

**INCOMPATIBILIDADE HETEROMÓRFICA EM *EICHHORNIA AZUREA*  
(PONTEDERIACEAE) NO PANTANAL DA NHECOLÂNDIA, MATO GROSSO DO SUL**

**Nicolay Leme da Cunha**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação, área de concentração ECOLOGIA.

Orientador: Erich Fischer

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

**Campo Grande**

**2006**

## AGRADECIMENTOS

Sou grato a Erich Fischer pela orientação, amizade e suporte burocrático para que este projeto pudesse ser realizado, sem ele isso não seria possível.

Agradeço aos meus amigos Luiz Felipe Alves da Cunha Carvalho, Reinaldo Teixeira, Raquel Oliveira, Carolina Santos, Alam F. Eriksson pela enorme ajuda no trabalho de campo, companheirismo e confiança. A todos que me ajudaram na árdua tarefa de contar frutos e sementes no laboratório: Luis Felipe Alves da Cunha Carvalho, Paulo Francis Dutra, Natália C. Campos.

Aos meus pais, Mauro Leme da Cunha e Lucrecia Aparecida da Cunha, e minha irmã, Nádia Leme da Cunha, pela ajuda, compreensão, paciência, atenção e carinho durante todo esse processo. Não posso deixar de agradecer em especial e novamente à minha mãe, “Dona Lú”, pelo esforço descomunal e pressão o qual se submetia para fazer as centenas de pequenos sacos de filó usados para os experimentos de polinização.

Ao Sérgio Sobreira Aquino e William Ivan Miyasato que me ajudaram em Campo Grande e compreenderam o motivo de tantas viagens para o pantanal.

Agradeço Spencer C. H. Barrett pela atenção e interesse no trabalho e elucidação de dúvidas a respeito do sistema da heterostilia. Ao amigo e professor Josué Raizer, pela ajuda nas análises estatísticas. Maria Rita Marques por permitir o uso do laboratório de Bioquímica. Ao amigo Don Eaton, por ceder a imagem detalhada e dados climáticos da área de estudo.

A Conservação Internacional por autorizar o trabalho na RPPN Fazenda Rio Negro. A Earthwatch Research Institute pelos voluntários que muito me ajudaram a contar, medir e coletar plantas na água. Ao Instituto Brasileiro de Conservação pelo empréstimo do carro em um momento muito importante.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, o qual fui bolsista por um ano. E ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela formação profissional.

A todos que me ajudaram, torceram e acreditaram no desenvolvimento desse projeto, meu muito obrigado!

## RESUMO

Em plantas heterostílicas a polinização entre anteras e estigmas de alturas equivalentes geralmente é compatível, ao passo que qualquer outro tipo de polinização cruzada ou auto-polinização resulta em incompatibilidade total ou parcial. *Eichhornia azurea* é uma macrófita aquática flutuante fixa no substrato comumente encontrada nos lagos, rios e áreas alagáveis da América do Sul. Estudos prévios na tristílica *E. azurea* indicaram a presença de incompatibilidade heteromórfica, entretanto a incompatibilidade pode variar entre regiões e populações. Neste estudo visou (1) estimar a frequência dos morfotipos florais de *E. azurea* em quatro populações da Fazenda Rio Negro, Pantanal da Nhecolândia, e verificar se existe a predominância de algum morfotipo; (2) verificar a presença de auto-incompatibilidade e incompatibilidade heteromórfica em *E. azurea* em duas populações da região estudada. Os três morfotipos florais ocorreram em todas as populações, porém em frequências diferentes, sendo que somente duas populações apresentavam frequência próxima de 1:1:1. A produção de frutos e sementes foi maior em polinizações cruzadas legítimas que em polinizações cruzadas ilegítimas e auto-polinizações para todos os morfotipos florais. Entretanto, ocorreram grandes quantidades de frutos e sementes para polinizações ilegítimas. O morfotipo inferior apresentou maior incompatibilidade heteromórfica seguido do morfotipo floral superior, já o morfotipo mediano pode ser considerado auto-compatível devido ao grande número de sementes produzidas sob polinizações ilegítimas. A discrepância na frequência de morfotipos em algumas baias pode estar relacionada com a variação no nível da água nos períodos de seca e cheias, e conectividade com o rio. A flexibilidade na incompatibilidade heteromórfica de *E. azurea* no Pantanal da Nhecolândia pode estar relacionada à escassez de polinizadores eficientes no efetivo fluxo de pólen.

**PALAVRAS-CHAVE:** água-pé, Heterostilia, Pantanal, sistema reprodutivo, tristílica.

## **ABSTRACT**

In heterostylous plants pollination between anthers and stigmas of equivalent heights are often compatible, but any other type of cross or self-pollination result in partial or total incompatibility. *Eichhornia azurea* is a fluctuant aquatic macrophyte, fixed in the substrate that is generally found in lagoons, rivers and flooded areas in South America. Previous studies on the tristylous *E. azurea* indicated the presence of heteromorphic incompatibility; however the incompatibility varies between regions and populations. In this study I aim to (1) estimate the frequency of the floral morphs of *E. azurea* in four populations in the Rio Negro farm, Pantanal of Nhecolândia, and to verify the existence of predominance of any floral morph in these locals, and (2) to verify the presence of self-incompatibility and heteromorphic incompatibility in *E. azurea* in two populations of the study area. The three floral morphs occurred in all four populations, in two populations frequency was near 1:1:1. The fruit and seed set were higher in legitimate cross pollination than in illegitimate cross or self-pollination. However, there were great quantities of fruits and seeds for illegitimate pollinations. The short styled morph presented the higher incompatibility followed by the long styled one; the middle style morph can be considered self-compatible because of the great number of seeds produce by illegitimate pollinations. The discrepancy in floral morphs frequencies in some lagoons can be related with the variation of the water level in the dry and flood periods, and connectivity with the river. The flexibility of heteromorphic incompatibility in *E. azurea* in Pantanal might be related with the scarcity of pollinators performing effective pollen flow.

**KEY-WORDS:** breeding system, Heterostyly, Pantanal, tristily, water peacock.

## INTRODUÇÃO

Nas angiospermas, o principal mecanismo para evitar autopolinização e seus efeitos prejudiciais para seus descendentes é o sistema de auto-incompatibilidade fisiológica (Richards, 1986; Proctor *et al.* 1996). Existem várias formas de ocorrer incompatibilidade, podendo depender diretamente do controle genético ou de estruturas responsáveis pelo reconhecimento e/ou rejeição dos grãos de pólen (Richards, 1986). Provavelmente o sistema mais complexo de incompatibilidade nas plantas com flores seja aquele que envolve auto-incompatibilidade heteromórfica (Ganders, 1979; Glover & Barrett, 1983). Em espécies com incompatibilidade heteromórfica, tipos de compatibilidade cruzada são distinguíveis pela sua morfologia floral (Vuilleumier, 1967, Ganders, 1979).

Heterostilia é um tipo raro de polimorfismo genético presentes em populações compostas por dois (distilia) ou três (tristilia) morfotipos florais que diferem na altura do estigma em relação ao estame, tamanho e forma dos grãos de pólen, morfologia estigmática e comportamento de auto-incompatibilidade (Ganders, 1979). Na maioria das espécies heterostílicas, polinizações entre anteras e estigmas de alturas equivalentes (polinizações legítimas) são compatíveis e qualquer outro tipo de polinização cruzada ou auto-polinização são incompatíveis, resultando em poucas ou nenhuma semente (Ornduff, 1966, 1983, 1993; Charlesworth, 1979; Glover & Barrett, 1983; Richards & Barrett, 1987; Bianchi *et al.*, 2000). A heterostilia é apontada como um mecanismo para promover a polinização cruzada mediada por insetos possibilitando maior variabilidade genética (Ganders, 1979; Charlesworth, 1979; Barrett, 1985; Richards, 1986; Alves dos Santos, 2000 e 2002).

Pontederiaceae é uma família das monocotiledôneas com oito gêneros e 34 espécies de macrófitas aquáticas e ervas palustres. A tristilia ocorre em três das

sete espécies do gênero *Eichhornia* e quatro das cinco espécies do gênero *Pontederia* (Barrett & Anderson, 1985). As flores das espécies tristílicas são polinizadas por uma gama variável de insetos, entre eles abelhas solitárias e insetos com probóscide longa (Barrett, 1985; Alves dos Santos, 2002).

Em *Pontederia*, a tristilia é associada com forte sistema de auto-incompatibilidade, trimorfismo dos grãos de pólen e populações que geralmente contém os três morfotipos florais (Price & Barrett 1982). Já no gênero *Eichhornia*, espécies tristílicas comumente apresentam populações monomórficas, auto-compatíveis, fraca diferenciação dos grãos de pólen entre os morfotipos e modificações nas estruturas reprodutivas favorecendo a autogamia (Barrett 1978, 1985). Enquanto em *Eichhornia* há quebra da tristilia em algumas populações em direção ao aumento da autofertilização (Barrett, 1978, 1979, 1985; Alves dos Santos, 2002), a ausência de modificações florais em *Pontederia rotundifolia* e *Pontederia cordata* sugerem que as taxas de alogamia estão sendo suficientes para a manutenção do polimorfismo genético da tristilia (Ornduff, 1966; Barrett 1977b, Barrett & Anderson, 1985). Portanto, é esperado que a frequência equivalente dos morfotipos florais em populações (isopletia), seja mantida sob presença de vetores eficientes para realizar polinizações cruzadas, caso contrário haveria tendência das populações tornarem-se dimórficas ou monomórficas (anisopletia) (Charlesworth, 1979).

O sistema reprodutivo de *Eichhornia azurea*, em diferentes locais, geralmente está associado à forte incompatibilidade heteromórfica. Existindo diferenças de incompatibilidade entre seus morfotipos florais (Costa Rica e Amazônia - Barrett, 1978; Região Sul do Brasil - Alves dos Santos & Wittmann, 2000; Rosário, Argentina

- Bianchi *et al.*, 2000), assim como reportado para outras espécies de plantas tristílicas (Ornduff, 1966; Barrett 1977a, 1978, 1979; Price & Barrett, 1982, 1984).

Na região do Pantanal do Miranda-Abobral e da Serra da Bodoquena (Mato Grosso do Sul) foram encontradas populações de *E.azurea* com os três morfotipos florais em proporções equivalentes (Bueno, 2003). Isto sugere a ocorrência de polinizadores capazes de realizar o fluxo de pólen entre os morfotipos nestas populações. Portanto, é esperado que as populações de *E. azurea* do Pantanal apresentem forte incompatibilidade trimórfica e auto-incompatibilidade. Entretanto nenhum estudo experimental, visando determinar a intensidade de incompatibilidade heteromórfica em *E. azurea* foi realizado no Pantanal.

Neste estudo (1) Estimei a frequência dos morfotipos florais de *Eichhornia azurea* em quatro baías do Pantanal, para verificar se existe a predominância de algum morfotipo nesses locais; (2) verifiquei se havia auto-incompatibilidade heteromórfica em duas dessas populações da região estudada; (3) Verifiquei a presença de incompatibilidade tardia para as sementes produzidas.

## **METODOLOGIA**

### ***Descrição da espécie***

*Eichhornia azurea* é macrófita aquática flutuante, mas fixa ao substrato, rizomatosa e perene (Pott & Pott, 2000). Particularmente encontrada nas planícies da América do Sul, associada aos ambientes aquáticos das bacias Amazônica, do Paraguai e do Paraná (Barrett 1978; Bianchi *et al.*, 2000; Alves dos Santos, 2002). Apresenta flores azuladas, claramente trífilicas, são formadas por seis pétalas de bordo fimbriado, apresentam guia de néctar e são reunidas em inflorescências (Figura 1). Os estames são aderidos à parte interna do tubo floral, sendo três distais e três proximais (Alves dos Santos, 2002). Ao final da floração, as inflorescências prostram e ficam submersas, condição em que ocorre a maturação dos frutos. Os frutos são cápsulas e suas sementes apresentam aproximadamente 2 mm de comprimento (Pott & Pott, 2000). Na região sul do Pantanal são freqüentes as visitas florais por abelhas, borboletas, hemípteros e dípteros (N. L. Cunha, observação pessoal). Na literatura é descrita como sendo polinizada por diversas abelhas, moscas e borboletas (Barrett, 1978; Alves dos Santos, 2000 e 2002).

*Eichhornia azurea* é muito abundante no Pantanal, sendo encontrada em diversos tipos de habitats como lagoas permanentes, temporárias e rios (Pott & Pott, 2000). Espécie de grande importância ecológica e econômica, serve como berçário e abrigo para muitas espécies de peixes e invertebrados (Petry *et al.*, 2003; Stripari & Henry, 2002).





Figura 1. Inflorescência do morfotipo floral inferior de *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) em uma lagoa no Pantanal da Nhecolândia. Notar, bordo fimbriado das pétalas (1) e os estames longos expostos para fora da corola (2). Foto de Nicolay L. da Cunha.

### ***Área de estudo***

O Pantanal é uma extensa planície aluvial, localizada no centro da América do Sul, circundada por planaltos e elevações residuais. O clima é tropical com períodos de seca e cheia bem definidos (Brazil, 1979) e a precipitação média anual é de aproximadamente 972 mm. É uma área com ambientes aquáticos temporários como lagoas e meandros abandonados de rios antigos. Conhecidas como “baías”, essas lagoas podem apresentar densa cobertura de macrófitas aquáticas, sendo geralmente rasas (1,5 m de profundidade) e podem secar em poucos meses (Carvalho, 1986). O presente estudo foi realizado em quatro baías da RPPN Fazenda Rio Negro (19° 34' S, 56° 14' O), município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul. A fazenda está localizada na região da Nhecolândia (Adámoli, 1982), caracterizada por apresentar baías, salinas, campos limpos, bosques e savanas (Figura 2).

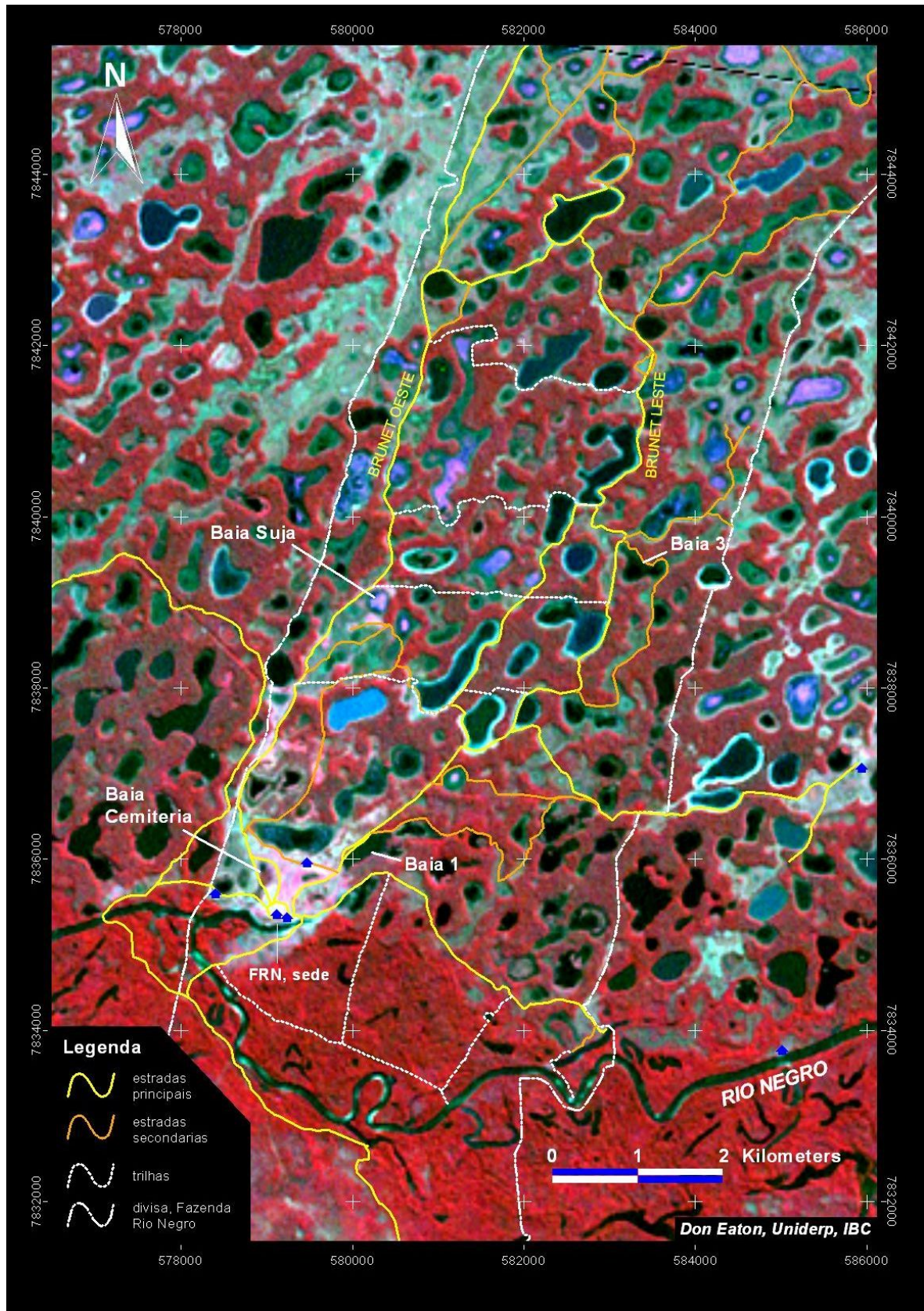


Figura 2. Imagem de satélite (Landsat) de parte do pantanal da Nhecolândia , mostrando a área da RPPN Fazenda Rio Negro (FRN), Pantanal da Nhecolândia. As baías amostradas estão apontadas na figura. Regiões com tons avermelhados representam florestas e as com tons azul e verde, corpos de água.

### ***Frequência dos morfotipos heterostílicos***

Para estimar a frequência de indivíduos pertencentes a diferentes morfotipos florais selecionei quatro baías (figura 2) que apresentavam *Eichhornia azurea*. Nestas baías, estabeleci transectos da margem em direção ao centro a cada 15 metros. Ao longo de cada transecto amostréi todas as inflorescências distantes até 1 m, para esquerda e para a direita. Os transectos apresentaram comprimento variado devido a irregularidade na forma da área dos bancos de macrófitas.

### ***Incompatibilidade Heteromórfica***

Para realizar experimentos de polinização manual selecionei as baías 1 e 3 (Figura 2) que apresentavam maior abundância de inflorescências de *Eichhornia azurea*. Nestas baías escolhi ao azar plantas que apresentassem botões em pré-antese e que estavam distantes no mínimo 10 metros entre si, visando minimizar amostrar indivíduos clones. Dezoito plantas de cada morfotipo floral foram selecionadas na Baía 1 e 17 plantas de cada morfotipo floral foram selecionadas na Baía 3, totalizando 54 e 51 indivíduos respectivamente. Os experimentos de polinização manual foram realizados no período de novembro de 2004 a fevereiro de 2005.

As plantas doadoras de grãos de pólen foram escolhidas um dia antes ou no mesmo dia em que foram feitos os tratamentos de polinização, antes das flores abrirem. Quando as plantas de uma baía foram utilizadas como receptoras de pólen, as flores da outra baía foram utilizadas como doadoras de pólen e vice-versa, isso foi realizado visando evitar cruzamentos entre clones da mesma baía. Todas as plantas utilizadas para os tratamentos de polinização e doação de pólen foram previamente ensacadas para evitar visitantes florais. Para evitar possível autopolinização, as anteras longas das

flores do morfotipo floral mediano e anteras longas e médias do morfotipo floral inferior foram retiradas com auxílio de pinça.

Para cada planta fiz seis diferentes tratamentos de polinização manual: dois de auto-polinizações, dois de polinizações cruzadas ilegítimas e dois de polinizações cruzadas legítimas (Figura 3A, 3B e 3C respectivamente). Realizei a transferência de pólen com auxílio de pinça e pincel, que foram constantemente lavados com água após cada experimento para evitar contaminação entre tratamentos. Após o término das polinizações manuais, todas as flores foram ensacadas com filó e as inflorescências marcadas. Após quatro semanas os frutos foram recolhidos e, em laboratório, quantifiquei o número de frutos formados e o número de sementes por fruto.

### ***Germinação***

Com o intuito de verificar algum tipo de incompatibilidade tardia, após a formação das sementes, realizei testes de germinação. Utilizei cinco sementes de cada fruto formado a partir dos experimentos de polinização manual. As sementes foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro e adicionados 5 ml de água destilada. As placas foram armazenadas em germinador, com temperatura de incubação de 26,4 °C e fotoperíodo de 16/8 horas diárias. As sementes foram monitoradas por 15 dias (cf. Cunha 2003), aquelas que apresentaram protrusão radicular foram consideradas como germinadas.

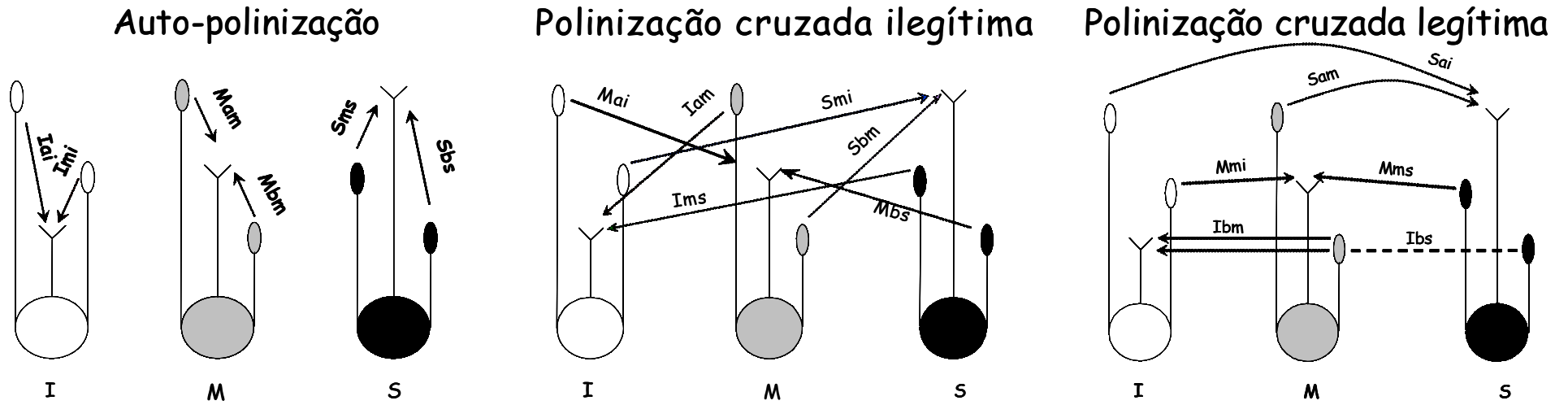


Figura 3. Esquemas representando os experimentos de polinização manual realizados em *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) no Pantanal da Nhecolândia. As estruturas em formato elipsóide representam as anteras, em formato circular os ovários e em formato da letra “Y” são os estigmas. A letras I:M:S representam os morfotipos florais inferior, mediano e superior, respectivamente. Significado das siglas junto às setas: A primeira letra corresponde à primeira letra do morfotipo receptor do pólen (Ex: Iai, o morfotipo inferior é o que esta recebendo o pólen). As demais letras correspondem à procedência dos grãos de pólen (Ex: Ims, antera média do morfotipo superior que esta doando o pólen).

### ***Análises estatísticas***

Para testar diferenças de frequência entre os morfotipos florais em cada baía, comparar a formação de frutos entre os morfotipos florais e entre os tratamentos de polinização manual utilizei teste  $\chi^2$  (qui-quadrado) (Zar, 1999). Já para comparar a produção de sementes entre os morfotipos florais e entre os tratamentos de polinização, bem como para comparar a frequência de sementes germinadas entre os morfotipos florais e entre os tratamentos utilizei ANOVA de dois fatores e teste de Tukey *a posteriori* (Zar, 1999). Todos os dados de frequência foram previamente transformados (multiplicados pelo arco seno da raiz quadrada da proporção) para atender às premissas da ANOVA (Zar, 1999).

## **RESULTADOS**

### ***Frequência dos morfotipos florais***

Os três morfotipos florais ocorreram em todas as baías amostradas, porém em quantidades e proporções diferentes (Tabela 1). A razão entre as proporções observadas entre cada morfotipo floral, não diferiu da razão esperada de 1:1:1 (inferior: mediano:superior) na baía 3, “Suja” e Cemiteria, mas nas duas últimas a diferença foi marginalmente significativa (Tabela 1). Na baía 1, a razão entre as proporções observadas para os morfotipos florais (2:1:2) difere do acaso (Tabela 1).

Tabela 1. Número total dos morfotipos florais de *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) amostradas nas quatro baías e de qui-quadrado para teste de proporções esperadas iguais. As populações com o asterisco na frequência foram as que apresentaram diferenças marginalmente significativa.

Local	Morfotipos florais						total	Qui-quadrado de			Frequência
	<i>inferior</i>		<i>mediano</i>		<i>superior</i>			Pearson			
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)		$\chi^2$	<i>gl</i>	<i>p</i>	
Baía 1	376	37,6	259	25,9	365	36,5	1000	25,05	2	0,0001	<i>anisopleitia</i>
Baía 3	49	38,0	35	27,1	45	34,9	129	2,419	2	0,029	<i>isopleitia</i>
Baía "Cemiteria"	11	17,2	22	34,4	31	48,4	64	5,56	2	0,06	<i>isopleitia</i> *
Baía "Suja"	9	33,3	4	14,8	14	51,9	27	5,556	2	0,062	<i>isopleitia</i> *



### **Sucesso na formação de frutos**

O sucesso da formação de frutos entre as flores polinizadas manualmente variou de 22 a 77% (Tabela 2). A razão total de frutos dos três morfotipos florais diferiu do acaso (Pearson  $\chi^2 = 28,00$ ,  $gl = 2$ ,  $p < 0,00001$ ). Houve menor formação de frutos dentre as flores do morfotipo floral inferior, e maior formação de frutos para as flores do morfotipo floral superior, já o morfotipo mediano apresentou valores intermediários (Figura 6).

Para as flores do morfotipo inferior assim como para flores do morfotipo superior o número de frutos formados diferiu entre os tratamentos de polinização. Os tratamentos de polinizações cruzadas legítimas apresentaram maior proporção de frutos formados que os tratamentos de auto-polinizações e polinizações cruzadas ilegítimas (Figura 6). As flores do morfotipo superior que receberam próprio pólen da antera baixa – *Sbs* (auto-polinização) – formaram menos frutos que todos os demais tratamentos realizados neste morfotipo floral. O tratamento de auto-polinização *lai* e o tratamento de polinização cruzada ilegítima *lam* apresentaram menor formação de frutos quando comparados com os demais tratamentos de auto-polinização e polinização cruzada ilegítima no morfotipo inferior (Figura 6). As freqüências de formação de frutos não diferiu entre os tratamentos realizados nas flores do morfotipo floral mediano.

Tabela 2. Sucesso de formação de frutos; médias, desvio padrão e total de sementes produzidas por fruto; e número de sementes germinadas de *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) para os diferentes tratamentos de polinização nas Baías 1 e 3, RPPN Fazenda Rio Negro, Pantanal da Nhecolândia. \*Significado das siglas: A primeira letra corresponde à primeira letra do morfotipo receptor do pólen (Ex: lmi, o morfotipo inferior é o que esta recebendo o pólen). As demais letras correspondem à procedência dos grãos de pólen (Ex: lms, antera média do morfotipo superior que esta doando o pólen).

Morfotipo	Tratamentos de polinização		Baías 01 e 03							
			N	frutos	Sementes produzidas				Germinação germinadas (total)	
					Total	Média	DP	Min		Max
Sigla *										
Inferior	Auto polinização	lai	35	8	461	57,63	57,82	3	150	25 (28)
		lmi	35	11	182	16,55	17,53	1	49	17 (26)
	Cruzada ilegítima	lam	35	9	600	66,67	59,56	1	159	14 (20)
		lms	35	13	935	71,92	59,79	2	179	32 (45)
	Cruzada legítima	lbn	35	21	2050	97,62	86,14	1	271	42 (63)
		lbs	35	17	1377	81,00	61,43	2	209	25 (39)
Mediano	Auto polinização	Mam	35	21	1692	80,57	62,47	9	250	55 (75)
		Mbm	35	18	669	37,17	47,79	3	140	36 (49)
	Cruzada ilegítima	Mai	35	27	2048	75,85	68,14	4	291	81 (104)
		Mbs	35	22	882	40,09	48,21	1	161	53 (68)
	Cruzada legítima	Mmi	35	25	3439	137,56	91,55	15	389	66 (85)
		Mms	35	21	2416	115,05	92,57	2	288	56 (78)
Superior	Auto polinização	Sms	35	18	972	54,00	43,11	2	130	21 (30)
		Sbs	35	9	166	18,44	18,04	1	46	31 (31)
	Cruzada ilegítima	Smi	35	17	1938	114,00	76,38	10	262	41 (48)
		Sbm	35	17	463	27,24	27,29	1	108	29 (40)
	Cruzada legítima	Sai	35	21	2431	115,76	82,43	1	285	44 (66)
		Sam	35	25	2640	105,60	65,61	12	263	67 (81)

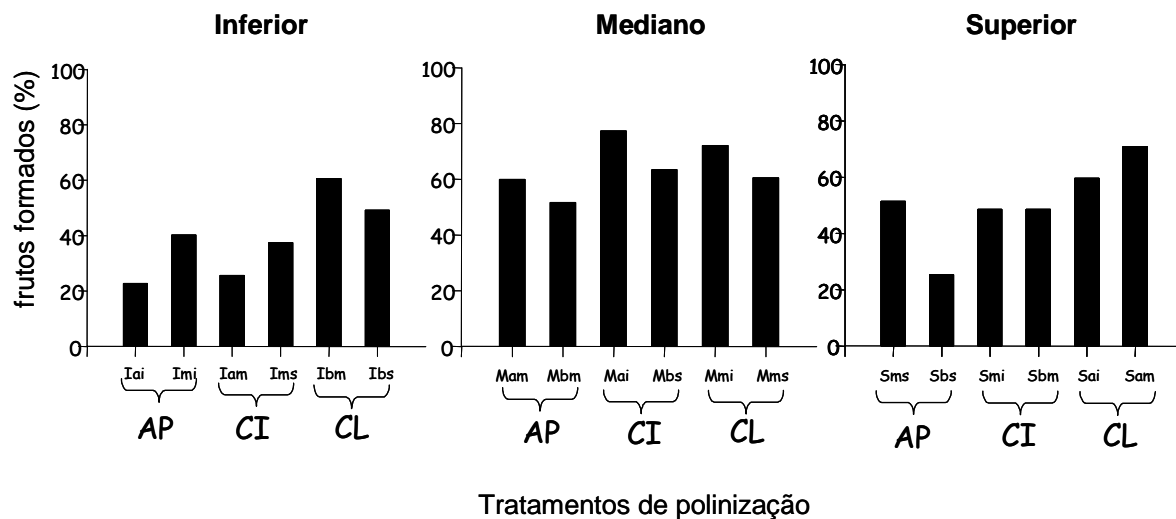


Figura 6. Porcentagem de frutos formados sob os diferentes tratamentos de polinização para os três morfotipos florais de *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) na RPPN Fazenda Rio Negro, Pantanal da Nhecolândia. \*Significado das siglas: A primeira letra corresponde à primeira letra do morfotipo receptor do pólen (Ex: Imi, o morfotipo inferior é o que esta recebendo o pólen). As demais letras correspondem à procedência dos grãos de pólen (Ex: Ims, antera média do morfotipo superior que esta doando o pólen). As siglas abaixo dos colchetes (AP, CI, CL) significam: auto-polinização, polinização cruzada legítima e polinização cruzada ilegítima respectivamente.

### **Formação de sementes por fruto**

A produção total de sementes por fruto formado não foi significativamente diferente entre morfotipos florais de *Eichhornia azurea* ( $F= 1,359$ ,  $gl = 2$ ,  $p < 0,26$ ) (Figura 7). Entretanto a produção de sementes por fruto diferiu entre tratamentos de polinização para os três morfotipos florais ( $F= 3,364$ ,  $gl = 5$ ,  $p < 0,006$ ). A maior quantidade de sementes produzidas ocorreu sob polinizações cruzadas legítimas seguidos de polinizações cruzadas ilegítimas e auto-polinizações (Tabela 2).

A quantidade de sementes por fruto foi determinada pela interação dos fatores morfotipo floral e tratamento de polinização (ANOVA,  $F= 6,178$ ,  $gl = 10$ ,  $p < 0,001$ ). O tratamento de polinização cruzada ilegítima *lam*, apresentou maior produção de sementes por fruto que o tratamento de auto-polinização *Sbs* (Tukey,  $p < 0,05$ ), e menor produção de sementes que o tratamento de polinização cruzada ilegítima *Smi* e os tratamentos de polinização cruzada legítima *Sai* e *Sam* (Tukey,  $p < 0,05$ ). O tratamento de polinização cruzada legítima *lbs*, apresentou maior produção de sementes por fruto que o tratamento de polinização cruzada ilegítima *Mbs* e auto-polinização *Sbs* (Tukey,  $p < 0,05$ ). Entretanto apresentou menor produção de sementes por fruto que os tratamentos de polinização cruzada legítima *Sai* e *Sam* (Tukey,  $p < 0,05$ ).

O tratamento de auto-polinização *Mbm* apresentou maior produção de sementes que o tratamento de auto-polinização *Sbs*, e menor que os tratamentos de polinização cruzada ilegítima *Smi* e *Mbs*, e os tratamentos de polinização cruzada legítima *Sai* e *Sam* (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os tratamentos de polinização cruzada ilegítima *Mai* e *Mbs* apresentaram menos sementes por fruto que os tratamentos de polinização cruzada legítima *Mmi*, sendo que *Mbs* também apresentou menos sementes do que *Mms* (Tukey,  $p < 0,05$ ). Os tratamentos de polinização cruzada

legítima *Mmi* e *Mms* apresentaram mais sementes por fruto que os tratamentos de polinização cruzada ilegítima *Smi* e de auto-polinização *Sbs* (Tukey,  $p < 0,05$ ). O tratamento *Mmi* ainda apresentou maior produção de sementes por fruto que os tratamentos de polinização cruzada legítima *Sai* e *Sam* (Tukey,  $p < 0,05$ ).

### **Germinação**

A frequência de sementes germinadas foi diferente entre os morfotipos florais (ANOVA,  $F = 5,650$ ,  $gl = 2$ ,  $p < 0,004$ ), sendo que o morfotipo superior apresentou a menor frequência de sementes germinadas em relação aos morfotipos inferior e mediano (Tukey,  $p < 0,05$ ) (Tabela 2; Figura 8).

A frequência de sementes germinadas não foi diferente entre os tratamentos de polinização manual (ANOVA,  $F = 0,595$ ,  $gl = 5$ ,  $p = 0,70$ ), e a interação dos fatores morfotipo floral e tratamento de polinização não explicou a frequência de sementes germinadas (ANOVA,  $F = 0,355$ ,  $gl = 10$ ,  $p = 0,96$ ).

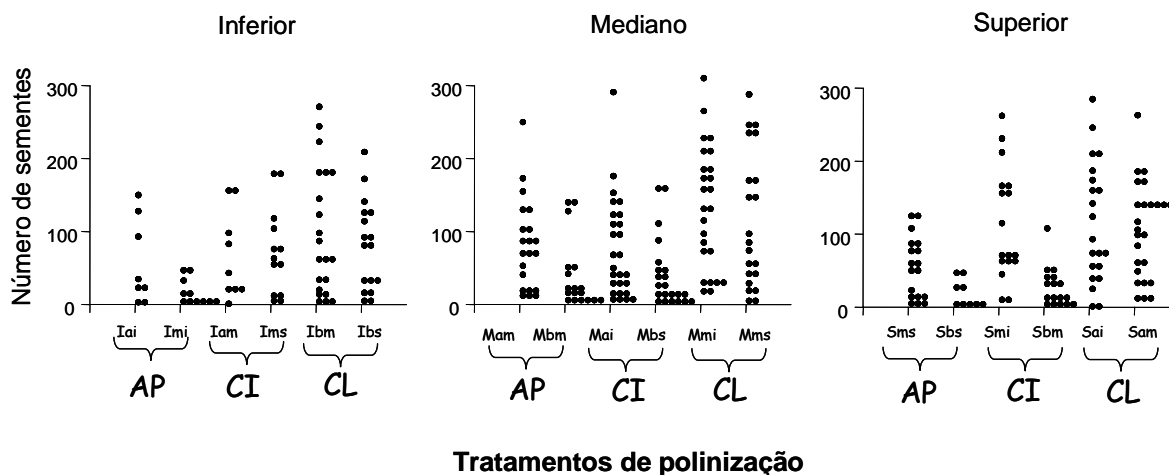


Figura 7. Número de sementes produzidas por fruto para os tratamentos de polinização em *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) entre os três morfotipos florais, RPPN Fazenda Rio Negro, Pantanal da Nhecolândia. As siglas referentes aos tratamentos de polinização estão descritas na Figura 3. O significado das siglas é explicado na tabela 2 e Figura 6.

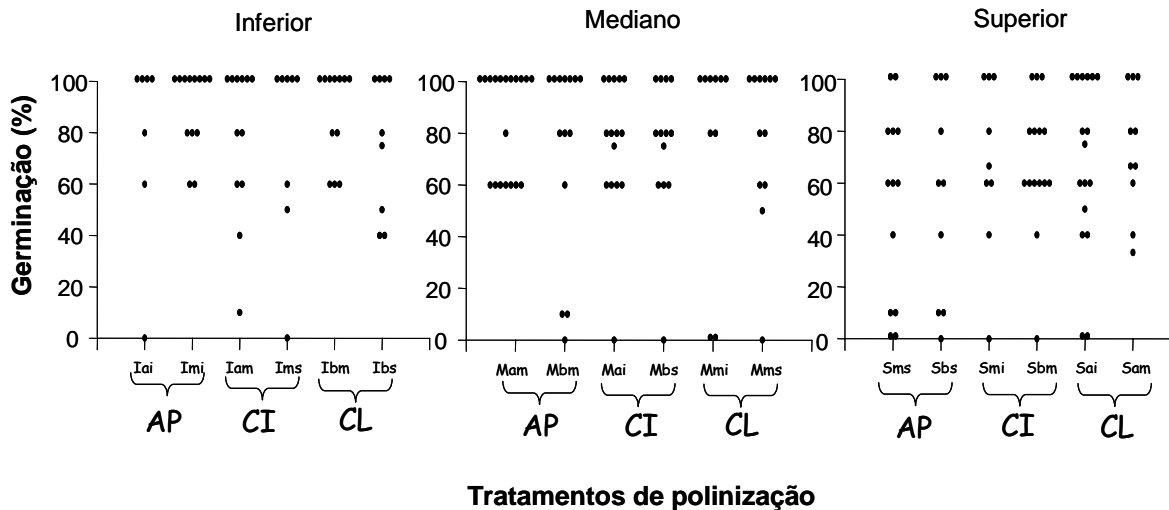


Figura 8. Freqüência de sementes germinadas para os diferentes tratamentos de polinização em *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) entre os três morfotipos florais, RPPN Fazenda Rio Negro, Pantanal da Nhecolândia. As siglas referentes aos tratamentos de polinização estão descritas na Tabela 2 e Figura 3.

## DISCUSSÃO

### *Freqüência dos morfotipos florais*

Os três morfotipos florais de *E. azurea* ocorreram nas quatro baías estudadas no Pantanal da Nhecolândia, semelhante ao registrado no Pantanal do Miranda-Abobral e regiões da Amazônia (Barrett, 1978; Bueno, 2003; N. Cunha & E. Fischer, dados não publicados). Por outro lado, na bacia do Paraná e na costa sul de São Paulo foram encontradas populações de *E. azurea* com apenas dois morfotipos, o mediano e o superior, e populações com o morfotipo semi-homostílico (Alves dos Santos, 2002). A ausência de polinizadores eficientes atuando como vetores para a transferência de pólen entre anteras e estigmas de alturas equivalentes é apontada como um dos fatores que podem determinar a ausência de um morfotipo floral e quebra do sistema de tristílica (Charlesworth, 1979; Wolfe & Barrett, 1987; Husband & Barrett, 1992; Alves dos Santos, 2000 e 2002).

*Eichhornia crassipes* é outra espécie tristílica cuja freqüência de morfotipos florais pode ser muito variável entre populações (Barrett, 1977a). Onde *E. crassipes* é exótica, o morfotipo de estigma mediano é dominante, podendo ocasionalmente ocorrer o morfotipo superior. Entretanto, em locais onde *E. crassipes* é espécie pristina suas populações apresentam os três morfotipos florais, com predominância do morfotipo inferior (Barrett, 1977a; Barrett & Forno, 1982). Esse padrão também é encontrado para outras espécies tristílicas de Pontederiaceae como *Eichhornia paniculata* (Glover & Barrett, 1986; Barrett & Husband, 1997), *Pontederia rotundifolia* (Barrett, 1977b) e *P. cordata* (Ornduff, 1966). A ocorrência dos três morfotipos em populações do Pantanal (presente estudo) e na Amazônia (Barrett, 1978) indica que as bacias Amazônica e do Alto Paraguai são regiões onde *E. azurea* é espécie

prístina, ao passo que a bacia do Paraná e a costa de São Paulo poderiam ser consideradas regiões de colonização relativamente recente.

Essa discrepância encontrada na freqüência dos morfotipos florais de *E. azurea* em algumas baías amostradas não reflete o padrão da região, sendo meramente um padrão local de distribuição dos morfotipos florais. O que pode estar primariamente associada com a dispersão da planta e eventos estocásticos como secas muito intensa, fazendo com que algum morfotipo floral seja desfavorecido sob tais condições por alguma pressão física e não fisiológica. Na baía Cemiteria encontrei essas condições, onde durante o período de cheias intensas conecta-se ao rio Negro, e no período de estiagem seca completamente.

A baía 1 também pode conectar-se ao rio, todavia como o número de plantas é muito grande, e esta baía mais profunda, as variações sazonais como seca e cheia provavelmente não apresentam efeitos muito representativos na freqüência dos morfotipos florais. Por outro lado as baías Suja e 3, são relativamente mais estáveis quanto à oscilação do nível de água (D. Eaton, comunicação pessoal). Portanto é possível que em ambientes mais estáveis a manutenção dos três morfotipos florais em proporções equivalentes seja mais viável, como o encontrado para *E. paniculata* no nordeste brasileiro (Barrett & Husband, 1997).

### **Sistema reprodutivo**

Os resultados aqui encontrados indicam que *E. azurea* apresente maior produção de frutos e sementes em polinizações cruzadas legítimas, sendo primariamente auto e intramorfo incompatível. A presença de incompatibilidade heteromórfica nas populações de *Eichhornia azurea* estudadas no Pantanal é evidenciada pela maior produção de frutos sob polinizações cruzadas legítimas. A



incompatibilidade não é absoluta, pois ocorreu a formação de frutos em polinizações ilegítimas e auto-polinizações, todavia em menor quantidade. O morfotipo inferior apresenta a menor flexibilidade a cruzamentos ilegítimos, pois houve maior sucesso na formação de frutos em polinizações cruzadas legítimas, seguido de polinizações cruzadas ilegítimas e auto-polinizações. Este é um padrão comum encontrado para este morfotipo floral (Ornduff, 1966; Barrett 1977b; Barrett & Anderson, 1985; Bianchi *et al.*, 2000). O morfotipo superior apresentou incompatibilidade moderada, sendo as diferenças encontradas na formação de frutos entre polinizações cruzadas ilegítimas e auto-polinizações menos expressivas que as diferenças encontradas para o morfotipo inferior. Todavia, quando flores do morfotipo superior receberam o próprio pólen da antera baixa, a produção de frutos foi muito baixa. Assim, as diferenças encontradas quanto à proporção dos diferentes morfotipos florais nas baías estudadas e a flexibilidade a cruzamentos ilegítimos indicam que fatores ecológicos podem interferir na manutenção da incompatibilidade trimórfica, onde genótipos auto-compatíveis poderão ser selecionados (Richards, 1986; Barrett, 1988).

A maior formação de frutos dentre as flores do morfotipo mediano deve estar associada com o maior relaxamento da incompatibilidade e maior aceitação a auto-polinizações e polinizações ilegítimas neste morfotipo floral (Bianchi *et al.*, 2000). Esse relaxamento da incompatibilidade apenas em flores do morfotipo mediano também foi encontrado para *Pontederia cordata* (Ornduff, 1966; Glover & Barrett, 1983; Barrett & Anderson, 1985) e *Oxalis nelsonii* (Ornduff, 1983). Já a menor produção de frutos no morfotipo floral inferior e a maior produção para o morfotipo superior deve estar relacionada ao sistema de reconhecimento e rejeição na interação pólen/estigma. Os grãos de pólen das anteras altas são frequentemente

maiores e produzidos em menor quantidade, enquanto os grãos de pólen das anteras curtas são menores e produzidos em maior número, enquanto para o morfotipo superior a papila estigmática apresenta superfície maior quando comparada à papila do morfotipo inferior (Ganders 1979; Richards, 1986; Scribailo & Barrett, 1991; Barrett 1993). Estas características são encontradas em diversas plantas tristílicas, inclusive em *E. azurea* (Barrett, 1978; Alves do Santos & Wittmann, 2000). Portanto, é possível que muitos grãos de pólen, mesmo que ilegítimos, germinem nas flores de estigma longo havendo maior formação de frutos para este morfotipo floral, e o processo contrário pode ser esperado para o morfotipo inferior.

O morfotipo floral mediano apresenta a maior flexibilidade para polinizações ilegítimas podendo ser considerado auto-compatível, pois não existiram diferenças na produção de sementes entre os tratamentos de auto-polinização, polinização cruzada ilegítima e polinização cruzada legítima. A compatibilidade heteromórfica encontrada para o morfotipo mediano foi reportada para *Eichhornia azurea* no Rio Paraná (Bianchi *et al.*, 2000) e também descrito para outras espécies tristílicas (Ornduff, 1966, 1983; Glover & Barrett, 1983; Barrett & Anderson, 1985). A auto-compatibilidade do morfotipo mediano pode ser um efeito pleiotrópico dos genes que atuam diretamente no controle da expressão dos caracteres morfológicos que acompanham o sistema tristílico, como comprimento do estilete e das anteras, bem como do tamanho e da forma dos grãos de pólen (Barrett & Anderson, 1985).

O total de sementes produzidas por fruto não foi diferente entre os morfotipos florais, demonstrando que na presença de vetores capazes de transportar o pólen para os estigmas, todos os morfotipos florais apresentam capacidades semelhantes em produzir sementes nas populações amostradas no Pantanal da Nhecolândia. O

morfotipo mediano apresenta certa vantagem na produção de sementes em relação aos demais morfotipos florais, o que provavelmente está relacionado a mais fraca incompatibilidade heteromórfica deste morfotipo (presente estudo).

Para todos os morfotipos florais, polinizações legítimas resultaram em mais sementes por fruto, seguidos de polinizações cruzadas ilegítimas e auto-polinizações. Isso indica a presença do sistema di-alélico de incompatibilidade (Barrett, 1988; Ganders, 1979; Richards, 1986; Yeo, 1975). Nas populações estudadas, *Eichhornia azurea* provavelmente apresenta características heteromórficas necessárias para a ocorrência de incompatibilidade, como diferenças na papila estigmática, trimorfismo do grão de pólen e tecido transmissor do estilete. Essas características foram anteriormente descritas para populações de *E. azurea* estudadas na Amazônia, Sul e Sudeste do Brasil (Barrett 1978; Alves dos Santos & Wittmann 2000). Ocorreram diferenças na expressão da incompatibilidade entre os morfotipos florais quanto à produção de sementes por fruto. O morfotipo mediano pode ser considerado auto-compatível, havendo somente pequena vantagem na quantidade de sementes produzidas sob polinizações cruzadas legítimas em relação aos demais tratamentos dentro deste morfotipo. Diferenças específicas na incompatibilidade entre morfotipos florais têm sido freqüentemente reportadas para outros táxons heterostílicos (Charlesworth, 1979; Richards, 1986; Barrett & Cruzan, 1994). Estudos de sistema reprodutivo na família Pontederiaceae, com as espécies *Pontederia cordata* (Ornduff, 1966; Barrett & Anderson, 1985), *P. rotundifolia* (Barrett, 1977); *Pontederia sagittata* (Glover & Barrett, 1983), *Eichhornia paniculata* (Manicacci & Barrett, 1996) e *Eichhornia azurea* (Bianchi *et al.*, 2000), demonstraram que a incompatibilidade é mais fortemente expressada no morfotipo inferior do que no superior ou mediano.

A diferença na incompatibilidade entre o morfotipo inferior e o superior foi muito sutil. Estes dados confrontam a idéia proposta por Yeo (1975), de que a maior incompatibilidade no morfotipo inferior em espécies distílicas é resultado de seleção para prevenir autofertilização. Este autor aponta que facilmente os grãos de pólen das anteras longas podem atingir o estigma curto e o processo contrário seria mais difícil. A expressão da incompatibilidade heteromórfica na formação de sementes foi mais fraca para o morfotipo mediano, seguido do morfotipo superior e inferior, mas em todos os morfotipos grandes quantidades de sementes foram produzidas em cruzamentos ilegítimos. É provável que esteja ocorrendo o relaxamento da incompatibilidade heteromórfica em *Eichhornia azurea* nas populações estudadas no pantanal. Os dados referentes ao sistema reprodutivo de *E. azurea* disponíveis na literatura não apresentam tamanha flexibilidade à produção de sementes e frutos sob cruzamentos ilegítimos (Barrett, 1978; Alves dos Santos & Wittmann, 2000; Bianchi *et al.*, 2000). Os dados aqui obtidos mostram que a incompatibilidade trimórfica de *E. azurea* é suscetível a variações ambientais, como a oferta de polinizadores. Outros estudos indicam que os visitantes florais com longa probóscide são os principais responsáveis pela transferência de pólen das anteras baixas e médias para os estigmas inferior e mediano respectivamente (Barrett, 1978; Charlesworth, 1979; Wolfe & Barrett, 1987; Husband & Barrett, 1992; Alves dos Santos & Wittmann, 2000). Entretanto, apenas abelhas generalistas de probóscide curta (*Apis mellifera* e *Trygona* sp.) e moscas visitaram as flores de *E. azurea* no local de estudo (N.L. Cunha, observação pessoal). No modelo idealizado por Charlesworth (1979), a incompatibilidade trimórfica pode ser quebrada através da redução da probabilidade de transferência de pólen para qualquer um dos morfotipos. O autor atribui tais reduções à ausência de polinizadores de probóscide

longa que transportam pólen das anteras baixas e médias para os respectivos estigmas, ao passo que a transferência de pólen das anteras altas para o estigma superior pode ser realizada por visitantes generalistas e de probóscide curta.

Os tratamentos de polinização cruzada ilegítima nos morfotipos mediano e superior que receberam pólen da antera baixa do morfotipo superior ou do morfotipo mediano formaram poucos frutos e sementes. Resultado semelhante foi encontrado por Barrett (1978), em estudo envolvendo um único clone de *E. azurea* do morfotipo superior. Ele encontrou que para autopolinizações com a antera média a produção média de sementes por fruto foi de 14,3 e com a antera baixa a produção de sementes foi de somente 4,3; e proporção de frutos formados foi de 94,3% e 12,2% respectivamente. Este resultado possivelmente está relacionado à quantidade de reserva armazenada nos pequenos grãos de pólen das anteras curtas. Para *Pontederia cordata*, os grãos de pólen das anteras curtas cessam o crescimento 3 mm adentro dos estiletos dos morfotipos mediano e superior. Por outro lado, os tubos polínicos dos grãos de pólen das anteras média e longa crescem por distâncias maiores estilete adentro em polinizações ilegítimas (Anderson & Barrett, 1986). O mesmo mecanismo de incompatibilidade tardia deve estar atuando em *Eichhornia azurea*, promovendo a menor formação de frutos e sementes em polinizações cruzadas ilegítimas com o pólen das anteras curtas. Estudos referentes ao crescimento dos tubos polínicos entre os morfotipos florais de *Eichhornia azurea* são necessários para confirmação dessas possibilidades.

O morfotipo superior apresentou a menor frequência de sementes germinadas em relação aos morfotipos mediano e inferior, ainda que tenha havido grande produção de frutos e sementes. A menor frequência de germinação pode indicar menor aptidão deste morfotipo floral para o estabelecimento de plântulas. Esse

resultado pode estar sendo determinado por alguma característica da semente como peso, tamanho, quantidade de reserva ou viabilidade dos embriões.

Em sementes de *E. azurea* produzidas sob condições naturais, o morfotipo superior também apresentou a menor frequência de sementes germinadas em relação aos morfotipos mediano e inferior em região do Pantanal do Miranda-Abobral (Cunha, 2003). Entretanto, para *E. paniculata* não foram encontradas diferenças entre os morfotipos florais na quantidade de sementes germinadas (Manicacci & Barrett, 1996). Em *Lythrum salicaria*, o morfotipo superior apresentou a maior frequência de sementes germinadas, seguido dos morfotipo mediano e inferior, (Anderson & Ascher, 2000).

Não ocorreram diferenças na frequência de sementes germinadas entre os diferentes tratamentos de polinização, bem como a interação entre os morfotipos e tratamentos de polinização não determinam a frequência de sementes germinadas. Isso demonstra que as sementes quando formadas, apresentam a capacidade de germinar independente de como foram geradas (auto-polinizações, polinizações cruzadas legítimas ou ilegítimas). Característica muito importante para uma planta que habita ambientes efêmeros como os lagos encontrados no pantanal. Todavia a quantidade de sementes formadas sob polinizações legítimas é muito maior. Em *E. paniculata* sementes do morfotipo inferior formadas por polinizações ilegítimas foram maiores que sementes formadas a partir de polinizações legítimas, este maior tamanho é apontado como uma compensação ao menor número de sementes formadas a partir de polinizações ilegítimas. Contudo, não existiram diferenças na proporção de sementes germinadas entre os três morfotipos florais (Manicacci & Barrett, 1996).

No presente estudo, o sistema reprodutivo de *Eichhornia azurea* apresentou incompatibilidade moderada, diferente do encontrado para a espécie em outros estudos sobre incompatibilidade heteromórfica. Essa flexibilidade na incompatibilidade pode estar sendo determinada pelas adversidades extremas, que a planta suporta na região estudada, como períodos de extrema seca e cheia e ausência de polinizadores eficientes para a realização do fluxo de pólen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adámoli, J. 1982.** O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados. *Congresso Nacional de Botânica, Anais*, pp. 109-119.
- Alves dos Santos I. 2002.** Flower-visiting bees and the breakdown of the tristylous breeding system of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **77**: 499–507.
- Alves dos Santos, I.; Wittmann, D. 2000.** Legitimate pollination of the trimorphic flowers of *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea). *Plant Systematics and Evolution* **223**: 127-137.
- Anderson, J.M. & Barrett, S.C.H. 1986.** Pollen tube growth in tristylous *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Canadian Journal of Botany* **64**: 2602-2607.
- Anderson, N.O. & Ascher, P.D. 2000.** Fecundity and fitness in cross-compatible pollinations of tristylous North American *Lythrum salicaria* populations. *Theoretical Applied Genetics* **101**: 830-843.
- Barrett, S.C.H. 1977a.** Tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Water Hyacinth). *Biotropica* **9**: 230-238.
- Barrett, S.C.H. 1977b.** The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytologist* **78**: 209-220.
- Barrett, S.C.H. 1978.** Floral biology of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Aquatic Botany* **5**: 217-228.
- Barrett, S.C.H. 1979.** The evolutionary breakdown of tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Water Hyacinth). *Evolution* **33**: 499-510.
- Barrett, S.C.H. 1985.** Ecological genetics of breakdown in tristyly. In: J. Haeck & J.W. Woldendorp Eds. *Structure and Functioning of Plant Populations 2. Phenotypic and Genotypic Variation in Plant Populations*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 267-275.



- Barrett, S.C.H. 1988.** *The evolution, maintenance and loss of self-incompatibility systems.* In: *Reproductive Strategies of Plants: Patterns & Strategies.* Eds. J. & L. Lovett Doust. Oxford University Press, New York. p. 98-124.
- Barrett, S.C.H. 1993.** The evolutionary biology of tristylly. In: D. Futuyma & J. Antonovics Eds. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* Oxford University Press, Oxford, U.K. **9**: 283-326.
- Barrett, S.C.H. & Anderson, J.M. 1985.** Variation in expression of trimorphic incompatibility in *Pontederia cordata* L. (Pontederiaceae). *Theoretical and Applied Genetics* **70**: 355-362.
- Barrett & Cruzan, 1994 .** Incompatibility in heterostylous plants. In: *Genetic Control of Self-Incompatibility & Reproductive Development* (Eds. E.G. Williams, R.B. Knox & A.E. Clarke), pp. 189-219. Kluwer Academic Publ., The Netherlands.
- Barrett, S.C.H. & Forno, I.W. 1982.** Style morph distribution in New World populations of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laubach (Water Hyacinth). *Aquatic Botany* **13**: 299-306.
- Barrett, S.C.H. & Husband, B.C. 1997.** Ecology and genetics of ephemeral plant populations: *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae) in N.E. Brazil. *Journal of Heredity* **88**: 277-284.
- Bianchi, M., Vesprini, & Barrett, S.C.H. 2000.** Trimorphic incompatibility in *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae). *Sexual Plant Reproduction* **12**: 203-208.
- Brazil, 1979.** Relatório da primeira fase, descrição física e recursos naturais. Estudo de desenvolvimento integrado da Bacia do alto Paraguai - *Superintendência do desenvolvimento da região centro-oeste, Brasília.*
- Bueno, P.A.A. 2003.** Relação entre morfos heterostílicos e características morfológicas de *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae) em dois

- ambientes distintos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, Brasil. 25p.
- Carvalho, N. O., 1986.** Hidrobiologia da bacia do Alto Paraguai. *I Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, Corumbá*, Anais 43-49.
- Charlesworth, D. 1979.** The Evolution and Breakdown of Tristyly. *Evolution* **33 (1)**: 489-498.
- Cunha, N. L. 2003.** Produção de sementes e frutos entre os morfotipos heterostílicos de *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) (Sw.) Kunth. Monografia de graduação, Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil. 18p.
- Ganders, F. R. 1979.** The Biology of Heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 607-635.
- Glover, D.E. & Barrett, S.C.H. 1983.** Trimorphic incompatibility in Mexican populations of *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *New Phytologist* **95**: 439-455.
- Glover, D.E. & Barrett, S.C.H. 1986.** Variation in the mating system of *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). *Evolution* **40**: 1122-1131.
- Husband, B.C. & Barrett, S.C.H. 1992.** Pollinator visitation in populations of tristylous *Eichhornia paniculata* in northeastern Brazil. *Oecologia* **89**: 365-371.
- Manicacci, D. & Barrett, S.C.H. 1996.** Fertility differences among floral morphs following selfing in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): inbreeding depression or partial incompatibility? *American Journal of Botany* **83**: 594-603..
- Ornduff, R. 1966.** The Breeding System of *Pontederia cordata* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **6**: 407-416.

- Ornduff , R. 1983.** Heteromorphic Incompatibility in *Oxalis nelsonii*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **2**: 214-216
- Ornduff, R. 1993.** Intramorph and Intermorph Compatibility in Tristylous Populations of *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **1**: 19-22.
- Petry, P., Bayley, P.B., & Markle, D.F. 2003.** Relationships between fish assemblages, macrophytes and environmental gradients in the Amazon River floodplain. *Journal of Fish Biology* **63**: 547–579.
- Pott, A & Pott, V.J. 2000.** Plantas Aquáticas do Pantanal. *Centro de Pesquisas Agropecuárias do Pantanal (Corumbá, MS). - Brasília – EMBRAPA.* 274-275.
- Price, S.D. & Barrett, S.C.H. 1982.** Tristyly in *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Canadian Journal of Botany* **60**: 897-905.
- Price, S.D. & Barrett, S.C.H 1984.** The function and adaptive significance of tristily in *Pontederia cordata* L. (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **21**: 315-329.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996.** *The Natural History of Pollination*. British Wildlife Publishing; Rotherwick Hampshire 479p.
- Richards, A.J. 1986.** *Plant breeding systems*. George & Unwin Ltd, 40 Museum Street, London WC1A 1LU, UK. 190-210.
- Richards, J.H. & Barrett, S.C.H. 1987.** Development of tristily in *Pontederia cordata* L. 1. Mature floral structure and patterns of relative growth of reproductive organs. *American Journal of Botany* **74**: 1831-1841.
- Scribailo, R.W. & Barrett, S.C.H. 1991.** Pollen-pistil interactions in tristylous *Pontederia sagittata* Presl. (Pontederiaceae). 2. Patterns of pollen tube growth. *American Journal of Botany* **78**: 1662-1682.

- Stripari, N.D.L. & Henry, R. 2002.** The Invertebrate Colonization During Decomposition of *Eichhornia azurea* Kunth in a Lateral Lake in The Mouth Zone of Paranapanema River Into Jurumirim Reservoir (São Paulo, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* **62**: 293-310.
- Vuilleumier, B. S. 1967.** The Origin and Evolutionary Development of Heterostyly in the Angiosperms. *Evolution* **21 (2)**: 210-226.
- Wolfe, L.M. & Barrett, S.C.H. 1987.** Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata*. *Oecologia* **74**: 347-351.
- Yeo, P.F. 1975.** Some aspects of heterostyly. *New Phytologist* **75 (1)**: 147-153.
- Zar, J. H. 1999.** *Biostatistical Analysis*. Fourth edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey USA.