

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO
DE ESPÉCIES DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO TRANSECTO DA
FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE-LESTE – FIOLE**

Mirelli dos Santos Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2024**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO
DE ESPÉCIES DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO TRANSECTO DA
FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE-LESTE – FIOLE**

Mirelli dos Santos Souza

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2024

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Dr. Everton Hilo de Souza

Coorientadoras: Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

S729b

Souza, Mirelli dos Santos.

Biologia reprodutiva, micropropagação e conservação *in vitro* de espécies de bromeliaceae ocorrentes no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste – FIOL / Mirelli dos Santos Souza. Cruz das Almas, BA, 2024.
120f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Everton Hilo de Souza.

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.

Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza.

1.Bromeliaceae – Produção – Mudanças. 2.Bromeliaceae – Propagação *in vitro*. 3.Levantamentos florestais – Ecossistema – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 635.9

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

BIOLOGIA REPRODUTIVA, MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN
VITRO DE ESPÉCIES DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO
TRANSECTO DA FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE-LESTE – FIOLE

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação
Mirelli dos Santos Souza

Aprovada em: 16 de janeiro de 2024



Dr. Everton Hilo de Souza

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Orientador)



Dra. Lidyanne Yuriko Saleme Aona

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Membro interno)



Dra. Hellen Cristina da Paixão Moura

Embrapa Mandioca e Fruticultura (Membro externo)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais: Manoel e Rosenilda, em reconhecimento à confiança, apoio e dedicação incansável que sempre me ofereceram ao longo da jornada da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao soberano Deus que é digno de toda exaltação;

Aos meus pais que sempre me incentivaram;

Ao meu orientador Dr. Everton Hilo de Souza, por compartilhar seus conhecimentos dedicados à realização deste estudo;

À Dra. Maria Angelica Pereira por subsidiar com seus conhecimentos teóricos, além da paciência e cordialidade que foram de total contribuição para meu processo formativo;

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelos conhecimentos adquiridos;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, expresse minha gratidão pela concessão do acesso às instalações físicas e aos recursos essenciais para a execução desta pesquisa;

À equipe do laboratório de Cultura de Tecidos pela harmoniosa convivência, apoio e respeito, Tiago Abreu, Gleice Nascimento, Railson Alves, Rivan França, Andressa Henrique, Beatriz França, Simplicio Mota, Wagner Alves e Dario Pereira.

Em especial à Mariana Menezes, Maria Inês Mendes, Danilo Andrade, Michele Ferreira, Caroline Santos, Eliane Bráulio e Hélder Carvalho.

A Leonardo Neves por ser um amigo constante nesta jornada de crescimento pessoal e acadêmico.

A Diego Fonseca pelas palavras motivadoras e celebração as novas conquistas.

A CAPES, pelo auxílio financeiro concedido por meio da bolsa de estudo e a FAPESB (PPF 2014/2021) pelo desenvolvimento e financiamento do projeto FIOL. Agradeço ao Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - INEMA (Processo no 046.0525.2022.0004974-68) pela autorização para realização dos estudos científicos no Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC) e ao gestor Marcelo Barreto e toda a sua equipe pelas facilitações.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste Trabalho.

*Toda nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil, e no entanto, é a coisa
mais preciosa que temos.
(Albert Einstein)*

BIOLOGIA REPRODUTIVA, MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE ESPÉCIES DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO TRANSECTO DA FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE-LESTE – FIOLE

RESUMO: As espécies de Bromeliaceae possuem diversos potenciais econômicos e ecológicos e, devido ao extrativismo predatório, à expansão urbana e ao agronegócio, muitas dessas espécies estão ameaçadas de extinção. Os estudos da biologia floral e reprodutiva, bem como a produção de mudas em larga escala, são fatores essenciais para minimizar os riscos de ameaças. O desenvolvimento de um sistema eficiente de produção de mudas pode representar uma alternativa viável para mitigar esses danos. Diante disso, esta dissertação está dividida em dois capítulos. O capítulo I, intitulado "Estudos reprodutivos de Bromeliaceae ocorrentes no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOLE)", teve como objetivo estudar os aspectos da biologia floral e reprodutiva de *Aechmea alba*, *A. echinata* e *Vriesea recurvata*, presentes na FIOLE. Foram utilizadas metodologias para avaliar a viabilidade polínica, a receptividade do estigma em diferentes estádios de desenvolvimento floral, os diferentes sistemas reprodutivos por meio de polinizações controladas, bem como seus visitantes florais. Os grãos de pólen das três espécies apresentaram altas porcentagens de viabilidade polínica durante a antese, independentemente do método utilizado (histoquímica e germinação in vitro). Ambos os métodos para avaliar a receptividade do estigma demonstraram eficácia, revelando que a atividade enzimática foi maior na antese para as três espécies. Entre os visitantes florais, os beija-flores foram os polinizadores efetivos e mais frequentes, enquanto borboletas, abelhas e formigas foram menos expressivas e não realizaram polinizações efetivas. Todas as três espécies apresentaram alogamia e são autoincompatíveis, sendo a antese o momento mais adequado para a realização de polinizações controladas. O capítulo II, intitulado "Micropropagação e conservação in vitro de Bromeliaceae ocorrentes no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOLE)" teve como objetivo avaliar a germinação in vitro de *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*, bem como quantificar o número médio de brotos por explante nos tratamentos com diferentes concentrações de BAP. Adicionalmente, foi realizada a conservação in vitro por crescimento mínimo, utilizando-se duas concentrações de sais de MS e duas condições de cultivo. Foi possível estabelecer in vitro as duas espécies de Bromeliaceae com germinação de sementes superior a 98%. Quanto à multiplicação in vitro, os tratamentos T02 (MS + 2,2 µM BAP + 0,05 µM ANA) e T03 (MS + 4,4 µM BAP + 0,05 µM ANA) foram os mais eficientes na indução de brotação para *A. mertensii*, permitindo a formação de 5,25 e 11,85 brotos por explante, respectivamente, independentemente do subcultivo. Já para *Hohenbergia castellanosii*, os tratamentos T03 (MS + 4,4 µM BAP + 0,05 µM ANA) e T04 (MS + 6,6 µM BAP + 0,05 µM ANA) apresentaram o maior número médio de brotos por explante. Em relação à conservação in vitro, o meio de cultura com a metade da concentração de sais de MS e a sala de conservação com temperatura de 18 ± 1 °C, intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, propiciaram a redução na altura de plantas, no número de folhas senescentes e no número de raízes. Como resultado, observou-se um maior número de folhas verdes em ambas as espécies, o que é ideal para a conservação.

Palavras-chave: Bromelioideae; *Aechmea*; *Vriesea*; *Hohenbergia*; viabilidade polínica; reprodução; micropropagação.

REPRODUCTIVE BIOLOGY, MICROPROPAGATION AND IN VITRO CONSERVATION OF BROMELIACEAE SPECIES OCCURRING ON THE WEST-EASTERN INTEGRATION RAILWAY TRANSECT – FIOLE

ABSTRACT: Bromeliaceae species offer various economic and ecological potentials. However, due to predatory extraction, urban expansion, and agribusiness, many species now face extinction. Studies focusing on floral biology and reproductive systems, along with large-scale seedling production, play a crucial role in reducing these threats. Developing an efficient seedling production system can serve as a viable alternative to mitigate these damages. In this context, the dissertation is divided into two chapters. Chapter I, titled "Reproductive studies of Bromeliaceae species occurring along the transect of the West-East Integration Railway (FIOLE)", aims to investigate the floral biology and reproductive aspects of *Aechmea alba*, *A. echinata*, and *Vriesea recurvata*, found in the FIOLE. The methodologies evaluated pollen viability, stigma receptivity at different stages of floral development, and various reproductive systems through controlled pollinations, as well as identified floral visitors. Pollen grains from all three species showed high viability during anthesis, regardless of the method used (histochemistry or in vitro germination). Both methods effectively assessed stigma receptivity, revealing higher enzymatic activity during anthesis for all three species. Among the floral visitors, hummingbirds acted as the most frequent and effective pollinators, while butterflies, bees, and ants appeared less significant and did not perform effective pollination. All three species exhibited allogamy and self-incompatibility, with anthesis being the most suitable time for controlled pollinations. Chapter II, titled "Micropropagation and in vitro Conservation of Bromeliaceae species occurring along the transect of the West-East Integration Railway (FIOLE)", aimed to evaluate the in vitro germination of *Aechmea mertensii* and *Hohenbergia castellanosii*, as well as quantify the average number of shoots per explant in treatments with different concentrations of BAP. Additionally, in vitro conservation through minimal growth under two MS salt concentrations and two cultivation conditions was conducted. The establishment of in vitro germination for both Bromeliaceae species resulted in seed germination rates exceeding 98%. For in vitro multiplication, treatments T02 (MS + 2.2 μM BAP + 0.05 μM ANA) and T03 (MS + 4.4 μM BAP + 0.05 μM ANA) proved most effective in inducing shoots for *A. mertensii*, allowing the formation of 5.25 and 11.85 shoots per explant, respectively, regardless of subcultivation. For *Hohenbergia castellanosii*, treatments T03 (MS + 4.4 μM BAP + 0.05 μM ANA) and T04 (MS + 6.6 μM BAP + 0.05 μM ANA) produced the highest average number of shoots per explant. Regarding in vitro conservation, the medium with half-strength MS salts and storage conditions with a temperature of 18 ± 1 °C, light intensity of $20 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, and a 12-hour photoperiod, reduced plant height, senescent leaves, and root numbers. Consequently, both species showed a higher number of green leaves, which is ideal for conservation.

Keywords: Bromelioideae; *Aechmea*; *Vriesea*; *Hohenbergia*; pollen viability; reproduction; micropropagation.

Sumário

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA	13
Bromeliaceae	13
<i>Aechmea</i>	14
<i>Vriesea</i>	14
<i>Hohenbergia</i>	15
Biologia Floral e Reprodutiva	16
Viabilidade dos grãos de pólen	17
Receptividade do estigma	19
Propagação in vitro e conservação	19
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 1	
ESTUDOS REPRODUTIVOS DE BROMELIACEAE OCORRENTE NO TRANSECTO DA FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE-LESTE (FIOL)	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 2	
MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO TRANSECTO DA FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE- LESTE (FIOL)	88
RESUMO	89
ABSTRACT	90
INTRODUÇÃO	91
MATERIAL E MÉTODOS	92
RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS	113

INTRODUÇÃO

Bromeliaceae é uma parte importante da composição das paisagens em áreas florestais brasileiras, ocupando o espaço epífita, terrestre e saxícola (Cavalcante et al., 2020). Essas plantas são típicas das zonas tropicais e subtropicais das Américas, com maior diversidade concentrada na região da Mata Atlântica (Givnish et al., 2011; Flora do Brasil, 2020). A família possui aproximadamente 3.742 espécies distribuídas em 82 gêneros (Gouda; Butcher, 2023). Acredita-se que o sucesso ecológico e evolutivo da família esteja relacionado à sua capacidade de adaptações morfofisiológicas (Zizka et al., 2020).

Dentro da família Bromeliaceae, a busca por novas espécies de plantas ornamentais tem crescido devido à alta durabilidade e beleza, especialmente pelo aspecto exótico e pela grande aceitação do mercado externo. Além disso, a família tem se destacado na produção de fibras para as indústrias têxtil e automobilística, bem como na produção de produtos naturais biodegradáveis.

A subfamília Bromelioideae geralmente exhibe folhas espinhosas e produz frutos do tipo bagas, cujas sementes são protegidas por uma mucilagem. Esta subfamília é particularmente significativa do ponto de vista econômico, com destaque para o gênero *Aechmea*, que abriga espécies com elevado valor ornamental, e para o gênero *Ananas*, que inclui o abacaxi, um fruto de grande relevância econômica devido ao seu alto consumo (Sass; Specht, 2010).

A dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo, denominado “Estudos reprodutivos de Bromeliaceae ocorrentes no transecto da ferrovia de integração Oeste-Leste” teve como objetivo estudar os aspectos da biologia floral e reprodutiva de *Aechmea alba*, *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata*, presentes no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste. Foram utilizadas metodologias para avaliar a viabilidade polínica por meio da germinação *in vitro* e teste histoquímicos, a receptividade do estigma em diferentes estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese), bem como para avaliar a

produção e composição do néctar, os diferentes sistemas reprodutivo a partir de polinizações controladas e os visitantes florais.

O segundo capítulo, denominado “Micropropagação e conservação *in vitro* de duas espécies de Bromeliaceae ocorrentes no transecto da ferrovia de integração Oeste-Leste”, teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*, além de quantificar o número médio de brotos por explantes nos tratamentos com diferentes concentrações de BAP, comparando a conservação *in vitro* nas diferentes concentrações de sais de MS e condições de cultivo.

Espera-se que os resultados alcançados possam oferecer uma contribuição significativa para minimizar dos riscos associados à perda de material genético em diversas espécies ameaçadas. Isso se deve ao fato de que os protocolos desenvolvidos demonstram um potencial aplicável para outras espécies de Bromeliaceae.

REVISÃO DE LITERATURA

Bromeliaceae

Bromeliaceae foi estabelecida em 1798 por Antoine Laurent de Jussieu (1748-1836), utilizando a denominação “Bromeliae”. Essa família compõe as paisagens das áreas florestais brasileiras, geralmente ocupando o extrato epífita, terrestre e rupícola, sendo um dos componentes importantes da flora, com grande variabilidade morfológica. Com predominância nas faixas tropicais e subtropicais do continente americano, possui ampla variedade ecológica, estando entre umas das famílias mais distintas (Givnish et al., 2011).

A família Bromeliaceae abrange aproximadamente 82 gêneros e 3.764 (Gouda et al., 2023). As espécies dessa família fornecem abrigo com condições propícias para a criação de ninhos como fonte de recursos para a fauna (Srivastava et al., 2020; Lopes Filho et al., 2023). Elas produzem frutos, néctar e grãos de pólen, além de servirem como reservatório de água em suas partes vegetativas, oferecendo recursos hídricos para inúmeras espécies de animais (Martinelli, 2006; Islair et al., 2015). Estudos filogenéticos resultaram na subdivisão da família em oito subfamílias: Bromelioideae, Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (Givnish et al., 2011).

As Bromeliaceae são ervas terrícolas, rupícolas ou epífitas, possuem folhas alternas ou espiraladas, e muitas espécies apresentam tanques acumuladores de água, conhecidos como fitotelma (Zizka et al., 2020). Segundo Benzing (2000), os diferentes habitats e substratos influenciam o desenvolvimento e aspecto da planta, que pode variar de tamanho, coloração das folhas e morfologia das flores. A superfície foliar possui tricomas especializados, denominados peltados ou escamiformes, cuja função é absorver umidade e nutrientes do ambiente (Vasconcellos; Oliveira, 2019).

As inflorescências são terminais, simples, cimosas ou racemosas, com bráctea vistosa, raramente axilares e com flores solitárias. As brácteas do pedúnculo frequentemente apresentam coloração intensa (Wanderley; Martins, 2007). A coloração nas Bromeliaceae é uma característica marcante e diversificada, manifestando-se de formas variadas, desde tons vibrantes até variações sutis. As flores com cores intensas, como vermelho, roxo e amarelo, estão frequentemente relacionadas à atração de polinizadores, como beija-flores e morcegos. As flores

possuem cálice trimero, dialissépalo ou gamossépalo, sépalas livres ou conadas, simétricas ou assimétricas, androceu com seis estames, ovário súpero, ínfero ou semi-ínfero, tricarpelar, trilocular, hipanto presente ou ausentes, e nectários septais geralmente bem desenvolvidos (Martinelli, 2006; Givnish et al., 2014; Kuhn et al., 2016).

O estigma possui três lobos, geralmente em forma de espiral, podendo variar entre as espécies (Siqueira et al., 2023). Os grãos de pólen apresentam grande variabilidade no padrão de abertura, podendo ser porados, monocolpados ou inaperturados (Souza et al., 2017). Os frutos são bagas ou cápsulas total ou parcialmente septicidas, com sementes geralmente numerosas, muitas vezes com apêndices plumoso caudado ou aliformes, ou sem apêndices (Fagundes et al., 2014).

Inúmeras espécies são utilizadas para diversas finalidades, como fibras, alimentação humana, combustíveis, produtos medicinais e cosméticos (Bennett et al., 2002). Além disso, várias espécies da família da Bromeliaceae possuem potencial ornamental para uso em vasos, como flores de corte ou em paisagismo (Souza et al., 2017).

Aechmea

É um gênero botânico pertencente à subfamília Bromelioideae e foi descrito por Ruiz & Pavon em 1794. São ervas de pequeno a médio porte, geralmente propagadas por rizomas basais, com inflorescência variando de composta a simples (Wanderley; Martins, 2007). Possuem folhas dispostas em roseta, com bainhas em forma de tanque. As espécies apresentam flores dísticas ou espiraladas, sésseis, de pequeno porte, que podem ser brancas, amarelas, róseas, vermelhas ou púrpuras com pétalas livres, presença de sépalas assimétrica, estames inclusos ou exsertos, ovário ínfero, óvulos caudados, fruto em forma de baga e sementes sem apêndices (Smith; Downs, 1979).

Vriesea

O gênero *Vriesea* foi descrito por John Lindley (1843) em homenagem ao botânico holandês Willem Hendrik De Vriese, devido à presença de apêndices petalíneos nestas espécies. Grisebach (1864) inicialmente considerou *Vriesea* como uma secção do gênero *Tillandsia*.

As folhas das espécies formam rosetas com características infundibuliformes, tubulares, funiformes ou fasciculadas, com inflorescência simples ou composta. O pedúnculo da inflorescência é ereto, subereto ou pendente; brácteas do pedúnculo são frequentemente eretas, podendo ser imbricadas ou não, ovais, elípticas ou oblongas, predominando as cores vermelhas, verdes, amarelas ou laranja (Smith; Downs, 1977; Wanderley; Martins, 2007). As brácteas florais são frequentemente ovais, elípticas, orbiculares a lanceoladas. As flores são dísticas, suberetas a patentes, secundas ou não, com fruto tipo cápsula e sementes com apêndices (Costa et al., 2014). Essas características são consideradas diagnósticas e úteis para distinguir espécies deste gênero.

As espécies de *Vriesea* são praticamente exclusivas da Mata Atlântica e da diagonal seca sul-americana, com poucas exceções. Aproximadamente 95% das espécies do gênero são endêmicas do Brasil, encontradas em campos rupestres, sendo terrestres, rupícolas ou epífitas. Possuem rizomas basais axilares e variam de 15 cm a 2,5 m quando em floração (Flora e Funga do Brasil, 2020).

Vriesea pertence à subfamília Tillandsioideae, tem grande potencial ornamental, e várias espécies e híbridos estão disponíveis no mercado, sendo o terceiro maior gênero da família Bromeliaceae (Costa et al., 2014; Flora e Funga do Brasil, 2020). Além disso, é um dos gêneros mais ricos em tamanho e diversidade de habitats, distribuído pelas regiões tropicais das Américas, em diferentes biomas (Pimentel; Maciel, 2018).

Espécies deste gênero têm sido intensamente exploradas devido a beleza, durabilidade e valor comercial acessível (Negrelee et al., 2012; Costa et al., 2014). A vulnerabilidade causada pela destruição de seu habitats, associada à grande quantidade de queimadas, desenvolvimento urbano, mineração e construção de ferrovias e estradas, tem contribuído para a perda de muitas espécies e prejudicando o conhecimento sobre novas espécies desses gêneros (Bitencourt, 2016).

Hohenbergia

Este gênero foi descrito por Schultes e Schultes Filho (1830) e recebeu esse nome em homenagem à família do príncipe chamado Hohenberg (Grant, 1998). No que diz respeito à distribuição geográfica, é importante observar que o gênero é predominantemente encontrado nas florestas tropicais, principalmnete do Nordeste

do Brasil e na região caribenha, manifestando-se tipicamente na forma de epífitas (Neves et al., 2015). No Brasil tem predominância na Mata Atlântica abrangendo desde o estado do Rio Grande do Norte até São Paulo, mas ocorre também na Floresta Estacional Semidecidual, dentro do bioma da Caatinga. A Bahia é o estado onde ocorre a maior parte das espécies do gênero, com mais de 75% delas registradas (Gouda et al., 2023). Na região da Chapada Diamantina em particular, é reconhecido pela rica diversidade de espécies (Silva; Oliveira et al., 2014; Gomes et al., 2014; Leitman et al., 2014).

São características de *Hohenbergia*: a presença de plantas epífitas, terrestres ou rupícolas; folhas rosuladas e polísticas; bainha larga, com diferentes tonalidades de castanho-escuro; inflorescência geralmente possui escapo floral desenvolvido com brácteas florais evidentes, frequentemente cobre o ovário e as sépalas; flores sésseis ou subsésseis, comumente de tons arroxeados; sépalas assimétricas, livres ou conadas; pétalas em formato espatuladas ou elipsóides, com apêndices petalíneos; estames antipétalos parcialmente fundidos às pétalas; ovário ínfero; óvulos obtusos a caudados e fruto bacáceo (Maciel; Louzada, 2014; Gonçalves-Oliveira et al., 2020).

Quanto aos mecanismos de polinização, são essencialmente ornitófilas, ou seja, apresentam uma associação prioritária com aves polinizadoras, como diversas espécies de beija-flores. Assim, a natureza da relação entre essas plantas e seus polinizadores pode variar, com alguns beija-flores manifestando padrões específicos de territorialidade em suas interações com as espécies, enquanto outros adotam um comportamento mais generalista, influenciado pela localização geográfica e pela disponibilidade de recursos (Siqueira-Filho; Leme, 2006).

Biologia Floral e Reprodutiva

A biologia floral e reprodutiva permite a compreensão das interações entre os grãos de pólen e o estigma, os mecanismos de atração das flores para os polinizadores, o comportamento dos visitantes florais, as estratégias empregadas pela espécie e o sucesso reprodutivo (Araújo et al. 1994; Siqueira Filho 1998; Revanassida; Belavadi, 2019; Adithiyaa et al., 2020). Segundo Faegri e Van Der Pijl (1980), a organização das flores em uma inflorescência favorece sua atração visual, e o período de abertura das flores ao longo do dia aumenta a probabilidade de acesso desta por polinizadores (Benzing, 2000).

Além dos grãos de pólen, as espécies também proporcionam néctar, o que exerce atração sobre os polinizadores. No caso das bromélias, polinizadas por abelhas, a quantidade de néctar disponível é comparativamente reduzida, como observado em estudos anteriores (Almeida et al., 2004; Machado, 2006). Em contrapartida, as polinizadas por beija-flores apresentam abundância de néctar e maiores níveis de concentração de açúcares. Além disso, Bromeliaceae oferecem recursos e condições favoráveis para diversas espécies de animais, predominando a polinização por aves (Benzing, 2000; Kessler, 2002; Tagliati et al., 2018).

Os morcegos também são importantes agentes polinizadores e recorrem às flores de antese noturna da família Bromeliaceae devido à presença de odores fortes (Sazima et al., 1999). Além da quiropterofilia e ornitofilia, os besouros, borboletas e abelhas atuam também como polinizadores (Snow; Snow, 1986; Benzing, 2000). Como visitantes ocasionais, podemos citar as formigas, que não possuem estruturas adequadas para aderir aos grãos de pólen (Galitzki et al., 2013). Desta forma, as diversas interações planta-animal e planta-polinizador trazem informações valiosas sobre a coevolução entre os indivíduos envolvidos nesse processo (Teixeira et al., 2014). Essa relação também pode ser resultado de um caráter adaptativo das espécies, uma vez que um número maior de polinizadores sincroniza com a época de floração, assegurando maior eficiência reprodutiva (Morellato et al., 2016).

Portanto, o estudo de sistema reprodutivo deve estar alinhado com o estudo fenológico, auxiliando na compreensão com os fenômenos periódicos dos seres vivos e como se relacionam com as condições ambientais (Sigrist; Sazima, 2015). Na autopolinização natural ou polinização direta, os grãos de pólen devem cair sobre o estigma da mesma flor que o originou, resultando na autofecundação (Shivanna, 2015). Por outro lado, a polinização cruzada é fonte de variação genética, possibilitando a formação de híbridos (Vervaeke et al., 2004).

Viabilidade dos grãos de pólen

Para compreender o sucesso reprodutivo e possíveis obstáculos na geração de sementes que garantam a sobrevivência das espécies, é necessário realizar estudos que abordem a biologia reprodutiva dos indivíduos. Estes estudos devem incluir aspectos como o tamanho da inflorescência, a produção flores e fruto, e a viabilidade das sementes e dos grãos de pólen (Silva et al., 2016; Neves et al.,

2020). O estudo da viabilidade polínica, em particular, representa um fator essencial para o sucesso da fertilização, sendo crucial para programas de conservação e melhoramento genético das espécies (Santos et al., 2015).

O sucesso reprodutivo dos indivíduos está diretamente relacionado ao estudo da germinação e teste histoquímicos. A germinação *in vitro* é uma valiosa alternativa que oferece resultados em um curto período de tempo, subsidiando programas de melhoramento genético e conservacionista (Chagas et al., 2010). Para alcançar bons resultados na germinação *in vitro*, é essencial controlar fatores como o estado nutricional das plantas, o horário de coleta, o fotoperíodo, o método de coleta, a qualidade no preparo do material, o período de incubação, e a presença de micro e macronutrientes no meio de cultura utilizado. Esses fatores são ajustados conforme a espécie estudada (Soares et al., 2008).

Segundo Taylor e Hepler (1997), o uso de meios de cultura que simulem o potencial fisiológico da espécie *in vivo* é essencial para a germinação *in vitro* (Soares et al., 2008). Assim, técnicas específicas devem ser adequadas a cada espécie em estudo (Souza et al., 2017). A composição do meio de cultura e o pH estão entre os fatores que afetam diretamente a germinação. Parton et al. (2002) destacam que meios de cultura contendo 200 g/L de sacarose, 10 g/L de ácido bórico e 5 g/L de ágar proporcionaram melhores resultados. O ácido bórico, ao interagir com o açúcar, forma um complexo ionizável que reage com as membranas celulares, contribuindo para uma maior porcentagem de germinação (Franzon et al., 2005). Além disso, o nitrato de cálcio tem uma influência positiva sobre a fisiologia do crescimento do tubo polínico (Stanley; Linskens, 1974), e micronutrientes e hormônios também desempenham um papel relevante (Pio et al., 2007).

A viabilidade polínica é um dos indicadores mais importantes para o sucesso e qualidade da fertilização, sendo essencial em programas de conservação, melhoramento genético, e na produção agrícola (Santos et al., 2015). Para avaliar a viabilidade polínica, são utilizados reagentes como diacetato de fluoresceína, carmim acético, sudan IV, azul de anilina, iodeto de potássio, azul de algodão e solução de Alexander (Stanley; Linskens, 1974).

No entanto, é importante observar que resultados baseados apenas em métodos histoquímicos podem não ser totalmente confiáveis, já que frequentemente há uma superestimação devido à interação com substâncias como enzimas, amidos e outros componentes presentes também em grãos de pólen inviáveis (Souza et al.,

2015). Por isso, a avaliação da germinação *in vitro* e *in vivo* oferece uma visão mais completa do desenvolvimento do tubo polínico (Jayaprakash; Sarla, 2001).

Receptividade do estigma

O estigma possui características secretoras conspícuas, incluindo proteínas, enzimas e polissacarídeos (Oliveira et al., 2020). Há variações entre indivíduos e espécies, sendo que algumas produzem substâncias viscosas que favorecem a aderência dos grãos de pólen, a germinação e o crescimento do tubo polínico, o que aumenta as chances de fertilização nas polinizações controladas (Souza et al., 2016; Nacata et al., 2019).

Os estigmas de Bromeliaceae podem ser categorizados em diferentes tipos morfológicos, como cilíndrico-distante, lâmina-convoluta I, lâmina-convoluta II, coraliforme, convoluta-obcônico, convoluta-guarda-chuva, cupulado, urceolado, tubo-laciniado, conduplicado-espiral, conduplicado-ereto, conduplicado-patente, conduplicado-pinatisecto, simples-ereto, simples-truncado, simples-pinatisecto, simples-patente, simples-dilatado e simples-imbricado (Leme et al., 2022; Siqueira et al., 2023).

Entre os testes mais utilizados para avaliar a receptividade estigmática, destaca-se o uso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devido ao baixo custo e à fácil aplicabilidade. Este teste detecta a presença de estigmas receptivos por meio da formação de bolhas de ar, que ocorre quando o peróxido de hidrogênio reage com a enzima peroxidase. Contudo, para evitar falsos positivos, é necessário que o tecido estigmático esteja íntegro e sem lesões (Dafni, 1992; Kearns; Inouye, 1993; Almeida, 2007).

Atualmente, a metodologia mais eficaz para indicar os níveis de receptividade estigmática é a reação do α -naftil-acetato com fast blue B salt, que interage com a enzima esterase. Essa interação contribui para a germinação dos grãos de pólen e a penetração do tubo polínico no estigma. O estigma cora em tons de marrom escuro a preto, indicando sua receptividade (Kearns; Inouye, 1993; Kulloli et al., 2010).

Propagação *in vitro* e conservação

Em virtude das inúmeras utilidades econômicas e ornamentais da família Bromeliaceae, técnicas de propagação *in vitro* surgem como uma alternativa para minimizar os efeitos antrópicos e garantir a perpetuação das espécies sem a

interrupção do ciclo evolutivo. A propagação in vitro de bromélias tem demonstrado sucesso em várias espécies, como *Tillandsia eizii* L.B.Sm. (Pickens et al., 2006), *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. e *Aechmea distichantha* Lem (Santa-Rosa et al., 2013), assim como em bromélias dos gêneros *Neoregelia* L.B.Sm. (Carvalho et al., 2011) e *Orthophytum mucugense* Wand. A.A. Conc. e *Neoregelia mucugensis* Leme (Bellintani et al., 2007).

A propagação in vitro por meio da cultura de tecidos é vantajosa tanto do ponto de vista numérico quanto na qualidade dos explantes cultivados em meio nutritivo (Soneji et al., 2002; Souza et al., 2013). A fase de estabelecimento, levando em consideração a influência de componentes como minerais reguladores de crescimento e vitaminas, juntamente com os genótipos e fatores físicos como condições assépticas e a limpeza viral das matrizes, desempenha um papel essencial na produção de plantas saudáveis e em escalas maiores de produtividade (Rout et al., 2006; Atawia et al., 2016; Yadav et al., 2019).

A utilização de fitorreguladores é relevante para o crescimento e desenvolvimento dos explantes. As auxinas influenciam o tropismo e a dominância apical, enquanto as citocininas regulam a divisão celular, induzindo o crescimento das gemas laterais e afetando o crescimento dos caules e raízes. Esses fitorreguladores atuam na regulação da morfogênese na cultura de tecidos (Silva et al., 2016; Oliveira-Caudo et al., 2017).

A conservação in vitro proporciona o armazenamento de plantas e tecidos vegetais a curto e médio prazo, sob condições de crescimento lento, e a longo prazo, frequentemente por meio da criopreservação, realizada em nitrogênio líquido a aproximadamente -196 °C (Engelmann, 2011). Assim, a conservação in vitro visa manter as plantas em condições de laboratório com manipulações mínimas, garantindo a preservação da identidade genética do material e sua qualidade fitossanitária (Almeida et al., 2002; Engelmann, 2011).

Diversos fatores podem influenciar o sucesso na conservação in vitro de bromélias. Condições de incubação da cultura, como a redução da temperatura e da luminosidade, são exemplos de modificações que podem ser feitas para melhorar o processo de conservação (Engelmann, 2011). Embora seja uma prática eficaz, a conservação in vitro requer estudos de adequação para cada nova espécie. Alguns casos de sucesso na propagação in vitro de bromélias de crescimento lento foram observados para *Alcantarea imperialis* Harms (Mollo et al., 2011), *Vriesea inflata*

(Wawra) Wawra (Freitas et al., 2015) e *Nidularium minutum* Mez (Carvalho et al., 2013).

Portanto, aprimorar as técnicas de propagação in vitro não apenas contribui para uma compreensão mais aprofundada das necessidades específicas de cada espécie estudada, como também oferece soluções práticas para a multiplicação e conservação eficaz dessas plantas em ambientes controlados.

REFERÊNCIAS

- ADITHIYAA, T.; CHANDRAMOHAN, D.; SATHISH, T. Flower pollination algorithm for the optimization of stair casting parameter for the preparation of AMC. **Materials Today**, v. 21, n. 4, p. 882-886, 2020.
- ALMEIDA, E. M.; STORNI, A.; RITTER, P. D.; ALVES, M. A. S. Floral visitors of *Tillandsia stricta* Sol. (Bromeliaceae) at Restinga of Jurubatiba, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil. **Vidalia**, v. 2, n. 1, p. 30-35, 2004.
- ARAÚJO, A. C.; FISCHER, E. A.; SAZIMA, M. Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região da Juréia, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 17, n. 2, p. 113-118, 1994.
- ATAWIA, A. R.; KHALIL, M. M.; HUSSEIN, E. A. Studies on micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). **Middle East Journal of Agriculture Research**, v. 5, n. 2, p. 224-232, 2016.
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento in vitro de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1101-1103, 2007.
- BENNETT, B. C.; BAKER, M. A.; GÓMEZ, P. Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador. **Advances in Economic Botany**, v. 14, p. 1-299, 2002.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: Profile of an adaptative radiation. Cambridge: Cambridge University Press, p.690, 2000.
- BITENCOURT, C.; RAPINI, A.; DAMASCENA, L. S.; DE MARCO JUNIOR, P. The worrying future of the endemic flora of a tropical mountain range under climate change. **Flora**, v. 218, p. 1-10, 2016.
- BORSATTO, R. S.; OTTMANN, M. M. A.; FONTE, N. N.; CIDADE JÚNIOR, H. A.; ALANO, E. R. C.; CAVALLET, V. J. Problemas agrários do litoral paranaense: abordagem histórica. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 4, p. 421-430, 2007.
- CARNEIRO, L. A.; MANSUR, E. Contribuição de metodologias in vitro para a conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v. 2, n. 1, p. 12-20, 2004.
- CARVALHO, A. C. P. P.; SANTOS, E. O.; RODRIGUES, A. A. J. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil. In: GERALD, L. T. S. (ed.). **Biofábrica de plantas**: produção industrial de plantas in vitro. São Paulo: Atiqua, p. 380-393, 2011.
- CARVALHO, C. P.; HAYASHI, A. H.; BRAGA, M. R.; NIEVOL, C. C. Biochemical and anatomical responses related to the in vitro survival of the tropical bromeliad *Nidularium minutum* to low temperatures. **Plant Physiology Biochechnology**, n. 71, p. 144-154, 2013.

- CAVALCANTE, B. P.; SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; MARTINELLI, A. P. *Hohenbergia ituberaensis* (Bromeliaceae): A new white-flowered species from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 439, n. 2, p. 119–126, 2020.
- CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; BETTIOL NETO, J. E. Composição de meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 231-236, 2010.
- COELHO, M.; AMORIM, A. M. Floristic composition of the Montane Forest in the Almadina-Barro Preto axis, Southern Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 14, p. 1-41, 2014.
- CORADIN, L.; CAMILLO, J.; VIEIRA, I. C. G. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**: plantas para o futuro: região Norte. Brasília: MMA. 2022. 1452 p.
- COSTA, A.F.; MOURA, R.L.; NEVES, B.; MACHADO, T.M.; KESSOUS, I.M.; URIBBE, F.P.; COUTO, D.R.; GOMES-DA-SILVA, J. *Vriesea* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2024.
- COSTA, A. F. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineage. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 141, n. 4, p. 338-352, 2014.
- COSTA, A. F.; GOMES-DA-SILVA, J.; WANDERLEY, M. D. G. L. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): a cladistic analysis of eastern Brazilian species based on morphological characters. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 429-440, 2015.
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 5-7, 2006.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 45, p. 5-16, 2011.
- FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. *The Principles of Pollination Ecology*. 3. ed. **Pergamon Press**, p.291,1980.
- FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. A. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 6, p. 1323-1336, 2014.
- FLORA DO BRASIL, 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 Jan. 2023.
- FRANZON, R. C.; CORRÊA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. In vitro pollen germination of feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 229-233.
- GALITZKI, E. L.; CERETO, C. E.; SCHERER, K. Z.; LOPES, B. C.; CASTELLANI, T.

T. Formigas visitantes de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano (*Eriocaulaceae*). **Biotemas**, v. 26, n. 4, p. 75-83, 2013.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 55-78, 2014.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.

GOMES, F. S.; GUEDES, M. L. S. Flora vascular e formas de vida das formações de restinga do litoral norte da Bahia, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, v. 1, n. 1, 2014.

GONÇALVES-OLIVEIRA, R. C.; MARTINS, S. E.; WANDERLEY, M. G. L. **Hohenbergia in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB6096>. Acesso em: 18 out. 2023.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. **Encyclopaedia of Bromeliads**, Version 4. Utrecht University Botanic Gardens. (continuamente atualizado). Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso em: 12 Agosto. 2023.

GRANT, J. R. An Annotated Catalogue of the Generic Names of the Bromeliaceae. In: The Marie Selby Botanical Gardens, 1998. **Selbyana**, v. 19, n. 1, p. 91-121, 1998.

ISLAIR, P.; CARVALHO, K. S.; FERREIRA, F. C.; ZINA, J. Bromeliads in caatinga: an oasis for invertebrates. **Biotemas**, v. 28, p. 67-77, 2015.

IUCN - International Union for Conservation of Nature. **Red List of Threatened Species Version 2021**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/22685521/0>. Acesso em: 20 out. 2023.

JAYAPRAKASH, P.; SARLA, N. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 851-855, 2001.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University Press of Colorado, 1993, 583 p.

KESSLER, M. Environmental patterns and ecological correlates of range size among bromeliad communities of Andean forest in Bolivia. **The Botanical Review**, v. 68, p. 100-127, 2002.

- KUHN, S. A.; NOGUEIRA, F. M.; FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. Morphoanatomy of the ovary and ovule in Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae and its systematic relevance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 343-361, 2016.
- KULLOLI, S. K.; RAMASUBBU, R.; SREEKALA, A. K.; PANDURANGAN, A. G. Cytochemical localization of stigma-surface esterase in three species of Impatiens (Balsaminaceae) of Western Ghats. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 106-111, 2010.
- LEITMAN, P.; AMORIM, A.; MENINI NETO, L.; FORZZA, R. C. Epiphytic angiosperms in a mountain forest in southern Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 2, p. 1-12, 2014.
- LEME, E. M. C.; ZIZKA, G.; SOUZA, E. H.; PAULE, J.; CARVALHO, J. D. T.; MARIATH, J. E. A.; HALBRITTER, H.; RIBEIRO, O. B. C. New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny. **Phytotaxa**, v. 544, n. 2, p. 128-170, 2022.
- LINDLEY, J. **Edwards’s Botanical Register**. London: James Ridgway and Sons, v. 6, n. 29. 1843.
- LOPES FILHO, D. R.; MANTOVANO, T.; NEVES, G. P.; SILVA, N. J.; MIRANDA, V. B. dos S.; LANSAC-TÔHA, F. A. Bromeliad phytotelmata: the first scientometric study. **Limnetica**, v. 42, n. 1, p. 143-154, 2023.
- MACHADO, C. G.; SEMIR, J. Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 163-174, 2006.
- MACIEL, J. R.; LOUZADA, R. A new species of *Hohenbergia* (Bromeliaceae) from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 156, n. 1, p. 54-58, 2014.
- MARTINELLI, A. P. Morfologia e Conservação de Grãos de Pólen. In: WORKSHOP DE MANEJO DE POMARES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA, 16., 2012, São Paulo. Anais [...] São Paulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2012.
- MARTINELLI, G. Manejo de populações e comunidades vegetais: um estudo de caso na conservação de Bromeliaceae. In: ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. A. S. **Biologia da conservação**. São Carlos, p. 582, 2006.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson e Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 315-397. 2013.
- MORELLATO, L. P. C.; ALBERTON, B.; ALVARADO, S. T.; BORGES, B.; BUISSON, E.; CAMARGO, M. G. G.; CANCIAN, L. F.; CARSTENSEN, D. W.; ESCOBAR, D. F. E.; LEITE, P. T. P.; MENDOZA, I.; ROCHA, N. M. W. B.; SOARES,

N. C.; SILVA, T. S. F.; STAGGEMEIER, V. G.; STREHER, A. S.; VARGAS, B. C.; PERES, C. A. Linking plant phenology to conservation biology. **Biological Conservation**, v. 195, n. 1, p. 60-72, 2016.

NACATA, G.; BELONSI, T. K.; GASPARINO, E. C. G.; ANDRADE, R. A. A. Pollen morphology and availability of pollen and stigma in *Syzygium* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 6, 2019.

NARA, A. K.; WEBBER, A. C. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixio na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 4, p. 571-588, 2002.

NEGRELLE, R. R. B.; ANACLETO, A. Extrativismo de bromélias no Estado do Paraná. **Ciência Rural**, v. 42, p. 981-986, 2012.

NEVES, B.; KESSOUS, I. M.; MOURA, R. L.; COUTO, D. R.; ZANELLA, C. M.; ANTONELLI, A.; BACON, C. D.; SALGUEIRO, F.; COSTA, A. F. Pollinators drive floral evolution in an Atlantic Forest genus. **Plantas AoB**, v. 12, n. 5, p. 046, 2020.

NEVES, B.; PÉREZ URIBBE, F.; JACQUES, S. S. A.; PAIXÃO-SOUZA, B.; MOURA, R. L.; BARROS, A. A. M.; COSTA, A. F. *Aechmea* e gêneros relacionados (Bromelioideae, Bromeliaceae) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 555-570, 2015.

NOGUEIRA, P. V.; SILVA, D. F.; PIO, R.; SILVA, P. A. O.; BISI, R. B.; BALBI, R. V. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, v. 74, p. 9-15, 2015.

OLIVEIRA, E. V. S.; LIMA, J. F.; SILVA, T. C.; LANDIM, M. F. Checklist of the flora of the Restingas State of Sergipe, Northeast Brazil. **Journal of Species Lists and Distribution**, v. 10, n. 3, p. 529-549, 2014.

OLIVEIRA, F. M. C.; RODRIGUES, A. C.; LUSA, M. G.; MELO-DE-PINA, G. F. A. Androecium and gynoecium anatomy of Bromeliaceae species. **Flora**, v. 263, p. 151-538, 2020.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y.; LOPES, V. R.; BONA, C. M.; ALCÂNTARA, G. B.; BIASI, L. A. Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento in vitro e ex vitro. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.12(2), p.53, 2017.

OZUDOGRU, E. A.; PREVIATI, A.; LAMBARDI, M. In vitro Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. Protocols for In vitro Propagation of Ornamental Plants, **Methods in Molecular Biology**, v. 589, p. 303-324, 2010.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, p. 155-161, 2002.

PICKENS, A. K; WOLF, J.; AFFOLLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Adventitious bud

development and regeneration in *Tillandsia eizii* in vitro. **Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 42, n. 4, p. 348-353, 2006

PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. S.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 147-153, 2007.

REVANASSIDA; BELAVADI, V. V. Floral biology and pollination in Cucumis melo L., a tropical andromonoecious cucurbit. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 215-225, 2019.

RIZZO, J. A. **Goiás de Saint-Hilaire e de hoje**. Goiânia: UFG, 1996. 81 p.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; MOHAN JAIN, S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 531-560, 2006.

SANTOS, T.; TIAGO, P.; SCHMITT, K. F.; MARTINS, K.; ROSSI, A. A. Viabilidade pólinica em *Bertholletia excelsa* Bonpl.(Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

SANTOS, T.; TIAGO, P.; SCHMITT, K. F.; MARTINS, K.; ROSSI, A. A. Viabilidade pólinica em *Bertholletia excelsa* Bonpl.(Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

SASS, C.; SPECHT, C. D. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 559-571, 2010.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated Flower Assemblages and Bat Visitors at Two Atlantic Forest Sites in Brazil. **Annals of Botany**, v. 83, p. 705-712, 1999.

SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, N. A.; SUBAIH, W. S.; AJLOUNI, M. M. In vitro Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources: A Review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 372-382, 2006.

SHIVANNA, K. R. Reproductive assurance through autogamous self-pollination across diverse sexual and breeding systems. **Current Science**, p. 1255-1263, 2015.

SIGRIST, M. R.; SAZIMA, M. Phenology, reproductive biology and diversity of buzzing bees of sympatric *Dichorisandra* species (Commelinaceae): breeding systems and performance of pollinators. **Plant Systematic and Evolution**, v. 301, n. 3, p. 1005-1015, 2015.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; RAMOS, J. D.; BRAGA, F. T.; ARAÚJO, A. G. Luz natural, sacarose e fitorreguladores na anatomia foliar e crescimento in vitro de abacaxizeiro micropropagado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 8, n. 1- 2, p.1-9, 2016.

- SILVA, R. M. A. **Evolução da taxonomia vegetal: perspectiva histórica.** Faculdade de Ciências/Universidade do Porto. 2000. Disponível em: <http://www.fc.up.pt/pessoas/rasilva/historia.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2023.
- SILVA, V. J. D.; RIBEIRO, E. M.; LUIZI-PONZO, A. P.; FARIA, A. P. G. Ultrastructure and pollen morphology of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest of southeastern Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, p. 439-449, 2016.
- SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PECALANI, C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and in vitro conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez., a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p.923-932, 2009.
- SIQUEIRA FILHO, J. A. Biologia floral de *Hohenbergia ridley* (Baker) Mez. **Bromélia**, v. 5, n.1-4, p. 3-13, 1998.
- SMITH L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, v. 14, n. 2, p.663-1492, 1977.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, n. 14, n. 3, p. 1493-2142, 1979.
- SNOW, D. W.; SNOW, B. K. Feeding ecology of hummingbirds in the Serra do Mar, southeastern Brazil. **El Hornero**, v. 12,p. 286-296,1986.
- SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 111-118, 2008.
- SONEJI, J. R.; RAO, P. S.; MHATRE, M. S. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 77, p. 28-32, 2002.
- SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006, 152 p.
- SOUZA, E. H.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P. Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, v. 203, n. 1, p. 118–125, 2016.
- SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; LEDO, C. A. S.; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic Forest. **Euphytica**, v. 204, p. 13-28, 2015.
- SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V.; ROSSI, M. L.; PACKER, R. M.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; MARTINELLI, A. P. Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 3067-3082, 2017.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; SILVA, K. R.; VERSIEUX, L. M.; ORIANI, A. Morphological and anatomical variations of roots, leaves, peduncles, and peduncle bracts in the *Vriesea oligantha* complex (Bromeliaceae): Perspectives for taxonomy. **Systematic Botany**, v. 45, n. 4, p. 779-793, 2020.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed., Brasília, v. 1, p. 345-372, 2013.

SRIVASTAVA, D. S. Extreme rainfall events alter the trophic structure in bromeliad tanks across the Neotropics. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2020.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, p. 307, 1974.

TAGLIATI, M. C.; OLIVEIRA, H. C.; FARIA, A. P. G. Fenologia reprodutiva, recursos florais e polinização de espécies de Bromeliaceae em um remanescente urbano de Floresta Atlântica do sudeste brasileiro. **Diversidade e Gestão**, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2018.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 461-491, 1997.

TEIXEIRA, S. P.; MARINHO, C. R.; PAULINO, J. P. A flor, aspectos morfofuncionais e evolutivos. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. **Biologia da Polinização**. 1a. ed. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultura, p.45-69, 2014.

VASCONCELLOS, V. C.; OLIVEIRA, J. M. S. Descrição morfológica e anatômica da estrutura floral em *Dyckia ibicuiensis* Strehl (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 6, n. 6, p. 58-69, 2019.

VERSIEUX, L. M. **Alcantarea**: giant bromeliads from Brazil. 2. ed. Natal: Capim Macio & Offset, 2021, 348 p.

VERVAEKE, I.; WOUTERS, J.; LONDERS, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Morphology of artificial hybrids of *Vriesea splendens* X *Tillandsia cyanea* and *V. splendens* X *Guzmania lingulata* (Bromeliaceae). **Annales Botanici Fennici**, v. 41, p. 201-208, 2004.

WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E. Bromeliaceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM; T.S.; GIULIETTI, A.M. (Eds.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: **Instituto de Botânica**, p. 39-162, 2017.

YADAV, S.; NAGARAJA, T. E.; LOHITHASWA, H. C.; SHIVAKUMAR, K. V. Effect of temperature, humidity and light intensity on micropropagated sugarcane (*Saccharum Species Hybrid*) Genotypes. **Sugar Tech**, v. 22, p. 226–231, 2019.

ZANELLA, C. M.; JANKE, A.; PALMA-SILVA, C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; PINHEIRO, F. G.; PAGGI, G. M.; SOARES, L. E.; GOETZE, M.; BÜTTOW, M. V.; BERED, F. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1020-1026, 2012.

ZIZKA, A.; AZEVEDO, J.; LEME, E.; NEVES, B.; COSTA, A. F.; CÁCERES, D.; ZIZKA, G. Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). **Diversity and Distributions**, v. 26, n. 2, p. 183-195, 2020.

Capítulo 1

Estudos reprodutivos de Bromeliaceae ocorrente no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL)¹

¹Capítulo a ser ajustado e submetido para a Acta Botanica Brasilica.

Estudos reprodutivos de Bromeliaceae ocorrente no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL)

RESUMO: Este estudo concentra-se na análise de espécies pertencentes à família Bromeliaceae, endêmicas do Brasil, com um enfoque específico na biologia floral e reprodutiva. Investigações sobre a viabilidade polínica e os sistemas reprodutivos desempenham um papel fundamental para compreender os mecanismos reprodutivos dessas espécies e, conseqüentemente, traçar estratégias de conservação. O objetivo deste estudo foi analisar aspectos da biologia floral e reprodutiva de três espécies de *Bromeliaceae* presentes no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL), utilizando diferentes técnicas, como: viabilidade polínica, receptividade do estigma, quantificação e composição do néctar, sistemas reprodutivos e visitantes florais. Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentaram altas porcentagens de germinação, comprimento do tubo polínico e viabilidade por histoquímica, especialmente durante a antese floral. Ambos os métodos utilizados para avaliar a receptividade do estigma demonstraram eficácia, evidenciando maior atividade enzimática durante a antese em todas as três espécies. A maior produção de néctar ocorreu às 6h da manhã, com uma concentração de açúcares de 8,8 mg para *Vriesea recurvata*. Quanto aos visitantes florais, observou-se uma predominância de beija-flores, especialmente *Phaethornis ruber*, que mostrou uma frequência significativa de visitas a todas as espécies nas primeiras horas do dia. Borboletas, abelhas e formigas tiveram uma presença menos expressiva. Além disso, a identificação dos sistemas reprodutivos e a avaliação do potencial para hibridação foram realizadas por meio da análise da germinação dos grãos de pólen e do desenvolvimento dos tubos polínicos no pistilo, utilizando microscopia de fluorescência. Todas as espécies apresentaram características alógamas e autoincompatíveis. As prováveis causas da autoincompatibilidade e das incongruências interespecíficas estão associadas a diferentes características, como restrição no crescimento do tubo polínico ao longo do estilete, enrolamento dos tubos polínicos e presença de tubos polínicos no interior do ovário sem penetração na micrópila. Nenhuma das espécies estudadas demonstrou agamosperma. Os resultados deste estudo contribuem de forma significativa para a conservação de espécies e produção de sementes, especialmente para as espécies endêmicas e ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: Bromeliaceae; Biologia Floral; Viabilidade Polínica; Conservação de espécies; Sistemas reprodutivos.

Reproductive studies of Bromeliaceae species occurring along the transect of the West- East Integration Railroad (FIOL)

ABSTRACT: This study focuses on analyzing species from the Bromeliaceae family that are endemic to Brazil, with a specific emphasis on floral and reproductive biology. Research on pollen viability and reproductive systems plays a crucial role in understanding the reproductive mechanisms of these species and, consequently, in developing conservation strategies. The study aimed to examine aspects of floral and reproductive biology in three Bromeliaceae species found along the Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL) transect, using various techniques such as pollen viability, stigma receptivity, nectar quantification and composition, reproductive systems, and floral visitors. Pollen grains from the studied species showed high percentages of germination, pollen tube length, and viability through histochemistry, particularly during floral anthesis. Both methods used to assess stigma receptivity proved effective, revealing increased enzymatic activity during anthesis in all three species. Nectar production peaked at 6 AM, with a sugar concentration of 8.8 mg in *Vriesea recurvata*. Floral visitors predominantly included hummingbirds, especially *Phaethornis ruber*, which exhibited a significant frequency of visits to all species in the early hours of the day. Butterflies, bees, and ants were less prominent. Additionally, the study identified reproductive systems and assessed hybridization potential through pollen germination analysis and pollen tube development in the pistil, utilizing fluorescence microscopy. All species displayed allogamous and self-incompatible traits. Likely causes of self-incompatibility and interspecific incongruences include constraints on pollen tube growth along the style, curling of pollen tubes, and pollen tubes present in the ovary without penetration into the micropyle. None of the studied species showed agamospermy. These results significantly contribute to the conservation of species and seed production, especially for endemic and endangered species.

Keywords: Bromeliaceae; Floral Biology; Pollen Viability; Species Conservation; Reproductive Systems.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é altamente adaptada a diversos habitats, podendo ser encontrada em ambientes que vão de secos a úmidos e em regiões com baixas ou elevadas temperaturas. Ela apresenta hábitos variados e desempenha um papel biológico significativo, diferenciando-se em espécies epífitas, terrestres e rupícolas (Benzing, 2000). Geralmente, os representantes dessa família possuem rizomas horizontais e folhas distribuídas em roseta, com uma bainha alargada na base que oferece nutrientes aos insetos e também funciona como reservatório de água (Costa et al., 2019).

Essas plantas fornecem recursos de forma contínua, sustentando diferentes grupos biológicos, como abelhas, beija-flores e morcegos (Martinelli, 1997; Buzato et al., 2000). A interação planta-animal proporcionada por essas plantas é essencial para o estudo da reprodução das plantas e dos recursos disponíveis no ambiente para os animais associados.

Nesse contexto, o estudo da biologia floral é fundamental para analisar as relações entre os elementos envolvidos, como os grãos de pólen, o estigma, as flores e os polinizadores (Soares et al., 2013; Bastos et al., 2017). Além disso, esses estudos são cruciais para avaliar o sucesso reprodutivo das espécies vegetais, compreendendo suas estratégias de sobrevivência e os mecanismos de preservação (Negrelle; Muraro, 2006; Bastos et al., 2017).

A família Bromeliaceae apresenta uma ampla diversidade de sistemas reprodutivos (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017). A maioria das espécies demonstra tanto alogamia quanto autocompatibilidade (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017). Além disso, há registros de agamospermia, autogamia e autoincompatibilidade em determinadas espécies (Paggi et al., 2013; Souza et al., 2017).

Outros fatores importantes para os estudos reprodutivos incluem a avaliação da viabilidade polínica, que pode ser conduzida por meio de métodos variados, como germinação *in vitro* ou testes histoquímicos (Santos et al., 2021; Novara et al., 2017). Essas técnicas permitem determinar o melhor momento para realizar a polinização controlada, utilizando grãos de pólen com maior viabilidade (Wang et al., 2015).

Para que a germinação *in vitro* seja bem-sucedida, vários fatores são fundamentais, como o estado nutricional da planta, o momento e a técnica de coleta

dos grãos de pólen, as condições de temperatura, fotoperíodo, período de incubação e a composição do meio de cultura (Soares et al., 2008; Souza et al., 2015; 2017). O meio de cultura básico para germinação geralmente inclui uma combinação de sacarose, ácido bórico, nitrato de cálcio e outras substâncias, podendo ser ajustado de acordo com a espécie (Brewbaker; Kwack, 1963). Outra técnica utilizada na avaliação da viabilidade polínica é a realização de testes histoquímicos, que são vantajosos por sua simplicidade, baixo custo e tempo reduzido de execução (Einhardt et al., 2006). Esses testes, ao entrarem em contato com os grãos de pólen, provocam mudanças na coloração e reações enzimáticas que indicam a viabilidade dos grãos (Souza et al., 2015). No entanto, os testes histoquímicos podem superestimar a viabilidade devido à interação e pigmentação de substâncias como enzimas e amidos, que também podem estar presentes em grãos de pólen inviáveis, reduzindo a confiabilidade dos resultados (Soares et al., 2008; Souza et al., 2017).

Diante disso, o objetivo deste trabalho é estudar aspectos da biologia floral e reprodutiva de *Aechmea alba*, *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata*, ocorrentes no transecto da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL) e endêmicas da região Sul da Bahia. Essas espécies estão catalogadas no Livro Vermelho da Flora do Brasil (Martinelli; Moraes, 2013) e na lista da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2023) como ameaçadas de extinção. Além disso, a *Vriesea recurvata* ainda não foi avaliada quanto ao risco de extinção. A destruição do habitat, resultante de queimadas, desenvolvimento urbano e construção de ferrovias, torna essas espécies vulneráveis, levando à perda de muitas delas e dificultando o conhecimento de novas espécies dentro desse gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O estudo foi realizado com as espécies *Aechmea alba* Mez (HURB 32802), *Aechmea echinata* (Leme) Leme (HURB 27809) e *Vriesea recurvata* Gaudich. (HURB 27815), provenientes de populações naturais do Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC) nos anos de 2022 e 2023 (Figura 1). Amostras dessas espécies foram coletadas e cultivadas no Banco de Germoplasma de Bromélias do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura e da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado

no município de Cruz das Almas, Bahia. As coletas foram realizadas com autorização do SISBIO, número 81949-1, e as atividades realizadas estão devidamente cadastradas no SISGEN.



Figura 1. Espécies de Bromeliaceae ocorrentes no Parque Estadual da Serra do Conduru, Uruçuca, Bahia. A-C) *Aechmea alba* Mez; D-F) *Aechmea echinata* (Leme) Leme; G-I) *Vriesea recurvata* Gaudich. A, D, G) Vista da planta em ambiente natural; B, E, H) Detalhe da inflorescência. C, F, I) Detalhe da flor.

Local da População estudada

O Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC) está localizado nos municípios de Uruçuca, Ilhéus e Itacaré (Figura 2) e abrange aproximadamente 9.275 hectares. É caracterizado por um conjunto diversificado de ecossistemas florestais, incluindo áreas de floresta primária, conforme descrito no Plano de Manejo de 2005. Sua área de abrangência cobre cerca de 45% do território do município de Uruçuca, aproximadamente 40% do município de Itacaré e cerca de 15% do município de Ilhéus (Bahia, 2005).

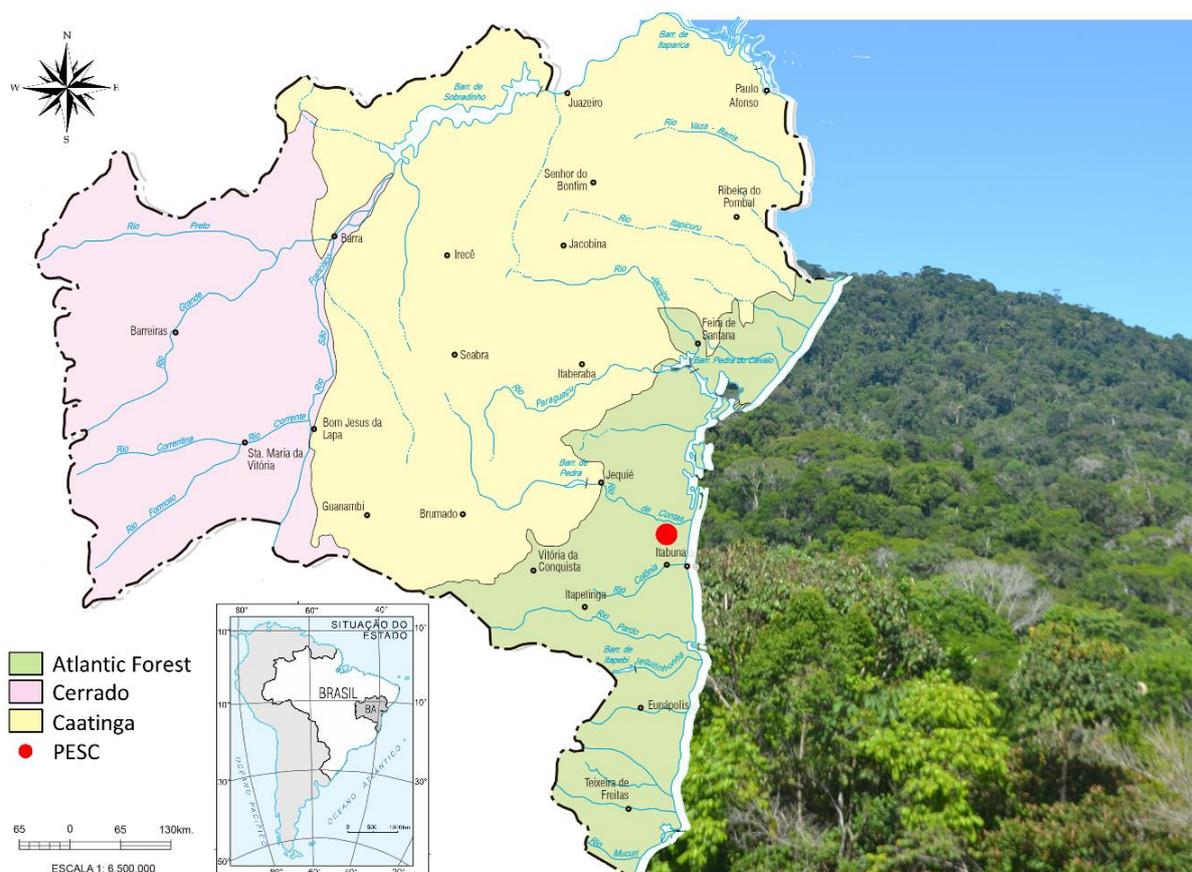


Figura 2. Mapa e fragmento florestal do Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC) onde foram realizados os estudos de biologia floral e reprodutiva das três espécies de Bromeliaceae. Imagem: SEI (2019).

Viabilidade polínica

Para a realização do teste histoquímico, três flores foram coletadas nos períodos de pré-antese, antese e pós-antese. Os grãos de pólen foram distribuídos sobre lâminas de vidro e tratados com duas a três gotas de solução de Alexander 2% (Alexander, 1980). A coloração foi visualizada por meio do método de varredura

da lâmina em um microscópio de luz Olympus BX51, acoplado a uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tokyo, Japão). Este teste interage com as estruturas celulares por meio da fucsina ácida, Orage G e verde malaquita, reagindo com o protoplasma e a celulose e promovendo diferenças na coloração dos grãos de pólen.

Para os estudos de germinação *in vitro*, foram utilizados dois meios de cultura: BM (Parton et al., 2002) e SM (Soares et al., 2008). Esses meios permitem determinar a fertilidade dos grãos de pólen e observar o desenvolvimento do tubo polínico. Anteras de três flores de diferentes plantas foram coletadas nos mesmos períodos do teste histoquímico. Os grãos de pólen de cada flor foram distribuídos uniformemente em placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura BM e SM.

O meio BM consiste em uma solução contendo 0,01% de ácido bórico (H_3BO_3), suplementada com 20% de sacarose e 0,8% de ágar. O meio SM é composto por 0,03% de nitrato de cálcio, 0,01% de ácido bórico, e 0,01% de nitrato de potássio, acrescidos de 20% de sacarose e 0,8% de ágar. Após a inoculação dos grãos de pólen, as placas foram mantidas em câmara escura à temperatura de 27 ± 1 °C por 24 horas. A porcentagem de germinação foi contabilizada e estimada.

Para mensurar o comprimento do tubo polínico, foi utilizado o programa ImageJ 1.46r (Rasband, 1997-2012). Foram medidos aleatoriamente em cada quadrante cinco tubos polínicos, totalizando 60 tubos em cada tratamento nas diferentes fases de desenvolvimento floral. De acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (2008), os grãos de pólen foram considerados germinados quando apresentaram tubos polínicos com comprimento maior ou igual ao diâmetro do grão de pólen.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 3 \times 3$ (meio de cultura x estágio de desenvolvimento floral x espécie), com 12 repetições. Para a porcentagem de germinação, as repetições foram representadas por três placas de Petri subdivididas em quatro quadrantes, totalizando 12 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,01$) para os estádios de abertura da flor e pelo teste F ($p < 0,01$) para os meios de cultura e espécies.

Receptividade do estigma

Para o estudo da receptividade estigmática, estigmas foram coletados nos períodos de pré-antese, antese e pós-antese ($n=3$). Os estigmas foram imersos por

três minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. A receptividade do estigma foi detectada pela reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima peroxidase, evidenciada pela formação de bolhas de ar no estigma (Zeisler, 1938).

Além disso, foi utilizada uma solução composta por alfa-naftil-acetato, fast blue B salt e acetona. Os estigmas foram imersos nesta solução por cinco minutos para avaliar a receptividade por meio da reação com a enzima esterase. A receptividade dos estigmas foi indicada por variações na coloração, que variavam do marrom escuro ao preto na superfície estigmática (Dafni, 1992).

Para ambas as metodologias, a receptividade estigmática foi classificada de acordo com as seguintes notas: (-) sem reação, (+) resposta positiva fraca, (++) resposta positiva forte e (+++) resposta positiva muito forte, conforme descrito por Dafni e Maués (1998) e Souza et al. (2016).

Quantificação de Néctar

Para quantificar a produção de néctar e outras variáveis, as inflorescências com flores em estágio de pré-antese foram protegidas com saco “voil” para evitar o contato com visitantes florais. As coletas foram realizadas nos seguintes períodos: pré-antese (18h), antese (6h) e a cada 3 horas até as 18h, além de pós-antese com a flor fechada (6h) do dia seguinte à antese.

O volume de néctar foi extraído utilizando uma microseringa (Hamilton 50 µL) introduzida na corola da flor em cada um dos sete intervalos de tempo. Foram avaliados o volume de néctar e o teor de sólidos solúveis usando um refratômetro digital (Atago PR-101), expresso em °Brix. Os açúcares totais foram obtidos conforme descrito por Bolten et al. (1979).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando cinco flores de diferentes plantas em populações naturais.

Quantificação dos óvulos

Para realizar a contagem dos óvulos foram necessários os seguintes procedimentos: 1) retirada do gineceu da flor; 2) corte longitudinal; 3) maceração do gineceu; 4) contagem do número de óvulos com auxílio de um microscópio de luz. Foram realizadas três repetições por flor contabilizando o número total de óvulos por lóculo.

Quantificação dos grãos de pólen

Para a quantificação dos grãos de pólen foram executados os seguintes passos: 1) Coleta dos botões florais no estágio de pré-antese; 2) Estabelecimento do número de anteras por flor; 3) Imersão das anteras em ácido láctico em um micro tubo de 2 mL; 4) Maceração das anteras e agitação do conteúdo com a finalidade dos grãos de pólen ficarem suspensos; 5) Transferência do material do microtubo para a câmara de Neubauer; 6) Contabilização dos grãos de pólen presentes nos quadrantes e 7) Cálculo para obtenção dos valores conforme metodologia descrita por Kearns e Inouye (1993).

Identificação dos Visitantes florais

Os visitantes florais foram observados entre janeiro e março durante cinco dias contínuos, no Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC), das 4h30 às 18h00, totalizando 144 horas de observação. Durante esse período, os visitantes da classe Insecta foram fotografados com uma câmera digital e coletados com um puçá entomológico, sendo posteriormente levados para uma câmera mortífera contendo acetato de etila. Os registros dos visitantes da ordem Passeriformes foram feitos por meio de fotografias, que foram analisadas posteriormente para identificação.

Foi contabilizado o número de visitas, o tempo de permanência dos visitantes na flor, o horário e a frequência dos indivíduos, além da acessibilidade aos recursos. Essas observações foram realizadas conforme os métodos descritos por Knight et al. (2005) e Paz et al. (2013).

Sistema Reprodutivo

A avaliação do sistema reprodutivo foi realizada em cinco tratamentos: polinização livre (controle), autopolinização manual, autopolinização natural, polinização cruzada (xenogamia) e agamospermia. As polinizações foram realizadas nas primeiras horas do dia, durante o período de antese. As flores foram etiquetadas com informações sobre cada tratamento. Cinco flores de cada tratamento foram coletadas e fixadas para observar o crescimento do tubo polínico no pistilo. As flores restantes foram deixadas no campo até a formação de frutos e sementes, que foram então contabilizadas. O número de repetições variou conforme a espécie e o tratamento.

Os tratamentos foram executados da seguinte forma:

Polinização livre (controle): Não houve manipulação das flores. No dia seguinte, as flores foram identificadas com barbantes e placas de identificação.

Autopolinização natural: As inflorescências foram cobertas com sacos de "voil" desde a pré-antese até um dia após a possível autopolinização. Após esse período, as flores foram marcadas e identificadas.

Autopolinização manual: Flores em pré-antese foram protegidas e, no dia seguinte, durante a antese, foram polinizadas manualmente com grãos de pólen da mesma flor.

Polinização cruzada (xenogamia): Flores foram cobertas com sacos de "voil" durante o estágio de pré-antese. Durante a antese, foram polinizadas com grãos de pólen provenientes de outros indivíduos.

Agamospermia: As flores foram emasculadas na pré-antese e não receberam grãos de pólen na superfície do estigma.

A estratégia reprodutiva foi avaliada usando dois índices: o Índice de Autogamia (IA), que é a proporção entre a autopolinização natural e a polinização cruzada, e o Índice de Autoincompatibilidade (IAI), obtido pela relação entre a autopolinização artificial e a polinização cruzada. Segundo Ramirez e Brito (1990), um valor de IAI inferior a 0,30 indica autoincompatibilidade (AI), enquanto valores acima de 0,30 indicam autocompatibilidade ou parcial autocompatibilidade (AC).

A eficiência reprodutiva (EF) foi mensurada com base na porcentagem de frutos formados com sementes de polinização livre em relação à porcentagem de frutos resultantes de sementes pela polinização cruzada, conforme descrito por Zapata e Arroyo (1978). Um índice próximo a 1 indica uma alta eficiência reprodutiva, enquanto valores próximos de 0 indicam uma menor eficiência reprodutiva.

Observação do Tubo Polínico no Estigma

Vinte e quatro horas após os diferentes tipos de polinização, os pistilos foram coletados e fixados em solução de Carnoy (etanol: ácido acético glacial 3:1 (v/v), com 95% de etanol em água) por 48 horas. Para o amolecimento dos tecidos, foi utilizada solução de sulfito de sódio a 10% (Na_2SO_3), autoclavada por 20 minutos a 120 °C.

A coloração foi realizada com corante azul de anilina a 0,01% em tampão

fosfato de potássio tribásico a 0,1M, conforme a metodologia descrita por Martin (1959) e Souza et al. (2017). Posteriormente, utilizou-se a microscopia de epifluorescência com filtro ultravioleta para observar a germinação dos grãos de pólen no estigma e acompanhar o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do pistilo. As lâminas foram analisadas com um fotomicroscópio Olympus BX51, equipado com uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tóquio, Japão).

Para a germinação dos grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos no pistilo, foram consideradas as seguintes variáveis: 1) quantidade de grãos de pólen aderidos à superfície do estigma (GPSE), 2) quantidade de grãos de pólen germinados na superfície do estigma (GPGE), 3) medidas do crescimento do tubo polínico (CTPP) e 4) contagem de óvulos com tubo polínico penetrando na micrópila (OTPM).

Os grãos de pólen aderidos à superfície dos estigmas (GPSE) e os grãos de pólen germinados na superfície do estigma foram categorizados em uma escala composta por: 0) ausência de grãos de pólen; 1) presença de 1 a 25 grãos de pólen; 2) presença de 25 a 50 grãos de pólen; 3) presença de mais de 50 grãos de pólen.

Para a avaliação do crescimento do tubo polínico, a técnica de microscopia de fluorescência permitiu uma avaliação precisa dos estágios de desenvolvimento do tubo polínico, conforme a metodologia descrita por Mota et al. (2023): 1) tubo polínico no estigma sem penetrar o estilete; 2) tubo polínico no primeiro terço; 3) tubo polínico no segundo terço; 4) tubo polínico no terceiro terço do estilete, paralisado; 5) tubo polínico no interior do ovário; 6) tubo polínico próximo ao óvulo; e 7) tubo polínico no óvulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três espécies de Bromeliaceae ocorrem em simpatria no PESC. *Aechmea alba*, que pertence à subfamília Bromelioideae, é terrestre e floresce no mesmo período que *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata*, de novembro a março, com pico de floração nos meses de janeiro e fevereiro.

Aechmea alba forma grandes populações com cerca de 300 indivíduos, principalmente em ambientes mais úmidos com a presença de rochas. Possui inflorescência simples, ereta, racemosa, que excede a roseta foliar, espiciforme, flocosa e ausente de plataforma de pouso, com brácteas vermelhas e flores inodoras. A inflorescência tem aproximadamente 9 cm de comprimento, com 80

flores que abrem, em média, 2 a 3 por dia, da base da inflorescência para o ápice. As flores têm 2,2 cm de comprimento, com androceu e gineceu inclusos na corola. As pétalas e sépalas são totalmente brancas, contornadas por tricomas também brancos. A antese ocorre às 6h, e a senescência floral no final da tarde, às 16h.

Aechmea echinata, também pertencente à subfamília Bromelioideae, é predominantemente terrestre, ocorrendo esporadicamente como epífita no estrato inferior a 1 m de altura. Está distribuída de forma isolada e raramente forma populações. A inflorescência possui brácteas vermelhas e flores inodoras, com pétalas lilás a azuladas, densamente corimbosa, capitada-estrelada, inclusa na roseta foliar e com plataforma de pouso formada pelos filamentos das brácteas e sépalas florais, semelhante a um ouriço do mar. A inflorescência é tripinada, com cerca de 150 a 200 flores que abrem, em média, de 3 a 6 por dia. As flores têm, em média, 3 cm de comprimento, com androceu e gineceu inclusos na corola.

Vriesea recurvata, da subfamília Tillandsioideae, é epífita e ocorre no estrato inferior da Mata Atlântica, a uma altura máxima de 1,8 m. Está distribuída aleatoriamente em forófitos de diâmetro inferior a 10 cm e pode ser confundida principalmente com *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer, que ocorre no mesmo ambiente. A principal diferença entre as duas espécies é que as brácteas de *Vriesea recurvata* são recurvadas para baixo, enquanto as de *Vriesea ensiformis* são mais curtas e eretas. *Vriesea recurvata* possui inflorescência simples, ereta, dística, que excede a roseta foliar e é ausente de plataforma de pouso. A inflorescência tem aproximadamente 28 cm de comprimento (sem o escapo floral) e contém de 8 a 12 flores que abrem, em média, de 1 a 2 por dia, da base da inflorescência para o ápice. As flores têm, em média, 6 cm de comprimento, com androceu e gineceu exsertos, com os lóbulos estigmáticos ainda acima das anteras. As pétalas e sépalas são amarelas, contrastando com as brácteas florais avermelhadas. A antese floral ocorre às 5h15 da manhã e permanece aberta durante a noite até às 20h.

Viabilidade dos grãos de pólen

No estudo da viabilidade polínica utilizando a solução de Alexander, foi possível observar a interação entre as três espécies (*Aechmea alba*, *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata*) e os três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese) (Figuras 3 e 4A-D), com base em 54 flores. A maior viabilidade polínica foi observada durante a antese para as três espécies de

Bromeliaceae, com valores acima de 90%. Na pré-antese, as taxas variaram de 80% a 90%, e na pós-antese, a viabilidade foi inferior a 30% para todas as espécies. De acordo com Hister e Tedesco (2016), altos índices de viabilidade polínica são definidos como valores superiores a 70%, índices entre 31% e 69% são considerados médios, e valores inferiores a 30% indicam baixa viabilidade.

Durante a antese, não houve diferença estatística entre as três espécies. A partir desses resultados, pode-se inferir que os cruzamentos controlados devem ser realizados preferencialmente durante a antese ou a pré-antese. Conforme mencionado por Souza et al. (2017), a solução de Alexander é um método confiável para mensuração da viabilidade polínica e permite a diferenciação entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. Assim, com base nos estudos realizados por Silva et al. (2016) e Neves et al. (2020), foram observados grãos de pólen corados em tonalidades de roxo (indicativos de viabilidade) e verde claro (indicativos de inviabilidade).

O corante Alexander é composto por uma solução tríplice contendo fucsina ácida, que cora o citoplasma dos grãos de pólen. Simultaneamente, o verde malaquita é usado para pigmentar a parede dos grãos de pólen, enquanto o Orange G intensifica as colorações, conforme descrito por Alexander (1969). Dessa forma, as interações dessas substâncias com os grãos de pólen facilitam a variação na coloração e no processo enzimático, evidenciando a viabilidade ou inviabilidade dos grãos (Kearns; Inouye, 1993).

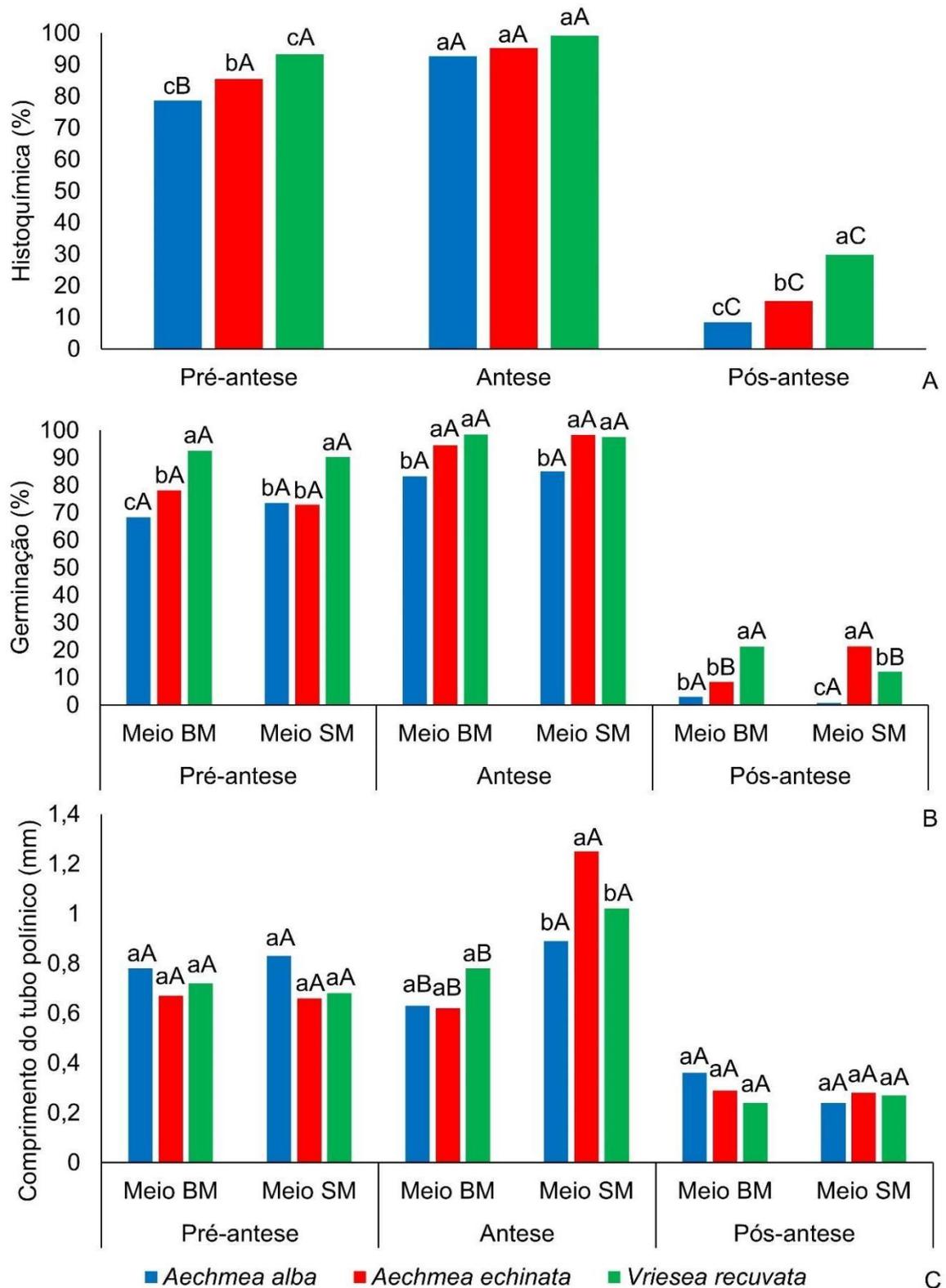


Figura 3. Viabilidade dos grãos de pólen de três espécies de Bromeliaceae em três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese). A) Teste histoquímico com solução de Alexander com 2% de ácido láctico. B-C) Germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico em dois meios de cultura (BM e SM). A) Letras minúsculas (espécies) e maiúsculas (estádio de desenvolvimento floral) dentro do mesmo fator, não diferem pelo teste Tukey ($p < 0.05$). B-C) Letras minúsculas

(espécies) e maiúsculas (meio de cultura) dentro do mesmo fator, não diferem pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

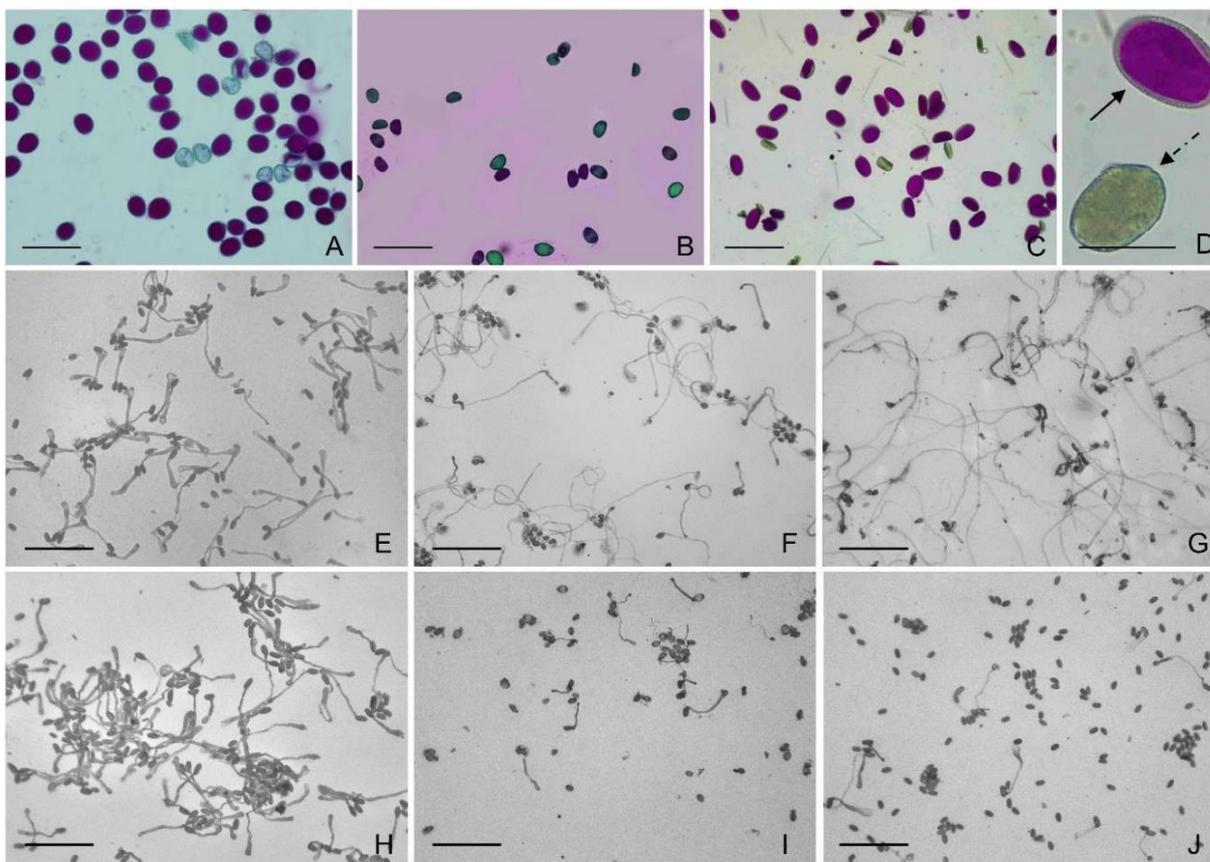


Figura 4. Viabilidade dos grãos de pólen de três espécies de Bromeliaceae em três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese). A-D) Teste histoquímico com solução de Alexander com 2% de ácido láctico. E-J) Germinação in vitro dos grãos de pólen em meio de cultura. A) *Aechmea alba* na pré-antese. B) *Aechmea echinata* na pós-antese. C) *Vriesea recurvata* na antese. D) Detalhe dos grãos de pólen viáveis (seta cheia) e inviáveis (seta pontilhada) em *Vriesea recurvata*. E) *Vriesea recurvata* em meio de cultura SM na pré-antese. F) *Aechmea alba* em meio de cultura BM na pré-antese. G) *Aechmea echinata* em meio de cultura SM na antese. H) *Vriesea recurvata* em meio de cultura BM na antese. I) *Aechmea echinata* em meio de cultura SM na pós-antese. J) *Vriesea recurvata* em meio de cultura SM na pós-antese. Barras: A-C) 200 µm; D) 50 µm; E-J) 0,5 mm.

Assim, Einhardt et al. (2006) observam que, embora a coloração seja um método acessível e economicamente vantajoso, sua aplicação não oferece uma avaliação aprofundada da viabilidade polínica, aspecto que é melhor evidenciado durante o protocolo de germinação in vitro. Por meio da técnica in vitro, é possível observar a viabilidade polínica e o desenvolvimento do tubo polínico, conforme Jayaprakash e Sarla (2001) e Souza et al. (2017).

Foram observadas interações significativas entre os meios de cultura, o estágio de desenvolvimento floral e a espécie, tanto para a porcentagem de

germinação in vitro quanto para o comprimento do tubo polínico, com base em 108 flores. No entanto, é um processo complexo que envolve variáveis como o estado nutricional da planta, temperatura, fotoperíodo, horários e métodos aplicados na coleta, além do período de incubação e a composição específica do meio de cultura utilizado, que foram cuidadosamente considerados e manipulados de acordo com as espécies estudadas (Dafni, 1992; Souza et al., 2017).

O meio de cultura BM é constituído por ácido bórico, sacarose e ágar, com ajuste de pH para 6,5 (Parton et al., 2002). Em contraste, o meio SM possui uma composição mais completa, incluindo ácido bórico, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de potássio, sacarose e ágar, com pH mantido em 6,5 (Soares et al., 2008).

Quanto à germinação in vitro, embora o crescimento integral do tubo polínico observado na fertilização in vivo não ocorra, os resultados obtidos se aproximam da dinâmica in vivo. A execução cuidadosa desta técnica foi crucial para cada espécie, dada a relevância dos resultados obtidos (Souza et al., 2015).

Neste estudo, a fase de pré-antese mostrou-se favorável para germinação quando cultivada em meio BM, com maiores médias para as espécies *Aechmea echinata* (80%) e *Vriesea recurvata* (90%), demonstrando eficácia na promoção da germinação antecedente ao estágio de antese. Souza et al. (2017) relataram ineficiência na germinação para espécies dos gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Alcantarea* e *Vriesea* quando utilizaram o meio BM.

Em contraste, no meio SM durante a pré-antese, as espécies do gênero *Aechmea* obtiveram a mesma média de germinação de 75%, enquanto *Vriesea recurvata* alcançou uma porcentagem de germinação de 90%. A espécie *V. recurvata* mostrou-se mais propensa a germinar em ambos os tratamentos. Parton et al. (2002) obtiveram sucesso na germinação com o meio BM para as espécies *Aechmea*, *Vriesea*, *Guzmania* e *Tillandsia*, evidenciando que o fator espécie é determinante para a seleção do meio de cultura.

No meio BM, durante a antese, a porcentagem de germinação foi altamente significativa para todas as espécies, apresentando valores de 79% para *Aechmea alba*, 87% para *Aechmea echinata* e 90% para *Vriesea recurvata*. Em contraste, no meio SM, *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata* obtiveram médias iguais de 90% de germinação, superiores em relação a *Aechmea alba*. Posteriormente, no estágio de pós-antese, houve uma redução na porcentagem de germinação ou inviabilidade

total para todas as espécies em ambos os tratamentos, sem diferenças estatísticas significativas entre os meios de cultura dentro de cada nível de espécie e estágio de desenvolvimento floral.

Quanto ao desenvolvimento do tubo polínico, essa variável é fundamental no processo reprodutivo das plantas, uma vez que permite o crescimento dos grãos de pólen em direção aos óvulos e possibilita a fertilização. As variáveis mencionadas contribuem para obter resultados confiáveis *in vitro* tanto para os grãos de pólen quanto para o desenvolvimento do tubo polínico, conforme destacado por Soares et al. (2008). Na fase de pré-antese, para ambos os meios de cultura, *Aechmea alba* apresentou a maior média de 0,8 mm. Para as demais espécies, os valores expressos apresentaram médias semelhantes para ambos os tratamentos.

Durante a antese, no meio BM, *Vriesea recurvata* apresentou a maior média para o comprimento do tubo polínico, com 0,8 mm. Em contraste, o meio SM na antese mostrou um comprimento do tubo polínico significativo. O meio SM tem uma composição mais completa em comparação ao BM, incluindo elementos como nitrato de cálcio, sulfato de magnésio e nitrato de potássio, o que sugere um potencial elevado para estimular o processo de germinação dos grãos de pólen e o comprimento do tubo polínico.

No entanto, neste estudo, *Aechmea echinata* apresentou uma média de 1,2 mm superior em relação a *Aechmea alba* e *Vriesea recurvata* utilizando o meio SM. Assim, o ácido bórico presente no meio de cultura promove o crescimento do tubo polínico, o nitrato de cálcio confere rigidez e crescimento ao tubo polínico, e os hormônios reguladores são componentes principais do meio de cultura (Franzon; Raseira, 2006; Pio et al., 2007; Soares et al., 2008).

No estágio de pós-antese, houve uma redução nos valores do comprimento do tubo polínico no meio BM, sendo mais significativo para *Aechmea alba* (0,3 mm) em relação às demais espécies. Em contraste, os valores no meio SM durante a pós-antese foram baixos, exibindo médias semelhantes para todas as espécies.

Receptividade do estigma

Mediante o uso da solução de peróxido de hidrogênio, foi possível observar a emissão de bolhas de ar nas papilas estigmáticas, permitindo a avaliação da atividade peroxidase nos três estágios de desenvolvimento floral. A aplicação da solução composta por α -naftil-acetato e Fast Blue B salt possibilitou a identificação

de uma coloração marrom escura na superfície do estigma, indicando atividade enzimática esterásica, conforme descrito por Dafni e Maués (1998) e Souza et al. (2016). Foram tomados cuidados no manejo dos estigmas para evitar interferências nos resultados obtidos.

No estágio de pré-antese para *Aechmea alba*, a aplicação das duas soluções mostrou maior resposta com a solução de α -naftil-acetato + Fast Blue B salt, evidenciando uma resposta positiva forte (++) . É importante mencionar que, mesmo em estágio de pré-antese, essas espécies já possuíam grãos de pólen aderidos à superfície do estigma. Nos estigmas no estágio de antese para *Aechmea alba*, foram observadas respostas muito fortes (+++) para ambas as metodologias, indicando atividade enzimática (Figura 5).

No estágio de pós-antese, as metodologias aplicadas mostraram respostas muito fortes (+++) utilizando a solução de peróxido de hidrogênio. De acordo com Souza et al. (2016), a receptividade floral está correlacionada ao intervalo de tempo durante o qual a flor permanece aberta, bem como ao período floral. Essa condição é estabelecida pelo processo de maturação do gameta feminino, que exerce uma influência significativa sobre a taxa de fecundação, como destacado por Silva et al. (2010).

Para *Aechmea echinata*, no estágio de pré-antese, as respostas foram diferentes. A solução de α -naftil-acetato + Fast Blue B salt mostrou uma resposta positiva forte (++) em relação à solução de peróxido de hidrogênio. No estágio de antese para essa espécie, as respostas foram semelhantes para ambas as metodologias, indicando uma resposta muito forte (+++) (Figura 5). Souza et al. (2016) observaram que a maior receptividade foi geralmente na fase floral de antese para a maioria das espécies. Assim, independentemente da metodologia empregada durante o estágio de antese, as espécies em questão manifestaram um padrão de crescimento com uma resposta positiva intensa (+++) (Tabela 1).

Tabela 1. Receptividade do estigma de três espécies de Bromeliaceae nos diferentes estádios de desenvolvimento floral e metodologias testadas.

Espécies	Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)			α -naftil-acetato + Fast blue B salt		
	Pré-antese	Antes e	Pós-antese	Pré-antese	Antes e	Pós-antese
<i>Achmea alba</i>	+	+++	+++	++	+++	++
<i>Achmea echinata</i>	+	+++	++	++	+++	++
<i>Vriesea recurvata</i>	-	+++	++	+	+++	++

Método adaptado de Dafni e Maués (1998): (-) sem reação; (+) reação positiva fraca; (++) reação positiva forte; (+++) reação positiva muito forte.

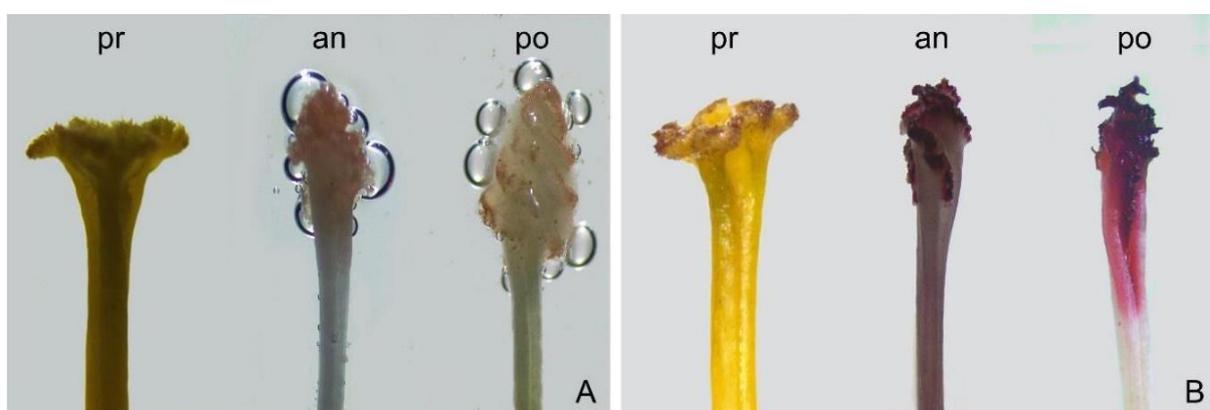


Figura 5. Receptividade do estigma de três espécies de Bromeliaceae nos diferentes estádios de desenvolvimento floral e metodologias testadas. A) Peróxido de Hidrogênio; B) α -naftil acetato + fast blue B salt; pr = pré-atese; an = antese; po = pós-atese.

No entanto, *Vriesea recurvata* no estágio de pré-atese apresentou respostas diferentes para ambas as metodologias, com ausência de resposta (-) na solução de peróxido de hidrogênio e resposta positiva fraca (+) utilizando α -naftil-acetato + Fast Blue B salt. Na antese, foi observada uma resposta positiva muito forte (+++) para ambas as metodologias, e esse mesmo resultado foi mantido na pós-atese com a solução de α -naftil-acetato + Fast Blue B salt. Essas variações na receptividade estigmática podem influenciar a biologia reprodutiva das espécies em questão, especialmente na eficácia da polinização, fertilização, compatibilidade e fatores ambientais.

Esses resultados corroboram as descobertas previamente relatadas por Souza et al. (2016), que, ao investigarem a receptividade do estigma de *Alcantarea nahoumii* em condições controladas de ambiente, especificamente em uma estufa, observaram que a receptividade ocorreu durante o período de antese e persistiu por um intervalo de 24 horas após a antese. Em outros estudos, foi proposto que

cruzamentos controlados fossem realizados na antese para aumentar a probabilidade de fecundação e, conseqüentemente, a produção de sementes (Bastos et al., 2017).

Assim, para *Vriesea recurvata* e *Aechmea echinata*, na pós-antese, a solução de peróxido de hidrogênio revelou uma redução na expressão enzimática com resposta positiva forte (++) . Souza et al. (2016) destacaram que em algumas espécies dos gêneros *Aechmea* e *Vriesea* há uma redução na receptividade na pós-antese. Portanto, o conhecimento sobre a receptividade do estigma permite a realização de polinizações controladas, sejam por autopolinização ou xenogamia, determinando o melhor período para realizar a polinização e garantir sucesso na reprodução e conservação.

Geralmente, a receptividade do estigma está correlacionada com a abertura floral e exerce uma influência direta sobre o sistema reprodutivo. Isso ocorre porque é durante esse momento que os grãos de pólen precisam ser depositados na superfície do estigma para assegurar a fecundação (Souza et al., 2016).

As metodologias empregadas desempenham um papel crucial na obtenção de uma compreensão abrangente dessas variações e oferecem informações sobre a biologia floral das espécies pertencentes à família Bromeliaceae, provenientes da região da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL). Tais abordagens revelam-se pertinentes para a elaboração de estratégias eficazes voltadas à conservação e gestão dessas plantas em seu ambiente natural.

Néctar

O volume do néctar, os sólidos solúveis totais e a concentração de açúcar variaram conforme a espécie e os diferentes estádios do desenvolvimento floral (Figura 6). O pico de produção do néctar ocorreu às 6h da manhã nas três espécies estudadas: 18,8 µL para *Aechmea alba*, 23,7 µL para *Aechmea echinata* e 59 µL para *Vriesea recurvata* (Figura 6A). Ao longo do dia, o volume do néctar diminuiu nas três espécies, chegando a 2 µL às 18h para as duas espécies de *Aechmea* e a 18 µL para *V. recurvata*. Na pré-antese e na pós-antese, os volumes foram insignificantes, principalmente para as espécies de *Aechmea* (Figura 6A).

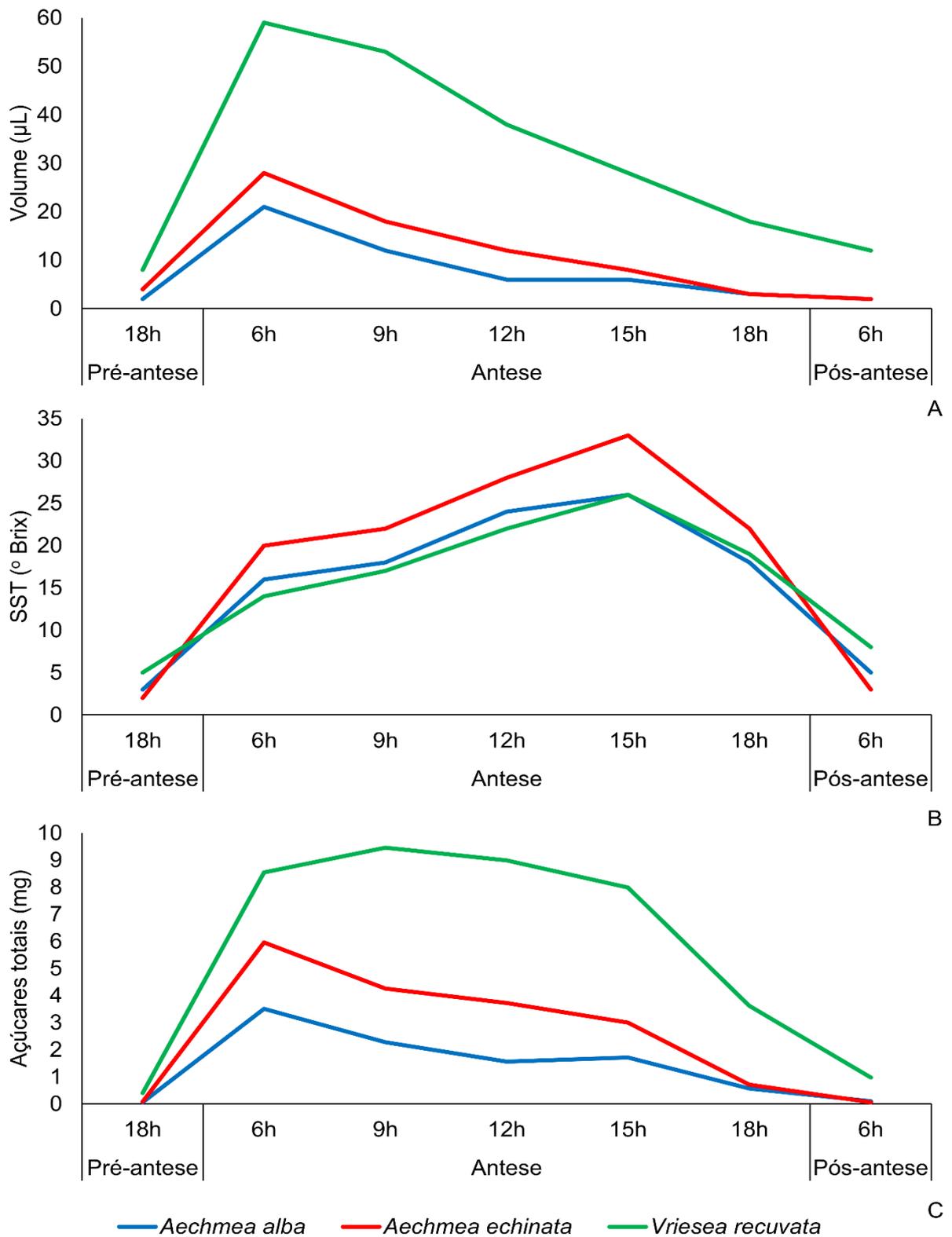


Figura 6. Volume (µL), sólidos solúveis totais (° Brix) e açúcares totais (mg) do néctar coletado em flores durante a pré-antese, antese e pós-antese de diferentes espécies de Bromeliaceae.

Em relação aos sólidos solúveis totais (°Brix), os resultados foram inversamente proporcionais ao volume de néctar (Figura 6B). Os maiores valores foram observados às 15h, com 24 °Brix para *Aechmea alba* e *Vriesea recurvata*, e 33,5 °Brix para *Aechmea echinata*. Quanto maior o volume de néctar, menor a concentração de sólidos solúveis totais. Assim como o volume do néctar, na pré-antese e na pós-antese, os valores foram insignificantes, principalmente para as espécies de *Aechmea* (Figura 6B). Já para a concentração de açúcares, a tendência seguiu o volume do néctar, com um pico às 6h da manhã e um decréscimo ao longo do dia (Figura 6C).

A produção e composição do néctar desempenham um papel significativo na atração e nas preferências dos polinizadores, exercendo influência direta na frequência das visitas e escolhas desses agentes polinizadores. Essa influência pode impactar os cruzamentos naturais entre plantas e espécies, tendo implicações relevantes na dinâmica ecológica e na conservação dessas espécies. Em Bromeliaceae, o néctar é o principal recurso floral para atração de beija-flores e é produzido nos nectários septais, armazenado na base da corola das flores entre o ovário e os apêndices petalares (Sajo et al., 2004).

Aguilar-Rodríguez et al. (2016) e Barboza et al. (2022) observaram uma relação entre o horário da coleta do néctar e o volume produzido, bem como entre o horário da coleta e a concentração de açúcar. Essas variações são influenciadas por fatores como a idade da planta e, principalmente, as condições ambientais, como umidade, altitude, temperatura e precipitação pluviométrica.

Machado e Semir (2006) relataram que a variação no volume de néctar e na concentração de açúcar ocorre em diversas espécies de Bromeliaceae. Em estudos realizados por Scrok e Varassin (2011), que investigaram *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker, atualmente *Aechmea comata* (Gaudich) Baker, e *Aechmea distichantha* Lem., constatou-se que o volume de néctar e a concentração de açúcar mantiveram-se invariáveis ao longo do dia. Já Bastos et al. (2017), durante um intervalo de 10 horas (das 8h às 18h), utilizando uma amostra composta por 20 flores de 20 indivíduos, constataram um volume médio de néctar de 44,71 μL e uma concentração média de açúcares de 29,7%. No entanto, a produção não se manteve constante ao longo do período. O ápice da produção de néctar foi de 73,55 μL às 11h, reduzindo para 11,11 μL às 18h.

Machado e Semir (2006) estudaram 14 espécies de cinco gêneros de Bromeliaceae e observaram uma variação na produção de néctar e nos sólidos solúveis totais conforme as espécies. Entre as espécies de *Aechmea*, essa variação foi de 25,1 a 64,2 μL , e entre as espécies de *Vriesea*, foi de 26,8 a 490,5 μL . Além disso, os sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$) variaram de 20,5 a 30,7% ao longo do mesmo período de observação. Essa variação também ocorreu ao longo do dia, com tendência de queda para a maioria das espécies.

Nicolson et al. (2007), Krömer et al. (2008) e Barbosa et al. (2022) relataram que a composição dos açúcares presentes no néctar está correlacionada com a síndrome de polinização e é influenciada pelas preferências dos polinizadores. Bastos et al. (2017) relataram que flores com um volume de néctar e concentração de açúcar mais elevados tendem a atrair mais polinizadores passeriformes.

Em termos de concentração de açúcares totais, *Vriesea recurvata* exibiu valores mais elevados em comparação com as espécies do gênero *Aechmea*. Barbosa et al. (2022) relataram que, quanto maior o comprimento da corola, há uma probabilidade maior de redução na perda de água e uma tendência para o néctar ser menos concentrado. Em corolas menores, a probabilidade de evaporação da água do néctar é maior, resultando em uma concentração mais elevada de açúcares totais.

Em estudos realizados por Corbet (2003) sobre a concentração de açúcares no néctar durante a abertura floral, o autor relatou que a concentração varia ao longo do dia e essa variação está associada aos níveis de umidade relativa do ar. Durante a noite, quando a umidade é baixa, há uma tendência para o néctar apresentar menor concentração, e pela manhã, quando a umidade é elevada, a concentração de açúcar do néctar tende a aumentar.

Krömer et al. (2008) conduziram uma investigação sobre a composição de açúcares e a concentração de néctar em 111 espécies pertencentes às três subfamílias de Bromeliaceae. Os pesquisadores concluíram que as características do néctar em Bromeliaceae são predominantemente influenciadas por adaptações presumíveis dos açúcares do néctar às preferências dos polinizadores, em vez de serem determinadas pela filogenia. Assim, a época de floração e a frequência das visitas dos polinizadores podem influenciar a variação na produção de néctar entre diferentes espécies e famílias de plantas, levando cada planta a ajustar sua produção de néctar de acordo com as demandas específicas de seus polinizadores.

Quantificação de Óvulo e Grãos de Pólen

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, observa-se o número de óvulos e grãos de pólen por flor nas três espécies estudadas. Para *Aechmea alba*, a contagem média de óvulos foi de 43 ± 11 , enquanto a quantidade de grãos de pólen foi de 72.500 ± 6.250 . Em relação a *Aechmea echinata*, a média de óvulos foi de 120 ± 18 e a de grãos de pólen foi de 80.833 ± 5.204 . Por outro lado, *Vriesea recurvata* apresentou uma média superior às demais espécies, com 701 ± 38 óvulos e 59.166 ± 721 grãos de pólen (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação dos óvulos e grãos de pólen de três espécies de Bromeliaceae

Espécie	Número de óvulos (O)	Número de grãos de pólen (P)	Relação P/O
<i>Achmea alba</i>	43 ± 11	72.500 ± 6.250	1.686
<i>Achmea echinata</i>	120 ± 18	80.833 ± 5.204	673
<i>Vriesea recurvata</i>	701 ± 38	59.166 ± 721	84
CV(%)	3,12	6,28	

A produção de grãos de pólen por flor pode variar tanto entre espécies pertencentes ao mesmo gênero quanto entre genótipos da mesma espécie. De acordo com Nogueira et al. (2015), as espécies que mantêm uma elevada quantidade de grãos de pólen têm uma probabilidade maior de sucesso na fertilização. Diversos fatores estão intrinsecamente ligados à produção de grãos de pólen, como a adaptação da planta ao ambiente, mudanças nas condições climáticas e altitude (Albuquerque Junior et al., 2010). Assim, quanto maior o número de grãos de pólen produzidos por flor e por anteras, maior a probabilidade de transporte por polinizadores (Clark; Finn, 2011).

Aechmea alba e *Aechmea echinata* apresentaram uma relação pólen/óvulo (P/O) variando de 1.686 a 673, respectivamente, enquanto *Vriesea recurvata* apresentou uma relação mais baixa de 84. Esses resultados sugerem que as duas espécies de *Aechmea* realizam xenogamia facultativa e que *V. recurvata* realiza autogamia facultativa (Cruden, 1977). As implicações dessas observações para estudos de conservação e melhoramento de plantas são significativas, podendo afetar as estratégias adotadas para garantir a diversidade genética. Cruden (1977) ressalta que a relação P/O é uma inferência e deve ser interpretada com cautela. Análises adicionais com polinizações controladas são necessárias para entender

com exatidão o sistema reprodutivo das espécies. Plitmann e Levin (1990) demonstraram que uma baixa razão P/O pode estar associada à autofecundação.

A razão P/O indica a quantidade de pólen disponível em relação ao número de óvulos nas flores de uma planta. Essa relação geralmente reflete a eficiência da polinização (Cruden, 1977, 2000), mas pode ser fortemente influenciada por fatores como tamanho da flor, tamanho dos grãos de pólen, separação temporal da deiscência da antera, receptividade do estigma (dicogamia) e separação espacial entre as anteras e o estigma (hercogamia) (Cruden, 1977), entre outros fatores. Desde o trabalho de Cruden (1977), diversos estudos utilizaram a relação P/O para fazer suposições sobre sistemas de reprodução, tanto para plantas em geral quanto para diferentes famílias (Bastos, 2017).

Visitantes florais

Durante 144 horas de observação, no período de janeiro a março, foram registradas 86 visitas para *A. alba*, 82 para *A. echinata* e 52 para *V. recurvata*, todas realizadas durante os períodos matutino e vespertino. Foram identificadas sete espécies de visitantes florais: três beija-flores (*Phaethornis ruber*, *Phaethornis pretrei* e *Chlorestes notata*), uma borboleta (*Eurybia lycisca*), duas abelhas (*Trigona spinipes* e *Oxytrigona sp.*) e uma formiga (*Iridomyrmex purpureus*) (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3. Polinizadores (beija-flor), visitantes florais, frequência relativa e permanência do polinizador na flor em três espécies de Bromeliaceae no Parque Estadual da Serra do Conduru, Uruçuca, Bahia.

Espécie	<i>Aechmea alba</i>			<i>Aechmea echinata</i>			<i>Vriesea recurvata</i>		
	NVI	FRR	PPF	NVI	FRR	PPF	NVI	FRR	PPF
Trochilidae									
<i>Phaethornis ruber</i>	36	80,00	6,25	76	100,00	8,91	9	18,75	7,92
<i>Phaethornis pretrei</i>	9	20,00	4,58	0	0	0	36	75,00	6,88
<i>Chlorestes notata</i>	0	0	0	0	0	0	3	6,25	3,82
Total	45	100		76	100		48	100	
Lepidoptera									
<i>Eurybia lycisca</i>	0			2			0		
Apidae									
<i>Trigona spinipes</i>	12			2			3		
<i>Oxytrigona</i>	1			1			1		
Formicidae									
<i>Iridomyrme vriesea recurvata x purpureus</i>	28			1			0		

NVI = número de visitas; FRR = frequência relativa; PPF = permanência do polinizador na flor (segundos).

Para *Aechmea alba*, foram registradas 45 visitas de beija-flores, sendo 80% de *Phaethornis ruber* e 20% de *Phaethornis pretrei*. Em *Aechmea echinata*, das 76 visitas, 100% foram de *Phaethornis ruber*. Para *Vriesea recurvata*, das 48 visitas, 75% foram de *Phaethornis pretrei*, 18,75% de *Phaethornis ruber* e 6,25% de *Chlorestes notata*. Não houve registro de visitas de *Chlorestes notata* para as duas espécies de *Aechmea*. A duração das visitas dos beija-flores variou conforme a espécie e o polinizador, com *Phaethornis ruber* passando mais tempo nas flores, de 6,25 segundos em *A. alba* a 8,91 segundos em *A. echinata*. *Phaethornis pretrei* teve uma permanência um pouco mais curta, de 4,58 segundos em *A. alba* e 6,88 segundos em *V. recurvata*. *Chlorestes notata* foi registrado apenas em *V. recurvata*, com uma permanência de 3,82 segundos.

As visitas ocorreram entre 6h e 16h, independentemente da espécie, com o pico de visitação entre 7h e 9h, coincidindo com a maior disponibilidade de néctar. Os beija-flores foram os únicos a realizar polinização efetiva, tocando o bico ou a cabeça nas anteras e na superfície do estigma. Outros visitantes, como formigas e

abelhas, foram considerados pilhadores. Portanto, a frequência relativa e o tempo de permanência dos visitantes foram calculados apenas para os beija-flores.

Os resultados indicam uma diferenciação na frequência dos beija-flores entre as plantas estudadas. Araújo et al. (1994) observam uma frequência maior de polinização por vertebrados em relação a insetos, com uma predominância de polinização por aves, especialmente beija-flores (Kessler, 2002; Tagliati et al., 2018). A estratégia reprodutiva das plantas envolve a produção de flores que direcionam grande parte de sua energia para atrair polinizadores, utilizando diferentes características, como formatos e tamanhos (Howe; Wettley, 1997). As interações entre plantas e polinizadores são cruciais para o sistema de cruzamento e o sucesso reprodutivo (Gaudeul; Till-Bottraud, 2004; Paggi et al., 2007).

Os visitantes florais foram classificados como polinizadores ou pilhadores de acordo com seu comportamento. Inouye (1980) e Dafni (1992) afirmam que lepidópteros, devido ao formato e tamanho da corola, acessam o recurso sem tocar nas estruturas reprodutivas, não realizando a polinização. Formigas e abelhas são frequentemente descritas como pilhadores ou visitantes ocasionais, com baixa aptidão para polinização devido à ausência de estruturas que promovem a adesão dos grãos de pólen (Gonçalves et al., 2010; Galitzki et al., 2013).

Diversos critérios adicionais contribuem para a eficácia dos agentes polinizadores, incluindo a frequência das visitas, fidelidade à planta hospedeira e a otimização das rotas de voo entre flores da mesma espécie (Alves et al., 2016). Animais com dieta baseada em néctar e atividade diurna, como borboletas e abelhas, são beneficiados pela floração sequencial e pelos recursos florais das bromélias (Machado e Semir, 2006). A eficácia reprodutiva pode ser influenciada por interações não mutualísticas, como a apropriação de pólen ou néctar, e a herbivoria de frutos e sementes (Silva et al., 2022).

A frequência relativa de visitas sugere alta eficiência dos beija-flores na polinização das bromélias estudadas. A média de permanência dos polinizadores nas flores, embora variável entre espécies, indica interações breves, possivelmente favorecendo a visitação a múltiplas flores em um curto período. Beija-flores são essenciais para o sucesso reprodutivo das plantas, facilitando a fertilização cruzada e influenciando a diversidade vegetal ao transportar pólen (Bascompte, 2007).

Os resultados mostram que, para cada espécie de bromélia, a frequência relativa de visitas pelos beija-flores atingiu 100%, indicando alta especialização dos

beija-flores nessas plantas. A frequência de polinizadores está relacionada com a época de florescimento, o que pode aumentar a probabilidade e eficiência reprodutiva (Ramos et al., 2014; Morellato et al., 2016). A eficácia de um agente polinizador está ligada à sua capacidade de transferir pólen das anteras para o estigma de flores da mesma espécie (Givnish et al., 2014). Durante a busca pelo néctar, os polinizadores introduzem seus bicos nas flores, extraindo néctar e removendo pólen, um processo essencial de polinização que pode ocorrer por autopolinização, geitonogamia ou xenogamia (Alves et al., 2016).

Em *Aechmea alba* (Figura A), *Phaethornis ruber* teve as maiores taxas de visitação entre 06:00 e 08:30, contabilizando 10 visitas nesse período. *Phaethornis pretrei* visitou entre 6:31 e 9:31 e 11:01 e 11:30. Em *Aechmea echinata* (Figura B), *Phaethornis ruber* foi o único visitante, com maior frequência entre 7:01 e 7:30, totalizando 12 visitas e mantendo constância até 12:00, quando o número de visitas foi reduzido. Em *Vriesea recurvata* (Figura C), *Phaethornis pretrei* visitou constantemente entre 06:31 e 12:00, com um pico entre 07:31 e 08:00, contabilizando 7 visitas. *Phaethornis ruber* e *Chlorestes notata* visitaram com menor frequência.

Machado et al. (2007) destacaram que *Aechmea bromeliifolia*, *Neoregalia bahiana*, *Orectanthe albopictum* e *Dyckia dissitiflora* contribuem substancialmente para a dieta dos beija-flores, com percentuais entre 30% e 70%. Fumero-Cabán e Meléndez-Ackerman (2007) observaram que *C. flaveola* foi o ladrão primário de néctar em *Pitcairnia angustifolia*, perfurando a base da corola e realizando polinização incidental. Varassin (2002) observou que aproximadamente 60% dos gêneros de Bromeliaceae são polinizados por beija-flores, sugerindo um processo coevolutivo entre beija-flores e bromélias, baseado na correlação entre a estrutura anatômica dos bicos e a morfologia das flores (Givnish et al., 2014). Barbosa et al. (2022) destacaram que a variação na polinização é resultado da adaptação das flores às características dos polinizadores. A morfologia da corola pode atuar como uma barreira estratégica, contribuindo para a competição interespecífica entre beija-flores com diferentes tipos de bicos (Maglianesi et al., 2014).

Por outro lado, flores de tamanho reduzido e formato linear podem sofrer maior perda de néctar devido à atividade de ladrões de néctar, resultando em diminuição na quantidade e qualidade do néctar, o que pode impactar a frequência de visitação e a produção de sementes (Salinas-Esquível et al., 2013).

Essas informações têm potencial para aplicação em futuros estudos sobre programas de preservação de recursos genéticos, dada a condição alógama e autocompatível das espécies, bem como a presença de visitantes florais na região. Medidas imediatas são essenciais para a conservação e restauração integral da área, a fim de assegurar a manutenção do habitat dessas espécies.

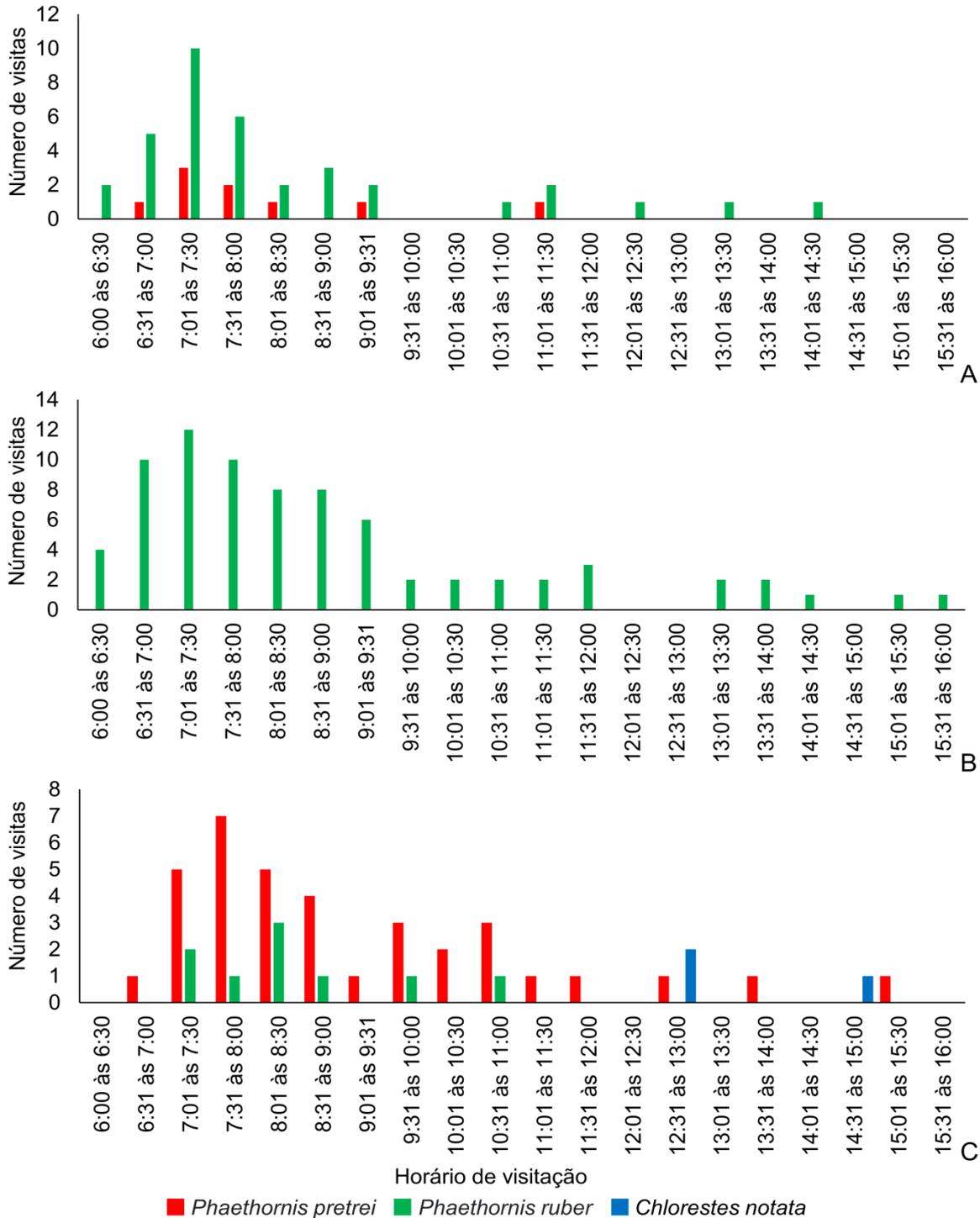


Figura 7. Número de visitas dos beija-flores registradas ao longo do dia em flores de *Aechmea alba* (A), *Aechmea echinata* (B) e *Vriesea recurvata* (C) em intervalos de trinta minutos no Parque Estadual da Serra do Conduru, Uruçuca, Bahia.

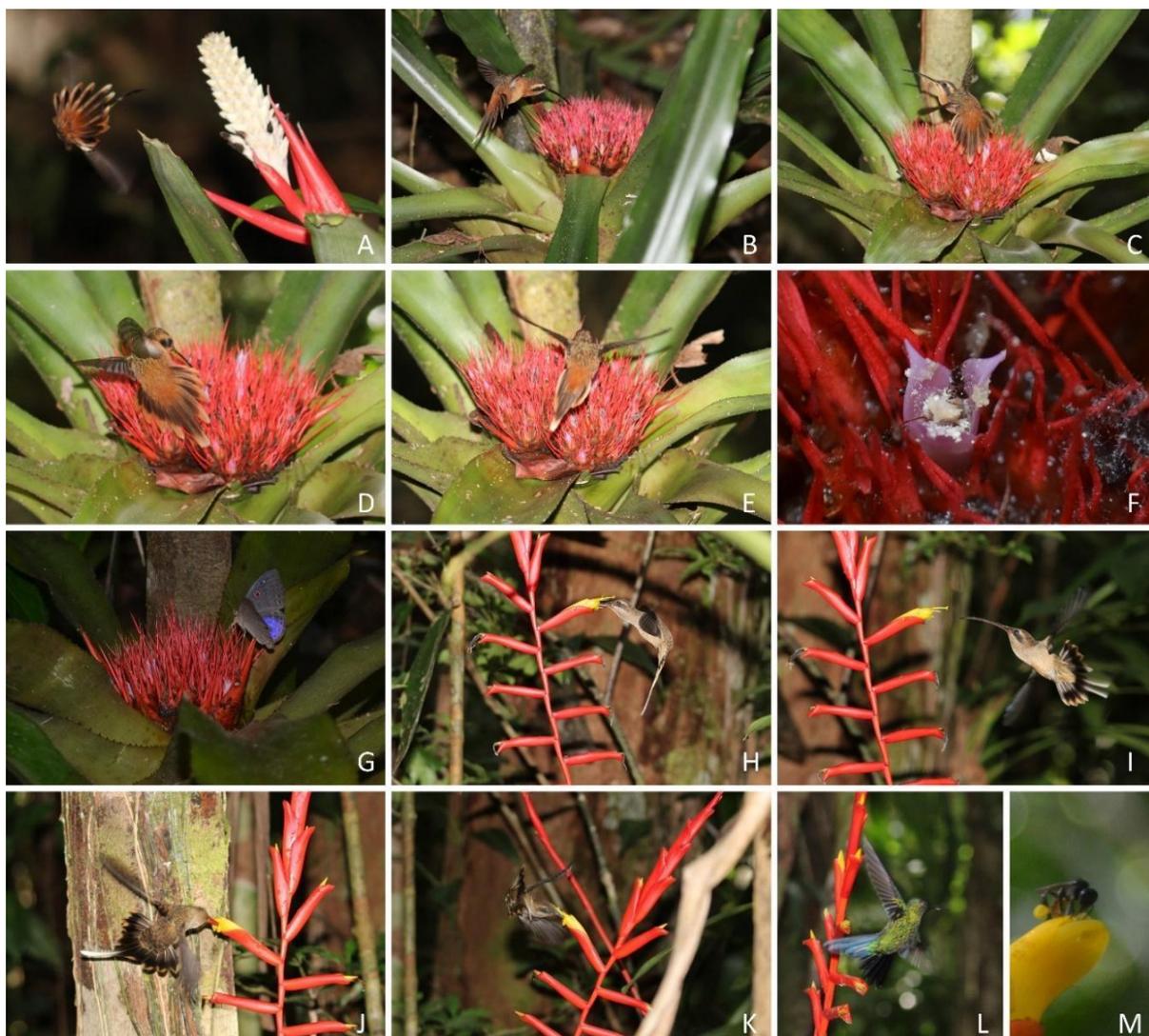


Figura 8. Polinizadores (beija-flores) e visitantes florais de *Aechmea alba* (A), *Aechmea echinata* (B-G) e *Vriesea recurvata* (H-M) no Parque Estadual da Serra do Conduru, Uruçuca, Bahia. A-E, K) *Phaethornis ruber*, H-J) *Phaethornis pretrei*; L) *Chlorestes notata*; G) *Eurybia lycisca*; F) *Iridomyrmex purpureus*; M) *Oxytrigona* sp.

Sistemas reprodutivos

Neste trabalho, os números de frutos resultantes de diferentes tipos de polinização ofereceram uma visão interessante sobre a eficácia reprodutiva das espécies *Aechmea alba*, *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata* (Tabela 4). Ao analisar os resultados, observaram-se variações significativas na porcentagem de frutos com sementes e no número de sementes produzidas conforme os métodos de polinização empregados. A porcentagem de frutos com sementes para *Aechmea alba*, na polinização livre, foi de 48%, enquanto a polinização cruzada atingiu 95%. Isso sugere uma alta dependência dessa espécie de polinizadores externos para uma reprodução bem-sucedida. Além disso, a ausência total de frutos na

autopolinização manual e na autopolinização natural reforça a necessidade de polinizadores para a reprodução.

A reprodução nas bromélias pode ocorrer por meio de múltiplos mecanismos, abrangendo tanto processos sexuais quanto assexuais (Pinangé et al., 2020). As espécies pertencentes à família Bromeliaceae podem apresentar uma variedade de estratégias reprodutivas. Um exemplo é a reprodução por estolões, uma forma comum de reprodução assexuada encontrada principalmente em espécies do gênero *Aechmea* (Sampaio et al., 2002).

Nesta pesquisa, foram realizadas polinizações controladas com o intuito de determinar o sistema reprodutivo. A polinização natural refere-se ao processo no qual os grãos de pólen provenientes de uma flor são depositados no estigma da mesma flor, resultando na autofecundação. A autopolinização manual promoveu a transferência do pólen para o órgão receptivo da mesma flor; a polinização cruzada foi realizada com flores previamente emasculadas e posteriormente polinizadas com grãos de pólen provenientes de outro indivíduo da mesma espécie; e a agamosperma envolveu a emasculação das flores, impedindo a deposição de grãos de pólen, resultando em um processo de reprodução assexuada, sem a participação de gametas masculinos.

O índice de autogamia foi determinado para cada espécie por meio da divisão do percentual de frutos resultantes da polinização natural pelo percentual de frutos provenientes de polinizações cruzadas. As espécies são categorizadas como autóginas ou parcialmente autóginas quando apresentam um índice de autogamia (IA) superior a 0,30, conforme descrito por Ramirez e Brito (1990). Para espécies classificadas como não autóginas, o valor do índice de autogamia deve ser inferior a 0,30.

O índice de autoincompatibilidade (IAI) é determinado pela relação entre o percentual de frutos resultantes da autopolinização manual e o percentual de frutos provenientes da polinização cruzada. O (IAI) é um parâmetro utilizado para determinar a compatibilidade reprodutiva entre diferentes espécies vegetais. Conforme previsto por Ramirez e Brito (1990), para espécies compatíveis e parcialmente compatíveis, é esperado que o valor do IAI seja superior a 0,30. Por outro lado, para espécies autoincompatíveis, o valor do IAI deve ser inferior a 0,30.

Tabela 4. Porcentagem de frutos com sementes e número de sementes produzidas nos diferentes sistemas reprodutivos, em três espécies de Bromelioideae.

	<i>Achmea alba</i>	<i>Achmea echinata</i>	<i>Vriesea Recurvata</i>
Número de frutos*			
Polinização livre (Controle)	48% (12/25)	76% (19/25)	72% (18/25)
Agamospermia	0	0	0
Polinização cruzada (Xenogamia)	95% (18/19)	81% (18/22)	92% (11/12)
Auto-polinização manual	0% (0/25)	0% (0/20)	0% (0/15)
Autopolinização natural	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/20)
Número de sementes por fruto**			
Polinização livre (Controle)	39 ± 11	96 ± 21	732 ± 52
Agamospermia	0	0	0
Polinização cruzada (Xenogamia)	31 ± 16	75 ± 38	676 ± 64
Auto-polinização manual	0	0	0
Autopolinização natural	0	0	0
Índice de autogamia (IA)	0,00	0,00	0,00
Índice de autoincompatibilidade (IAI)	0,00	0,00	0,00
Eficiência reprodutiva (EF)	0,50	0,84	0,78
Sistema de Melhoramento	AI	AI	AI

* Porcentagem de frutos (frutos com sementes/ flores polinizadas). ** Média ± desvio padrão de sementes obtidas por flor (menor número de sementes por frutos – maior número de sementes por fruto). IA = índice de autogamia (autopolinização natural/ polinização cruzada); IAI = índice de autoincompatibilidade (autopolinização manual/ polinização cruzada). EF = eficiência reprodutiva (porcentagem de frutos formados com sementes de polinização livre/ porcentagem de frutos formados com sementes por polinização cruzada). AI = autoincompatível (IAI é inferior a 0,30).

A *Aechmea echinata* mostrou uma dependência moderada da polinização cruzada, com uma taxa de sucesso de 81%, em comparação com a polinização livre, que alcançou 76%. Embora ainda haja uma preferência pela polinização cruzada, essa espécie demonstrou uma capacidade relativamente melhor de produzir frutos mesmo em condições de polinização livre, em comparação com *Aechmea alba*. Portanto, para *Aechmea alba*, a ausência total de frutos na autopolinização manual e na autopolinização natural destaca a necessidade de polinizadores externos para a reprodução. Em contraste, para *Vriesea recurvata*, as taxas de sucesso para a polinização livre e a polinização cruzada estão na faixa de 72% a 92%, indicando uma maior porcentagem de frutos com sementes em comparação com as espécies do gênero *Aechmea*.

Por outro lado, nas pesquisas desenvolvidas por Bastos (2017), foram identificadas disparidades estatisticamente significativas entre os diversos tratamentos de polinização no que diz respeito à geração de frutos contendo sementes viáveis. Os autores identificaram que a polinização cruzada manual alcançou uma taxa de sucesso de 52% (41/76), enquanto a polinização aberta apresentou uma taxa de 35% (31/86). A autopolinização manual apresentou uma taxa significativamente inferior, atingindo apenas 10% (10/100), destacando que os tratamentos de autopolinização espontânea e agamospermia não resultaram na produção de frutos. Assim, a polinização cruzada desempenha um papel significativo na preservação das espécies ao facilitar o intercâmbio de material genético entre os indivíduos. Esse processo é fundamental para a promoção do fluxo gênico, resultando no aumento da variabilidade genética (Vosgueritchian; Buzato, 2006).

Com relação ao número de sementes por fruto, para *Aechmea alba*, o número foi significativamente menor na polinização livre (39 ± 11) em comparação com a polinização cruzada (31 ± 16). Para *Aechmea echinata*, a polinização livre resultou em um número menor de sementes por fruto (96 ± 21) em comparação com a polinização cruzada (75 ± 38). Para *Vriesea recurvata*, os resultados foram similares aos de outras espécies, com o número de sementes por fruto sendo menor na polinização livre (732 ± 52) em comparação com a polinização cruzada (676 ± 64).

Em outros trabalhos, Silva e colaboradores (2022) mencionaram que *Aechmea bruggeri* apresentou uma notável elevação na produção de frutos durante a polinização cruzada manual (88%) em comparação com o tratamento de autopolinização manual (9,6%). A média do número de sementes provenientes da autopolinização manual foi de $21,06 \pm 2,71$, enquanto a polinização cruzada manual atingiu $32 \pm 2,23$. No entanto, em estudos anteriores, Wendt e colaboradores (2001) constataram uma redução de frutos e sementes por agamospermia, como no exemplo do gênero *Pitcairnia*, no qual foi observada uma média de 17,95% de frutos produzidos.

No trabalho de Bastos e colaboradores (2017), a quantidade de sementes foi observada nos grupos submetidos à polinização por xenogamia (454 ± 141) e polinização aberta (446 ± 116). Em contrapartida, nesse mesmo estudo, a autopolinização resultou em uma quantidade inferior de sementes, totalizando 199 ± 73 . Posteriormente, em outras pesquisas, o número médio de sementes de *Quesnelia indecora* provenientes dos frutos gerados mostrou que a autopolinização

manual não gerou sementes, enquanto a polinização por xenogamia resultou em um número substancial de sementes, com uma média de $92 \pm 6,21$, de acordo com Silva et al. (2022).

Nesta pesquisa, todas as espécies demonstraram a ausência total de sementes por agamospermia. Isso reforça a ideia de que, mesmo ao tentar induzir a formação de frutos sem fertilização, não se obteve a produção de sementes nessas plantas. Essa constatação é crucial para compreender os mecanismos reprodutivos e as estratégias de fertilização práticas dessas espécies, mostrando que a reprodução sexuada com fertilização é necessária para a formação de sementes.

Para todas as três espécies de Bromeliaceae estudadas, o índice de autogamia (IA) é 0%, o que sugere que a autopolinização natural não é um mecanismo predominante nesses sistemas reprodutivos. Assim, essas espécies também demonstram um índice de autoincompatibilidade (IAI) de 0%, indicando que a autopolinização manual não resulta na produção de sementes, ou seja, essas plantas são auto-incompatíveis, o que significa que não podem se autofertilizar. Segundo as contribuições de Souza et al. (2017), há uma concepção difundida na comunidade científica de que o sistema primário de incompatibilidade para a reprodução de espécies com ampla distribuição geográfica é o gametofítico. Portanto, neste trabalho, os resultados sugerem que as espécies de *Bromeliaceae* estudadas dependem principalmente da polinização cruzada para a produção de sementes e reprodução bem-sucedida, mostrando uma forte dependência de agentes polinizadores para a fertilização e formação de sementes.

Deste modo, com relação à eficiência reprodutiva, *Aechmea alba* apresentou 0,50, *Aechmea echinata* 0,84 e *Vriesea recurvata* 0,78. Esses valores de eficiência reprodutiva mostram variações entre as espécies. *Aechmea alba* depende mais da polinização cruzada para a produção de sementes, enquanto *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata* demonstram uma capacidade relativamente maior de produzir sementes mesmo na ausência de polinizadores externos. Logo, as espécies estudadas são auto-incompatíveis, ou seja, a fertilização só ocorre com pólen de outra planta. Portanto, a polinização cruzada e/ou a polinização aberta facilitam o intercâmbio gênico entre os indivíduos, contribuindo para o aumento da variabilidade genética dentro e entre as populações. Essas são características cruciais para a diversificação e preservação das espécies, como indicado por Vosgueritchian e Buzato (2006).

Germinação e Crescimento dos Tubos Polínicos

O êxito da polinização aberta é provavelmente resultado do aumento do fluxo gênico entre as plantas, facilitado pela atividade dos polinizadores, que são capazes de percorrer extensas distâncias transportando grãos de pólen de uma planta para outra (Matallana et al., 2010). Assim, na polinização livre, destacaram-se *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata*, e na polinização natural, *Aechmea echinata*, com números elevados de pólen aderidos ao estigma.

Os dados a seguir fornecem informações sobre a germinação dos grãos de pólen, crescimento dos tubos polínicos no pistilo e a penetração desses tubos nos óvulos em diferentes condições de polinização. Com relação aos grãos de pólen na superfície do estigma, houve variações nos resultados, indicando diferentes números de grãos de pólen aderidos ao estigma nas diferentes espécies e sistemas reprodutivos.

Nos sistemas de autopolinização manual e cruzada, os valores foram superiores a 50 grãos de pólen, com uma taxa de 100% para todas as espécies estudadas (Tabela 5). Deste modo, Souza e colaboradores (2017) mencionaram que a transferência dos grãos de pólen para o pistilo não garante necessariamente a fertilização e subsequente formação de sementes, pois várias barreiras reprodutivas podem surgir no interior do pistilo.

Neste estudo, a quantidade de grãos de pólen que efetivamente germinaram nos estigmas variou entre os sistemas de autopolinização manual, apresentando valores de 0 a mais de 50 grãos. Essa variação foi significativa, especialmente nos casos em que foram observados números superiores a 25 e mais de 50 grãos de pólen germinados. Na polinização livre, o número de germinações no estigma foi maior para as espécies *Aechmea echinata* e *Vriesea recurvata*; na polinização natural, para *Aechmea echinata*. Com relação à polinização cruzada, a germinação consistiu em um número superior a 50 grãos de pólen nos estigmas de todas as espécies estudadas, indicando eficiência reprodutiva (Tabela 5).

Sequencialmente, no estágio de crescimento dos tubos polínicos no pistilo, a escala variou de 0 a 7, indicando desde a não germinação até a penetração dos tubos polínicos na micrópila. Valores mais altos indicam um estágio avançado de crescimento e penetração nos óvulos na micrópila. Na polinização livre, para *Aechmea alba*, o tubo polínico ficou próximo ao óvulo com taxa de 10% e penetrou a micrópila com taxa de 90%. Nas demais espécies, nesse mesmo sistema

reprodutivo, o tubo polínico penetrou a micrópila com percentual de 100% (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação quanto à germinação dos grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos no pistilo nos diferentes sistemas reprodutivos em três espécies de Bromeliaceae.

Espécie	GPSE	GPGE	CTPP	OTPM
Polinização livre (Controle)				
<i>Achmea alba</i>	1 (10%)	1 (10%)	6 (10%)	0 (30%)
	2 (10%)	2 (10%)	7 (90%)	1 (10%)
	3 (80%)	3 (80%)		3 (60%)
<i>Achmea echinata</i>	2 (10%)	2 (10%)	7 (100%)	0 (20%)
	3 (90%)	3 (90%)		1 (10%)
				3 (70%)
<i>Vrisea recuvata</i>	2 (10%)	2 (20%)	7 (100%)	0 (25%)
	3 (90%)	3 (80%)		3 (70%)
Autopolinização natural				
<i>Achmea alba</i>	3 (50%)	1 (50%)	1 (80%)	0 (100%)
	2 (50%)	2 (50%)	2 (20%)	
<i>Achmea echinata</i>			2 (20%)	0 (100%)
	3 (100%)	3 (100%)	3 (20%)	
<i>Vrisea recuvata</i>			4 (60%)	0 (100%)
	0 (80%)	0 (80%)	4 (100%)	
	1 (20%)	1 (20%)		
Autopolinização manual				
<i>Achmea alba</i>		2 (33%)	2 (33%)	0 (100%)
	3 (100%)	3 (66%)	3 (33%)	
<i>Achmea echinata</i>			4 (33%)	0 (100%)
	3 (100%)	3 (100%)	4 (80%)	
<i>Vrisea recuvata</i>			5 (20%)	0 (100%)
	3 (100%)	3 (100%)	4 (100%)	
Polinização Cruzada (Xenogamia)				
<i>Achmea alba</i>			6 (10%)	1 (40%)
	3 (100%)	3 (100%)	7 (90%)	2 (40%)
<i>Achmea echinata</i>				3 (20%)
	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	2 (40%)
<i>Vrisea recuvata</i>				3 (60%)
	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	3 (100%)
Agamospermia				
<i>Achmea alba</i>	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
<i>Achmea echinata</i>	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
<i>Vrisea recuvata</i>	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)

GPSE = grãos de pólen que aderido à superfície do estigma; GPGE = grãos de pólen germinados na superfície do estigma foram avaliados de acordo a escala: 0) ausente; 1) 1 a 25 grãos de pólen; 2) 25 a 50 grãos de pólen; 3) > 50 grãos de pólen. CTPP = crescimento do tubo polínico no pistilo foi avaliado conforme escala: 0) grãos de pólen não germinados na superfície do estigma; 1) grãos de pólen

germinados na superfície do estigma; 2) tubos polínicos paralisados no primeiro terço do estilete; 3) tubos polínicos paralisados no segundo terço do estilete; 4) tubos polínicos paralisados no terceiro terço do estilete; 5) tubos polínicos na região do ovário; 6) tubo polínico próximo ao óvulo; 7) tubo polínico penetrando na micrópila. OTPM = óvulos com tubo polínico penetrado na micrópila: 0) ausente; 1) 1 a 5 óvulos; 2) 5 a 10 óvulos; 3) > 10 óvulos.

O estudo de Vervaeke et al. (2001; 2002) examinou diversas espécies de bromélias, identificando barreiras antes e depois da fertilização. Eles notaram problemas no estilete, principalmente na região basal, como desigualdade no comprimento do estilete e tubo polínico, variação no tamanho e na morfologia dos grãos de pólen, falhas na germinação do pólen no estigma devido a hidratação inadequada, falta de nutrientes, principalmente cálcio e boro, ausência de substâncias quimiotrópicas na micrópila, além de problemas durante a polinização, como o momento de maior receptividade do estigma e os polinizadores envolvidos.

Em estudos posteriores, Gouveia et al. (2015) ressaltaram as barreiras pré-zigóticas, destacando sua natureza como mecanismos que impedem a fertilização entre gametas masculinos e femininos. Essas barreiras podem incluir restrições de espaço, tempo, incompatibilidades genéticas e modificações na estrutura floral que interagem com os polinizadores.

Por outro lado, a quantidade de óvulos nos quais o tubo polínico penetrou na micrópila indicou fertilização. Na polinização natural e manual, não foram observados óvulos com tubo polínico penetrado na micrópila. No entanto, na polinização por xenogamia, os valores variaram significativamente: *Aechmea alba* e *Vriesea recurvata* atingiram um número maior de óvulos com tubo polínico penetrado na micrópila em relação às demais espécies. Assim, para que ocorra sucesso na fecundação, os grãos de pólen precisam germinar na superfície do estigma, desenvolver a estrutura fisiológica do tubo polínico no interior do estilete e, a partir desse processo, liberar os gametas masculinos nos óvulos (Johnson et al., 2019; Tang et al., 2020).

Com relação à agamospermia, houve ausência para todas as espécies em todos os sistemas reprodutivos quanto à aderência do grão de pólen, grãos de pólen germinados na superfície do estigma, crescimento do tubo polínico no pistilo e óvulos com tubo polínico penetrando na micrópila. Portanto, o conhecimento da biologia reprodutiva das *Bromeliaceae* é vital para entender como essas plantas se reproduzem. Isso inclui informações sobre polinização, dispersão de sementes e

padrões de reprodução, contribuindo para estratégias de conservação para espécies ameaçadas de extinção (Cesário; Gaglianone, 2008).

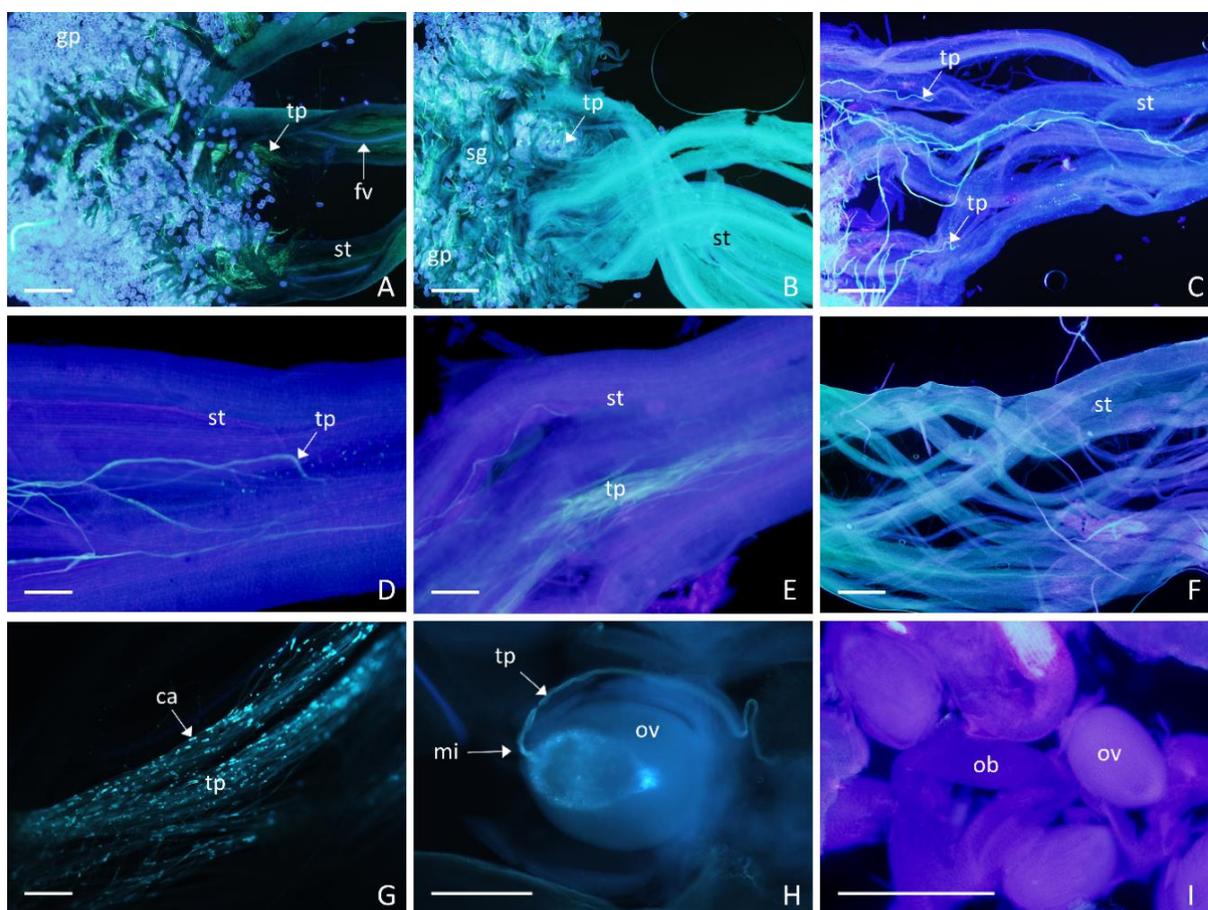


Figura 9. Crescimento do tubo polínico em *Aechmea alba* nos diferentes sistemas reprodutivos por meio da microscopia de fluorescência com solução de azul de anilina. A) Muita deposição de grãos de pólen germinando e parализando na superfície do estigma ou no terço superior do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira reprodutiva. B) Muita deposição de grãos de pólen germinando e parализando na superfície do estigma ou no terço superior do estilete em autopolinização natural, evidenciando uma barreira reprodutiva. C) Tubos polínicos interrompidos o crescimento no terço superior e mediano do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira reprodutiva. D) Tubos polínicos interrompidos o crescimento no terço inferior do estilete em autopolinização natural, evidenciando uma barreira reprodutiva. E) Tubos polínicos enovelados no terço mediano do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira reprodutiva. F) Ausência de crescimento do tubo polínico no estilete em agamospermia G) Tubos polínicos com distribuição regular de calose no interior do estilete em polinização livre (controle); H) Tubos polínicos penetrando na micrópila resultando na fertilização em polinização cruzada (xenogamia); I) Óvulos sem a penetração do tubo polínico na micrópila em agamospermia. ca = placas de calose; fv = feixe vascular; gp = grãos de pólen; mi = micrópila; ob = obturador; ov = óvulo; sg = estigma; st = estilete; tp = tubo polínico. Barras: A-G, I) 500 µm; H) 200 µm.

Para compreender melhor os diferentes tipos de reprodução em Bromeliaceae, utiliza-se a microscopia de fluorescência, técnica que emprega a emissão de luz para visualizar detalhes em células, tecidos e outras estruturas biológicas coradas com azul de anilina nos diversos sistemas reprodutivos. Assim, as barreiras reprodutivas são evidenciadas pela parada do crescimento do tubo polínico no interior do estilete, enovelamento do tubo polínico ou resultados incoerentes referentes ao sistema reprodutivo.

Deste modo, as barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas presentes em *Bromeliaceae* podem incluir autocompatibilidade, autoincompatibilidade, agamospermia e cleistogamia (Matallana et al., 2010; Souza et al., 2017).

A autopolinização manual em *Aechmea alba* ocorre quando os grãos de pólen são depositados no estigma da mesma flor de origem, resultando na autofecundação. Esse processo é fundamental para a reprodução de diversas espécies vegetais (Shivanna, 2015). Nessa pesquisa, os resultados apresentados na autopolinização natural possuem semelhança com a autopolinização manual (Figura A e B). Foram visualizadas a deposição de grãos de pólen germinando e parados na superfície do estigma ou no terço superior do estilete.

Em contrapartida, segundo Newbing et al. (1993), a incompatibilidade gametofítica ocorre com a germinação dos grãos de pólen no estigma. Contudo, o desenvolvimento do tubo polínico é interrompido no estilete ou ovário (Figura C, D e E). Isso é diferente da incompatibilidade esporofítica, que é caracterizada pela interrupção do desenvolvimento dos grãos de pólen no estigma, sem penetração no estilete (Nasrallah et al., 1993), como apresentado na Figura A.

Por outro lado, na Figura G e H, os grãos de pólen germinam na superfície do estigma, desenvolvem a estrutura fisiológica do tubo polínico no interior do estilete, acompanhados por placas de calose, e a partir desse processo liberam os gametas masculinos nos óvulos, conforme as considerações de Johnson et al. (2019). Dessa forma, Souza e colaboradores (2017) descreveram sistemas reprodutivos e as possibilidades de barreiras reprodutivas em híbridos interespecíficos e intergenéricos, observando que o gênero *Ananas* está entre os híbridos com maior sucesso.

Em outros trabalhos, Coppens d'Eeckenbrugge et al. (2011) descrevem o sistema reprodutivo do gênero *Ananas* como pseudoautoincompatível do tipo gametofítico. Nesse sistema, foi observada a inibição do crescimento do tubo

polínico no terço superior do estilete, semelhante aos resultados apresentados na Figura B. Os autores explicaram que o enovelamento ou paralisação dos tubos polínicos no estilete, como barreiras pré-zigóticas, foi estabelecido em hibridações intergenéricas, sendo possível apenas nas combinações entre *Vriesea michaelii* W. Weber x *Aechmea nahoumii* Leme e *Vriesea simplex* (Vell.) Beer x *Aechmea nahoumii*.

No entanto, na espécie *Aechmea alba*, a presença de frutos nos tratamentos por agamospermia não foi observada (Figura I). Trabalhos como os de Wendt et al. (2001) e Scrok; Varassin (2011) relatam uma baixa produção de frutos e sementes devido à ocorrência de agamospermia, evidenciada no gênero *Pitcairnia*, onde foi registrada uma média de apenas 17,95% dos frutos produzidos. Em outra espécie, *Aechmea distichantha*, foi observada uma taxa ainda menor, de apenas 10% de frutos formados.

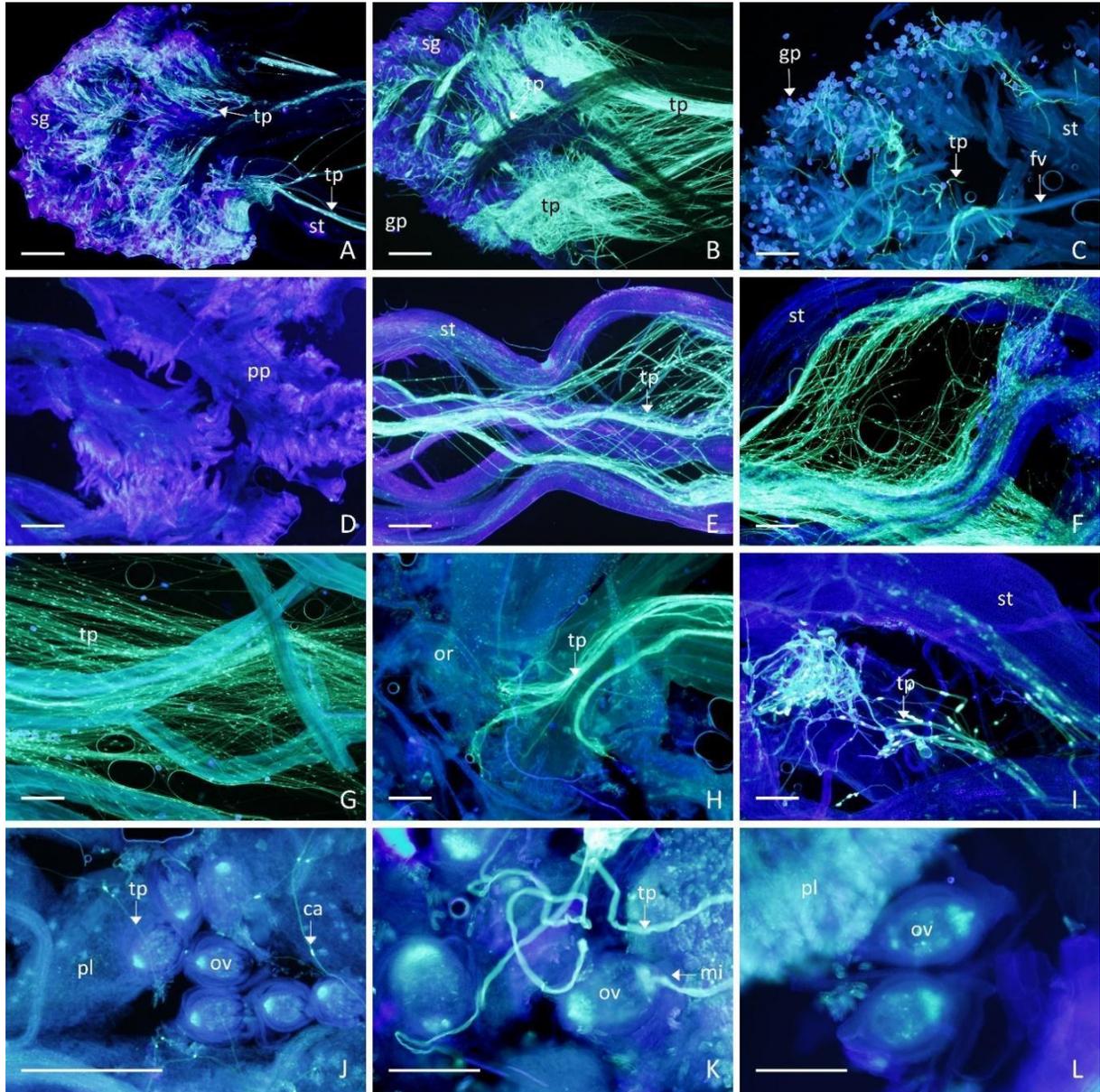


Figura 10. Crescimento do tubo polínico em *Aechmea echinate* nos diferentes sistemas reprodutivos por meio da microscopia de fluorescência com solução de azul de anilina. A) Muita deposição de grãos de pólen germinando na superfície do estigma em autopolinização manual. B) Muita deposição de grãos de pólen germinando na superfície do estigma em polinização livre. C) Muita deposição de grãos de pólen germinando na superfície do estigma e paralisação no primeiro terço do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira. D) Ausência de deposição de grãos de pólen da superfície do estigma em agamospermia. E) Tubos polínicos com distribuição regular de calose no interior do estilete em polinização livre (controle); F) Tubos polínicos com distribuição regular de calose no terço superior do estilete em polinização cruzada (xenogamia); G) Tubos polínicos com distribuição regular de calose no terço inferior do estilete em polinização cruzada (xenogamia); H) Tubos polínicos na entrada do ovário em polinização cruzada (xenogamia); I) Tubos polínicos enovelados no terço inferior do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira; J) Tubos polínicos penetrando na micrópila resultando na fertilização em polinização livre (controle); K) Tubos polínicos penetrando na micrópila resultando na fertilização em polinização cruzada

(xenogamia); L) Óvulos sem a penetração do tubo polínico na micrópila em agamosperma. ca = placas de calose; fv = feixe vascular; gp = grãos de pólen; mi = micrópila; or = ovário; ov = óvulo; pl = placenta; pp = papilas estigmáticas; sg = estigma; st = estilete; tp = tubo polínico. Barras: A-J) 500 µm; K-L) 200 µm.

A família Bromeliaceae exibe uma ampla diversidade em sistemas reprodutivos. A maioria das espécies dentro desta família apresenta tanto alogamia quanto autocompatibilidade, conforme indicado por estudos anteriores (Matallana et al., 2010; 2016). Acredita-se que a alogamia seja promovida pelas barreiras reprodutivas como a dicogamia e a heterostilia, que garantem a combinação de gametas femininos e masculinos, promovendo a variabilidade genética (Givnish et al., 2007; Matallana et al., 2016).

Neste estudo, foram observadas algumas barreiras reprodutivas no desenvolvimento do tubo polínico na micrópila durante os cruzamentos realizados na espécie *Aechmea echinata*. Embora tenham sido observados muitos grãos de pólen germinando na superfície do estigma na polinização natural manual (Figura A e B), os tubos polínicos pararam no primeiro terço do estilete, exibindo uma barreira como indicado na Figura C e I na polinização manual. Isso sugere uma interrupção ou bloqueio no desenvolvimento do tubo polínico, possivelmente relacionado a uma defesa da planta receptora que impede a continuação da extensão do tubo polínico em direção à micrópila, onde a fertilização ocorreria.

Na polinização livre, os grãos de pólen exibiram germinação na superfície do estigma. Posteriormente, o tubo polínico, acompanhado de placas de calose, seguiu de forma regular no interior do estilete, alcançando a micrópila e resultando em fertilização (Figura B, E e J). Resultados semelhantes foram observados na polinização por xenogamia, onde os tubos polínicos, acompanhados por placas de calose, seguiram de forma regular no interior do estilete, alcançando o ovário e penetrando na micrópila (Figura F, G, H e K).

A autoincompatibilidade é um mecanismo comum em angiospermas que atua como um sistema reprodutivo para prevenir a autopolinização e favorecer a polinização cruzada. Esse processo desempenha um papel fundamental na promoção da diversidade genética dentro das espécies (Bandeira et al., 2011). Assim, os cruzamentos desempenham um papel significativo na geração de diversidade genética, especificamente as hibridações entre espécies diferentes e até entre gêneros, possibilitando a criação de genótipos com modificações. Essa prática

assume uma função estratégica no desenvolvimento de novas variedades ornamentais (Vervaeke et al., 2004).

Segundo Caetano e Cortez (2014), o sistema reprodutivo baseado na alogamia está diretamente relacionado ao investimento na produção de flores, visando uma abundante produção de grãos de pólen. Isso assegura a disponibilidade para os polinizadores, promovendo a dispersão e a produção de sementes. Além disso, esse sistema contribui para a minimização da existência de clones, dado que a reprodução assexuada é limitada.

Por outro lado, no sistema de agamospermia foi observada a ausência de deposição de grãos de pólen na superfície do estigma, resultando em óvulos sem a penetração do tubo polínico na micrópila (Figura D e L).

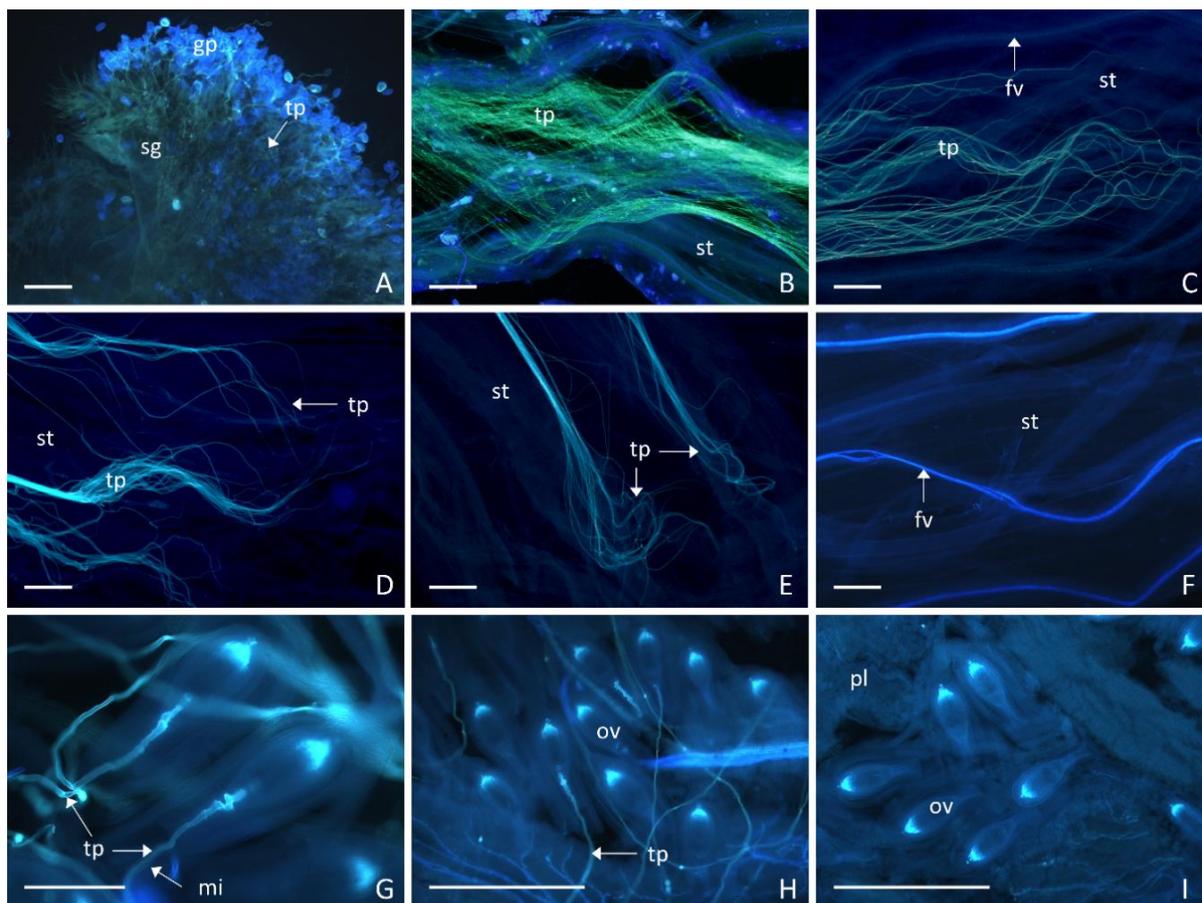


Figura 11. Crescimento do tubo polínico em *Vriesea recurvata* nos diferentes sistemas reprodutivos por meio da microscopia de fluorescência com solução de azul de anilina. A) Muita deposição de grãos de pólen germinando e paralizzando na superfície do estigma ou no terço superior do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira reprodutiva. B) Crescimento dos tubos polínicos no terço inferior do estilete em polinização cruzada, com deposição regular de calose (xenogamia). C) Tubos polínicos interrompidos o crescimento no terço inferior do estilete em autopolinização natural, evidenciando uma barreira reprodutiva. D) Tubos polínicos interrompidos o crescimento no terço mediano e mediano do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira reprodutiva. E) Tubos polínicos enovelados e interrompidos no terço inferior do estilete em autopolinização manual, evidenciando uma barreira reprodutiva. F) Ausência de crescimento do tubo polínico no estilete em agamospermia. G) Tubos polínicos penetrando na micrópila resultando na fertilização em polinização livre (controle); H) Tubos polínicos penetrando na micrópila resultando na fertilização em polinização cruzada (xenogamia); I) Óvulos sem a penetração do tubo polínico na micrópila em agamospermia. fv = feixe vascular; gp = grãos de pólen; mi = micrópila; ob = obturador; ov = óvulo; pl = placenta; sg = estigma; st = estilete; tp = tubo polínico. Barras: A-G, I) 500 μ m; H) 200 μ m.

Para investigar o crescimento do tubo polínico no pistilo, foram consideradas diferentes regiões pré-determinadas. Estas incluíram: a presença do tubo polínico no estigma, sem apresentar crescimento no estilete; o tubo polínico localizado no primeiro, segundo e terceiro terço do estilete; a presença do tubo polínico no interior

do ovário; a proximidade do tubo polínico ao óvulo; e o tubo polínico penetrando na micrópila. Essas regiões delimitadas foram fundamentais para avaliar a progressão do crescimento do tubo polínico ao longo do pistilo em *Vriesea recurvata*, conforme indicado no estudo de Bandeira (2011).

As dificuldades na obtenção de híbridos podem ser atribuídas a barreiras pré-zigóticas, que se manifestam pela falha na germinação do grão de pólen no estigma ou pela inibição do crescimento do tubo polínico no estilete (Vervaeke et al., 2002) (Figura A). Foi observado crescimento do tubo polínico nos estágios iniciais do terço inferior do estilete, bem como a ocorrência de deposição regular de placas de calose (Figura B). No entanto, Souza et al. (2017) relataram incongruências em hibridações interespecíficas e intergenéricas, especialmente entre espécies do gênero *Vriesea*.

A interrupção do crescimento dos tubos polínicos no terço inferior do estilete durante a autopolinização natural evidencia a presença de uma barreira reprodutiva, sugerindo que *V. recurvata* não possui capacidade de autofertilização. As dificuldades na obtenção de híbridos podem decorrer de barreiras pré-zigóticas, que se manifestam pela incapacidade do grão de pólen de germinar no estigma e pela inibição do crescimento do tubo polínico no estilete (Figura C) (Vervaeke et al., 2002). Essas barreiras pré-zigóticas atuam como mecanismos de isolamento reprodutivo, impedindo ou limitando a fertilização entre espécies (Figura D).

Embora a ocorrência de agamospermia tenha sido documentada em determinadas espécies de *Bromeliaceae* (Rogalski et al., 2009; Scrok; Varassin, 2011), contaminações eventuais por grãos de pólen na superfície do estigma antes da abertura da flor não podem ser descartadas devido à proximidade física entre as anteras e o estigma. Neste estudo, houve ausência de crescimento do tubo polínico no estilete em agamospermia na espécie *V. recurvata* (Figura F), indicando que a fertilização não ocorre através da fecundação tradicional após a polinização. Nesse processo, os óvulos se desenvolvem sem a fertilização pelo pólen, resultando na formação de sementes sem a união dos gametas masculino e feminino.

Por outro lado, estudos anteriores como os de Allard (1971), Vervaeke et al. (2001) e Greiner et al. (2011) ressaltaram que o aborto do zigoto ou embrião é classificado como uma barreira pós-zigótica. Essa interrupção no desenvolvimento pode ser atribuída à incompatibilidade entre os tecidos do embrião e o endosperma, ou ainda entre o óvulo e o ovário da planta mãe, resultando na interrupção precoce do desenvolvimento do zigoto ou embrião e no aborto do embrião (Figura I).

Na polinização livre e por xenogamia, os tubos polínicos seguiram de forma regular, com placas de calose no interior do estilete, penetrando na micrópila (Figura G e H). A Sociedade Internacional de Bromélias (Bromeliad Society International - BSI, 2023) e o "Journal of the Bromeliad Society" registraram mais de 600 híbridos de várias espécies e gêneros da família, tanto de origem natural quanto de híbridos controlados. A polinização por xenogamia, em particular, garante uma fertilização mais eficaz, pois diferentes espécies podem ter uma maior compatibilidade para uma fecundação bem-sucedida. Esses processos são importantes para a evolução das espécies, possibilitando maiores adaptações às mudanças ambientais e evolução ao longo do tempo.

CONCLUSÃO

A pesquisa evidenciou que, independentemente do método empregado, seja o histoquímico ou a germinação in vitro, os resultados indicaram porcentagens significativas na antese para todas as espécies estudadas. O meio BM e SM mostraram-se eficazes para o desenvolvimento de estudos relacionados a essas espécies.

Em relação aos polinizadores, *Phaethornis ruber* foi o mais frequente, realizando 36 visitas a *Aechmea alba*, 76 a *Aechmea echinata* e 9 a *Vriesea recurvata*. *Phaethornis pretrei* apresentou o maior número de visitas para *Vriesea recurvata*, indicando uma associação direta com essa espécie em particular. *Chlorestes notata* teve um número consideravelmente menor de visitas, apenas 3, todas direcionadas a *Vriesea recurvata*.

Além dos beija-flores, outras espécies de visitantes também foram observadas, como borboletas, abelhas, formigas e outros insetos. No entanto, suas interações com as bromélias foram menos significativas em comparação com os beija-flores.

As porcentagens de frutos com sementes e o número de sementes produzidas foram superiores na polinização cruzada (xenogamia). As espécies estudadas demonstram uma alta especificidade de autoincompatibilidade gametofítica, com restrição à autopolinização e interrupção do crescimento do tubo polínico em regiões específicas do pistilo, mais precisamente no terço inferior, superior e médio.

As barreiras reprodutivas pré-zigóticas são o principal mecanismo que dificulta o fluxo genético. O conhecimento das espécies em questão fornece

informações relevantes para a taxonomia do gênero, além de ser crucial para a realização de cruzamentos controlados, a obtenção de sementes e a condução de estudos voltados para a conservação.

Portanto, os resultados deste estudo oferecem subsídios que enriquecem a compreensão da biologia reprodutiva das três espécies pertencentes à família *Bromeliaceae* na região da Ferrovia de Integração Oeste-Leste, situada no estado da Bahia, Brasil. Essas descobertas são relevantes para orientar investigações futuras voltadas à conservação e ao manejo dessas espécies em seu ambiente natural.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-RODRÍGUEZ, P. A.; KRÖMER, T.; GARCIA-FRANCO, J. G.; MACSWINEY, G. M. C. From dusk till dawn: nocturnal and diurnal pollination in the epiphyte *Tillandsia heterophylla* (Bromeliaceae). **Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 37-45, 2016.

ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L.; DANERDI, F.; DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, 2010.

ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, v. 44, n. 3, p. 117-122, 1969.

ALVES-DOS-SANTOS, I.; SILVA, C. I.; PINHEIRO, M.; KLEINERT, A. M. P. Quando um visitante floral é um polinizador? **Rodriguésia**, v. 67, p. 295-307, 2016.

ARAÚJO, A. C.; FISCHER, E. A.; SAZIMA, M. Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região de Juréia, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, v. 17, p. 113 - 118, 1994.

BAHIA. **Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Conduru**. Bahia: Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Superintendência de Desenvolvimento Florestal e Unidade de Conservação - SFC, 2005.

BANDEIRA, J. D. M.; THUROW, L. B.; PETERS, J. A.; RASEIRA, M. D. C. B.; BIANCHI, V. J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 860-867, 2011.

BARBOZA, Y. G. H. Producción de néctar en flores visitadas por colibríes en la Cordillera de Talamanca, **UNED Research Journal**, v. 14, e3875, 2022.

BASCOMPTE, J.; JORDANO, P. Plant-animal mutualistic networks: the architecture

of biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, n. 1, p. 567-593, 2007.

BASTOS, M. J. S. M.; BASTOS, L. P.; SOUZA, E. H.; SOARES, T. L.; MORAIS, D. V.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, v. 31, p. 665-676, 2017.

BENZING, D. L. (2000). **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge: Cambridge University Press. Florianópolis, v. 26, n. 4, p. 75-83, 2013.

BOLTEN, A. B.; FEINSINGER, P.; BAKER, H. G.; BAKER, I. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. **Oecologia**, v. 41, p. 301-304, 1979.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

BSI (BROMELIAD SOCIETY INTERNATIONAL). **Bromeliad Cultivar Register: Lista de nomes**. Bromeliad Society International. (Continuamente atualizado). Disponível em: <https://registry.bsi.org/>. Acesso em: 19 Janeiro de 2023.

BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. **Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic forest sites**. Cambridge University Press, v. 32, p. 824-841, 2000.

CAVALCANTE, B. P.; SOUZA, E. H.; WILLIAMS, J. H.; VERSIEUX, L. M. Reproductive systems and post-pollination barriers between two closely related eu-bromelioids (Bromeliaceae) in the Atlantic Forest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 828-839, 2020.

CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE, M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 828-833, 2008.

CLARK, J. R.; FINN, C. E. Blackberry breeding and genetics. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 5, p. 27-43, 2011.

CLASSEN, A.; EARDLEY, C. D.; HEMP, A.; PETERS, M. K.; PETERS, R. S.; SSYMANK, A.; STEFFAN-DEWENTER, I. Specialization of plant-pollinator interactions increases with temperature at Mt. Kilimanjaro. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 2182-2195, 2020.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; SANEWSKI, G. M.; SMITH, M. K.; DUVAL, M. F.; LEAL, F. *Ananas*. In: KOLE, C. (Org.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, tropical and subtropical fruits**. Berlin: Springer-Verlag, p. 21-41. 2011.

CORBET, S. A. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. **Apidologie**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2003.

COSTA, A. F.; MOURA, R. L.; NEVES, B.; MACHADO, T. M.; KESSOUS, I. M.; URIBBE, F. P.; COUTO, D. R.; GOMES-DA-SILVA, J. **Vriesea in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB6540>>. Acesso em: 25 nov. 2023.

COSTA, F. C. B.; CHIAVEGATTO, B.; BARBOSA, D. E. F.; FURTADO, S. G.; MENINI NETO, L. Espécies de *Tillandsia* L. (Tillandsioideae, Bromeliaceae) como bioindicadoras de poluição atmosférica. **CES Revista**, v. 33, n. 1, p. 235-257, 2019.

COSTA, L. M. S.; GOETZE, M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; HIRSCH, L. D.; BERED, F. Hybridization and species boundaries between three sympatric bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 198, n. 4, p. 438-455, 2022.

CRUDEN, R. W. Pollen grains: why so many? **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 1, p. 143-165, 2000.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 3, p. 1-46, 1977.

DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach. New York: University Press, 1992, 250 p.

DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple method to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 177-180, 1998.

FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. A revision of *Aechmea subgenus* Macrochordion (Bromeliaceae), based on phenetic analyses of morphological variation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 162, n. 1, p. 1-27, 2010.

GALETTO, L.; FIONI, A.; CALVINO, A. Exito Reproductivo y Calidad de los Frutos en Poblaciones del Extremo Sur de la Distribucion de *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae). **Darwiniana**, v.40, p. 25-32. 2002.

GANGULY, S.; BARUA, D. Inter-morph pollen flow and reproductive success in a self-compatible species with stigma-height dimorphism: the influence of herkogamy and reciprocity. **Plant Biology**, v. 23, n. 6, p. 939-946, 2021.

GAUDEUL, M.; TILL-BOTTRAUD, I. Reproductive ecology of the endangered alpine species *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Phenology, gene dispersal and reproductive success. **Annals of Botany**, v. 93, p. 711-721, 2004.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; VAN EE, B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D.M.; SMITH, J.A.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 55-78, 2014.

GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhf sequence data. **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 23, p. 3-26, 2007.

GONÇALVES, C. B. S.; SILVA, C. B.; CANDIDO, A. C. S. Visitantes florais de *Inga edulis* (Fabaceae - Mimosoideae), na região do Pantanal - Passo do Lontra, **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, p. 15-22, 2010.

GOUVEIA, T. M. Z. M.; PINHEIRO, F. Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss. **Revista da Biologia**, v. 14, n. 1, p. 17–23, jul. 2015.

GREINER, S.; RAUWOLF, U. W. E.; MEURER, J.; HERRMANN, R. G. The role of plastids in plant speciation. **Molecular ecology**, v. 20, n. 4, p. 671-691, 2011.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 135-141, 2016.

INOUE, D. The terminology of floral larceny. **Ecology**, v. 61, n. 5, 1980.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). **The IUCN red list of threatened species**. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/> > Acesso em 30 Agosto de 2023.

JAYAPRAKASH, P.; SARLA, N. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Pollen in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 851-855, 2001.

JOHNSON, M. A.; HARPER, J. F.; PALANIVELU, R. A fruitful journey: pollen tube navigation from germination to fertilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, n. 1, p. 809–837, 2019.

KAEHLER, M.; VARASSIN, I. G.; GOLDENBERG, R. Polinização em uma comunidade de bromélias na Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 219-228, 2005.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University of Colorado, 1993, 583 p.

KESSLER, M. Environmental patterns and ecological correlates of range size among bromeliad communities of Andean forest in Bolivian. **The Botanical Review**, v. 68, p. 100-127, 2002.

KNIGHT, T. M.; STEETS, J. A.; VAMOSI, J. C.; MAZER, S. J.; BURD, M.; CAMPBELL, D. R.; DUDASH, M. R.; JOHNSTON, M. O.; MITCHELL, R. J.; ASHMAN, T. Pollen limitation of plant reproduction: Pattern and Process. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p. 467-497, 2005.

KRÖMER T, K. M.; LOHAUS, G.; SCHMIDT-LEBUHN, A. N. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. **Plant Biology**, 10: 502-511, 2008.

LOISEAU, O.; MACHADO, T. M.; PARIS, M.; KOUBÍNOVÁ, D.; DEXTER, K. G.; VERSIEUX, L. M.; LEXER, C.; SALAMIN, E. Genome skimming reveals widespread hybridization in a Neotropical flowering plant radiation. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 668281, 2021.

MACHADO, C. G.; COELHO, A. G.; SANTANA, C. S.; RODRIGUES, M. Hummingbirds e seus recursos florais em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, Bahia. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 15, p. 267-279, 2007.

MACHADO, C. G.; SEMIR, J. Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 163-174, 2006.

MAGLIANESI, M. A.; BLÜTHGEN, N.; BÖHNING-GAESE, K.; SCHLEUNING, M. Morphological traits determine specialization and resource use in plant–hummingbird networks in the neotropics. **Ecology**, v. 95, n. 12, p. 3325-3334, 2014.

MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H. C.; GUEDES-BRUNI, R. R. (Org.). **Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico, p. 213-250, 1997

MATALLANA, G.; GODINHO, M. A. S.; GUILHERME, F. A. G.; BELISARIO, M.; COSER, T. S.; WENDT, T. Breeding systems of Bromeliaceae species: Evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, p. 57-65, 2010.

MATALLANA, G.; OLIVEIRA, P. E.; ROCHA DA SILVA, P. R.; WENDT, T. Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in South-Eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 521-531, 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica: patrimônio dos brasileiros**. Brasília: MMA, 2010.

MORELLATO, L. P. C.; ALBERTON, B.; ALVARADO, S. T.; BORGES, B.; BUISSON, E.; CAMARGO, M. G. G.; CANCIAN, L. F.; CARSTENSEN, D. W.; ESCOBAR, D. F. E.; LEITE, P. T. P.; MENDOZA, I.; ROCHA, N. M. W. B.; SOARES, N. C.; SILVA, T. S. F.; STAGGEMEIER, V. G.; STREHER, A. S.; VARGAS, B. C.; PERES, C. A. Linking plant phenology to conservation biology. **Biological Conservation**, v. 195, n. 1, p. 60-72, 2016.

NASRALLAH, H. B.; NASRALLAH, M.E. Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1325-1335, 1993.

- NEGRELLE, R. R. B.; MURARO, D. Aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 28, p. 95-102, 2006.
- NEVES, B.; KESSOUS, I. M.; MOURA, R. L.; COUTO, D. R.; ZANELLA, C. M.; ANTONELLI, A.; BACON, C. D.; SALGUEIRO, F.; COSTA, A. F.. Pollinators drive floral evolution in an Atlantic Forest genus. *Plantas AoB*, v. 12, n. 5, p. 046, 2020.
- NEWBIGIN, E.; ANDERSON, M. A.; CLARKE, A. E. Gametophytic self-incompatibility systems. *The Plant Cell*, v. 5, p. 1315-1324, 1993.
- NICOLSON, S. W.; NEPI, M.; PACINI, E. **Nectaries and Nectar**. Springer, New York, 2007, 267p.
- NOGUEIRA, P. V.; FERNANDES, D. S.; PIO, R.; SILVA, P. A. D. O.; BISI, R. B.; BALBI, R. V. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. *Bragantia*, v. 74, p. 9-15, 2015.
- NOVARA C, Ascari L, Morgia V, Reale L, Siniscalco C. Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. *Scientia Horticulturae*, v. 214, p. 295-303, 2017.
- PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; SILVEIRA, L. C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; BERED, F. Fertilidade de *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) no sul do Brasil. *American Journal of Botany*, v. 94, n. 4, p. 683-689, 2007.
- PAGGI, G. M.; TIEPPO DA SILVEIRA, L. C.; ZANELLA, C. M.; BRUXEL, M.; BERED, F.; KALTCHUK-SANTOS, E.; PALMA-SILVA, C.. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Species Biology*, v. 28, p. 169-176, 2013.
- PARK, N. I.; YEUNG, E. C.; MUENCH, D. G. Mago Nashi is involved in meristem organization, pollen formation, and seed development in Arabidopsis. *Plant Science*, v. 176, p. 461-469, 2009.
- PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R.; DE PROFT, S. Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, v. 125, p. 155-161, 2002.
- PAZ, J. R. L.; GIMENES, M.; PIGOZZO, C. M. Three timing of anthesis in *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae): implications for temporal, behavioral and morphological characteristics of pollinators? *Flora*, v. 208, n. 2, p. 138-146, 2013.
- PINANGÉ, D. S.; LOUZADA, R. B.; WÖHRMANN, T.; KRAPP, F.; WEISING, K.; ZIZKA, G.; POLO, É. M.; WANDERLEY, M. G. L.; BENKO-ISEPPON, A. M. Population genetics shed light on species delimitation and life history of the *Dyckia pernambucana* complex (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 192, n. 4, p. 706-725, 2020.
- PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de

armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 147-153, 2007.

PLITMANN, U.; LEVIN, D. A. Variação altitudinal em *Phlox drummondii*: diferenciação em características fisiológicas e componentes de aptidão. **Evolution**, v. 44, n. 5, p. 1221-1230, 1990.

POLATTO, L. P. Reprodução de plantas em um ecótono floresta Atlântica-Cerradão: dependência de agentes polinizadores. **Biodiversidade**, v. 19, n. 1, 2020.

RAMÍREZ, N.; BRITO, Y. Reproductive biology of tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. **American Journal of Botany**, v. 77, p. 1260-1271, 1990.

RAMOS, D. M.; DINIZ, P.; VALLS, J. F. M. Habitat filtering and interspecific competition influence phenological diversity in an assemblage of Neotropical savanna grasses. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 37, n. 1, p. 29-36, 2014.

RASBAND, W. S. **ImageJ, U. S.** National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

SAJO, M. G.; RUDALL, P. J.; PRYCHID, C. J. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. **Plant Systematics and Evolution**, v. 247, p. 215-231, 2004.

SAMPAIO, M. C.; PERISSÉ, L. E.; OLIVEIRA, G. A.; RIOS, R. I. The contrasting clonal architecture of two bromeliads from sandy coastal plains in Brazil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 197, n. 6, p. 443-451, 2002.

SANTOS, V. L.; NIEVOLA, C. C.; FIDALGO, A. O.; KANASHIRO, S.; WANDERLEY, M. G. L.; GOMES, E. P. C.; LUZ, C. F. P. Floral morphology and pollen viability of an endangered and endemic Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. **Grana**, v. 60, n. 5, p. 327-346, 2021.

SARASAN, V. A.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 206-214, 2006.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated Flower Assemblages and Bat Visitors at Two Atlantic Forest Sites in Brazil. **Annals of Botany**, v. 83, p. 705-712, 1999.

SCOGIN, R.; FREEMAN, C. E. Floral pigments and nectar constituents in the genus *Puya* (Bromeliaceae). **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 10, n. 4, p. 617-619, 1984.

SCROK, G. J.; VARASSIN IG. Reproductive biology and pollination of *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 571-576, 2011.

SHIVANNA, K. R. Reproductive assurance through autogamous self-pollination

across diverse sexual and breeding systems. **Current Science**, p. 1255-1263, 2015.

SILVA, D. F. D.; PIO, R.; NOGUEIRA, P. V.; SILVA, P. A. D. O.; FIGUEIREDO, A. L. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, p. 365-373, 2017.

SILVA, L. F. D. O. D.; ZAMBON, C. R.; PIO, R.; OLIVEIRA, A. F. D.; GONÇALVES, E. D. Establishment of growth medium and qualification of pollen grains of olive cultivars in Brazil 'subtropical áreas. **Bragantia**, v. 75, p. 26-32, 2016.

SILVA, R. P.; DANTAS, G. G.; NAVES, R. V.; CUNHA, M. G. Comportamento fenológico de videira, cultivar Patrícia, em diferentes épocas de poda de frutificação em Goiás. **Bragantia**, v. 65, p. 399-406, 2006.

SILVA, V. J. D.; RIBEIRO, E. M.; LUIZI-PONZO, A. P.; FARIA, A. P. G. Ultrastructure and pollen morphology of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest of southeastern Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, p. 439-449, 2016.

SOARES, T. L.; JESUS, O. N.; SOUZA, E. H.; SANTOS-SEREJO, J. A.; OLIVEIRA, E. J. Morphology and viability of pollen grains from passion fruit species (*Passiflora* spp.). **Acta Botanica Brasílica**, v. 27, n. 4, p. 779-787, 2013.

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 111-118, 2008.

SOUZA, E. H.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P. Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, v. 203, p. 118-125, 2016.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEAO, N.; LEDO, C. A. S.; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic Forest. **Euphytica**, v. 204, p. 13-28, 2015.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; PACKER, R. M.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; MARTINELLI, A. P. Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 3067-3082, 2017.

SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; CARVALHO COSTA, M. A. P.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 53-61, 2017.

SWANSON, R. J.; HAMMOND, A. T.; CARLSON, A. L.; GONG, H.; DONOVAN, T. K.. Pollen performance traits reveal prezygotic nonrandom mating and interference competition in *Arabidopsis thaliana*. **American Journal of Botany**, v. 103, p. 1-16, 2016.

TAGLIATI, M. C.; OLIVEIRA, H. C.; FARIA A. P. G. Fenologia reprodutiva, recursos florais e polinização de espécies de Bromeliaceae em um remanescente urbano de Floresta Atlântica do sudeste brasileiro. **Diversidade e Gestão**, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2018.

TANG, C.; ZHU, X.; QIAO, X.; GAO, H.; LI, Q.; WANG, P.; WU, J.; ZHANG, S. Characterization of the pectin methyl-esterase gene family and its function in controlling pollen tube growth in pear (*Pyrus bretschneideri*). **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2467-2477, 2020.

VARASSIN, I. G. **Estrutura espacial e temporal de uma comunidade de Bromeliaceae e seus polinizadores em Floresta Atlântica no sudeste do Brasil**. Tese (Universidade Estadual de Campinas), Brazil, 2002.

VAUGHTON, G.; RAMSEY, M.; JOHNSON, S. D. Pollination and late-acting self-incompatibility in *Cyrtanthus breviflorus* (Amaryllidaceae): implications for seed production. **Annals of Botany**, v. 106, p. 547-555, 2010.

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DEROOSE, R.; PROFT, M. P. Controlling prefertilization barriers by in vitro pollination and fertilization of Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, v. 572, p. 21-28, 2002.

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; MAENE, L.; DEROOSE, R.; PROFT, M. P. Prefertilization barriers between different Bromeliaceae. **Euphytica**, v. 118, p. 91-97, 2001.

VOSGUERITCHIAN, S. B.; BUZATO, S. Sexual reproduction of *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) and plant-animal interaction. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 433-442, 2006.

WAGNER, N. D.; WÖHRMANN, T.; ÖDER, V.; BURMEISTER, A.; WEISING, K. Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 2231-2246, 2015.

WANG, L.; WU, J.; CHEN, J.; FU, D.; ZHANG, C.; CAI, C.; OU L. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **Scientia Horticulturae**, v. 188, n. 4, p. 78-83, 2015.

WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; FARIA, A. P. G.; RIOS, R. I. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 88, p. 1760-1767, 2001.

WETZSTEIN, H. Y.; YI, W.; PORTER, A. J.; RAVID, N. Flower position and size impact ovule number per flower, fruit set, and fruit size in pomegranate. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, p. 159-166, 2013.

ZANELLA, C. M.; PALMA-SILVA, C.; GOETZE, M.; BERED, F. Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*.

Botanical Journal of the Linnean Society, v. 181, n. 3, p. 491-504, 2016.

ZAPATA, T. R.; ARROYO, M. T. K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. **Biotropica**, v. 10, n. 3, p. 221-230, 1978.

ZEISLER, M. Über die abgrenzung der igitlichen narbenfläche mit hilf von reaktionen. **Beihefte zum botanischen Centralblatt**, v. 58, p. 308-318, 1938.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO TRANSECTO DA FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE- LESTE (FIOL)¹

¹ Capítulo a ser ajustado e submetido para o Anais da Academia Brasileira de Ciências.

MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE BROMELIACEAE OCORRENTES NO TRANSECTO DA FERROVIA DE INTEGRAÇÃO OESTE-LESTE (FIOL)

RESUMO: A Mata Atlântica é rica em biodiversidade, mas enfrenta um declínio na diversidade genética de suas espécies, incluindo as bromélias. Este grupo taxonômico é amplamente encontrado nos ecossistemas, e medidas de conservação são essenciais para mitigar esse declínio genético e preservar a biodiversidade. As técnicas de cultura de tecidos vegetais têm se mostrado eficazes para a propagação em larga escala e conservação dessas espécies. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação in vitro, dia após a sementeira, de *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*, e quantificar o número médio de brotos por explante em tratamentos com diferentes concentrações de BAP, além de comparar a conservação in vitro em diferentes concentrações de sais de MS e condições de cultivo. Foi realizado o processo de germinação das sementes em ambiente controlado, utilizando metade da concentração de sais de MS, sem reguladores de crescimento, para promover o desenvolvimento das sementes. Posteriormente, as plântulas germinadas foram transferidas para meios de cultura MS adicionados de ANA e diferentes concentrações de BAP, possibilitando subcultivos e a continuidade do crescimento das plântulas. As plantas provenientes da germinação in vitro foram conservadas em uma sala a 18 ± 1 °C e em uma sala de crescimento a 25 ± 1 °C, com meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS. Este sistema revelou, na germinação in vitro, uma uniformidade entre os lotes de sementes e uma condição fisiológica de boa qualidade. O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi de 98% e 18,60 para *Hohenbergia castellanosii*, e de 100% e 23,62 para *Aechmea mertensii*. Em relação ao tempo médio de germinação, observou-se um discreto aumento no tempo médio de emergência das plântulas de *Hohenbergia castellanosii*. Para a multiplicação dos brotos, em todos os tratamentos, as maiores médias foram observadas em *Hohenbergia castellanosii*. Nos dois subcultivos, ao transferir o material vegetal para um novo meio, houve um incremento absoluto no número de brotações adventícias. No contexto da conservação in vitro, a utilização de meio de cultura com metade da concentração de sais de MS e a manutenção da sala de conservação a uma temperatura de 18 ± 1 °C, com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, resultaram na redução da altura das plantas, no número de folhas senescentes e no número de raízes. Como resultado, observou-se um aumento significativo no número de folhas verdes para ambas as espécies, tornando essas condições ideais para o processo de conservação.

Palavras chaves: Germinação; Multiplicação in vitro; Fitoreguladores; Conservação.

MICROPROPAGATION AND IN VITRO CONSERVATION OF BROMELIACEAE SPECIES OCCURRING ALONG THE TRANSECT OF THE WEST-EAST INTEGRATION RAILWAY (FIOL)

ABSTRACT: The Atlantic Forest is rich in biodiversity but is experiencing a decline in the genetic diversity of its species, including bromeliads. This taxonomic group is widely found in ecosystems, and conservation measures are crucial to address this genetic decline and preserve biodiversity. Plant tissue culture techniques have proven effective for large-scale propagation and conservation of these species. This study aimed to evaluate in vitro germination, one day after sowing, of *Aechmea mertensii* and *Hohenbergia castellanosii*, and to quantify the average number of shoots per explant in treatments with different concentrations of BAP. The study also compared in vitro conservation in different concentrations of MS salts and cultivation conditions. We germinated seeds in a controlled environment using half the concentration of MS salts, without growth regulators, to promote seed development. Then, we transferred the germinated seedlings to MS culture media with ANA and varying concentrations of BAP, allowing for subcultures and continued growth of the seedlings. We conserved the plants from in vitro germination in a room at 18 ± 1 °C and in a growth chamber at 25 ± 1 °C, using MS and $\frac{1}{2}$ MS culture media. This system revealed uniformity among seed lots and good physiological condition during in vitro germination. The Germination Velocity Index (IVG) was 98% and 18.60 for *Hohenbergia castellanosii*, and 100% and 23.62 for *Aechmea mertensii*. We observed a slight increase in the average emergence time of *Hohenbergia castellanosii* seedlings. For shoot multiplication, *Hohenbergia castellanosii* showed the highest averages across all treatments. In both subcultures, transferring the plant material to a new medium resulted in an absolute increase in the number of adventitious shoots. In the context of in vitro conservation, using culture media with half the concentration of MS salts and maintaining the conservation room at 18 ± 1 °C, with light intensity of $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a 12-hour photoperiod, reduced plant height, the number of senescent leaves, and the number of roots. As a result, we observed a significant increase in the number of green leaves for both species, making these conditions ideal for the conservation process.

Keywords: Germination; In vitro multiplication; Phytohormones; Conservation.

INTRODUÇÃO

As bromélias possuem diversas finalidades para o ecossistema, incluindo usos medicinais, alimentares e ornamentais. No entanto, sua preservação exige maiores esforços, uma vez que as áreas naturais estão cada vez mais reduzidas. Diante da exploração desses locais, as técnicas de cultura de tecidos vêm sendo utilizadas em áreas como silvicultura, biologia e agricultura, com a finalidade de minimizar os efeitos causados pelas ações antrópicas, visando a conservação de germoplasma, produção de mudas, comercialização, melhoramento genético e reflorestamento (Hartmann et al., 2014).

Nesse contexto, a germinação de sementes *in vitro* se apresenta como uma estratégia tanto para a produção em larga escala de mudas quanto para a preservação da diversidade genética (Corredor-Prado et al., 2019; Koufan et al., 2022). Assim, a germinação é um processo fisiológico em que mecanismos como a restauração e a reativação do metabolismo celular e a superação de estágios de dormência operam de forma simultânea ou sequencial (Ali; Elozeiri, 2017). Deste modo, os mecanismos germinativos das espécies vegetais são afetados pelo genótipo da planta, anatomia, regulação hormonal e classificação taxonômica, além de fatores ambientais como a presença ou ausência de patógenos, níveis de oxigênio, intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de água (Baskin, 2014; Carrera-Castaño et al., 2020).

Por outro lado, as técnicas de cultura de tecidos associadas à micropropagação visam a obtenção de mudas de alta qualidade, isentas de doenças, possibilitando a multiplicação em um curto período de tempo (Bramhanapalli et al., 2017; Souza et al., 2017). Logo, a composição do meio de cultura e o uso de hormônios reguladores de crescimento vegetal são fatores cruciais para o protocolo de micropropagação. Esses reguladores são compostos à base de substâncias sintéticas que imitam os efeitos dos hormônios naturais (Edwin et al., 2008; Flores et al., 2015). De acordo com Malá et al. (2013) e Silva et al. (2020), as citocininas, especialmente a benzilaminopurina (BAP), são empregadas em variadas concentrações e combinações em bromélias, com o objetivo de facilitar o avanço das técnicas de micropropagação vegetal e induzir a organogênese.

Nesse sentido, os métodos propagativos promovem o cultivo dos explantes em meio nutritivo, principalmente em condições assépticas (Silva et al., 2022; Souza et al., 2023), possibilitando a multiplicação, o desenvolvimento dos brotos, a

uniformidade das mudas, o enraizamento e a aclimatização em condições adequadas, com características superiores aos métodos convencionais (Mezzalira; Kuhn, 2020).

A conservação *in vitro*, conforme destacado por Arbeloa et al. (2017), em comparação com a preservação de plantas em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), exige menor espaço e proporciona maior proteção contra patógenos e variações somaclonais. Pode ser alcançada por meio da restrição na disponibilidade de nutrientes, baixa temperatura ou outras estratégias, a fim de manter as plantas em um estado de desenvolvimento mais controlado e prolongado. Essa técnica visa aumentar o período de subcultivo, reduzindo significativamente o espaço utilizado. A conservação *in vitro* também apresenta vantagens, como a redução da mão de obra, a produção de clones a partir de células ou tecidos e a diminuição do risco de perda do germoplasma, especialmente para espécies ameaçadas de extinção, proporcionando disponibilidade imediata para a propagação e facilidade de intercâmbio (Valois et al., 2001; Engelmann, 2011; Fao, 2019).

Diante disso o trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro*, dia após a sementeira, de *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*, e quantificar o número médio de brotos por explante em tratamentos com diferentes concentrações de BAP, além de comparar a conservação *in vitro* em diferentes concentrações de sais de MS e condições de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de frutos maduros de espécies de *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii* foram coletadas em populações naturais sob a influência direta da Ferrovia de Integração Oeste-Leste (FIOL).

Germinação *in vitro* das sementes

As sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e água destilada (2:1) por 20 minutos, seguidas de três lavagens em água destilada e autoclavada. Em seguida, foram estabelecidas em placas de Petri (100 x 20 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel®, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As sementes permaneceram por 60 dias em incubadoras tipo B.O.D.,

sob um fotoperíodo de 12 horas, com densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A avaliação da germinação foi cumulativa e realizada diariamente, até a estabilização do processo, que ocorreu entre oito e doze dias após o início da semeadura. Os dados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas. Foram colocadas 100 sementes por placa, com 4 repetições, totalizando 400 sementes por espécie. Consideraram-se germinadas as sementes que apresentaram a protrusão da raiz primária (Pereira et al., 2008). As porcentagens de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foram calculados conforme: $G (\%) = (N/A) \times 100$, onde N = número de sementes germinadas e A = número total de sementes; $IVG = \Sigma(G_i/n_i)$, onde G_i = número de sementes germinadas e n_i = dia da contagem. O tempo médio de germinação (TMG) foi calculado pela fórmula $TMG = (\Sigma n_i t_i) / \Sigma n_i$, em que: n_i = número de sementes germinadas por dia; t_i = tempo de incubação.

Multiplicação

Segmentos do caule com altura média de 0,5 cm foram retirados de 150 plântulas com aproximadamente 4 cm de altura, obtidas do experimento de germinação in vitro. Os segmentos foram estabelecidos em frascos contendo 50 mL do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com 2 g L^{-1} de Phytigel®, suplementado com ANA (ácido 1-naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina), constituindo os seguintes tratamentos: T01 = Controle MS; T02 = MS + $2,2 \mu\text{M}$ BAP + $0,05 \mu\text{M}$ ANA; T03 = MS + $4,4 \mu\text{M}$ BAP + $0,05 \mu\text{M}$ ANA; T04 = MS + $6,6 \mu\text{M}$ BAP + $0,05 \mu\text{M}$ ANA; T05 = MS + $8,8 \mu\text{M}$ BAP + $0,05 \mu\text{M}$ ANA. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem à temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A multiplicação foi realizada em dois subcultivos, pela subdivisão longitudinal dos rebentos sempre que possível, em intervalos de 45 dias. Para cada subcultivo, avaliou-se o número médio de brotações por explante. Foi utilizada uma regressão polinomial para avaliar o número de brotos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições, sendo cada repetição constituída por 5 explantes por frasco. As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

Conservação

Plântulas com aproximadamente 2 cm de comprimento, provenientes da germinação *in vitro*, foram estabelecidas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) e MS/2 com 2 g L⁻¹ de Phytigel® e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, onde permaneceram por 24 meses em condições de incubação em dois ambientes: a) temperatura de 25 ± 2 °C, intensidade luminosa de 22 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas; e b) temperatura de 18 ± 1 °C, intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (sais de MS x ambiente de cultivo), com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por uma plântula por tubo. Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura média da planta (cm), número médio de folhas verdes, número médio de folhas senescentes e número médio de raízes após 180, 365 e 571 dias de incubação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste F (p < 0,01). As análises foram realizadas no programa SAS Institute (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação das sementes

Na Tabela 1, estão expressos os dados referentes à porcentagem de germinação *in vitro*, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação de sementes (TMG) das duas espécies de Bromeliaceae (*Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*) em meio de cultura com metade da concentração de sais de MS. Com relação à germinação, esta ocorreu pela emissão da bainha cotiledonar com uma coifa distal. A germinação das sementes iniciou no 2º dia após a semeadura, estabilizando no 7º dia para *Aechmea mertensii* e no 12º dia para *Hohenbergia castellanosii* (Figura 1). Estes resultados demonstram a homogeneidade dos lotes e, conseqüentemente, a boa condição fisiológica das sementes. A germinação e o índice de velocidade de germinação variaram (Tabela 1) respectivamente entre 98% e 18,60 para *H. castellanosii*, e 100% e 23,62 para *A. mertensii*. Com relação ao tempo médio de germinação, verificou-se um ligeiro aumento no tempo médio de emergência das plântulas de *H. castellanosii*.

Tabela 1. Porcentagem de germinação in vitro, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação de sementes (TMG) em duas espécies de Bromeliaceae (*Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*) em meio de cultura com a metade da concentração de sais de MS.

Espécie	Germinação (%)	Índice de Velocidade de Germinação (IVG)	Tempo Médio de Germinação em dias (TMG)
<i>Aechmea mertensii</i>	100	23,62	4,51
<i>Hohenbergia castellanosii</i>	98	18,60	5,89

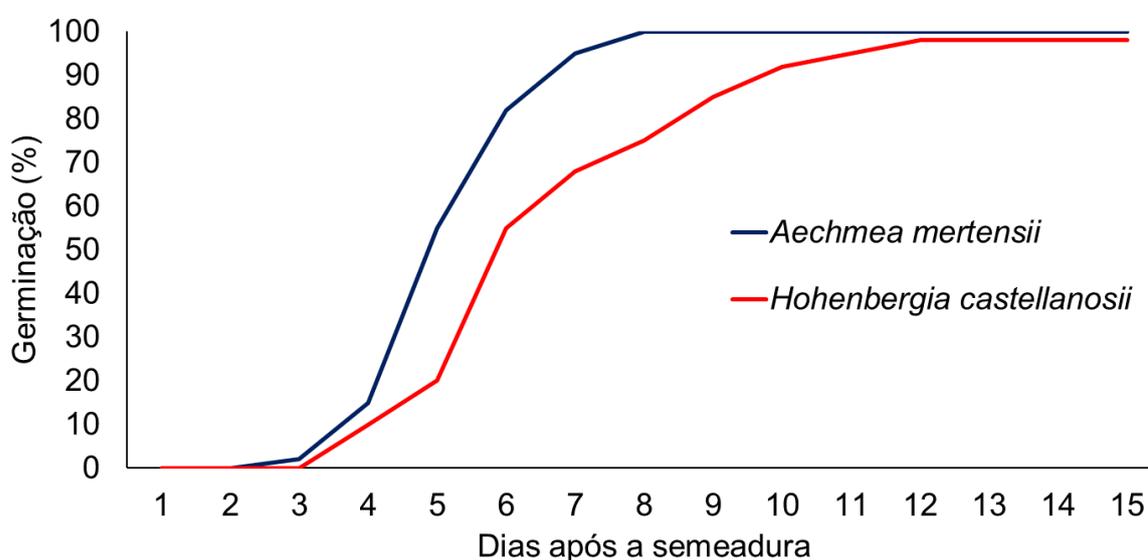


Figura 1. Porcentagem de germinação in vitro em meio de cultura com a metade da concentração de MS de duas espécies de Bromeliaceae (*Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*) ao longo dos 15 dias.

Aechmea mertensii apresentou um tempo médio de germinação (TMG) de 4,51 dias, enquanto *Hohenbergia castellanosii* apresentou um TMG de 5,89 dias (Tabela 1). Isso indica que *A. mertensii* possui um período médio de germinação mais curto, apontando maior eficiência no processo de germinação. A germinação de sementes é um processo complexo que se inicia com a fase de embebição, na qual a semente reativa seu metabolismo, realiza eventos celulares cruciais para permitir a emergência do embrião e se prepara para o desenvolvimento da plântula,

como descrito por Nonogaki et al. (2010), Obroucheva et al. (2017), Lozano-Isla et al. (2017) e Carrera-Castaño et al. (2020).

Conforme observado por Ferreira et al. (2020), diversos fatores, como a coleta das sementes, o manejo adequado, as condições de armazenamento e as variáveis experimentais, têm o potencial de influenciar o tempo associado à germinação. Assim, o método de desinfecção empregado neste trabalho também pode ter contribuído para a redução do tempo médio de germinação.

Bewley et al. (2013) observaram que o controle da temperatura exerce influência sobre a taxa de absorção de água pelas sementes, o que, por sua vez, afeta a porcentagem geral, a velocidade e a uniformidade do processo de germinação. Em contraste, neste trabalho, *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*, assim como outras espécies de bromélias descritas na literatura, alcançaram níveis significativamente elevados de germinação. Por exemplo, *Vriesea cacuminis* alcançou 95% de germinação (Resende et al., 2016), e *V. philippocoburgii* (99%) e *V. reitzii* (100%) foram relatados por Pradella et al. (2022).

No estudo de Corredor Prado et al. (2023), a germinação de *Vriesea friburgensis* alcançou uma alta taxa de germinação (98%) em meio de cultura com a formulação padrão do meio MS. Kievitsbosch (2011) observou que a germinação in vitro de *V. friburgensis* foi mais rápida em comparação com a germinação in situ, iniciando entre o terceiro e o quarto dia após a inoculação. Em contraste, Santa Rosa (2010) realizou testes de germinação in vitro em *Aechmea distichantha* em ágar e meio líquido, obtendo uma taxa de germinação que variou de 46% a 60%.

Esses resultados podem ser contrastados com os obtidos por Arrigoni-Blank et al. (2013) em seu estudo com sementes de *Bromelia laciniosa*, que apresentaram índices de germinação variando de 0,60 a 0,62 quando as sementes foram cultivadas em meios líquidos e em meios gelificados com ágar. Segundo os autores, a alta concentração de sais no meio pode variar em função do potencial osmótico, impactando a disponibilidade de água para absorção pelas sementes durante o processo de germinação. Logo, a escolha do meio de germinação, as condições fisiológicas das sementes, seu grau de maturidade e as condições de incubação demonstraram ter um impacto significativo na germinação das sementes sob as condições avaliadas (Zeng et al., 2013).

As taxas de germinação citadas por Santa Rosa (2010) e Arrigoni-Blank et al. (2013) foram inferiores quando comparadas com os resultados obtidos para

Aechmea mertensii e *Hohenbergia castellanosii*, indicando que o meio utilizado neste estudo foi eficaz para a germinação das sementes. Sementes cultivadas em meios de cultura in vitro apropriados e sob condições controladas oferecem o ambiente e os nutrientes propícios para estimular a germinação e, posteriormente, o desenvolvimento das plântulas (Souza et al., 2009). Esses resultados para *A. mertensii* e *H. castellanosii* sugerem uma relação com outras espécies de bromélias, nas quais as maiores taxas de germinação ocorrem quando as sementes apresentam altos níveis de umidade, como evidenciado nos casos de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker e *Puya santosii* Cuatrec. (Calderón-Hernández; Pérez-Martínez, 2018).

Por outro lado, a germinação das espécies estudadas atingiu resultados significativos por não haver contaminação por microrganismos patogênicos (Stefenon et al., 2020; Afonso et al., 2018). Ao comparar com o estudo de Santa Rosa (2010), que utilizou sementes de *A. blanchetiana* na propagação in vitro e encontrou 14,3% de contaminação por fungos, a ausência de contaminação neste estudo pode estar relacionada a problemas na esterilização, manuseio inadequado e possíveis resíduos de mucilagem nas sementes. Como afirmado por Grossi (2000), a mucilagem que envolve a maioria das sementes de bromélias torna a esterilização um desafio. Sendo assim, a prática adequada resulta na redução das taxas de contaminação e minimiza o risco de instabilidade genética, conforme indicado por Benelli et al. (2022).

Portanto, é de grande importância compreender todos os fatores que podem influenciar o êxito da germinação e do desenvolvimento de cada espécie, com o propósito de alcançar resultados de alta qualidade no estabelecimento de plântulas in vitro. A germinação in vitro de sementes viabiliza a obtenção de altas taxas de multiplicação, sem depender das condições climáticas ou de fatores bióticos, como dispersores, competição por recursos ou interações simbióticas, como o mutualismo entre plantas e microrganismos do solo (Generoso et al., 2019). Os resultados apresentados neste estudo demonstram que as sementes de *A. mertensii* e *H. castellanosii* são viáveis e exibem uma qualidade fisiológica elevada. Esses dados são úteis para entender o comportamento da germinação e podem ser importantes para a produção de mudas e cultivo, bem como para pesquisas relacionadas à ecologia e conservação de plantas. Assim, estudos futuros podem explorar os mecanismos dessas diferenças de germinação.

Multiplicação in vitro

A multiplicação dos brotos foi realizada em todos os tratamentos avaliados. As maiores médias observadas foram para *Hohenbergia castellanosii*, com 50,4 brotações por explante nos dois subcultivos, enquanto *Aechmea mertensii* produziu em média 22,3 brotos, cerca de 30 brotos a menos. Em relação ao efeito dos subcultivos sobre o número de brotos, foi possível constatar que, à medida que o material vegetal foi transferido para um novo meio, houve um incremento nos valores absolutos do número de brotações adventícias ao longo do tempo (Figura 2), provenientes do meio MS suplementado com sacarose, ácido 1-naftalenoacético (ANA) e variadas concentrações de reguladores de crescimento, como benzilaminopurina (BAP) (Pasqual et al., 2008; Moraes et al., 2010; Souza et al., 2012).

Considerando os diferentes meios de cultura, os tratamentos T02 (MS + 2,2 μ M BAP + 0,05 μ M ANA) e T03 (MS + 4,4 μ M BAP + 0,05 μ M ANA) foram os mais eficientes na indução de brotação para *Aechmea mertensii*, permitindo a formação de 5,25 e 11,85 brotos, respectivamente. Já os tratamentos T03 (MS + 4,4 μ M BAP + 0,05 μ M ANA) e T04 (MS + 6,6 μ M BAP + 0,05 μ M ANA) foram mais significativos para o número médio de brotos por explante em *Hohenbergia castellanosii*, demonstrando que as espécies apresentam diferentes respostas morfogênicas in vitro.

A Figura 2 apresenta os resultados do número médio de brotos em dois subcultivos de duas espécies de Bromeliaceae (*H. castellanosii* e *A. mertensii*) estabelecidas in vitro, utilizando cinco tratamentos. Os valores do número médio de brotos estão expressos de acordo com os tratamentos, subcultivos e espécies, utilizando diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP).

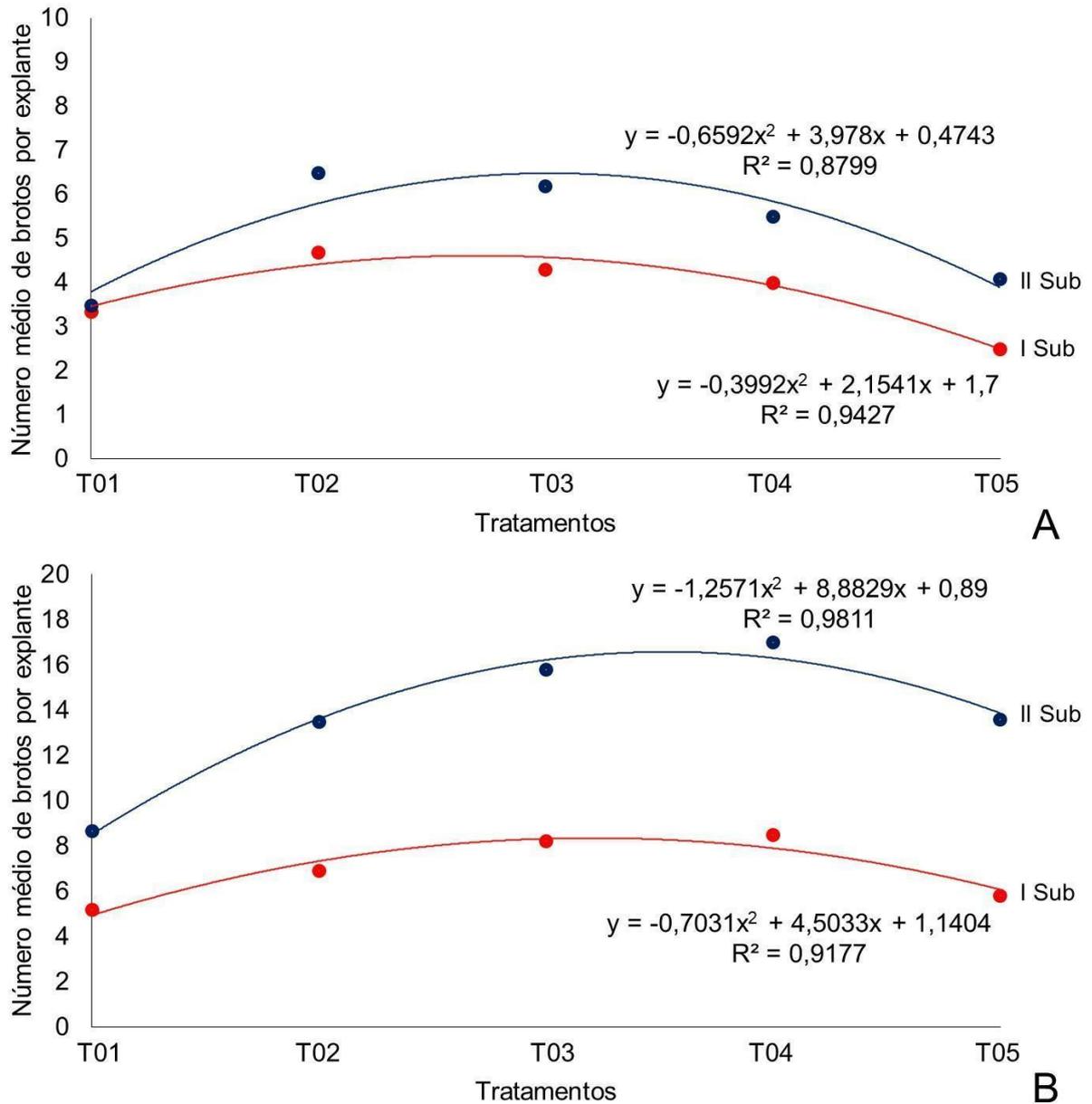


Figura 2. Multiplicação in vitro de duas espécies de Bromeliaceae (A) *Aechmea mertensii* e (B) *Hohenbergia castellanosii* nos diferentes tratamentos (T01 = Controle MS; T02 = MS + 2,2 μ M BAP + 0,05 μ M ANA; T03 = MS + 4,4 μ M BAP + 0,05 μ M ANA; T04 = MS + 6,6 μ M BAP + 0,05 μ M ANA; T05 = MS + 8,8 μ M BAP + 0,05 μ M ANA) em dois subcultivos com intervalo de 45 dias.



Figura 3. Multiplicação in vitro de duas espécies de Bromeliaceae (A) *Aechmea mertensii* e (B) *Hohenbergia castellanosii* nos diferentes tratamentos (T01 = Controle MS; T02 = MS + 2,2 μM BAP + 0,05 μM ANA; T03 = MS + 4,4 μM BAP + 0,05 μM ANA; T04 = MS + 6,6 μM BAP + 0,05 μM ANA; T05 = MS + 8,8 μM BAP + 0,05 μM ANA) aos 90 dias, antes da aclimatização.

Em outros trabalhos, ao utilizar o meio MS com *Ananas lucidus* Miller estabelecido com concentração de 1,0 mg L^{-1} de BAP e 0,1 mg L^{-1} de ANA, foram atingidos 32,6 brotos por explante (Borges et al., 2003). Nas pesquisas desenvolvidas por Carvalho et al. (2009), ao investigar a micropropagação de abacaxi ornamental, foi alcançada uma maior formação de brotações com uma média de 3,75 brotos por explante ao utilizar 13,32 μM de BAP. Galvanese et al. (2007) constataram que a combinação de 6,0 mg L^{-1} de BAP com 1,0 mg L^{-1} de ANA em meio MS semi-sólido resultou em uma média de 62 brotações por explante após 180 dias de cultivo em plantas de *Aechmea blanchetiana*. Pasqual et al. (2008) alcançaram uma média de 21 brotações por explante em *Ananas comosus* utilizando uma concentração de 1,5 mg L^{-1} de BAP.

Em estudos posteriores, Da Silva (2022) constatou que a adição de regulador de crescimento (BAP) resultou em uma modificação do equilíbrio hormonal nos

explantes de *Aechmea setigera*, influenciando o direcionamento dos recursos para o desenvolvimento das plantas. Essa influência elevou o número de brotações, revelando uma relação positiva com o aumento da concentração de BAP. Conforme Faria et al. (2018), na micropropagação de *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f., uma alta concentração de Benzilaminopurina (6 μM) resultou em produção de brotos menores. Santa Rosa et al. (2013) observaram um efeito inibitório significativo ao empregar uma concentração elevada do regulador de crescimento, indicando que o maior número de brotos por explante foi gerado por plantas cultivadas em meio contendo uma menor concentração de Benzilaminopurina (BAP), correspondente a 2,2 μM . Isso coincide com os resultados apresentados neste estudo para *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii* utilizando a concentração de 2,2 μM de BAP.

A utilização de concentrações elevadas de reguladores de crescimento, como o BAP, pode aumentar o número de brotações em culturas in vitro, mas também está associada a um maior risco de ocorrência de variação somaclonal (Bairu et al., 2011; Pinto et al., 2023). Essa variação somaclonal refere-se às mudanças genéticas que ocorrem nas células de plantas durante o cultivo in vitro, resultando em plantas com características genéticas diferentes das plantas-mãe.

Por outro lado, Dal Vesco et al. (2001) relataram uma taxa média de multiplicação de 11,9 brotos por explante em *Aechmea fasciata*, quando cultivadas em meio de cultura MS suplementado com 2 μM de Ácido Naftalenoacético (ANA) e 4 μM de Benzilaminopurina (BAP). Em estudos anteriores, Calixto e Siqueira (1996) constataram que não houve uma diferença significativa no abacaxizeiro ao variar os níveis de Benzilaminopurina (BAP) de 0 a 14 mg L^{-1} . No entanto, Moreira et al. (2003) ao estudar a espécie de abacaxi Pérola utilizando o meio de cultura MS enriquecido com 1,8 mg L^{-1} de Ácido Naftalenoacético (ANA) e 2 mg L^{-1} de Benzilaminopurina (BAP), demonstraram maior eficácia no número de brotos, embora tenha havido formação de massa de calos. Esses calos, obtidos em condições in vitro, são caracterizados por uma organização celular não específica, apresentando gradientes de nutrientes e reguladores do crescimento, conforme observado por Golle et al. (2020).

Embora a proliferação de brotos adventícios em *Tillandsia eizii* a partir de calos em uma combinação de ácido 1-naftalenoacético e citocinina tenha resultado em um maior número de brotos quando comparada à germinação convencional de

sementes (Pickens et al., 2006), as auxinas são classificadas como fitohormônios devido à sua capacidade de induzir respostas em plantas em níveis metabólicos, genéticos e anatômicos. A incorporação dessas substâncias ocorre em concentrações que variam de micromolar (μM) a milimolar (mM). Para lidar com essa variação de concentração, é comum preparar soluções concentradas em água, referidas como soluções estoque. Esse procedimento é justificado pela inviabilidade de realizar várias pesagens de pequenas quantidades de auxinas repetidamente para cada litro de meio de cultura utilizado (Coutinho Neto et al., 2023).

As divergências observadas entre os resultados deste estudo e aqueles obtidos por outros pesquisadores provavelmente decorrem das variações genéticas das plantas, bem como das metodologias distintas empregadas. O BAP é uma das citocininas mais utilizadas na indução de brotos devido à sua capacidade de atuar na parte aérea (Komakech et al., 2020; Kornatskiy, 2020). No entanto, Pierik et al. (1984) já haviam apresentado a eficácia do Ácido Naftalenoacético (ANA) na promoção do crescimento da parte aérea de plantas pertencentes à família Bromeliaceae (Oliveira; Cauduro et al., 2016).

No estudo desenvolvido por Teixeira et al. (2023), constatou-se que o uso de BAP resultou em um aumento em *Nidularium minutum*. Entretanto, para que *N. minutum* atingisse uma taxa de brotação superior a 90%, foi necessário um período mais prolongado de 240 dias, em comparação com *Nidularium procerum* e *Nidularium inocenteii*, que atingiram mais de 90% de brotação em 120 dias ao utilizar $4 \mu\text{M}$ ($\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$) de BAP e $2 \mu\text{M}$ de ANA ($0,37 \text{ mg L}^{-1}$). Em estudo de Silva et al. (2012), *Nidularium procerum* e *Nidularium inocenteii* necessitaram de 120 dias para atingir uma taxa de produção de brotos de 61% a 100%, respectivamente, ao utilizar $4 \mu\text{M}$ ($\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$) de BAP e $2 \mu\text{M}$ de ANA ($0,37 \text{ mg L}^{-1}$).

Da Silva (2022) constatou que a adição de regulador de crescimento ao meio de cultura favoreceu a indução de brotações durante o cultivo in vitro de *Aechmea setigera*. Embora o cultivo de plantas na ausência de BAP para *Aechmea setigera* tenha resultado em uma taxa de multiplicação baixa, com a produção de apenas 2,2 brotos por explante. Esses resultados apresentaram semelhança quando comparados com as respostas obtidas neste estudo no tratamento 1, tanto para *A. mertensii* quanto para *H. castellanosii*.

As citocininas, entre outras atuações, agem estimulando a formação de brotos, principalmente quando associadas a uma auxina. No entanto, a natureza e a

concentração desses reguladores variam de acordo com a espécie (Gana, 2010). As citocininas apresentam receptores celulares que, conforme Sakakibara (2006), podem variar entre as espécies vegetais, conferindo especificidades na interação citocinina-receptor, onde o processo de reconhecimento molecular das citocininas envolve modificações das cadeias laterais ligadas à adenina.

Portanto, esses resultados comparados a outros trabalhos acadêmicos indicam que o número de subcultivos influencia a adaptação dos explantes às novas condições estabelecidas, de forma que detectam, reconhecem e absorvem os reguladores de crescimento e, em uma fase posterior, respondem a esses estímulos (Pasqual et al., 2008). Essas formulações de meios básicos e diferentes concentrações ou combinações de reguladores de crescimento têm a finalidade de adequar-se às necessidades de cada espécie vegetal, induzindo respostas como crescimento, enraizamento e multiplicação da parte aérea (Pasqual et al., 2004; Villa et al., 2010). Nessa perspectiva, esses resultados têm importantes implicações para a prática de cultivo *in vitro* das espécies de Bromeliaceae, fornecendo informações para o manejo e a produção em escala (Ciano et al., 2021).

Logo, a multiplicação envolve procedimentos que permitem a propagação de plantas *in vitro* em condições assépticas, reduzindo a periodicidade de subcultivos e proporcionando condições adequadas para o crescimento. Além disso, diminui o trabalho manual e o risco de contaminação (Ozudogru et al., 2010). O processo de multiplicação *in vitro* é adaptado conforme as especialidades de cada espécie, assim como a estratégia adotada, seja a curto, médio ou longo prazo em ambiente controlado na produção de mudas e conservação de germoplasma (Benelli et al., 2022).

Conservação

Os resultados obtidos sobre a conservação *in vitro* de duas espécies de Bromeliaceae, *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*, em diferentes concentrações de sais de MS e condições de cultivo ao longo de 540 dias de avaliação, forneceram respostas para as seguintes variáveis: Altura Média da Planta (cm), Número Médio de Folhas Verdes, Número Médio de Folhas Senescentes e Número Médio de Raízes (Tabela 2).

Tabela 2. Conservação in vitro de duas espécies de Bromeliaceae (*Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*) nas diferentes concentrações de sais de MS e condições de cultivo (sala de conservação = 18 ± 1 °C e sala de crescimento = 25 ± 1 °C) ao longo de 540 dias de avaliação.

Tratamento	180 dias		360 dias		540 dias	
	½ MS	MS	½ MS	MS	½ MS	MS
<i>Aechmea mertensii</i>						
Altura Média de Planta (cm)						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	4,58aA	4,85Aa	5,78Ab	6,96aA	7,77aB	8,98aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	3,12bA	3,25Ba	4,58Ba	5,12bA	6,12bB	7,58bA
Número Médio de Folhas Verdes						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	10,21aA	12,10Aa	9,85Aa	10,25aA	8,52aA	7,85aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	10,05aA	11,52Aa	9,95Aa	9,25aA	9,25aA	8,55aA
Número Médio de Folhas Senescentes						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	0,12aA	0,15Aa	3,10 aA	3,50 aA	4,15 aA	4,68 aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	0,09aA	0,00Aa	1,93 bA	1,78 bA	3,05 bA	3,12 bA
Número Médio de Raizes						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	3,87aA	4,12Aa	6,78aA	7,10aA	8,75aA	9,33aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	3,12aA	3,54Aa	6,55aA	7,36aA	7,78aA	8,10aA
<i>Hohenbergia castellanosii</i>						
Altura Média de Planta (cm)						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	5,95aA	6,83Aa	8,14aA	9,10aA	10,95aA	11,21aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	4,92bA	5,12Ba	6,87bA	7,13bA	8,95bA	9,13bA
Número Médio de Folhas Verdes						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	7,35aA	7,85Aa	6,98aA	7,21aA	4,85bA	4,25bA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	6,78aA	7,21Aa	7,33aA	7,50aA	6,85aA	6,12aA
Número Médio de Folhas Senescentes						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	0,35aA	0,50Aa	4,15 aA	5,12 aA	5,20 aB	6,90 aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	0,00aA	0,00Aa	2,98 bA	3,05 bA	3,08 bB	4,98 bA
Número Médio de Raizes						
Sala de crescimento (25 ± 1 °C)	4,50aA	4,87Aa	8,12aB	10,25aA	10,12aB	12,33aA
Sala de conservação (18 ± 1 °C)	4,12aA	4,32Aa	6,10bB	7,66bA	8,10bB	9,71bA

No tratamento com meio ½ MS, a altura média das plantas de *Aechmea mertensii* apresentou 3,12 cm após 180 dias e 6,12 cm após 540 dias. No entanto, ao utilizar o meio MS, as plantas registraram uma elevação na altura média de 3,25 cm em 180 dias para 7,58 cm ao final dos 540 dias. Portanto, o meio de cultura ½

MS demonstrou melhores resultados na conservação de *Aechmea mertensii*, resultando em uma redução na altura das plantas.

Ferreira et al. (2013) observaram que, ao utilizar o meio de cultura MS mantido a uma temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, a sobrevivência de *Ananas lucidus* foi superior a 70% ao longo de 470 dias de observação, mesmo quando submetido a irradiâncias de 35, 45 e $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A redução da temperatura tem sido amplamente empregada na conservação in vitro de plantas, como destacado por Costa, Spehar e Sereno (2012). Assim, a combinação de luz e temperatura pode aumentar a eficácia da conservação in vitro, ao reduzir o metabolismo das plantas sem comprometer sua viabilidade (Silva et al., 2016).

Em um ambiente de cultivo mantido a uma temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, foi observado que a espécie *Aechmea mertensii* (Figura 3) apresentou variações na altura média das plantas ao longo de um período de 540 dias, quando submetida a diferentes tratamentos. No tratamento com $\frac{1}{2}$ MS, a altura média das plantas variou de 4,58 cm no início do período (180 dias) para 7,77 cm ao final dos 540 dias. Por outro lado, ao utilizar o MS, a altura média partiu de 4,85 cm em 180 dias, chegando a 8,98 cm após 540 dias. Com uma temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, *Aechmea mertensii* também apresentou variações nas alturas médias, embora em níveis inferiores em comparação com a sala de crescimento.

Posteriormente, a *Hohenbergia castellanosii* (Figura 3), cultivada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no tratamento $\frac{1}{2}$ MS, mostrou um aumento na altura média da planta de 5,95 cm em 180 dias para 10,95 cm em 540 dias. No entanto, ao utilizar o MS, a altura média partiu de 6,83 cm em 180 dias, atingindo 11,21 cm em 540 dias. Sob condições de cultivo a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, *Hohenbergia castellanosii* com $\frac{1}{2}$ MS apresentou uma altura média de 4,92 cm em 180 dias, alcançando 8,95 cm em 540 dias. Utilizando MS, a altura média partiu de 5,12 cm em 180 dias, chegando a 9,13 cm em 540 dias. Nessas condições, a altura média das plantas foi superior ao longo de 540 dias utilizando $\frac{1}{2}$ MS.

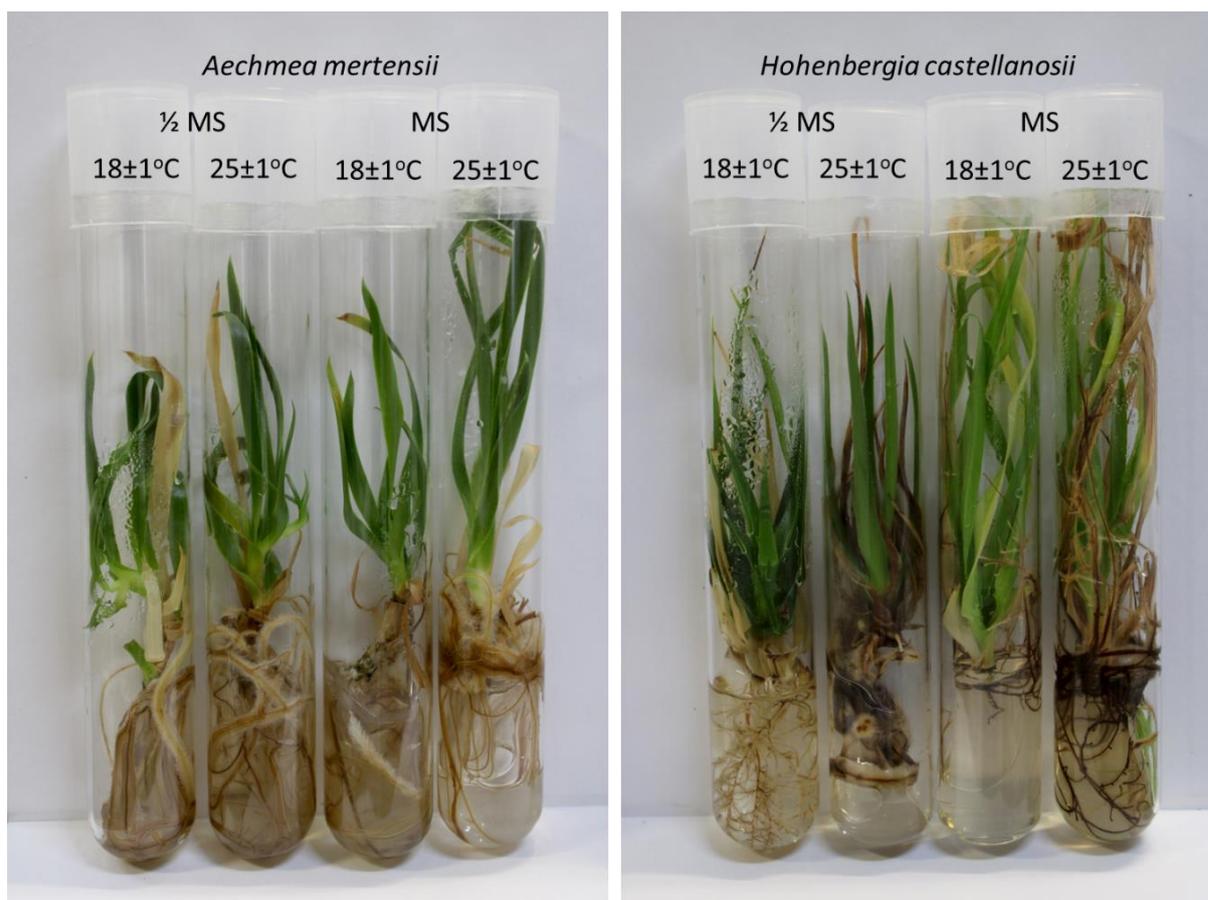


Figura 3. Conservação in vitro de duas espécies de Bromeliaceae (*Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*) nas diferentes concentrações de sais de MS e condições de cultivo (sala de conservação = $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e sala de crescimento = $25 \pm 1^\circ\text{C}$) aos 540 dias de avaliação.

Assim, conforme destacado por Jiménez (2010), a intensidade de luz é um fator crítico que influencia o êxito da conservação in vitro de espécies vegetais. Em contrapartida, Ferreira et al. (2013) apontaram que, nos resultados da pesquisa com *Ananas lucidus*, uma espécie originária da região amazônica utilizada como fonte de fibras para a fabricação de cordas, cestos e redes, e na sala de crescimento suplementada com MS, mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e irradiação de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os resultados mostraram alturas médias superiores às irradâncias de 35, 45 e $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Gonçalves et al., 2018).

Todavia, em estudos anteriores, Joyce et al. (2003) e Kohpail et al. (2017) destacaram que a utilização de reguladores de crescimento em meios de cultura está associada a variações somaclonais. Sequencialmente, Carneiro e Mansur (2004) ressaltaram que essas variações são indesejáveis, principalmente quando se almeja a uniformidade na produção ou preservação do genótipo original, sem

ocorrência de mutações que comprometam programas de conservação. Logo, Silva (2022) constatou que as folhas das plantas cultivadas em meio sem regulador de crescimento atingiram um comprimento de 10,0 cm, enquanto aquelas submetidas a uma concentração mais elevada de BAP apresentaram um comprimento de 4,2 cm.

Por outro lado, ao analisar o número médio de folhas verdes de *Aechmea mertensii* mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, verificou-se que, ao empregar $\frac{1}{2}$ MS, o número variou de 10,21 em 180 dias para 8,52 em 540 dias. Em contrapartida, ao utilizar o MS, o número médio de folhas verdes foi de 12,10 em 180 dias, alcançando 7,85 em 540 dias. *Aechmea mertensii* sob temperatura controlada a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, no tratamento com $\frac{1}{2}$ MS, apresentou um número médio de folhas verdes de 10,05 em 180 dias para 9,25 em 540 dias. Com MS, o número médio de folhas verdes foi de 11,52 em 180 dias, chegando a 8,55 em 540 dias. Na sala de conservação, o $\frac{1}{2}$ MS demonstrou mais eficiência no desenvolvimento do número médio de folhas verdes para *Aechmea mertensii*.

A temperatura é reconhecida como um dos principais fatores determinantes na preservação de espécies, tendo influência significativa na taxa de absorção de água e na reativação das reações metabólicas. Essas soluções metabólicas são essenciais para os processos de mobilização de reservas e o crescimento das plantas (Coelho et al., 2011). Todavia, no trabalho de Aoyama et al. (2012) com *Alcantarea imperialis*, foi constatado que, em relação ao número de folhas, somente após um período de seis meses as plântulas cultivadas in vitro apresentaram resultados superiores em comparação às plântulas cultivadas fora do ambiente controlado. Deste modo, Silva (2018) descreveu que a elevação das temperaturas pode resultar em um incremento no metabolismo das plantas, resultando em um aumento na altura e no número de folhas.

Em trabalhos posteriores, Silva et al. (2022) constataram que o número médio de folhas por broto manteve-se próximo de quatro em todos os tratamentos com *Aechmea setigera*, e certificaram que a adição de BAP não teve efeitos significativos. Porém, em outra pesquisa, *Alcantarea nahoumii* foi submetida ao tratamento contendo uma concentração de sais equivalente à metade daquela presente no meio MS, e demonstrou um crescimento reduzido comparado ao MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, que favoreceu maior crescimento tanto da parte aérea quanto do número de folhas, de acordo com Santos et al. (2020).

No entanto, com a temperatura de 25 ± 1 °C, os resultados revelaram que *H. castellanossii*, no tratamento com $\frac{1}{2}$ MS, apresentou um número médio de folhas verdes que variou de 7,35 em 180 dias para 4,85 em 540 dias. No tratamento com MS, esses números partiram de 7,85 em 180 dias, reduzindo para 4,25 em 540 dias. Para *H. castellanossii* a 18 ± 1 °C, com $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de folhas verdes foi de 6,78 em 180 dias para 6,85 em 540 dias. Com MS, o número médio de folhas verdes partiu de 7,21 em 180 dias, chegando a 6,12 em 540 dias. É importante observar que, à temperatura de 18 ± 1 °C, *H. castellanossii* no meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS resultou em maior capacidade de desenvolvimento do número médio de folhas verdes.

Assim, Faria (2018) destacou que a porção basal das folhas apresenta células que induzem eventos morfogenéticos no meio de cultura. Deste modo, nos resultados das pesquisas de Santos et al. (2020) com outras espécies de bromélias, a prática de reduzir as concentrações de sais e sacarose em um meio de cultura MS foi empregada com sucesso na conservação in vitro por um período que varia de 12 a 24 meses. Esse período de 24 meses sem a necessidade de subcultivo é considerado altamente satisfatório para a manutenção de bancos de germoplasma in vitro. Logo, essa prática de redução das concentrações de sais já havia sido observada, por exemplo, em espécies como *Aechmea fasciata* e *Aechmea miniata* Baker (Costa et al. , 2012), *Vriesea reitzii* (Rech Filho et al., 2005) e *V. philippocoburgii* Wawra (Droste et al., 2005).

Em outros estudos, pesquisadores usaram explantes de folhas de bromélias como meio de propagação vegetativa (Silva et al., 2009). Essa prática é justificada devido à competência das células localizadas no elemento vaso, na região basal das folhas, para o processo de rediferenciação (Souza et al., 2017). Portanto, é relevante proceder a uma avaliação de todas as variáveis em questão antes de tomar uma decisão quanto ao tratamento mais apropriado, não se limitando apenas à mensuração do tamanho das plantas.

Contudo, no âmbito da conservação in vitro, um dos parâmetros de maior relevância é a contagem de folhas senescentes, uma vez que esse fator constitui um indicador do estado fisiológico mais avançado da planta (Santos et al., 2020). Assim, para *Aechmea mertensii* mantida a 25 ± 1 °C, os resultados indicaram que, no tratamento com meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de folhas senescentes variou de 0,12 em 180 dias para 4,68 em 540 dias. No tratamento com MS, esse

número partiu de 0,15 em 180 dias, alcançando 4,15 em 540 dias. Por outro lado, para *Aechmea mertensii* com temperatura controlada a 18 ± 1 °C, no tratamento com meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de folhas senescentes variou de 0,09 em 180 dias para 3,05 em 540 dias. Já no tratamento com meio de cultura MS, o número médio de folhas senescentes partiu de 0,00 em 180 dias, aumentando para 3,12 em 540 dias. Logo, o tratamento com $\frac{1}{2}$ MS foi ligeiramente melhor, apresentando menores números de folhas senescentes na sala de conservação.

Os resultados alcançados para essa variável podem estar relacionados à capacidade de cada genótipo de absorver maiores quantidades de água e nutrientes e de responder a estímulos específicos de acordo com as concentrações de sais e condições de cultivo. Logo, as auxinas naturalmente sintetizadas desempenham funções em diversos processos nas plantas, incluindo a senescência, e aumentos nos níveis de auxinas por meio de suplementação podem influenciar no aumento da senescência de folhas em culturas in vitro (Kerbaui, 2019).

Deste modo, a senescência é um processo fisiológico regulado por vários fatores, entre os quais se destaca a distribuição das citocininas das raízes para as folhas, citando a zeatina ribosídeo e diidrozeatina ribosídeo como as principais substâncias envolvidas na senescência foliar, de acordo com Coutinho Neto et al. (2023). Desta forma, a senescência é um evento metabólico que representa um obstáculo na expansão das culturas in vitro de diversas espécies vegetais (Oliveira et al., 2007) e é regulada por ações coordenadas em vários níveis, que incluem células, tecidos, órgãos e o organismo como um todo (Lim; Nam, 2007).

Nesse trabalho, a 25 ± 1 °C, o número médio de folhas senescentes nas espécies *Hohenbergia castelanosii* variou significativamente com base no tipo de meio de cultura utilizado. No tratamento com meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de folhas senescentes iniciou em 0,35 em 180 dias, evoluindo para 5,20 em 540 dias. No tratamento com meio de cultura MS, o número médio de folhas senescentes começou em 0,50 em 180 dias, aumentando para 6,90 em 540 dias.

À temperatura de 18 ± 1 °C, *H. castellanossii* novamente apresentou variações no número médio de folhas senescentes com base no meio de cultura empregado. No tratamento com $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de folhas senescentes obteve médias de 0,00 em 180 dias, atingindo 3,08 em 540 dias. Com MS, o número médio de folhas senescentes começou em 0,00 em 180 dias, aumentando para 4,98 em 540 dias. O $\frac{1}{2}$ MS na sala de conservação para *H. castellanossii* apresentou

menor incidência de folhas senescentes em comparação ao meio de cultura MS, resultando em uma maior longevidade foliar.

No trabalho de Aoyama (2012), a senescência foliar apresentou um padrão crescente a partir do sexto mês, culminando no décimo segundo mês, com uma média de nove folhas senescentes ao final do período de doze meses. Conforme apontado por Rodrigues, Arruda e Forti (2018), o processo de senescência pode ser intensificado devido ao estresse *in vitro*, resultante da restrição das trocas gasosas ou da insuficiência de nutrientes. Em contrapartida, no experimento realizado com *Alcantarea nahoumii*, não se constataram discrepâncias significativas no quantitativo de folhas senescentes, evidenciando que, embora o tratamento com concentração típica de sais no meio MS e 30 g L⁻¹ de sacarose tenha induzido um crescimento superior, não houve manifestações de dano ou envelhecimento nas plantas de *Alcantarea nahoumii* submetidas a este método de conservação (Santos et al., 2020).

Além disso, no que diz respeito às bromélias, a morfogênese *in vitro* é influenciada pela fonte dos explantes, resultando em organogênese direta, que influencia na formação de brotação e raízes (Faria et al., 2018). Para *Aechmea mertensii* mantida a 25 ± 1 °C, os resultados revelaram que, no tratamento com meio de cultura ½ MS, o número médio de raízes aumentou de 3,87 em 180 dias para 8,75 em 540 dias. Com MS, esse número iniciou de 4,12 em 180 dias, chegando a 9,33 em 540 dias. À temperatura de 18 ± 1 °C, com ½ MS, o número médio de raízes variou de 3,12 em 180 dias para 7,78 em 540 dias. Já com MS, o número médio de raízes foi de 3,54 em 180 dias, alcançando 8,10 em 540 dias. Ou seja, em condições de cultivo a 18 ± 1 °C para *Aechmea mertensii*, a concentração com ½ MS obteve melhores resultados em relação ao número de raízes, diferente dos resultados apontados por Pessott (2009), que não identificou diferenças estatisticamente significativas em relação à presença e quantidade de raízes geradas a partir de sementes de *Vriesea sucrei* inoculadas em meios de cultura com diferentes concentrações de MS.

No entanto, Silva (2022) observou uma redução linear no número total de raízes de *Aechmea setigera* à medida que a concentração de BAP aumentava. Já no trabalho de Aoyama et al. (2012), plantas que foram cultivadas *in vitro* por 12 meses apresentaram, em média, um número de raízes três vezes superior comparado com plantas cultivadas fora do ambiente controlado. Assim, neste

trabalho, a 25 ± 1 °C, foi constatado que o número médio de raízes da espécie *H. castellanossii* variou significativamente com base no tipo de meio de cultura utilizado. No tratamento com $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de raízes foi de 4,50 em 180 dias, evoluindo para 10,12 em 540 dias. No entanto, com meio de cultura MS, o número médio de raízes foi de 4,87 em 180 dias, atingindo 12,33 em 540 dias. À temperatura de 18 ± 1 °C, *H. castellanossii* novamente apresentou variações no número médio de raízes com base no meio de cultura. No tratamento contendo $\frac{1}{2}$ MS, o número médio de raízes variou de 4,12 em 180 dias para 8,10 em 540 dias. Utilizando o MS, o número médio de raízes foi de 4,32 em 180 dias, chegando a 9,71 em 540 dias. Assim, o meio $\frac{1}{2}$ MS na sala de conservação demonstrou ser mais eficiente em desenvolver um menor número de raízes em comparação ao MS, ao longo do período de 540 dias.

Em outros trabalhos, o número de raízes não apresentou variações significativas entre os diferentes tratamentos, com MS + 15 g L⁻¹ de sacarose e MS + 30 g L⁻¹ de sacarose, conforme destacado por Meneghetti et al. (2019) e Dos Santos et al. (2020). A sacarose serve como fonte de carbono e energia, assim como para a incorporação dos nutrientes (Taiz; Zeiger, 2009). Contudo, alguns estudos atribuem aos carboidratos a função de influenciar o desenvolvimento de órgãos, sendo importante para o desenvolvimento das raízes, a multiplicação dos brotos e o aumento da altura da plântula (Sarasam et al., 2006; Taiz; Zeiger, 2009; Aoyama, 2012).

Portanto, de acordo com as considerações de Souza et al. (2013), as raízes das plantas cultivadas em condições *in vitro* frequentemente não mantêm sua funcionalidade quando as plantas são transferidas para o ambiente. Em alguns casos, é indicado um procedimento de corte e regeneração das raízes durante o período de aclimação, demandando mais cuidados devido ao processo de transição para o estado autotrófico. Deste modo, esses resultados apresentados nesta pesquisa serão úteis na escolha das condições ideais para a conservação *in vitro*, levando em consideração o equilíbrio entre crescimento e longevidade das folhas.

CONCLUSÃO

O estudo revelou a uniformidade entre sementes, apresentando condições favoráveis e fisiológicas. No que se refere à germinação e ao Índice de Velocidade de Germinação, foram observadas variações de 98% a 18,60 para *Hohenbergia castellanosii* e de 100% a 23,62 para *Aechmea mertensii*. Quanto ao tempo médio de germinação, constatou-se um aumento rápido no tempo médio das plântulas de *Hohenbergia castellanosii*.

Hohenbergia castellanosii apresentou as maiores médias de brotações por explante, registrando 50,4 brotações por explante nos dois subcultivos realizados. Em contrapartida, *Aechmea mertensii* obteve uma média de 22,3 brotos. Quanto aos subcultivos, foi observado um aumento progressivo no número absoluto de brotações adventícias à medida que o material vegetal foi transferido para um novo meio, indicando uma relação direta entre os subcultivos e o aumento do número de brotações.

Os tratamentos T02, que consistiam em MS com 2,2 µM de BAP e 0,05 µM de ANA, e T03, com MS contendo 4,4 µM de BAP e 0,05 µM de ANA, demonstraram ser os mais eficazes na indução de brotação para *Aechmea mertensii*. Para *Hohenbergia castellanosii*, os tratamentos T03 (MS + 4,4 µM BAP + 0,05 µM ANA) e T04 (MS + 6,6 µM BAP + 0,05 µM ANA) foram mais significativos em termos de número médio de brotos por explante.

Em sala de conservação, o meio de cultura ½ MS apresentou resultados superiores em relação à altura média das plantas, número de folhas verdes, e número médio de raízes, além de um menor número de folhas senescentes para *Aechmea mertensii* e *Hohenbergia castellanosii*.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. V.; PARANHOS, J. T.; TABALDI, L. A.; SORIANI, H. H. Germinação in vitro de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 39-45, 2018.
- ALI, A. S.; ELOZEIRI, A. A. Metabolic process during seed germination. In: LOPEZ-JIMÉNEZ, J. C. (Ed.). **Advances in Seed Biology**. 1. ed. London: Intechopen, p. 141-146. 2017.
- AOYAMA, E. M.; VERSIEUX, L. M.; NIEVOLA, C. C.; MAZZONI-VIVEIROS, S. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada in vitro e ex vitro. **Rodriguésia**, v. 63, p. 321-331, 2012.
- ARBELOA, A.; MARÍN, J. A.; ANDREU, P.; GARCÍA, E.; LORENTE, P. In vitro conservation of fruit trees by slow growth storage. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 101–106, 2017.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, F.; OLIVEIRA, A. C. L.; BLANK, A. F.; SANTOS, M. S.; MENEZES, T. S. A. In vitro germination of seeds and acclimatization of Macambira (*Bromelia laciniosa* Martius ex Schultes f.) seedlings. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 56, p.68-71, 2013.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 147-173, 2011.
- BALZON, T. A.; CARDOSO, L. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Conservação in vitro de germoplasma de abacaxi (*Ananas sp.*) sob regime de crescimento mínimo**. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 12 a 17 de Outubro de 2008, Vitória/ES.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C.. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar SmoothCayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 725-733, 2004.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014, p.150-162.
- BENELLI, C.; TARRAF, W.; IZGU, T.; CARLO, A. In vitro Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 1-18, 2022.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2013. 392 p.
- BRAMHANAPALLI, M.; THOGATABALIJA, L.; GUDIPALLI, P. Efficient in vitro plant regeneration from seedling-derived explants and genetic stability analysis of

regenerated plants of *Simarouba glauca* DC. by RAPD and ISSR markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 50-63, 2017.

CALDERÓN-HERNÁNDEZ, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, L. V. Seed desiccation tolerance and germination of four *Puya* (Bromeliaceae) high-andean tropical species from Colombia. **Caldasia**, v. 40, p. 177-187, 2018.

CALIXTO, M. C.; SIQUEIRA, D. L. **Efeito do BAP e ferimentos na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv Smooth Cayenne**. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 14. Anais. Londrina: IAPAR, p. 561, 1996.

CARRERA-CASTAÑO, G.; CALLEJA-CABRERA, J.; PERNAS, M.; GÓMEZ, L.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. An update overview on the regulation of seed germination. **Plants**, v. 9, n. 6, p.703, 2020.

CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.

CIANO, G. S. O. S.; SILVA, E. C.; BORGES, C. V.; CARVALHO, M. J. S.; ALMEIDA, W. A. B. Efeito do seccionamento de explantes no cultivo in vitro de babosa (*Aloe vera*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 21, n. 4, p.92-97, 2019.

COELHO, M. F. B.; VIEIRA, S. N.; CHIG, L. A.; SANTOS, L. W.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 472-476, 2011.

CORREDOR-PRADO, J. P.; CONTI, D.; ROECKER JÚNIOR, D.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R. Proteomic identification of differentially altered proteins during regeneration from nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v.38, p.586-599, 2019.

CORREDOR-PRADO, J. P.; SANTOS-AMAYA, O. F.; PESCADOR, R. In vitro germination and reserve mobilization of *Vriesea friburgensis* Mez. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, e. 273906, 2023.

COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. 1a edição ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012, 628 p.

DAL VESCO, L. L.; NOVAES, A. L. T.; PINTO, T. H.; POMPELLI, M. F.; RIBEIRO, R. J.; GUERRA, M. P. **Protocolo para a micropropagação de bromélias ornamentais em biofábricas**. In: VIII Congresso Brasileiro De Fisiologia Vegetal, Ilhéus, BA. Anais, p. 278, 2001.

DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; ESCALONA, M. Bromeliads micropropagation in temporary immersion system. In: **BioVeg'99 - Internacional Workshop on Plant Biotechnology**, Ciego de Avila, Cuba, Anais, p.19-23, 1999.

- DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.
- EDWIN F, G.; HALL, M. A.; KLERK, G. Plant propagation by tissue culture. Volume I. The background. **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 1, p. 205-226, 2008.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, p. 5-16, 2011.
- FAO. The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture. In: BÉLANGER, J.; PILLING, D. (Eds.). **FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments**. Rome, 2019.
- FARIA, D. V.; SIMÃO, M. J.; CIPRIANO, R.; WERNER, E. T.; SOARES, T. C. B.; AOYAMA, E. M.; LIMA-GONTIJO, A. B. P. In vitro morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae) from leaf explants. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 54, p. 530-536, 2018.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p. 323, 2004.
- FERREIRA, C. D.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; FERREIRA, J. C. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **Journal of Plant Research**, v. 133, n. 5, p. 693-713, 2020.
- FERREIRA, T. A. A.; COSTA, M. S. M.; SILVA, A. C. B.; GUEDES, A. S.; MEDEIROS, A. P. R.; COSTA, A. S.; CAMPELO, S. R.; LAMEIRA, O. A. Conservação *in vitro* através do crescimento lento de *Ananas lucidus* Mill. (Curauá). **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, v. 16, n. 5, p. 2803-2813, 2023.
- FEUSER, S.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Eficiência Comparativa dos Sistemas de Cultura Estacionária e Imersão Temporária para a Micropropagação do Abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 006-010, 2001.
- FLORES, R.; MAGGIO, L. P.; FLORES, P. Z.; BEMPCK, G. S.; AULER, N. M. F.; CARVALHO, F. C.; GODOI, R. S.; FRANZIN, S. M.; BECKER, L. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de Ipomoea batatas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 429-437, 2015.
- GALVANESE, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (baker) L.B. Smith, bromélia nativa da mata atlântica. **Revista Ceres**, v. 54, n. 311, p. 63-67, 2007.
- GANA, A. S. The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 51, p. 10330-10334,

2010.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, S. M.; SERROTE, C. M. L. Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, e201901908, p. 1-9, 2020.

GONÇALVES, F. A. C.; AMARAL, E. L. S.; LOPES JUNIOR, J. L.; LOPES, B. L. S.; RIBEIRO JUNIOR, L. S.; BRABO, D. R.; AMARANTE, C. B. Fibras vegetais: Aspectos gerais, aproveitamento, inovação tecnológica e uso em compósitos. **Espacios**, v. 39, n. 6, p.1-16, 2018.

GROSSI, F. **Aspectos da nutrição nitrogenada in vitro e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia**. Dissertação de Mestrado (Universidade de São Paulo), Piracicaba, 2000.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 8 ed., 2014, 880 p.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2019, 420 p.

KIEVITSBOSCH, T. J. **Cultura in vitro e desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae com potencial ornamental**. Dissertação (Mestrado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2011. 153 p.

KOHPAI, F. N.; FARAHANI, F.; NOORMOHAMMADI, Z. Somaclonal variation in the in vitro regenerated pineapple (*Ananas comosus*): Investigation of the cellular characteristics, biochemical specificities and ISSR markers. **Phytologia Balcanica**, v. 23, p. 73–83, 2017.

KOMAKECH, R.; KIM, Y. G.; KIM, W. J.; OMUJAL, F.; YANG, S.; MOON, B. C.; OKELLO, D.; RAHMAT, E.; KYEYUNE, G. N.; MATSABISA, M. G.; KANG, Y. A micropropagation protocol for the endangered medicinal tree *Prunus africana* (Hook f.) Kalkman: Genetic fidelity and physiological parameter assessment. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-14, 2020.

KOUFAN, M.; BELKOURA, I.; MAZRI, M.A. In Vitro Propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.): A Review. **Horticulturae**, v. 8, p. 737, 2022.

LIM, P. O.; NAM, H. G. Aging and Senescence of the Leaf Organ. **Journal of Plant Biology**, v. 50, p. 291-300, 2007.

LOZANO-ISLA, F.; MIRANDA, P. V.; POMPELLI, M. F. Germination behavior of *Jatropha curcas* L. after different imbibition times. **Peruvian Journal of Agronomy**, v.1, n. 1, p. 32-38, 2017.

- MALÁ, J.; MÁCHOVÁ, R.; CVRCKOVÁ, H.; KARADY, M.; NOVÁK, O.; MIKULÍK, J.; DOSTÁL, J.; STRNAD, M.; DOLEZAL, K. The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. **Biologia Plantarum**, v.57, p.174-178, 2013.
- COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, M. J.; SOUZA, F. V. D.; ROCHA, M. A. C. Conservação in vitro de *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker e *Aechmea miniata* Beer ex Baker (Bromeliaceae-Bromelioideae). **Magistra**, v. 24, n. 4, p. 293-303, 2012.
- MENEGHETTI, E. C.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Multiplicação in vitro de *Neoregelia johannis* (Carrière) LB Smith em meio líquido sob diferentes concentrações de nutrientes. **Série Botânica**, Iheringia, v. 74, 2019.
- MEZZALIRA, F. K.; KUHN, B. Uso de ferramentas da bioinformática para determinação dos possíveis efeitos do β -caroteno no cultivo in vitro de *Phalaenopsis*. **Colloquium Agrariae**, v.16, n.2, p.101-113, 2020.
- MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; BRUNO, R. L. A.; FILHO, J. C.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 932-936, 2010.
- MOREIRA, M. A.; PASCOAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Etiolated in micropropagation of cv. Pérola Pineapple plant. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27 n. 5, p. 1002-1006, 2003.
- MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D.; BASTOS, L. P.; ROCHA, M. A. C. Germinação de sementes in vitro de espécies de bromélias ameaçadas de extinção. **Magistra**, v. 20, n. 4, p. 321-327, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. M. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- COUTINHO NETO, A. A.; SILVA, M. F.; SILVA, M. M. As citocininas no desenvolvimento vegetal: Correlação com o nitrogênio. In: LOPES, A. S.; CRUZ, B. S.; SILVEIRA, E. R.; CACERES, I. H.; BRITO, J. O. F.; SILVA, L. G.; FURLAN, C. M. **Botânica no inverno**, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pp. 99-110, 2023.
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination: still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.
- OBROUCHEVA, N. V.; SINKEVICH, I. A.; LITYAGINA, S. V.; NOVIKOVA, G. V. Water relations in germinating seeds. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 64, n. 4, p. 625-633, 2017.
- OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; SILVA, L. C. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo in vitro de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 25-30, 2007.
- OLIVEIRA-CAUDURO, Y.; LOPES, V. R.; BONA, C. M.; ALCANTARA, G. B.; BIASI,

- L. A. Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento in vitro e ex vitro. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 2, p. 53-60, 2016.
- PASQUAL, M. **Propagação de plantas ornamentais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004, 106 p.
- PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 45-49, 2008.
- PICKENS, K. A.; WOLF, J.; AFFOLTER, J. M.; WETZSTEIN, H. Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42 n.4:p.348– 353, 2006.
- PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; HENDRIKS, J. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro cultivated seedlings of Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, v. 25, n. 3-4, p. 193-199, 1984.
- PINTO, D. I. J. G. C.; LIMA-BRITO, A. Micropropagation of *Vellozia seubertiana* (Velloziaceae). **Revista Caatinga**, v. 36, p. 271-279, 2023.
- PRADELLA, E. M.; SOUZA, P. F.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, P.; PESCADOR, R. Morphophysiology and polyamine content in seeds from cryopreserved capsules of two *Vriesea* species. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 44, e. 44, 2022.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity & Conservation**, v. 14, p. 1799-1808, 2005.
- RESENDE, C.; RIBEIRO, C.; MENDES, G. C.; SOARES, C. G.; BRAGA, V.; CRUZ, B. P.; FORZZA, R.; PEIXOTO, P. H. In vitro culture of *Vriesea cacuminis* L.B.Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 71, n. 1, p. 55-61, 2016.
- RODRIGUES, P. H. V.; ARRUDA, F.; FORTI, V. A. Slow-grown in vitro conservation of *Heliconia champneiana* cv. Splash under different light spectra. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 163-166, 2018.
- SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 431-449, 2006.
- SANTA-ROSA, S.; SOUZA, F. V. D.; VIDAL, Á. M.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2013.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide**: statistics. Version 9.1.3. ed. Cary, NC, 2010.

SILVA, A. L. L.; COSTA, J. da L.; ALCANTARA, G. B.; CARVALHO, D. C.; SCHUCK, M. R.; BIASI, L. A.; SCHEIDT, G. N.; SOCCOL, C. R.. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 3, p. 1095-1101, 2012.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; BORTOLI, C. L. R.; QUOIRIN, M. In vitro multiplication of *Vriesea scalaris* E.Morren (Bromeliaceae). **Iheringia, Série Botânica**, v. 64, p. 151-156, 2009.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; SILVA, P. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of *Ananas comosus* germplasm after 10 years of in vitro conservation. **Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 123-133, 2014.

SILVA, S. S. S.; SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; NEPOMUCENO, C. F.; COSTA, M. A. P. C. Micropropagation and in vitro conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 42, p. e52940-e52940, 2020.

SILVA, T. C.; LUIZ, C.; OLIVEIRA, M. T.; BORGHEZAN, M.; PESCADOR, R.; FERMINO JUNIOR, P. C. P. Respostas fisiológicas de *Aechmea setigera* Mart. Ex Schult. & Schult. F. (Bromeliaceae) cultivada in vitro. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 10, n. 1, p. 16-25, 2022.

SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Selection and use recommendation in hybrids of ornamental pineapple. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 45, p. 409-416, 2014.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. da S.. Genetic variation of the *Ananas genus* with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, M. J. M. F.; THOMAZ, D. V.; AGUIAR, D. V. A.; VAZ, B. G.; SOUSA, C. M.; SANTOS, P. A. Micropropagação in vitro de *Bromelia balansae* Mez: efeitos da intensidade luminosa e dos reguladores de crescimento no desenvolvimento das plantas. **Research, Society and Development**, v. 3, e18212340518, 2023.

SOUZA, R. A.; DANTAS, P. V. P.; CAVALCANTE, P. F.; TENÓRIO, R. R.; HOULLOU, L. M. Basic procedure for the in vitro propagation of Brazilian trees for reforestation purposes. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, n. 2, p. 107-114, 2017.

SOUZA, T. V.; THIESEN, J. F.; LANDO, A. P.; GUERRA, M. P.; SANTOS, M. Morpho histodifferentiation of *Billbergia* Thunb. (Bromeliaceae) nodular cultures. **Protoplasma**, v. 254, p. 435-443, 2017.

STEFENON, V. M.; PINHEIRO, M. V. M.; FREITAS, F. R.; SILVA, V. J. B.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, D. D.; GUERRA, M. P. In vitro callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*.

Biotecnología Vegetal, v. 20, n. 2, p.135-146, 2020.

STEFENON, V. M.; REE, J. F.; PINHEIRO, M. V. M.; GOETEN, D.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 1928, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Arned, 2009. 820 p.

TEIXEIRA, M. G.; NIEVOLA, C. C. Differential sprouting ability during micropropagation of *Nidularium minutum* Mez (Bromeliaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 45, e. 64678, 2023.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação ex situ de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARESINGLIS, M. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Fundação MT: Rodanópolis, pp.124-147, 2001.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SOUZA, A. G.; VILELA, X. M. S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, v.11, n.2, p.109-117, 2010.

ZENG, S.; ZHANG, Y.; TEIXEIRA DA SILVA, JA; WU, K.; ZHANG, J.; DUAN, J.. Seed biology and in vitro seed germination of *Cypripedium*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34,n. 4, p. 358-371, 2013.