Mexican Coast. *Aquatic Botany*, **102**, 1-7.
- Maddison W. P., Maddison D.R. (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.7. <http://mesquiteproject.org>
- Marinho, E.B. (2013) Palinotaxonomia dos gêneros neotropicais de Podostemaceae. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro/Museu Nacional. Rio de Janeiro, Brasil.
- Matzk F., Hammer, K., Schubert, I. (2003) Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. *Sex Plant Reproduction*, **16**, 51-58.
- Mao Y.Y., Huang S.Q. (2009) Pollen resistance to water in 80 angiosperm species: flower structures protect rain-susceptible pollen. *New Phytologist*, **183**, 892-899.
- Newstrom L.E., Frankie, G.W., Baker, H.G. (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, **26**, 141-159.

- Okada H., Kado M. (2002) Pollination systems inferred from pollen – ovule ratios of some species of Podostemaceae. *Acta Phytotaxomica et Geobotanica*, **53**, 51-61.
- Ollerton J., Masinde S., Meve U., Picker M., Whittington A. (2009) Fly pollination in *Ceropegia* (Apocynaceae: *Asclepiadoideae*): biogeographic and phylogenetic perspectives. *Annals of Botany*, **103**, 1501-1514.
- Passi & Hesse (2005) *Pollenkitt* - its composition, forms and functions. *Flora*, 200, 399-415.
- Pérez F., Arroyo M.T.K., Mendel R., Hershkovitz M.A. (2006) Ancestral reconstruction of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, **93**, 1029-1038.
- Pérez F., Arroyo M.T.K., Mendel R. (2007) Phylogenetic analysis of floral integration in *Schizanthus* (Solanaceae): does pollination truly integrate corolla traits? *Journal of Evolution Biology*, **20**, 1730-1738.
- Philbrick C.T. (1984) Aspects of floral biology, breeding system, and seed and seedling biology in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae). *Systematic Botany*, **9**, 166–174.
- Philbrick C.T., Les (1996) Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *BioScience*, **46**, 813-826.
- Philbrick C.T., Les D.H. (2000) Phylogenetic studies in *Callitriche*: implications for interpretation of ecological, karyological and pollination system evolution. *Aquatic Botany*, **68**, 123-141.
- 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., Novelo A.R. (2004) Monograph of *Podostemum* (Podostemaceae). *Systematic Botany Monographs*, **70**, 1-106.

- Philbrick C., Vomela M., Novelo A.R. (2006) Preanthesis cleistogamy in the genus *Podostemum* (Podostemaceae). *Rhodora*, **108**, 195-202.
- Radford A.E., Dickson W.C., Massey J.R., Bell C.R. (1974) *Vascular Plant Systematic*. New York: *Harber and Row Publ.*
- Ramos-Ordoñez M.F., Arizmendi M.C. (2011) Parthenocarpy, attractiveness and seed predation by birds in *Bursera morelensis*. *Journal of Arid Environments*, **75**, 757-762.
- Ribeiro J.E.L.S (2007) Estudos sobre filogenia, taxonomia e evolução de caracteres reprodutivos em Moraceae Gaudich. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.
- Richards A.J. (1997) *Plant breeding systems*. London: Chapman & Hall.
- Richards A.J. (2003) Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.*, **358**, 1085–1093.
- Royen P. van 1954. The Podostemaceae of the New World. Part III. *Acta Botanica Neerlandica*, **3**, 215–263.
- Rufhel B.R., Bittrich V., Bove, C.P., Gustafsson M.H.G., Philbrick C.T., Rutishauser R.; Zhenxiang X.I., Davis C.C. (2011) Phylogeny of clusoid clade (Malpighiales): evidence from plastids and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany*, **98**, 306-325.
- Rutishauser R. (1997) Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquatic Botany*, **57**, 29-70.
- Sculthorpe (1966) *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. Londres: Edward Arnol.
- Sá-Haiad B., Torres C.A., Abreu V.H.R., Gonçalves M.R., Mendonça C.B.F., Santiago-Fernandes L.D.R., Bove C.P., Gonçalves-Esteves V. (2010) Floral structure and palynology of *Podostemum weddellianum* (Podostemaceae: Malpighiales). *Plant Systematics and Evolution*, **290**, 141-149.

- Sehgal A., Khurana J. P., Sethi M., Ara H. (2010) Occurrence of unique three-celled megagametophyte and single fertilization in an aquatic angiosperm – *Dalzellia zeylanica* (Podostemaceae-Tristichioideae). *Sexual Plant Reproduction*, **24**, 199-210.
- Smith S. D. (2010) Using phylogenetics to detect pollinator-mediated floral evolution. *New Phytologist*, **188**, 354–363.
- Sobral-Leite M., Siqueira Filho J.A., Erbar C., Machado I.C. (2011) Anthecology and reproductive system of *Mourera fluviatilis* (Podostemeaceae): polination by bees and xenogamy in a predominantly anemophilous and autogamous family. *Aquatic Botany*, **95**, 77-87.
- Tavares A.S. (1997) A família Podostemaceae de alguns rios de água preta do Estado do Amazonas. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, Brasil.
- Tipperry N.P., Philbrick C.T., Bove C.P., Les D.H. (2011) Systematics and phylogeny of neotropical Podostemaceae. *Systematic Botany*, **36**, 105–118.
- Tur N.M. (1997) Taxonomy of Podostemaceae in Argentina. *Aquatic Botany*, **57**, 213-241.
- Varoquaux F., Blanvillain R., Delseny M., Gallois P. (2000) Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in Biotechnology*, **18**, 233-242.
- Vilella F.S., Becker F.G., Hartz S.M. (2002) Diet of *Astyanax* species (Teleostei Characidae) in an Atlantic Florest River in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **45**, 223-232.
- Xie P.-W., Luo Z.-L., Zhang D.-X. (2013) Syrphid fly pollination of *Guihaiothamnus acaulis* (Rubiaceae), a species with “butterfly” flowers. *Journal of Systematic and Evolution*, **51**, 86-93.
- Zeisler M. (1938) Über die Abgrenzung der eigentlichen Narben flächen MIT der Hilfe. *Beihefte zum Botanische Zentralblatt*, **58**, 308-318.
- Weber J.J. & Goodwillie C. (2013) Variation in floral longevity in the genus *Leptosiphon*: mating system consequences. *Plant Biology*, **15**, 220-225.

Zangerl A.R., Berebaum. M.R. & Nitao, J. K. (1999) Parthenocarpic fruits in wild parsnip: decoy defense against a specialist herbivore. *Evolutionary Ecology*, 5, 136-145.