

**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**

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E REPRODUTIVOS DE
Tillandsia L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA,
BRASIL**

SANDRA DE OLIVEIRA SOUZA

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
2020**

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E REPRODUTIVOS DE
Tillandsia L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL**

Sandra de Oliveira Souza

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

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

Orientador: Dr. Everton Hilo de Souza.

Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte
Souza

Coorientadora: Dra. Lidyanne Yuriko Saleme
Aona

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

S719a Souza, Sandra de Oliveira.
Aspectos morfoanatômicos e reprodutivos de *Tillandsia L.*
(*Bromeliaceae*) ocorrentes na Bahia, Brasil / Sandra de Oliveira
Souza. _ Cruz das Almas, BA, 2020.
86f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Everton Hilo de Souza
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Lidyanne Yuriko Saleme Aona

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

1. Plantas Ornamentais. 2. Biologia Reprodutiva 3. Cultivo
de Bromélias. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 635.9

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)

**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**

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E REPRODUTIVOS DE *Tillandsia*
L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Sandra de Oliveira Souza

Aprovada em 06 de março de 2020

Prof. Dr. Everton Hilo de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)

Prof. Dr. Weliton Antônio Bastos de Almeida
Faculdade Maria Milza
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Francisco Hilder Magalhães e Silva
Universidade do Estado da Bahia
(Examinador Externo)

Dedicatória

À minha amada mãe, por seu amor, confiança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela disponibilidade da estrutura física e recursos materiais para realização deste trabalho;

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD - 88887.124186/2014-00), pela concessão de auxílio financeiro e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP e ao Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, na pessoa da Profa. Adriana Pinheiro Martinelli, CENA/USP pela infraestrutura para realização dos trabalhos de microscopia eletrônica de varredura;

À Mônica Lanzoni Rossi pelo auxílio e colaboração nas etapas da análise da microscopia eletrônica de varredura;

À Dra. Taliane Leila Soares pelo apoio e colaboração durante o desenvolvimento do projeto;

À Profa. Dra. Lidyanne Aona, pela oportunidade de realização do estágio docência e coorientação do projeto;

À Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza, por toda colaboração e incentivo durante o desenvolvimento do trabalho;

À equipe do laboratório de Cultura de Tecidos pelo apoio, amizade e respeito;

À Rafaelle Oliveira, pela amizade, compreensão e auxílio nos momentos mais difíceis, sou grata por cada momento que passamos juntas;

Ao meu querido Orientador Dr. Everton Hilo de Souza, por compartilhar seus conhecimentos e por cada minuto dedicado à realização deste estudo. Serei grata eternamente;

À minha mãe Marinalva, minha irmã Neide, ao meu pai Raimundo, meu irmão Antônio e aos amigos por torcerem por minhas conquistas;

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

ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E REPRODUTIVOS DE *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL

RESUMO: As espécies de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) destacam-se pelo importante papel ecológico que desempenham nos ecossistemas. São plantas ornamentais tropicais com grande diversidade de cores e formas que as tornam extremamente apreciadas. O crescente interesse pelas bromélias para os diversos usos, o extrativismo predatório e a acelerada destruição dos habitats, resultou na entrada de várias espécies na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção. O estudo da biologia floral associado aos mecanismos reprodutivos é de fundamental importância para a conservação das espécies e para o melhoramento genético de plantas, pois auxiliam na definição de técnicas mais apropriadas a serem usadas para esses objetivos. Além disso, esses estudos ajudam a gerar informações taxonômicas, ecológicas e de evolução das espécies. O objetivo desse trabalho foi avaliar alguns aspectos reprodutivos de 24 espécies de *Tillandsia* ocorrentes na Bahia, tais como morfologia, produção e viabilidade polínica por meio da germinação *in vitro* e histoquímica. Foram também caracterizados, morfoanatomicamente, os estigmas e sua receptividade por meio do peróxido de hidrogênio e α -naftil-acetato + fast blue B salt. Os resultados deste trabalho evidenciaram que o padrão de abertura dos grãos de pólen foi monocarpado para *Tillandsia* e confirmado para as espécies ocorrentes na Bahia. Variações na ornamentação e no tamanho dos grãos de pólen foram observadas entre as espécies estudadas. A maioria apresentou grãos de pólen de tamanho médio e simetria bilateral, monocarpados com contornos irregulares, com exina variando de semitectada, reticulada a heterobrocada. Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentam elevadas taxas de germinação, comprimento do tubo polínico e viabilidade, exceto para *T. recurvata*, *T. usneoides* e *T. loliacea*. O meio de cultura SM e a coleta dos grãos de pólen no estágio de antese floral foram os mais adequados para as espécies de *Tillandsia*. Foram observados três tipos de estigma: conduplicado-espiral para as espécies do subgênero *Tillandsia*, simples-ereto para as espécies do subgênero *Diaphoranthema*, coraliforme para as espécies do subgênero *Phytahrriza*. As espécies do subgênero *Anoplophytum* apresentam duas variações morfológicas, quanto ao tipo de estigma, conduplicado-espiral e simples-ereto. Todas as espécies estudadas apresentaram estigma trífido, com epiderme uniestratificada, numerosos idioblastos contendo ráfides no parênquima fundamental e feixes vasculares individuais para cada carpelo. Ambas as metodologias para avaliar a receptividade do estigma foram eficientes, sendo que a maior atividade enzimática foi observada na antese, em todas as espécies estudadas. Esse estudo demonstrou algumas características taxonômicas que podem ser usadas para identificar espécies, delimitar os subgêneros e para futuros estudos de conservação.

Palavras-chave: Biologia floral e reprodutiva; Conservação; Estigma; Grãos de pólen; Plantas Ornamentais; Receptividade do estigma; Taxonomia.

MORPHOANATOMIC AND REPRODUCTIVE ASPECTS OF *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCCURRENT IN BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT: *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) species stand out for their important ecological role in ecosystems. They are tropical ornamental plants with a great diversity of colors and shapes that make them extremely appreciated. The growing interest in bromeliads for different uses, the predatory extraction and the accelerated destruction of habitats, resulted in the entry of several species in the red list of endangered species. The study of floral biology associated with reproductive mechanisms is of fundamental importance for the conservation of species and for the genetic improvement of plants, because they help in the definition of the most appropriate techniques to be used for these purposes. In addition, these studies help to generate taxonomic, ecological and species evolution's information. The objective of this work was to evaluate some reproductive aspects of 24 species of *Tillandsia* occurring in Bahia, such as morphology, production and pollen viability through *in vitro* germination and histochemistry. The stigmas and their receptivity through hydrogen peroxide and α -naphthyl-acetate + fast blue B salt were also morphologically characterized. The results of this work showed that the pattern of pollen grains opening was monocolpate for *Tillandsia* and confirmed for the species occurring in Bahia. Variations in ornamentation and pollen grain size were observed between the species studied. The majority presented pollen grains of medium size and bilateral symmetry, monocolpate with irregular contours, with exine varying from semitectate, reticulate to heterobrochate. The pollen grains of the studied species showed high germination rates, pollen tube length and viability, except for *T. recurvata*, *T. usneoides* and *T. loliacea*. The SM culture medium and the collection of pollen grains at the stage of floral anthesis were the most suitable for the species of *Tillandsia*. Three types of stigma were observed: conduplicate-spiral for species of the subgenus *Tillandsia*, simple-erect for species of the subgenus *Diaphoranthema*, coraliform for species of the subgenus *Phytahrriza*. The species of the subgenus *Anoplophytum* present two morphological variations, as to the type of stigma, conduplicate-spiral and simple-erect. All species studied showed trifold stigma, with uni-stratified epidermis, numerous idioblasts containing raffids in the fundamental parenchyma and individual vascular bundles for each carpel. Both methodologies for assessing the receptivity of stigma were efficient, with the highest enzyme activity being observed in anthesis, in all species studied. This study demonstrated some taxonomic characteristics that can be used to identify species, delimit the subgenera and for future studies of the conservation.

Keywords: Floral and reproductive biology; Conservation; Stigma; Pollen grains; Ornamental plants; Stigma receptivity; Taxonomy

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DE LITERATURA	14
BROMELIACEAE.....	14
TILLANDSIOIDEAE BURNETT	17
BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA EM BROMELIACEAE	19
REFERÊNCIAS	23

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM <i>TILLANDSIA</i> L. (BROMELIACEAE) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL¹	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAIS E MÉTODOS	36
MATERIAL VEGETAL.....	36
MORFOLOGIA POLÍNICA.....	37
QUANTIFICAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN	37
VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
MORFOLOGIA POLÍNICA.....	39
QUANTIFICAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN	37
Subgênero <i>Tillandsia</i>	44
Subgênero <i>Diaphoranthema</i>	45
Subgênero <i>Phytarrhiza</i>	46
Subgênero <i>Anoplophytum</i>	47
VIABILIDADE POLÍNICA	54
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 2

MORFOANATOMIA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM <i>TILLANDSIA</i> L. (BROMELIACEAE) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL¹	66
RESUMO.....	67
ABSTRACT	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	70
MATERIAL VEGETAL.....	70
MORFOANATOMIA DO ESTIGMA.....	71
RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA.....	72

RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
MORFOANATOMIA DO ESTIGMA	73
RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA	79
CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	84

INTRODUÇÃO

Bromeliaceae Juss. possui 3.620 espécies distribuídas em 76 gêneros (GOUDA; BUTCHER, 2020) e atualmente está dividida em oito subfamílias (Bromelioideae, Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae) com base nos caracteres morfológicos, filogenéticos e moleculares (GIVNISH et al., 2007; 2011). A família apresenta distribuição neotropical com apenas uma espécie ocorrendo na costa oeste africana (SMITH; DOWNS, 1974). O Brasil abriga 1.736 espécies (GOUDA; BUTCHER, 2020) com vários gêneros endêmicos, que podem ser encontrados em todos os biomas, sendo representados por plantas terrestres, rupícolas e epífitas (SMITH; DOWNS, 1974; REITZ, 1983; BENZING, 2000).

A subfamília Tillandsioideae consiste em plantas predominantemente epífitas com folhas de margens inteiras, ausentes de espinhos, escamas peltadas e sementes plumosas (BARFUSS et al., 2016). Esses mesmos autores, reconhecem seis gêneros amplamente aceitos [*Alcantarea* É.Morren ex Mez Harms, *Catopsis* Griseb., *Glomeropitcairnia* Mez, *Guzmania* Ruiz & Pav., *Racinaea* M.A.Spencer & L.B.Sm. e *Werauhia* J.R.Grant e propõem a divisão de *Mezobromelia* L.B.Sm., *Tillandsia* L. e *Vriesea* Lindl. em grupos menores para melhor caracterização morfológica.

O gênero *Tillandsia* é caracterizado por ervas, epífitas ou rupícolas, de tamanho variável (PONTES; AGRA, 2006). Algumas espécies desse gênero apresentam inflorescência simples, composta e extremamente exuberante, podendo ser de longa duração, requisito importante para o comércio de plantas ornamentais, que constitui o principal uso das bromélias (PAULA; SILVA, 2004; PONTES; AGRA, 2006; ANACLETO; NEGRELLE, 2013a; 2013b). Algumas espécies de Bromeliaceae, com destaque para o abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.] também podem ser utilizadas na alimentação humana (SOUZA et al., 2018), na produção de fibras (SENA NETO et al., 2015; 2017; SOUZA et al., 2018; SILVA et al., 2019), na produção de enzimas de ação proteolítica e metabólitos secundários (MANETTI et al., 2009; MIRANDA et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Em decorrência do crescente interesse pelas bromélias para os diversos usos, o extrativismo predatório, que se intensificou nos últimos anos e, a acelerada

destruição dos habitats, resultou na entrada de várias espécies na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (FORZZA et al., 2013).

Considerando o grande número de espécies e gêneros que compõem a família Bromeliaceae, poucos são os estudos publicados a respeito da biologia floral e os aspectos reprodutivos. O estudo da biologia floral associado aos mecanismos reprodutivos das espécies vegetais é de fundamental importância para a conservação das espécies e para o melhoramento genético de plantas, pois auxiliam na definição de técnicas mais apropriadas a serem usadas. Além disso, esses estudos ajudam a gerar informações de processos reprodutivos (ecologia reprodutiva e genética) das espécies, bem como elucidar alguns entraves taxonômicos em nível específicos e genéricos. Assim, o conhecimento de aspectos da biologia floral e reprodutiva das espécies tende a ter fundamental importância para a ciência.

Neste trabalho, foram estudadas 24 espécies do gênero *Tillandsia* (*T. bulbosa* Hook.f. (Figura 1a), *T. juncea* (Tuiz & Pav.) Poir (Figura 1b), *T. polystachia* (L.) L. (Figura 1c), *T. loliaceae* Mart. ex Schult. & Shult.f. (Figura 1d), *T. recurvata* (L.) L. (Figura 1e), *T. tricholepsis* Baker (Figura 1f), *T. usneoides* (L.) L. (Figura 1g), *T. streptocarpa* Baker 1 (Figura 1h), *T. streptocarpa* 2 (Figura 1i), *Tillandsia* sp. (Figura 1j), *T. chapeuensis* Raul (Figura 1k), *T. gardineri* Lindl. (Figura 1l), *T. geminiflora* Brongn (Figura 2a), *T. globosa* Wawra (Figura 2b), *T. heubergeri* Ehlers (Figura 2c), *T. milagrensis* Leme (Figura 2d), *T. pohliana* Mez (Figura 2e), *T. sprengeliana* Klotzsch ex Mez (Figura 2f), *T. stricta* Sol. 1 (Figura 2g), *T. stricta* 2 (Figura 2h), *T. stricta* var. subsp. *piniformis* Rauh ex.Ehers & H.Heidt (Figura 2 i), *T. tenuifolia* L. (Figura 2 j), *T. tenuifolia* var. *saxicola* Griseb. (Figura 2k), *T. tenuifolia* var. *vaginata* (Wawra) L.B.Sm. (Figura 2l).

Esta dissertação está dividida em dois capítulos que abrangem estudos da morfologia e viabilidade de grãos de pólen (Capítulo 1), assim como a morfoanatomia e receptividade do estigma (Capítulo 2).

O primeiro capítulo aborda a morfologia e viabilidade de grãos de pólen de espécies de *Tillandsia* de ocorrência da Bahia visando contribuir para os estudos taxonômicos do gênero bem como subsidiar ações voltadas para a conservação e programas de melhoramento genético das espécies. Neste sentido, o objetivo foi caracterizar os padrões da morfologia polínica utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Luz (ML) e avaliar a fertilidade estaminal por

meio de testes histoquímicos e germinação *in vitro* de grãos de pólen em espécies de Bromeliaceae.

Por fim, o segundo capítulo apresenta estudos sobre a morfoanatomia do estigma e estilete utilizando-se MEV e ML, além da receptividade estigmática que consiste fator fundamental para a determinação do melhor período de polinização e sucesso nas polinizações controladas. Em muitas espécies, os grãos de pólen se aderem no estigma por meio de exsudatos produzidas pelo estigma que promovem também a hidratação, germinação e crescimento do tubo polínico, contribuindo para uma provável fertilização, com formação de frutos e sementes. Desta forma, neste capítulo verificamos a eficiência de diferentes metodologias para subsidiar ações de reprodução e conservação das espécies, bem como para programas de melhoramento genético da família Bromeliaceae.

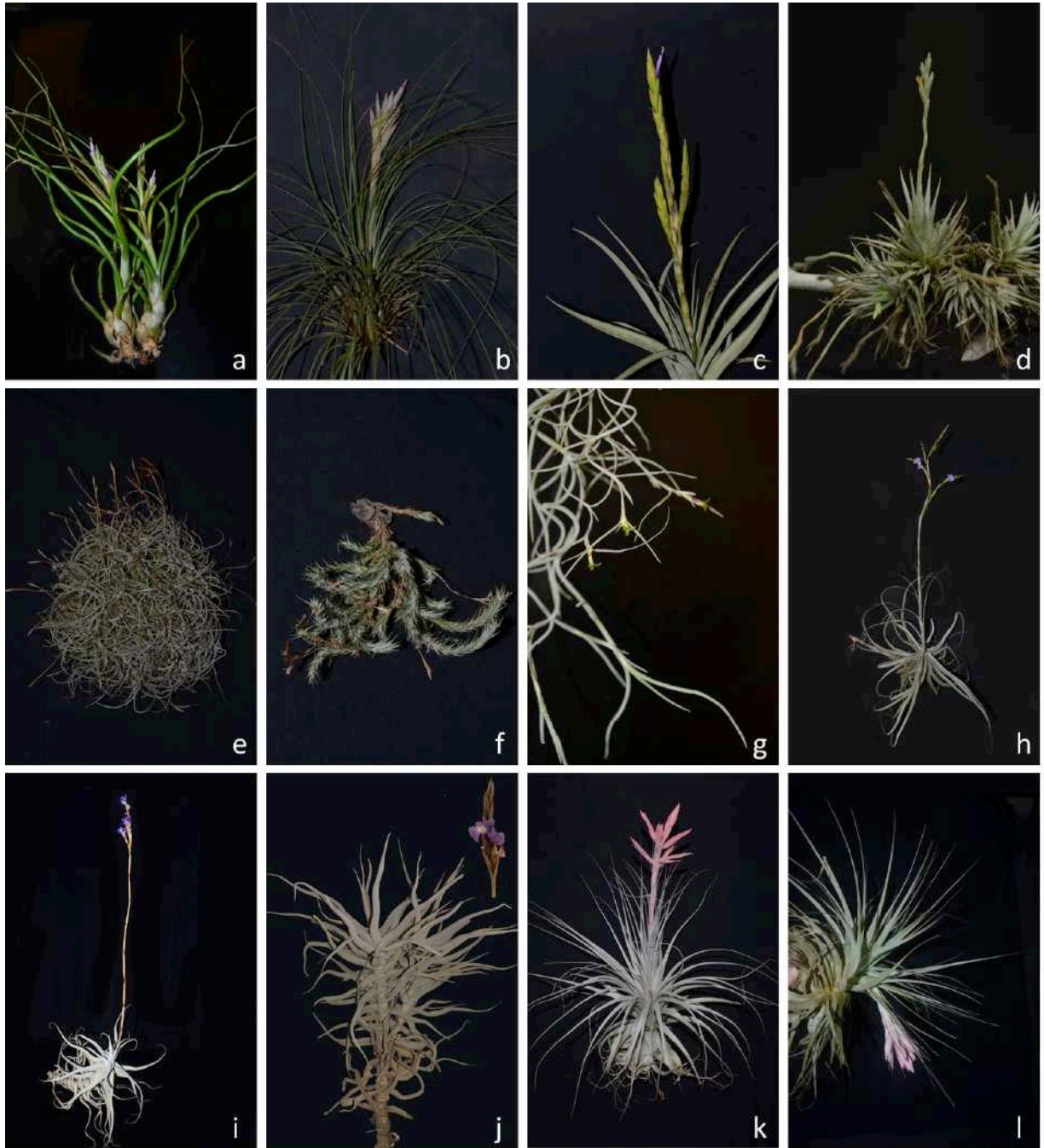


Figura 1. Espécies de *Tillandsia* de ocorrência na Bahia, Brasil. a) *T. bulbosa*; b) *T. juncea*; c) *T. polystachia*; d) *T. loliaceae*; e) *T. recurvata*; f) *T. tricholepsis*; g) *T. usneoides*; h) *T. streptocarpa* 1; i) *T. streptocarpa* 2; j) *Tillandsia* sp.; k) *T. chapeuensis*; l) *T. gardineri*.

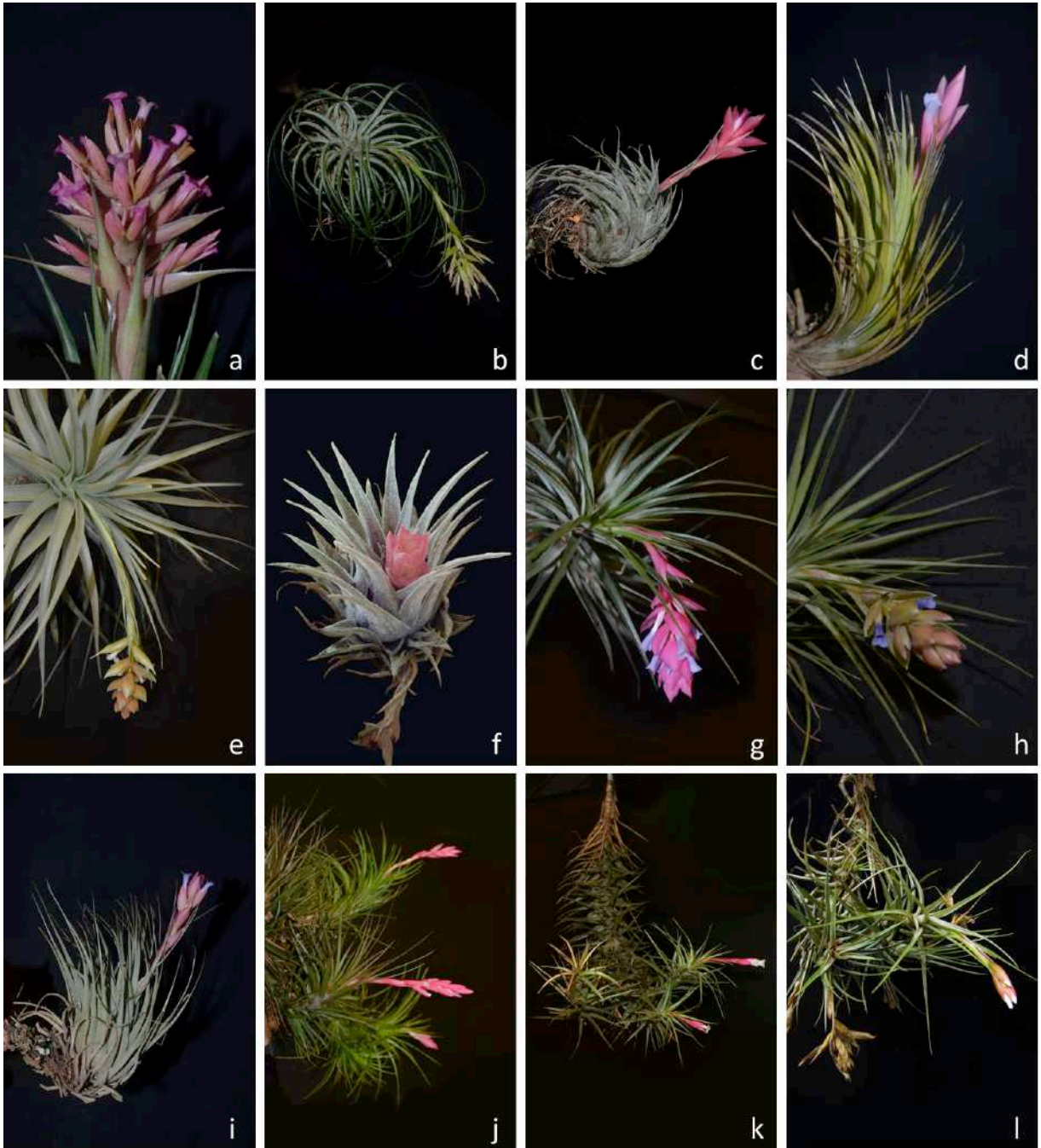


Figura 2. Espécies de *Tillandsia* de ocorrência na Bahia, Brasil. a) *T. geminiflora*; b) *T. globosa*; c) *T. heubergeri*; d) *T. milagrensis*; e) *T. pohliana*; f) *T. sprengeliana*; g) *T. stricta* 1; h) *T. stricta* 2; i) *T. stricta* subsp. *piniformis*; j) *T. tenuifolia*; k) *T. tenuifolia* var. *saxicola*; l) *T. tenuifolia* var. *vaginata*.

REVISÃO DE LITERATURA

Bromeliaceae

Bromeliaceae pertence à Ordem Poales (APG IV, 2016), abrange 76 gêneros e 3.620 espécies (GOUDA; BUTCHER, 2020). Atualmente, está dividida em oito subfamílias, com base na morfologia das flores, frutos, sementes, e, principalmente por dados filogenéticos e moleculares: Bromelioideae, Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (GIVNISH et al., 2007; 2011). A família apresenta distribuição Neotropical, exceto para *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms e Mildbraed que ocorre na costa oeste da África, na Guiné Francesa (SMITH; DOWNS, 1974; GIVNISH et al., 2011; LUTHER, 2012).

As bromélias teriam surgido há cerca de 70 milhões de anos, no Escudo das Guianas. Em seguida, se espalharam pela América Central, América do Sul até alcançarem a África Ocidental tropical, por meio da dispersão de sementes a longa distância (GIVNISH et al., 2007). Atualmente são reconhecidos quatro grandes centros de diversidade, o Escudo das Guianas, América Central, Andes e costa leste do Brasil (GIVNISH et al., 2011).

As bromélias se destacam por apresentar grande diversidade de habitats, ocorrendo no Brasil, em todos os biomas (PIMENTEL; MACIEL, 2018). O Brasil abriga mais de 48% das espécies (1.736 spp.) com grande endemismo (1.177 spp.), principalmente na Mata Atlântica (LEME; MARIGO, 1993; GIVNISH et al., 2011; FLORA DO BRASIL, 2020), bioma que é construído por um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados que o torna um *hotspot* de biodiversidade do mundo. Contudo, em virtude da degradação ao longo dos anos, restam cerca de 20% de remanescentes da vegetação original em diferentes estágios de regeneração, com apenas 7% desses remanescentes em bom estado de conservação, desta forma, a conservação *in situ* das espécies de bromélias torna-se um desafio (MMA, 2015). A Caatinga também é um importante bioma onde são encontradas bromélias endêmicas, adaptadas ao ambiente xérico, geralmente com folhas em rosetas que acumulam água e nutrientes ideais para o equilíbrio ecológico no ecossistema (ISLAIR et al., 2015).

A Bahia possui uma área de 564.692,669 km² e destaca-se por apresentar três biomas de grande importância para as bromélias como a Caatinga, a Mata Atlântica e o Cerrado, além da Zona Costeira, com seus ecossistemas que se repetem ao longo de todo o litoral como praias, restingas, lagoas e manguezais. A vegetação do Estado é caracterizada com uma grande diversidade de ecossistemas, campos rupestres, manguezal, restinga, áreas de transição, além de florestas estacionais e os ecossistemas já citados. São também identificados no Estado, três tipos climáticos: o clima de savana, o clima superúmido e o clima semiárido quente (CBPM, 2020). Portanto, justifica-se a necessidade da realização de estudos ampliados para essa família neste estado (LANDAU, 2003; PALHA et al., 2018).

As bromélias são plantas herbáceas que podem ser: epífitas, rupícolas ou terrícolas. As folhas são dícticas ou polísticas, distribuídas ao longo do caule ou formam rosetas, sua superfície apresenta tricomas especializados que são responsáveis pela adaptação das espécies nos mais variados habitats (BENZING, 2000).

A inflorescência pode variar em racemosa, simples ou composta, com posição terminal, raramente axilar, geralmente, o escapo floral e as brácteas são coloridas. As flores podem ser poucas ou numerosas, bissexuadas ou funcionalmente unissexuadas, trímeras, normalmente com bráctea vistosa (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; WANDERLEY; MARTINS, 2007). As sépalas apresentam diferentes cores, variando de verdes, amarelas, vermelhas ou brancas. De modo semelhante, as pétalas são coloridas, podendo apresentar apêndices na face interna, responsável principalmente por proteger o néctar (SIQUEIRA-FILHO; MACHADO, 2001). Os estames (3+3) diplostêmone podem formar um tubo pelo concrecimento dos filetes (andróforos), estar livres (dialistêmone) ou conado às pétalas (epipétalas). As anteras são bitecas com deiscência rimosa (WANDERLEY; MARTINS, 2007). Os grãos de pólen possuem padrão de abertura variado, sendo classificados em porado, monocarpado ou inaperturado (SMITH; DOWNS, 1974; MOREIRA, 2007). O ovário pode ser súpero a ínfero, tricarpelar, trilocular com estilete terminal trífido. O estigma pode apresentar formatos variados como, simples-ereto, coraliforme, espiral-conduplicado ou lâmina-convoluta (BROWN; GILMARTIN, 1984). Recentemente uma nova classificação com tipos e subtipos de estigmas foi proposta para a subfamília Tillandsioideae: conduplicado-ereto, patente-conduplicado, conduplicado-pinatisecta, conduplicado-espiral, lâmina-convoluta I,

lâmina-convoluta II, convoluta-obcônico, umbrela-convoluta, coraliforme, cupulado, simples-ereto, simples-patente, simples-pinatisecta, simples-truncado, tubolaciniado, urceolado (BARFUSS et al., 2016). Os óvulos podem ser numerosos com placentação axial. Os frutos podem variar de cápsulas a bagas. Quanto às sementes, as mesmas são pequenas podendo apresentar apêndices carnosos, plumosos e alados (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; WANDERLEY; MARTINS, 2007).

O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) e o hábito epífito representam apomorfias para a Bromeliaceae, em virtude de essas características serem raras ou ausentes em outras Poales. Essas características podem ter surgido independentemente ou várias vezes na história evolutiva da família (CRAYN et al., 2004). Em Tillandsioideae, por exemplo, a fotossíntese CAM ocorre em todas as *Tillandsia* epífitas e rupícolas (MARTIN, 1994). Esse mecanismo é de extrema importância para a manutenção de um estado hídrico favorável, por meio da qual a planta reduz de forma drástica a perda de água pelo fechamento dos estômatos durante o dia e abertura durante a noite (VASCONCELOS et al., 2013).

As bromélias evoluíram para preencher inúmeros nichos, com grande diversidade de adaptações. Entretanto, muitos aspectos da história evolutiva complexa da família ainda não são claros. Neste sentido, diversos estudos direcionados para a revisão de gêneros, subgêneros e de espécies foram realizados nos últimos anos, podemos citar: VERSIEUX; WENDT, 2006; WANDERLEY et al., 2007; VERSIEUX et al., 2012; VERSIEUX; TOMAZ; JARDIM, 2013a; VERSIEUX; MAGALHÃES; CAVALCANTE, 2013b; LOUZADA et al., 2014; HELLER et al., 2015; SARAIVA et al., 2015; BARFUSS et al., 2016; AGUIRRE-SANTORO et al., 2017; CRUZ et al., 2017; LEME et al., 2017; VERSIEUX et al., 2017; 2018; SILVA; WANDERLEY; MELO, 2018; LEME et al., 2019.

As espécies de Bromeliaceae destacam-se pelo importante papel ecológico que desempenham nos ecossistemas, pois participam do ciclo de nutrientes e da água e são habitats para diversos animais, para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (BENZING, 2000; ISLAIR et al., 2015; VERSIEUX; WANDERLEY, 2015). Além disso, alguns herbívoros e insetos se alimentam de suas folhas (PAULA; SILVA, 2004). Já suas flores são atrativas para diversos polinizadores vertebrados, tais como, beija-flores e morcegos que se alimentam de néctar e grãos de pólen (MARTINELLI, 2006). Desta forma, a família constitui

elemento importante para as comunidades e, contribui para a ampliação e manutenção da biodiversidade (ISLAIR et al., 2015; VERSIEUX; WANDERLEY, 2015).

Na economia, a família se destaca na alimentação humana com o abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merr.], que fornece o fruto *in natura* ou industrializado em doces, compotas, sucos, bebidas e outros, também são usadas para esta finalidade o *Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F.Leal, *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. e *Bromelia antiacantha* Bertol. (ANACLETO; NEGRELLE; KOEHLER, 2008). Outras espécies como o Caróá [*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez], e *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L.B.Sm.) Coppens & F.Leal são fornecedoras de fibras vegetais na indústria têxtil e automobilística, respectivamente (PAULA; SILVA, 2004; SENA NETO et al., 2015; 2017; SOUZA et al., 2018; SILVA et al., 2019). *Bromelia laciniosa* Mart. ex. Schult.f. conhecida como macambira é utilizada na alimentação do gado (LEME; MARIGO, 1993), *Tillandsia usneoides* (L.) L., *T. recurvata* (L.) L., *T. aeranthis* (Loisel.) L.B.Sm., *T. streptocarpa* Baker e *T. pohliana* Mez. são usadas como bioindicadoras de qualidade do ar (ALBUQUERQUE et al., 2013; DRAGUNSKI et al., 2009) e, outras espécies como a *Bromelia balansae* Mez são utilizadas como cerca viva (PAULA; SILVA, 2004).

Em virtude da grande diversidade de formas e cores as bromélias também se destacam pelo seu grande potencial ornamental (SOUZA et al., 2012; DIAS et al., 2014; SOUZA et al., 2015; ANACLETO; NEGRELLE, 2013a; 2013b). As espécies variam no tamanho e na coloração das folhas, na morfologia das flores, bem como no hábito de crescimento (BENZING, 2000). Desde a década de setenta elas despertam o interesse comercial e a curiosidade dos compradores de plantas, com dezenas de espécies inseridas anualmente no comércio, a exemplo da *Aechmea fasciata* Baker e *Guzmania lingulata* Mez (PULIDO et al., 2018; NEGRELLE; ANACLETO, 2019).

Tillandsioideae Burnett

A subfamília Tillandsioideae é representada por plantas epífitas, rupícolas ou raramente terrestres, possuem folhas sem espinhos com margens inteiras e escamas peltadas capazes de absorver água e nutrientes. As sementes são plumosas que facilitam a dispersão pelo vento e o sistema radicular reduzido, direcionado, principalmente, à fixação da planta (BARFUSS et al., 2016).

Tillandsioideae possivelmente tem origem no Escudo das Guianas (GIVNISH et al., 2007; 2011) e é amplamente distribuída nas Américas (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979). É a maior subfamília de Bromeliaceae (BARFUSS et al., 2005). Recentemente foi realizada uma revisão taxonômica e foram propostas quatro tribos circunscritas que constituem seis subtribos e 21 gêneros com base em caracteres morfológicos novos ou reavaliados e em dados moleculares: *Alcantarea*, *Barfussia* Manzan. & W.Till, *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Goudaea* W.Till & Barfuss, *Gregbrownia* W.Till & Barfuss, *Guzmania*, *Jagrantia* Barfuss & W.Till, *Josemania* W.Till & Barfuss, *Lemeltonia* Barfuss & W.Till, *Lutheria* Barfuss & W.Till, *Mezobromelia*, *Pitcairnia* L'Hér., *Pseudalcantarea* C. Presl Pinzón & Barfuss, *Racinaea*, *Stigmatodon* Leme, G.K.Br. & Barfuss, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Wallisia* Regel, *Werauhia* e *Zizkaea* W.Till & Barfuss (BARFUSS et al., 2016).

Tillandsia L. é o maior gênero dentre as bromélias, responsável pela grande amplitude geográfica da família (BENZING, 2000), sendo composto por 745 espécies distribuídas em sete subgêneros: *Aerobia* Mez, *Anoplophytum* (Beer) Baker, *Diaphoranthema* (Beer) Baker, *Phytarrhiza* (Vis.) Baker, *Pseudovriesea* Barfuss & W. Till, *Tillandsia* (G. Nicholson) e *Viridantha* (Espejo) W. Till & Barfuss. O gênero está distribuído desde o sul dos Estados Unidos até o Uruguai sendo encontradas desde o nível do mar até grandes altitudes (SMITH; DOWNS, 1977; BENZING, 2000; BARFUSS et al., 2016).

O centro de diversidade do gênero *Tillandsia* é o norte da América Central e a Cordilheira dos Andes (BARFUSS et al., 2016) onde ocorrem mais de 20% das espécies. No Brasil, ocorrem 82 espécies de *Tillandsia* ao longo de todo território nacional (FLORA DO BRASIL, 2020), sendo 29 espécies atualmente registrada na região Nordeste, com mais de 70% (24 spp.) de ocorrência no Estado da Bahia. Além disso, podemos encontrar espécies em todas as fitofisionomias brasileiras, desde as florestas úmidas até o Cerrado, destacando-se a Mata Atlântica por apresentar o maior número de espécies (59 spp.), seguido pelo Cerrado (27 spp.) e Caatinga (22 spp.) (FLORA DO BRASIL, 2020).

A *Tillandsia* pode ser encontrada como ervas caulescentes até caules inconspícuos, com hábito epífita, rupícola ou raramente terrestre. As folhas podem ser rosuladas, distribuídas ao longo do caule, polísticas ou dísticas, imbricadas, com margens inteiras, lâminas estreitamente liguladas, lanceoladas ou linear-filiformes; o indumento pode ser pouco a fortemente cinérea, as escamas podem ser simétricas

ou assimétricas com contorno arredondado, triangular ou irregular. O escapo varia desde bem distinto até ausente. A inflorescência apresenta-se em espiga, simples ou ramificada, com flores dísticas ou polísticas, raramente reduzidas a uma única flor. A bráctea é conspícua, elíptica, elíptico-lanceolada ou oval-lanceolada. As flores são sésseis, eretas. As sépalas são simétricas, podem ser livres ou as posteriores soldadas, carenadas ou ecarenadas. As pétalas são livres com coloração que varia em lilás, amarela, rosa, branca, azul ou verde-amarelada. Os estames são inclusos ou exsertos; com filetes cilíndricos ou complanados; as anteras com deiscência rimosas, com coloração amarela ou preta. O ovário é súpero, com óvulos numerosos, caudados e o estilete é cilíndrico. O estigma pode ser simples-ereto, conduplicado-espiral, simples-truncado, simples-patente, lâmina-convoluta I e conduplicado-patente (BARFUSS et al., 2016). O fruto é uma capsula septícida e as sementes cilíndricas ou fusiformes, com apêndices basais, plumosos e brancos (PONTES; AGRA, 2006).

Biologia Floral e Reprodutiva em Bromeliaceae

A biologia floral e reprodutiva de uma comunidade vegetal é fundamental para o entendimento das interações planta-animal, por permitir que se tenha conhecimento dos aspectos da organização espaço-temporal dos recursos presentes no ambiente que estão disponíveis aos animais associados (TALORA; MORELLATO, 2000). Além disso, o entendimento do sucesso reprodutivo, competição e partilha por polinizadores e vários temas relacionados à manutenção do fluxo gênico entre espécies podem ser compreendidas a partir de estudos fenológicos associados ao conhecimento de aspectos sobre biologia floral e da polinização. Esses estudos contribuem no desenvolvimento de estratégias voltadas para a conservação de habitats naturais em fragmentação (MACHADO; LOPES, 2002), de espécies endêmicas ou em risco de extinção, bem como podem subsidiar programas de melhoramento genético.

As estratégias reprodutivas em Bromeliaceae são bastante diversificadas (MATALLANA et al., 2010; ZANELLA et al., 2012; GIVNISH et al., 2014; BASTOS et al., 2017; SOUZA et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2019), com espécies ornitófilas (SANTANA; MACHADO, 2010) quiropterófilas (MARQUES; TAGLIATI; FARIA, 2015), melitófilas (KAMKE et al., 2011), e esfingófilas (BENZING, 2000; PALMA-SILVA et al., 2011). Em relação ao sistema reprodutivo pode ser autocompatível

(MATALLANA et al., 2010), autoincompatível (SOUZA et al., 2017), autógamo, potencialmente alógamo, cleistógamo (CULLEY; KLOOSTER, 2007) ou protândrico (MARTINELLI, 1994). Parte dessa diversidade é atribuída às características das flores e inflorescências em sua maioria vistosas e com recursos florais variados (GIVNISH et al., 2014).

Entre os atrativos florais, o néctar fornece água e energia, sendo o mais requerido pelos visitantes e polinizadores (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979), assim como os grãos de pólen também são uma importante recompensa para os polinizadores e visitantes florais (TAGLIATI; OLIVEIRA; FARIA, 2018).

A maioria dos estudos sobre a biologia reprodutiva em Bromeliaceae se concentram na Mata Atlântica (SANTANA; MACHADO, 2010) por esse bioma representar um dos principais centros de diversidade e endemismo da família e por apresentar avançado estado de degradação, colocando muitas espécies de bromélias sob ameaça de extinção (TAGLIATI; OLIVEIRA; FARIA, 2018). Todavia, o bioma Caatinga também é importante para a conservação dessa família, sendo o gênero *Tillandsia* o mais representado e com poucos estudos sobre a diversidade neste bioma (PONTES; AGRA, 2006). Desta forma, se faz necessário mais estudos sobre os aspectos reprodutivos em Bromeliaceae nos biomas citados, considerando que atributos reprodutivos, tais como, fenologia e oferta de recompensas florais, além do funcionamento e desempenho das flores e seus polinizadores, podem sofrer alterações pelas ações antrópicas, interferindo no sucesso reprodutivo (AIZEN; VÁZQUEZ, 2006).

Com relação ao processo de polinização, várias características influenciam a taxa de reprodução por autopolinização ou por polinização cruzada, em virtude de aspectos como a história natural e ecologia das espécies estarem correlacionados (BENZING, 2000). Desta forma, em estudos sobre polinização deve-se considerar sua unidade funcional, o grão de pólen (PACINI; HESSE, 2004; SOUZA et al., 2015), pois o conhecimento sobre sua morfologia e ultraestrutura são relevantes para estudos voltados à conservação e mesmo para a promoção do melhoramento genético, quando for o caso (CHAGAS et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

No grão de pólen, a esporoderme é constituída por uma parede celular complexa, com camadas estratificadas e propriedades físico-químicas específicas que ajudam a amenizar os possíveis danos causados pela desidratação excessiva (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2012). A exina constitui o

estrato mais externo da esporoderme e, devido aos vários padrões de ornamentações, juntamente com a capacidade de fossilização tem sido muito usada para classificação e distinção taxonômica. Em Bromeliaceae a morfologia polínica é bastante diversificada. Desta forma, o reconhecimento de caracteres como, o padrão de abertura do grão de pólen e estrutura da exina é relevante para identificação de espécies dentro da família, uma vez que estas características são geralmente mantidas na mesma linha evolutiva (EHLER; SCHILL, 1973; ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974).

Um táxon pode ser classificado como estenopolínico, com seus grãos de pólen homogêneos morfologicamente ou euripolínico, com variações significativas. Neste sentido, Bromeliaceae é uma família euripolínica, apresentando quatro padrões de abertura da exina, ocorrendo grãos de pólen inaperturados, porados, pantoporados e 1-sulcados (ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974). Quanto ao número de poros, pode ser fixo ou variar dentro de uma mesma espécie (ERDTMAN, 1952). Portanto, a palinologia contribui para o entendimento das relações dentro da família, sendo a morfologia polínica um caráter taxonômico relevante que deve ser mais utilizada na taxonomia (ERDTMAN, 1952).

Para que ocorra a fecundação é imprescindível que os grãos de pólen estejam viáveis. Neste sentido, para determinar a viabilidade pode-se recorrer a diferentes metodologias, tais como a germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; PARTON et al., 2002, SOUZA et al., 2015), *in vivo* (OLIVEIRA; MAUÉS; KALUME, 2001; SOUZA et al., 2015; 2017) e os procedimentos histoquímicos a fim de verificar substâncias químicas ou atividades enzimáticas (SOUZA et al., 2015).

Alguns estudos classificam o teste histoquímico como pouco confiável em virtude da apresentação de resultados superestimados, principalmente com o uso do carmim acético (SOARES et al., 2008; PARTON et al., 2002; SOUZA et al., 2015; 2017). Em vista disso, o método mais utilizado para determinar a viabilidade dos grãos de pólen é a germinação *in vitro*, tendo em vista que este método permite o desenvolvimento do tubo polínico (SOUZA et al., 2015; 2017), apesar de não ser conclusivo. O sucesso desta metodologia depende de uma série de fatores como, a espécie em si, a nutrição das plantas, o horário e o método utilizado para a coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e, sobretudo da composição do meio de cultura (SOARES et al., 2008), que deve ser ajustado para cada espécie, gênero ou família (DAFNI, 1992; SOUZA et al., 2017). Neste sentido,

a germinação *in vitro* não garante a fertilização, mas é um indicativo confiante de viabilidade. A fertilização *in vivo* é o método mais eficiente e conclusivo para os estudos reprodutivos na família (SOUZA et al., 2015).

A fertilização, com formação de frutos e sementes está relacionada também com a produção de exsudatos no estigma que promovem a aderência dos grãos de pólen, hidratação, germinação e crescimento do tubo polínico sobre a superfície do estigma (ALMEIDA, 2007). A presença de enzimas, a exemplo das esterases e peroxidases na superfície do estigma tem sido considerada um indicativo de receptividade. Essas enzimas desempenham papel fundamental na germinação dos grãos de pólen, na penetração do tubo polínico no estigma e provavelmente nas respostas de incompatibilidade (KULLOLI et al., 2010; SOUZA et al., 2016).

Desta forma, os métodos usados para determinar a receptividade do estigma *in vitro*, geralmente, baseiam-se na identificação da atividade enzimática (DAFNI 1992). A receptividade do estigma pode influenciar na taxa de autopolinização e no sucesso da polinização. Assim, para obtenção de êxito em experimentos envolvendo reprodução, se faz necessário o monitoramento do tempo e da duração da receptividade do estigma (STONE et al., 1995), para determinar o melhor momento para a deposição dos grãos de pólen sobre o estigma e obter sucesso em cruzamentos controlados (ALMEIDA, 2007).

Dentre as metodologias mais utilizadas destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que indica a receptividade por meio da formação de bolhas de ar. Esse método é simples e de baixo custo, porém deve-se evitar qualquer dano ao tecido para não incorrer em resultado falso-positivo (KEARNS; INOUE, 1993). Todavia, existem metodologias mais eficientes para determinar a receptividade do estigma, a exemplo da reação de α -naftil-acetato com *fast blue B salt* que interage com a enzima esterase, deixando os estigmas receptivos corados de marrom escuro a preto (KEARNS; INOUE, 1993).

Aliar os estudos morfológicos dos grãos de pólen e estigma aos estudos de viabilidade e receptividade estigmática, além de servir de ferramenta para classificação taxonômica auxiliam, tanto nos estudos voltados para a conservação, como podem subsidiar programas de melhoramento genético aumentando assim as chances de fertilização nas polinizações controladas (NACATA et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-SANTORO, J. Taxonomy of the *Ronnbergia* Alliance (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, n.5, p. 615–640, 2017.
- AIZEN, M. A.; VÁZQUEZ, D. P. Flower performance in human-altered habitats In: HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. **Ecology and Evolution of Flowers**, 1. ed. Oxford: Oxford University Press, cap. 9, p. 159-176, 2006.
- ALBUQUERQUE, C. R.; FIGUEIREDO, A. M. G.; SILVA, B. C.; TICIANELLI, R. B.; FIGUEIRA, R. C. L.; NIEVOLA, C. C.; ALVES, E. S.; DOMINGOS, M.; RIBEIRO, A. P. Utilização da bromélia *Tillandsia usneoides* L. no biomonitoramento da poluição atmosférica na região metropolitana de São Paulo – SP, Brasil, International Nuclear Atlantic Conference – INAC, 2013.
- ALMEIDA, O. S. **Biologia floral: Tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.)**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2007.
- ANACLETO, A.; NEGRELLE, R. R. B. Comércio de bromélias no Paraná. **Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 43-52, 2013a.
- ANACLETO, A.; NEGRELLE, R. R. B. Produção de bromélias no Paraná. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 121-136, 2013b.
- ANACLETO, A.; NEGRELLE, R. R. B.; KOEHLER, H. S. Germinação de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae) em diferentes substratos alternativos ao pó de xaxim. **Acta Scientiarum Agrônômica**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 73-79, 2008.
- APG - Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 181, p. 1-20, 2016.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Eds.) **Anatomia vegetal**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012.
- BARFUSS, M. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 92, p. 337-351, 2005.
- BARFUSS, M. H. J.; TILL, W.; LEME, E. M. C.; PINZÓN, J. P.; MANZANARES, J. M.; HALBRITTER, H.; SAMUEL, R.; BROWN, J. K. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**. Auckland, v. 279, n. 1, p.1-97, 2016.
- 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**, Alta Floresta, v. 31, p. 665-676, 2017.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: profile of an adaptive radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae- Neglected taxonomic caracteres. **Brittonia**, New York, v. 36, p. 364-374, 1984.

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**, London, v. online, p. 1, 2019.

COMPANHIA BAIANA DE PESQUISA MINERAL – CBPM. **Meio Ambiente na Bahia**. Secretaria do Desenvolvimento Econômico. Governo do Estado da Bahia, Salvador. Disponível em: <<http://www.cbpm.ba.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=22>>. Acesso em: 20 de Jan. de 2020.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; NETO, J. E. B. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 231- 266, 2010.

CRAYN, D. M., WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A., v. 101, p. 3703-3708, 2004.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. 2. ed. New York Botanical Gardens, New York, p. 1262, 1981.

CRUZ, G. A. S.; ZIZKA, G.; SILVESTRO, D.; LEME, E. M. C.; SCHULTE, K.; BENKO-ISEPPON, A. M. Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr. (Bromeliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 107, p. 152–165, 2017.

CULLEY, T. M.; KLOOSTER, M. R. The Cleistogamous Breeding System: A Review of Its Frequency, Evolution, and Ecology in Angiosperms. **The Botanical Review**, Lancaster, v. 73, n. 1, p. 1–30, 2007.

DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach (the practical approach series). New York: Oxford University Press, p. 250, 1992.

DAHLGREN, R.; CLIFFORD, T. H.; YEO, P. E. **The families of the monocotyledons**: Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag. Berlin, p. 100, 1985.

DIAS, M. L.; PREZOTO, F.; ABREU, P. F.; NETO, L. M. Bromélias e suas principais interações com a fauna. **CES Revista**, Juiz de Fora, v. 28, n. 1, p. 3-16, 2014.

DRAGUNSKI, D. C.; CAIADO, J.; FERREIRA, E. F.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE Jr. A. Uso de bromeliáceas em biomonitoramento atmosférico. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 13, n. 3, p. 205-209, 2009.

DUTRA, G. A. P.; SOUSA, M. M.; RODRIGUES, R.; SUDE, C. P.; PEREIRA, T. N. S. Viabilidade em grãos de pólen fresco e armazenado em acessos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, Dois Irmãos, v. 18, p. 729-730, 2000.

EHLER, N.; SCHILL, R. Die Pollenmorphologie der Bromeliaceae. **Pollen et Spores**, Paris, v. 15, p. 13-45, 1973.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. **Stockolm**: Almqvist & Mikself, p. 539, 1952.

ERDTMAN, G.; PRAGLOWSKI, K. A note on pollen morphology. **Flora Neotropica**, New York, v. 14, p. 1, p. 28-33, 1974.

FAEGRI, K.; VAN DER PULL, L. **The principles of pollination ecology**. London: pergamon press, 3. ed., p. 244, 1979.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 Jan. 2020.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; LEME, E. M. C.; VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LOUZADA, R. B.; MONTEIRO, R. F.; JUDICE, D. M.; FERNANDEZ, E. P.; BORGES, R. A. X.; PENEDO, T. S. A.; MONTEIRO, N. P.; MORAES, M. A. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson & Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 315-397, 2013.

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

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

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; RINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SIMTH, J. A. C.; 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**, New York, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D. (cont. Atualizado) **Encyclopaedia of Bromeliads**. Disponível em: <<http://bromeliad.nl/bromNames/>>. University Botanic Gardens, Utrecht. Acesso em: 02 Jan. 2020.

HELLER, S.; LEME, E. M. C.; SCHULTE, K.; BENKO-ISEPPON, A. M.; ZISKA, G. Elucidating Phylogenetic Relationships in the *Aechmea alliance*: AFLP Analysis of *Portea* and the *Gravisia* Complex (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Systematic Botany**, Auckland, v. 40, n.3, p. 716–725, 2015.

- ISLAIR, P.; CARVALHO, K. S.; FERREIRA, F. C.; ZINA, J. Bromeliads in caatinga: an oasis for invertebrates. **Biotemas**, Florianópolis, v. 28, p. 67-77, 2015.
- KAMKE, R.; SCHMID, S.; ZILLIKENS, A.; LOPES, B. C.; STEINER, J. The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 8, p. 749–756, 2011.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University of Colorado, p. 583, 1993.
- 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**, Agra, India, v. 1, p. 106-111, 2010.
- LANDAU, E. C. **Padrões de ocupação espacial da paisagem na Mata Atlântica da Bahia, Brasil**. In: P.I. PRADO, E. C.; LANDAU, R. T.; MOURA, L. P. S.; PINTO, G. A. B.; FONSECA, K. Alger, organizadores. Corredor da Biodiversidade da Mata Atlântica do Sul da Bahia, 2003.
- LEME, E. M. C.; HELLER, S.; ZIZKA, G.; HALBRITTER, H. Nova circunscrição de *Cryptanthus* e novos gêneros e subgêneros *Cryptanthoid* (Bromeliaceae: Bromelioideae) com base em características morfológicas negligenciadas e filogenia molecular. **Phytotaxa**, Auckland, v. 318, p. 1-88, 2017.
- LEME, E.; Forzza, R.; HALBRITTER, H.; RIBEIRO, O. Contribution to the study of the genus *Fosterella* (Bromeliaceae: *Pitcairnioideae*) in Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 395, p. 137, 2019.
- LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Marigo comunicação visual Ltda, Rio de Janeiro, 1993.
- LOUZADA, R. B.; SCHULTE, K.; WANDERLEY, M. G. L.; SILVETRO, D.; ZIZKA, G.; BARFUSS, M. H.; PALMA-SILVA, C. Molecular phylogeny of the Brazilian endemic genus *Orthophytum* (Bromelioideae, Bromeliaceae) and its implications on morphological character evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 77, n. 1, p. 54–64, 2014.
- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.
- MACHADO, I. C. S.; LOPES, A. V. A polinização em ecossistema de Pernambuco: uma revisão do estado atual do conhecimento. In: TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Ed). **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Meio Ambiente, Fundação Joaquim Nabuco e Editora Massangana, Recife. p. 583-596, 2002.
- MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE, J. R. A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, 2009.
- MARQUES, J. S.; TAGLIATI, M. C.; FARIA, A. P. G. Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* regel (Bromeliaceae) and the first record of

chiropterophily for the genus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 835–842, 2015.

MARTIN, C. E. Physiological Ecology of the Bromeliaceae. **The Botanical Review**, Lancaster, v. 60, p. 1-82, 1994.

MARTINELLI, G. Reproductive biology of Bromeliaceae in Atlantic rainforest of southeastern Brazil. Phd Thesis. **St. Andrews**, University of St. Andrews, 1994.

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.

MATALLANA, G.; GODINHO, M. A. S.; GUILERME, 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**, Wien, v. 289, n. 1-2, p. 57-65, 2010.

MIRANDA, I. K. S. P. B.; MIRANDA, A. F. S.; SOUZA, F. V. D.; VANNIER-SANTOS, M. A.; PIROVANI, C. P.; PEPE, I. M.; RODOWANSKI, I. J.; FERREIRA, K. T. S. E.; VAZ, L. M. S.; SANDRA, A. A. The biochemical characterization, stabilization studies and the antiproliferative effect of bromelain against B16F10 murine melanoma cells. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v. 4, p. 442-454, 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Mapa de Vegetação Nativa na Área de Aplicação da **Lei no. 11.428/2006 – Lei da Mata Atlântica (ano base 2009)**. Brasília, 2015.

MOREIRA, B.A. **Palinotaxonomia da família Bromeliaceae do Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo, 2007.

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**, Jaboticabal, v. 41, n. 6, (e-485), 2019.

NEGRELLE, R. R. B.; ANACLETO, A. Cadeia de suprimentos de bromélias do Estado do Paraná - Brasil. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, Jaipur, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2019.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 15, p. 27-33, 2001.

PACINI, E.; HESSE, M. Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. **Flora**, Amsterdam, v. 199, p. 273-285, 2004.

PALHA, P. M. G.; SILVA, J. S.; SILVA, J. S.; LIMA, T. E. F.; MARQUES, M. F. O.; BEZERRA, J. L. B. Parâmetros ecológicos de fungos em Bromeliaceae em ecossistemas naturais e cultivadas na Bahia. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 4, p. 2025-2033, 2018.

PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; MICHAEL, F. F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia spp.*) facilitate

tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, West Sussex, v. 20, n. 15, p. 3185-3201, 2011.

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

PAULA, C. C; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélias**. Viçosa: UFV, p.106. 2004.

PIMENTEL, M. C. C; MACIEL, J. R. Propagação vegetativa e crescimento de Bromélias raras e ameaçadas de extinção do Centro de Endemismo Pernambuco. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, Piauí, v.3, n. 1, p. 41-44, 2018.

PONTES, R. A. S.; AGRA, M. F. Flora of Paraíba, Brazil: *Tillandsia* L. (BROMELIACEAE). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 1, pp.47-61, 2006.

PULIDO, R. E. E; MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; NEGRELLE, R. R. B. Germinação e crescimento *in vitro* de *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae). **Acta Agronomica**, Palmira, v. 67, p. 142-147, 2018.

REITZ, R. Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica. **Flora Ilustrada Catarinense**. Fasc. Brom. Itajaí: Herbário Bardosa Rodrigues, 1983.

SANTANA, C. S.; MACHADO, C. G. Fenologia de floração e polinização de espécies ornitófilas de bromeliáceas em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, BA, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 469-477, 2010.

SARAIVA, D. P.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R. C. Insights into the Evolution of *Pitcairnia* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), based on Morphological Evidence. **Systematic Botany**, Kent, v. 40, n. 3, p. 726-736, 2015.

SENA NETO, A. R.; ARAUJO, M. A. M.; BARBOZA, R. M. P.; FONSECA, A. S.; TONOLI, G. H.; SOUZA, F. V. D.; MATTOSO, L. H. C.; MARCONCINI, J. M. Comparative study of 12 pineapple leaf fiber varieties for use as mechanical reinforcement in polymer composites. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 64, p. 68-78, 2015.

SENA NETO, A. R.; CLARO, P. I. C.; SOUZA, F. V. D.; MATTOSO, L. H. C.; MARCONCINI, J. M. Poly(lactic acid) composites reinforced with leaf fibers from ornamental variety of hybrid pineapple (Potyra). **Polymer Composites**, New York, v. 38, p. 1228-1235, 2017.

SILVA, J. M.; LIMA, P. R. L.; **SOUZA, F. V. D.**; LEDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; PESTANA, K. N.; FERREIRA, C. F. Genetic diversity and nonparametric statistics to identify possible ISSR marker association with fiber quality of pineapple. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 91, p. e20180749, 2019.

SILVA, T. S.; WANDERLEY, M. G. L.; MELO, J. I. M. Flora of Paraíba State, Brazil: *Aechmea* Ruiz & Pav. (BROMELIACEAE). **Biota Neotropica**, Campinas, V. 18, 2018.

- SIQUEIRA-FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Alta Floresta, v. 15, n. 3, p. 497-443, 2001.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae. Part 3). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 14, n. 3, p.1493-2141, 1979.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 14, n.1, p.1-658, 1974.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica**, New York, v. 14, n. 2, p. 663-1492, 1977.
- 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**, Londrina, v. 8, p. 111-118, 2008.
- SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, C. M. A. P.; COSTA, D. S.; DOS SANTOS-SEREJO, JANAY, A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, London, v. 59, p. 1357-1376, 2012.
- 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**, Wageningen, v. 204, p. 13–28, 2015.
- 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**, Wageningen, v. 203, n. 1, p. 118–125, 2016.
- SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. D. C.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 223, p. 53–61, 2017.
- SOUZA, C. P. F. ; SOUZA, E. H. ; LÊDO, C. A. S. ; SOUZA, F. V. D. . Evaluation of the micropropagation potential of curauá pineapple hybrids for fiber production. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 48, p. 290-297, 2018.
- STONE, J. L.; THOMSON, J. D.; DENT-ACOSTA, S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, New York, v. 82, p. 1186-1197, 1995.
- 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**, Três Rios, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2018.
- TALORA, D. C.; MORELLATO, L. P. C. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 13-26, 2000.

- VASCONCELOS, A. L.. VASCONCELOS, A. L.; XIMENES, E. A.; RANDAU, K. P. *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae): aspectos farmacognósticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 2, p.151-159, 2013.
- VERSIEUX, L. M.; BARBARÁ, T.; WANDERLEY, M. G. L.; CALVENTE, A.; FAY, M. F.; LEXER, C. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): Implications for morphological evolution and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 64, n.1, p. 177–189, 2012.
- VERSIEUX, L. M.; DÁVILA, N.; DELGADO, G. C.; DE SOUSA, V. F.; DE MOURA, E. O.; FILGUEIRAS, T.; ALVES, M. V.; CARVALHO, E.; PIOTTO, D.; FORZZA, R. C.; CALVENTE, A.; JARDIM, J. G. Integrative research identifies 71 new plant species records in the state of Rio Grande do Norte (Brazil) and enhances a small herbarium collection during a funding shortage. **PhytoKeys**, Sofia, v. 86, p. 43–74, 2017.
- VERSIEUX, L.; COFFANI-NUNES, J.; PAGGI, G.; COSTA, A. Check-list of Bromeliaceae from Mato Grosso do Sul, Brazil, Iheringia, Porto Alegre, v. 73, sulp., p. 163-168, 2018.
- VERSIEUX, L. M.; MAGALHÃES, R.; CALVENTE, A. Extension of the *Cryptanthus* range in Northeastern Brazil with new findings in the phenotypic variation including changes in the trichome's distribution, thus enhancing the understanding of the *Cryptanthus zonatus* complex (Bromeliaceae). **Phytotaxa**, Auckland, v. 109, p. 54–60, 2013b.
- VERSIEUX, L. M.; TOMAZ, E. C.; JARDIM, J. G. New genus and species records of Bromeliaceae in the Caatinga of Rio Grande do Norte state, northeastern Brazil: *Orthophytum disjunctum* L.B. Sm. (Bromelioideae) and *Tillandsia paraibensis* R.A. Pontes (Tillandsioideae). **Check List**, São Paulo, v. 9, p. 663–665, 2013a.
- VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. **Bromélias Gigantes do Brasil**. Capim Macio, Natal, p. 200, 2015.
- VERSIEUX, L. M.; WENDT, T. Checklist of Bromeliaceae of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemism. **Selbyana**, Sarasota, v. 27, p. 107–146, 2006.
- WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E., COORDS. 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, v. 5, p. 39-161, 2007.
- ZANELLA, C. M.; JANKE, A.; PALMA-SILVA, C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; PINHEIRO, F. G.; PAGGI, G. M.; SOARES, L. E. S.; GOETZE, M.; BUTTOW, M. V.; BERED, F. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 35, p. 1020–1026, 2012.

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL¹

¹Capítulo a ser formatado e submetido ao periódico científico Grana.

MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL

RESUMO: *Tillandsia* L. é o maior gênero dentre as bromélias e é responsável pela grande amplitude geográfica da família, possuindo um importante papel ecológico nos ecossistemas. Na economia, as espécies de *Tillandsia* movimentam o mercado de plantas ornamentais. Estudos sobre a morfologia polínica são importantes para subsidiar estudos taxonômicos e de conservação, além de cruzamentos controlados que visam obter seleções promissoras. Com o intuito de auxiliar nesses estudos, o objetivo deste trabalho foi avaliar alguns aspectos reprodutivos como, os padrões da morfologia polínica, produção, viabilidade dos grãos de pólen por meio da germinação *in vitro* e métodos histoquímicos aplicados a espécies do gênero *Tillandsia* de ocorrência na Bahia, Brasil. Para caracterização morfológica, grãos de pólen foram preparados por acetólise láctica (ACLAC 40) e observados em microscópio de luz. A caracterização da exina foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. A germinação *in vitro* dos grãos de pólen foi realizada em dois meios diferentes (BM e SM) e a viabilidade foi comparada em dois testes histoquímicos (solução de Alexander e carmim acético). O padrão de abertura monocarpado dos grãos de pólen para *Tillandsia* foi confirmado para as espécies ocorrentes na Bahia. Variações na ornamentação e no tamanho foram observadas entre as espécies estudadas, com a maioria apresentando grãos de pólen de tamanho médio e *T. polystachia* e *T. juncea* com grãos de pólen de tamanho grande. O subgênero *Anoplophytum* apresentou grãos de pólen de tamanho médio para todas as 14 espécies estudadas, enquanto os subgêneros *Diaphoranthema* e *Phytarrhiza* apresentaram grãos de pólen classificados como pequenos. Os grãos de pólen da maioria das espécies estudadas apresentaram simetria bilateral, monocarpados e golpes com contornos irregulares, com exina semitectada, reticulada e heterobrocada. Esses estudos subsidiam futuros trabalhos taxonômicos e conservacionistas dessas espécies de grande importância ambiental e como planta ornamental. Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentaram elevadas taxas de germinação, comprimento do tubo polínico e viabilidade, exceto para *T. recurvata*, *T. usneoides* e *T. loliacea*. O meio de cultura SM e a coleta dos grãos de pólen no estágio de antese foram os mais adequados para as espécies de *Tillandsia*. Esse estudo demonstrou algumas características morfológicas que podem ser usadas na delimitação de espécies, além da caracterização dos subgêneros para futuros estudos de conservação.

Palavras chave: Germinação *in vitro* de grãos de pólen; histoquímica; microscopia; Tillandsioideae

MORPHOLOGY AND VIABILITY OF POLLEN GRAINS IN *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCCURRENT IN BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT: *Tillandsia* L. is the largest genus among the bromeliads and is responsible for the large geographical range of the family, having an important ecological paper that they perform in ecosystems. In the economy, *Tillandsia* species move the ornamental plant market. Studies about pollen morphology are important to support taxonomic and conservation studies, in addition to controlled crossings that aim to obtain promising selections. In order to help in these studies, the objective of this work was to evaluate some reproductive aspects such the patterns of pollen morphology, production, viability of pollen grains through *in vitro* germination and histochemical methods of species of the genus *Tillandsia* occurring in Bahia, Brazil. For morphological characterization, pollen grains were prepared by lactic acetolysis (ACLAC 40) and observed under a light microscope. The exine was realized by scanning electron microscopy. The *in vitro* germination of pollen grains was carried out in two different culture medium (BM and SM) and the viability was compared in two histochemical tests (Alexander solution and acetic carmine). The pattern of monocolpous opening of pollen grains for *Tillandsia* was confirmed for species occurring in Bahia. Variations in ornamentation and size were observed between the species studied, with the majority showing medium-sized pollen grains and *T. polystachia* and *T. juncea* with large-sized pollen grains. The subgenus *Anoplophytum* presented medium-sized pollen grains for all 14 species studied, while the subgenera *Diaphoranthema* and *Phytarrhiza* presented pollen grains classified as small. The pollen grains of most of the studied species showed bilateral symmetry, monocolpate with irregular contours, with semitectate, reticulate and heterobrochate exine. These studies support for future taxonomic and conservation works of these species of great environmental importance and as an ornamental plant. The pollen grains of the studied species showed high germination rates, pollen tube length and viability, except for *T. recurvata*, *T. usneoides* and *T. loliacea*. The SM culture medium and the collection of pollen grains at the anthesis stage was the most suitable for *Tillandsia* species. This study demonstrated some morphological characteristics that can be used in the delimitation of species, in addition to the characterization of subgenera for future conservation studies.

Keyword: *In vitro* germination of pollen grains; histochemistry; microscopy; Tillandsioideae.

INTRODUÇÃO

O gênero *Tillandsia* L. (Tillandsioideae) é o maior representante da família Bromeliaceae com 745 espécies distribuídas em sete subgêneros, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o Uruguai (BENZING, 2000; BARFUSS et al., 2016). No Brasil, ocorrem 82 espécies, destas 29 registradas para a região Nordeste e 24 encontradas no Estado da Bahia, principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica e Caatinga (FLORA DO BRASIL, 2020).

Estudos sobre a morfologia polínica são importantes para subsidiar estudos taxonômicos e de conservação, além de cruzamentos controlados em programas de melhoramento genético que visam obter seleções promissoras (SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2017a).

Alguns estudos foram publicados sobre a morfologia, ultraestrutura e viabilidade polínica em Bromeliaceae, a exemplo de Ehler e Schill (1973), Erdtman e Praglowski (1974), Roubik e Moreno (1991), Wanderley e Melhem (1991), Halbritter (1992), Halbritter e Till (1998), Tardivo e Rodrigues (1998), Vervaeke et al., (2003b), Souza et al. (2004) e Moreira, Cruz-Barros e Wanderley (2005), Soares et al. (2011), Silva et al. (2016), Souza et al. (2017a), Santos et al. (2018), Schoeder et al. (2019). Esses estudos, entretanto, em face do tamanho da família são considerados insuficientes. Visando fornecer subsídios à taxonomia desta família, Mez (1891-1894; 1896; 1934-1935) caracterizou inicialmente as três subfamílias baseando-se no padrão de abertura do grão de pólen. Entre as espécies de *Tillandsia*, apenas 12 foram estudadas (ROUBIK; MORENO, 1991; SOUZA et al., 2004; SILVA et al., 2016; SCHOEDER et al., 2019) havendo assim, uma carência de mais estudos.

Os grãos de pólen em espécies de Bromeliaceae apresenta formas e tamanhos diversificados. Desta forma, o reconhecimento de caracteres morfológicos, como o padrão de abertura do grão de pólen e ornamentação da exina são relevantes para identificação de espécies dentro da família (EHLER; SCHILL, 1973; ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974). A ornamentação da exina dos grãos de pólen é altamente conservada e geneticamente estável e tem sido frequentemente utilizada para investigar a origem e evolução das plantas e estudos taxonômicos e filogenéticos (SARWAR; TAKAHASHI, 2012; ZHANG et al. 2017).

Além dos estudos morfológicos, é importante o conhecimento sobre a viabilidade polínica para ações de conservação dessas espécies (SOUZA et al.,

2017a). A conservação de grãos de pólen pode ser feita mediante criopreservação e garante a manutenção de um importante *pool genético* da espécie, além de ser importante para permitir a realização de cruzamentos controlados em casos de assincronia de florescimento (SOUZA et al., 2015; 2017a; 2017b). Entretanto, para o estabelecimento de protocolos dessa natureza, estratégias para medir a viabilidade polínica são fundamentais. Dentre as metodologias existentes podem ser destacadas a germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; PARTON et al., 2002; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007), *in vivo* (OLIVEIRA; MAUÉS, KALUME, 2001) e os procedimentos colorimétricos (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; KEARNS; INOUE, 1993).

O método mais utilizado para determinar a fertilidade dos grãos de pólen é a germinação *in vitro*, tendo em vista que permite observar o desenvolvimento do tubo polínico. Mas, o sucesso da germinação *in vitro* depende da espécie e de fatores como, , nutrição da planta, horário e metodologia utilizada para a coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e, sobretudo, a composição do meio de cultura (TAYLOR; HEPLER, 1997; SOARES et al., 2008) que deve ser ajustado para cada espécie (BREWBAKER; KWACH, 1963; DAFNI, 1992). No entanto, a germinação *in vitro* pode não expressar de forma fidedigna a capacidade de fertilização do pólen conservado, sendo a fertilização *in vivo* o método mais eficiente e conclusivo.

Com o intuito de auxiliar nos estudos taxonômicos e de conservação da família Bromeliaceae, o objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia polínica, produção, viabilidade dos grãos de pólen por meio da germinação *in vitro* e métodos histoquímicos aplicados em espécies do gênero *Tillandsia* ocorrentes na Bahia, Brasil. Esse trabalho visa subsidiar também programas de cruzamentos controlados e obtenção de híbridos superiores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram estudadas 24 espécies de *Tillandsia* de ocorrência no Estado da Bahia conforme Tabela 1. Todas as espécies foram coletadas em populações naturais e incorporadas no Herbário HURB e no Banco de Germoplasma de Bromélias do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As coletas foram realizadas conforme autorização do SISBIO no: 69870-1 e as atividades realizadas estão devidamente cadastradas no SISGEN sob a autorização A9E9F8D.

Tabela 1. Espécies de *Tillandsia* ocorrentes na Bahia, Brasil, incluindo subgênero, município de coleta e voucher do Herbário HURB.

Espécie	Subgênero	Município	HURB
<i>T. bulbosa</i> Hook.f.	<i>Tillandsia</i>	Ilhéus	25395
<i>T. juncea</i> (Ruiz & Pav.) Poir.	<i>Tillandsia</i>	Santa Terezinha	22220
<i>T. polystachia</i> (L.) L	<i>Tillandsia</i>	Milagres	22131
<i>T. loliacea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	<i>Diaphoranthema</i>	Milagres	22130
<i>T. recurvata</i> (L.) L.	<i>Diaphoranthema</i>	Milagres	22149
<i>T. tricholepis</i> Baker	<i>Diaphoranthema</i>	Ibitiara	25753
<i>T. usneoides</i> (L.) L.	<i>Diaphoranthema</i>	Milagres	22152
<i>T. streptocarpa</i> Baker 1	<i>Phyrarrhiza</i>	Milagres	18591
<i>T. streptocarpa</i> Baker 2	<i>Phyrarrhiza</i>	Milagres	25006
<i>Tillandsia</i> sp.	<i>Phyrarrhiza</i>	Milagres	18592
<i>T. chapeuensis</i> Rauh	<i>Anoplophytum</i>	Morro do Chapéu	23983
<i>T. gardneri</i> Lindl.	<i>Anoplophytum</i>	Ilhéus	25393
<i>T. geminiflora</i> Brongn.	<i>Anoplophytum</i>	Brejões	22222
<i>T. globosa</i> Wawra	<i>Anoplophytum</i>	Muritiba	25569
<i>T. heubergeri</i> Ehlers	<i>Anoplophytum</i>	Brejões	17892
<i>T. milagrensis</i> Leme	<i>Anoplophytum</i>	Milagres	17887
<i>T. pohliana</i> Mez	<i>Anoplophytum</i>	Morro do Chapéu	23978
<i>T. sprengeliana</i> Klotzsch ex Mez	<i>Anoplophytum</i>	Palmeiras	23997
<i>T. stricta</i> Sol. 1	<i>Anoplophytum</i>	Ilhéus	25384
<i>T. stricta</i> Sol. 2	<i>Anoplophytum</i>	Milagres	22180
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i> Rauh ex. Ehlers & Heidt	<i>Anoplophytum</i>	Morro do Chapéu	23977
<i>T. tenuifolia</i> L.	<i>Anoplophytum</i>	Milagres	15626
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i> Griseb.	<i>Anoplophytum</i>	Mucugê	25755
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i> (Wawra) L.B.Sm.	<i>Anoplophytum</i>	Cruz das Almas	24541

Morfologia Polínica

A morfometria dos grãos de pólen foi realizada a partir da acetólise láctica fraca (ACLAC 40), conforme Raynal e Raynal (1979), escolhendo-se aleatoriamente 25 grãos para aferição das medidas dos diâmetros polar, equatorial e espessura da exina com auxílio do programa ImageJ 1.4.3.67 (RASBAND, 2012).

Os grãos de pólen das espécies foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl₂ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas. Em seguida, foram desidratadas em série etílica crescente por 20 minutos cada. As amostras foram secas ao ponto crítico (Leica EM CPD 300, Balzers, Alemanha) por meio de CO₂ líquido. Após isso, foram montadas sobre suportes metálicos recobertos com fita adesiva carbonada e metalizadas com ouro por 180 segundos (Leica EM ACE 600 Wetzlar, Alemanha). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de pressão variável JEOL JSMIT300LV (Tokyo, Japão) operando a 20 kV sendo as imagens digitalizadas. Os grãos de pólen foram caracterizados conforme nomenclatura descrita por Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

Quantificação dos Grãos de Pólen

A estimativa do número dos grãos de pólen foi realizada por meio da contagem dos grãos presentes por flor, considerando a existência de seis anteras. Três botões florais de diferentes plantas de cada espécie foram armazenados em tubos de Eppendorf® individualmente, seguindo metodologia descrita por Kearns e Inouye (1993).

Viabilidade dos Grãos de Pólen

Foram coletadas três flores de diferentes plantas nos estádios de pré-antese (botão - 18h), antese (7h30) e pós-antese (recém fechada - 18h). A germinação *in vitro* dos grãos de pólen foram avaliados em dois diferentes meios de cultura: BM (PARTON et al., 2002): H₃BO₃ (0,01%), sacarose (20%), ágar (0,5%), pH 6,5 e SM (SOARES et al., 2008): H₃BO₃ (0,01%), Ca(NO₃)₂ * 4H₂O (0,03%), MgSO₄ * 7H₂O (0,02%), KNO₃ (0,01%), sacarose (15%), ágar (0,8%) e pH 6,5.

Os grãos de pólen foram distribuídos em placas de Petri contendo 35 mL de cada meio de cultura. As placas foram mantidas no escuro a uma temperatura de 27 ± 1 °C por 24 horas, para seguir aos procedimentos de contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento do tubo polínico conforme SOARES et al. (2008). O delineamento experimental utilizado para a porcentagem de germinação do grão de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (meios de cultura x estádios) com 12 repetições, sendo cada repetição, composta por três placas de Petri subdividida em quatro quadrantes.

A contagem dos grãos de pólen germinados foi realizada 24 horas após o estabelecimento em meio de cultura. As imagens foram obtidas com auxílio de estereomicroscópio Leica EZ4 D (Leica, Wetzlar, Alemanha).

Todos os grãos de pólen de cada quadrante foram contabilizados para a determinação da porcentagem de germinação. Para o comprimento do tubo polínico foram mensurados aleatoriamente cinco tubos em cada quadrante, perfazendo 60 tubos polínicos em cada tratamento. Os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen foram considerados germinados.

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados em arc sen ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e teste Scott-Knott ($p < 0,01$) para as espécies e Tukey ($p < 0,01$) para os estádios de abertura da flor, por meio do programa R Core Team (2018).

Para os testes histoquímicos dos grãos de pólen foram utilizados dois corantes: solução de Alexander, 2% de ácido láctico (ALEXANDER, 1980) e carmim acético (1%) (KEARNS; INOUE, 1993). As anteras de três flores de diferentes plantas nos três estádios de pré-antese, antese e pós-antese foram distribuídas sobre lâminas histológicas, adicionando uma gota do respectivo corante, cobrindo-se com lamínula e avaliando-se em seguida em microscópio de luz (Leica, LMD 7000, Alemanha). Por meio do método de varredura da lâmina foram contabilizados 100 grãos de pólen por lâmina com três repetições cada, totalizando 300 grãos de pólen para cada corante.

O delineamento experimental utilizado para os testes histoquímicos foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (teste histoquímico x estádios) com três repetições, sendo cada repetição, composta por uma lâmina histológica. Os

dados de porcentagem de viabilidade foram transformados em arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e teste Scott-Knott ($p < 0,01$) para as espécies e Tukey ($p < 0,01$) para os estádios de abertura da flor, por meio do programa R Core Team (2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia Polínica

Foi observada variabilidade morfopolínica entre as 24 espécies de *Tillandsia*, principalmente em relação ao tamanho, formato e ornamentação da exina dos grãos de pólen. Essa variação foi menos evidente entre as espécies dentro dos subgêneros estudados (Tabelas 2 e 3 e Figuras 2 a 6).

Em relação ao tamanho dos grãos de pólen, foi observada uma variação apenas no subgênero *Tillandsia*, com a *T. bulbosa* apresentando grãos de pólen de tamanho médio e *T. polystachia* e *T. juncea* com grãos de pólen de tamanho grande. O subgênero *Anoplophytum* apresentou grãos de pólen de tamanho médio para todas as 14 espécies estudadas, enquanto os subgêneros *Diaphoranthema* e *Phytarrhiza* apresentaram grãos de pólen classificados como pequenos (Tabela 2). Vale destacar, que o critério usado para classificar o tamanho dos grãos de pólen seguiu as recomendações de Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

Tabela 2. Características morfométricas dos grãos de pólen de 24 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil.

Espécies	Vista Equatorial ¹		Vista Polar ¹		Tamanho dos grãos de pólen ²	Espessura ¹		Diâmetro ¹
	Diâmetro Equatorial (µm)	Diâmetro Polar (µm)	Equatorial maior (µm)	Equatorial menor (µm)		Exina (µm)	Teto (µm)	
<i>T. bulbosa</i>	44,41 ± 4,15	31,57 ± 5,93	28,11 ± 3,12	27,16 ± 2,87	Médio	2,61 ± 0,53	0,57 ± 0,19	2,10 ± 0,22
<i>T. juncea</i>	50,46 ± 6,60	35,27 ± 6,08	37,93 ± 4,58	36,75 ± 5,32	Grande	4,33 ± 0,85	0,49 ± 0,11	1,21 ± 0,11
<i>T. polystachia</i>	58,14 ± 4,08	37,90 ± 4,48	39,93 ± 3,21	37,71 ± 3,22	Grande	2,45 ± 0,33	0,27 ± 0,07	1,71 ± 0,41
<i>T. loliacea</i>	21,11 ± 3,28	19,54 ± 3,10	19,68 ± 2,28	19,22 ± 2,31	Pequeno	3,03 ± 0,44	0,52 ± 0,08	2,20 ± 0,09
<i>T. recurvata</i>	22,37 ± 3,30	18,61 ± 3,21	18,86 ± 2,20	16,47 ± 2,32	Pequeno	2,22 ± 0,21	1,11 ± 0,27	2,58 ± 0,51
<i>T. tricholepis</i>	21,44 ± 2,21	18,41 ± 2,11	19,53 ± 1,87	17,88 ± 2,00	Pequeno	2,42 ± 0,26	0,45 ± 0,05	1,89 ± 0,22
<i>T. usneoides</i>	19,28 ± 2,78	18,75 ± 3,12	17,93 ± 2,08	17,85 ± 2,18	Pequeno	2,19 ± 0,21	0,65 ± 0,06	1,95 ± 0,49
<i>T. streptocarpa</i> 1	24,96 ± 2,71	18,88 ± 2,99	18,47 ± 1,95	18,24 ± 2,05	Pequeno	2,27 ± 0,32	0,45 ± 0,11	1,21 ± 0,42
<i>T. streptocarpa</i> 2	24,97 ± 3,47	18,95 ± 2,98	20,04 ± 2,98	19,65 ± 3,02	Pequeno	1,61 ± 0,30	0,48 ± 0,05	1,21 ± 0,19
<i>Tillandsia</i> sp.	21,83 ± 6,13	16,45 ± 5,58	18,24 ± 4,36	17,44 ± 4,95	Pequeno	2,98 ± 0,41	0,41 ± 0,05	0,58 ± 0,14
<i>T. chapeuensis</i>	40,67 ± 5,15	37,97 ± 3,95	36,14 ± 2,98	35,82 ± 3,03	Médio	2,75 ± 0,44	1,36 ± 0,16	0,75 ± 0,21
<i>T. gardneri</i>	41,18 ± 3,40	35,95 ± 3,90	36,70 ± 3,23	36,18 ± 3,01	Médio	2,53 ± 0,26	1,22 ± 0,51	0,54 ± 0,11
<i>T. geminiflora</i>	37,54 ± 8,32	32,61 ± 7,15	35,75 ± 6,34	33,83 ± 5,98	Médio	3,41 ± 0,28	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,04
<i>T. globosa</i>	31,64 ± 3,14	25,08 ± 4,35	27,59 ± 3,41	26,01 ± 4,02	Médio	3,51 ± 1,08	Ausente	Ausente
<i>T. heubergeri</i>	35,67 ± 2,74	29,53 ± 4,46	28,98 ± 3,21	28,48 ± 3,75	Médio	2,72 ± 0,55	0,91 ± 0,28	1,82 ± 1,03
<i>T. milagrensis</i>	39,02 ± 2,90	32,06 ± 3,45	33,04 ± 2,89	29,13 ± 2,53	Médio	2,11 ± 0,40	0,48 ± 1,86	1,43 ± 0,39
<i>T. pohliana</i>	33,15 ± 3,45	28,01 ± 3,55	30,24 ± 2,95	27,84 ± 2,35	Médio	2,56 ± 0,46	0,71 ± 0,13	1,74 ± 0,41
<i>T. sprengeliana</i>	37,21 ± 4,99	33,21 ± 3,85	36,26 ± 3,21	34,88 ± 3,85	Médio	2,97 ± 0,49	1,04 ± 0,16	3,89 ± 1,01
<i>T. stricta</i> 1	32,68 ± 3,47	26,66 ± 2,98	26,17 ± 3,54	25,76 ± 3,21	Médio	2,27 ± 0,22	0,48 ± 0,13	0,97 ± 0,14
<i>T. stricta</i> 2	32,24 ± 3,87	26,04 ± 4,99	28,21 ± 3,32	26,14 ± 3,32	Médio	1,81 ± 0,31	0,68 ± 0,04	0,72 ± 0,06
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i>	35,84 ± 3,48	27,88 ± 4,86	27,02 ± 3,21	24,67 ± 3,36	Médio	2,55 ± 0,31	0,93 ± 0,03	1,33 ± 0,03
<i>T. tenuifolia</i>	37,25 ± 5,69	29,41 ± 4,01	32,93 ± 4,05	29,01 ± 4,25	Médio	2,52 ± 0,37	0,73 ± 0,22	1,47 ± 0,17
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i>	30,77 ± 2,69	23,83 ± 4,28	24,27 ± 2,02	21,58 ± 3,45	Médio	1,98 ± 0,39	0,75 ± 0,15	0,95 ± 0,21
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i>	31,95 ± 5,64	28,74 ± 5,39	29,31 ± 5,21	27,77 ± 5,01	Médio	3,06 ± 0,51	0,64 ± 0,11	1,36 ± 0,32

¹ Os grãos de pólen foram acetolizado conforme Raynal e Raynal (1979). Os resultados correspondem à média de 25 repetições ± desvio padrão.² De acordo com Hesse et al. (2009), médio (25 – 50 µm), grande (50 - 100 µm) e muito grande (> 100 µm).

Tabela 3. Caracteres morfológicos dos grãos de pólen de 24 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil.

Espécies	Forma ¹	Polaridade ¹	Simetria ¹	Exina ¹	Ornamentação ¹	Lumem ¹	Teto ¹
<i>T. bulbosa</i>	oblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. juncea</i>	oblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	muitos báculos	pisilado
<i>T. polystachia</i>	oblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	muitos báculos	pisilado
<i>T. loliacea</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	muitos báculos	pisilado
<i>T. recurvata</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. tricholepis</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	muitos báculos	pisilado
<i>T. usneoides</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. streptocarpa</i> 1	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. streptocarpa</i> 2	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>Tillandsia</i> sp.	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. chapeuensis</i>	oblata-esferoidal	heteropolar	bilateral	semitectado	perfurada	-	estriado
<i>T. gardneri</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	perfurada	-	pisilado
<i>T. geminiflora</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	perfurada	-	pisilado
<i>T. globosa</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	eutectado	verrucada	-	-
<i>T. heubergeri</i>	oblata-esferoidal	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	báculos ausentes	pisilado
<i>T. milagrensis</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	muitos báculos	pisilado
<i>T. pohliana</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. sprengeliana</i>	oblata-esferoidal	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. stricta</i> 1	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	microrreticulada	poucos báculos	pisilado
<i>T. stricta</i> 2	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	microrreticulada	poucos báculos	pisilado
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	báculos ausentes	pisilado
<i>T. tenuifolia</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	báculos ausentes	estriado
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i>	suboblata	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	pisilado
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i>	oblata-esferoidal	heteropolar	bilateral	semitectado	reticulada-heterobrocada	poucos báculos	estriado

¹ De acordo com Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

Em observações realizadas a partir da acetólise dos grãos de pólen pode-se verificar uma variação na espessura da exina, teto e diâmetro do lumem (Tabela 2). Para a espessura da exina o menor valor foi observado em *T. stresptocarpa* 2 com $1,61 \pm 0,30 \mu\text{m}$ e a maior em *T. juncea* com $4,33 \pm 0,85 \mu\text{m}$. Para a espessura do teto a variação foi de $0,21 \pm 0,04 \mu\text{m}$ para *T. geminiflora* a $1,36 \pm 0,51 \mu\text{m}$ para *T. chapeuensis*. Para o diâmetro lumem a variação foi de $0,19 \pm 0,04 \mu\text{m}$ para *T. geminiflora* e $3,89 \pm 1,01 \mu\text{m}$ para *T. sprengeliana* (Tabela 2). Vale destacar que para a *T. globosa* o teto e o lumem foram ausentes por possuir grãos de pólen com exina eutectada. A espessura da exina está relacionada à sua ornamentação, que por sua vez, tem a função de proteção quanto a desidratação e incidência dos raios ultra-violetas nos grãos de pólen. Além disso, existe uma correlação direta da ornamentação e espessura da exina com os polinizadores, uma revisão mais detalhada sobre esse assunto pode ser encontrada em Ferguson e Skvarla (1982), Philbrick e Osborn (1994) e Hesse (2000). A espessura da exina também é um parâmetro importante quando se pensa em conservação dos grãos de pólen, pois influencia diretamente na dissecação e na ruptura dos grãos de pólen (SOUZA et al., 2015).

Quantificação dos grãos de pólen

O número de grãos de pólen produzidos por flor variou entre as espécies, exceto para as espécies do subgênero *Diaphoranthema* que apresentaram a variação de 12.133 grãos de pólen para *T. usneoides* a 24.200 grãos de pólen para a *T. tricholepis* e no subgênero *Tillandsia* com uma variação de 11.267 grãos de pólen por flor para *T. bulbosa* e 23.367 para *T. juncea* (Figura 1). No subgênero *Phytarrhiza* observaram-se 152.133 grãos por flor para *T. streptocarpa* 1, 133.800 para *T. streptocarpa* 2, enquanto *Tillandsia* sp. apresentou uma média de 51.267 grãos de pólen por flor. O subgênero *Anoplophytum* apresentou uma variação maior entre as espécies com 11.667 grãos de pólen por flor para *T. tenuifolia* var. *vaginata* a 80.033 para *T. milagrensis* (Figura 1).

Diversos fatores podem interferir na produção de grãos de pólen por flor, entre os quais adaptação da planta ao ambiente, altitude, condições climáticas, dentre outros fatores (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2010; KHANDURI, 2011). A variação no número de grãos de pólen por flor foi também verificada por SOUZA et

al. (2017a) a partir de 18 espécies pertencentes a cinco gêneros diferentes. Esses autores verificaram uma variação no número de grãos de pólen por flor dentro de um mesmo gênero, a exemplo da *Aechmea bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f. com 32.080 e *A. distichantha* Lem. com 221.666 grãos.

Na prática, quanto maior a quantidade de grãos de pólen produzidos por flor maior a chance de ser transportado por um polinizador. Quando se pensa em conservação e melhoramento genético menos flores serão necessárias em cruzamentos/ hibridações. Além disso, a produção de grãos de pólen juntamente com a viabilidade podem influenciar diretamente no sucesso da fertilização e produção das sementes (SIQUEIRA et al., 2009), justificando a necessidade da realização de estudos desta natureza.

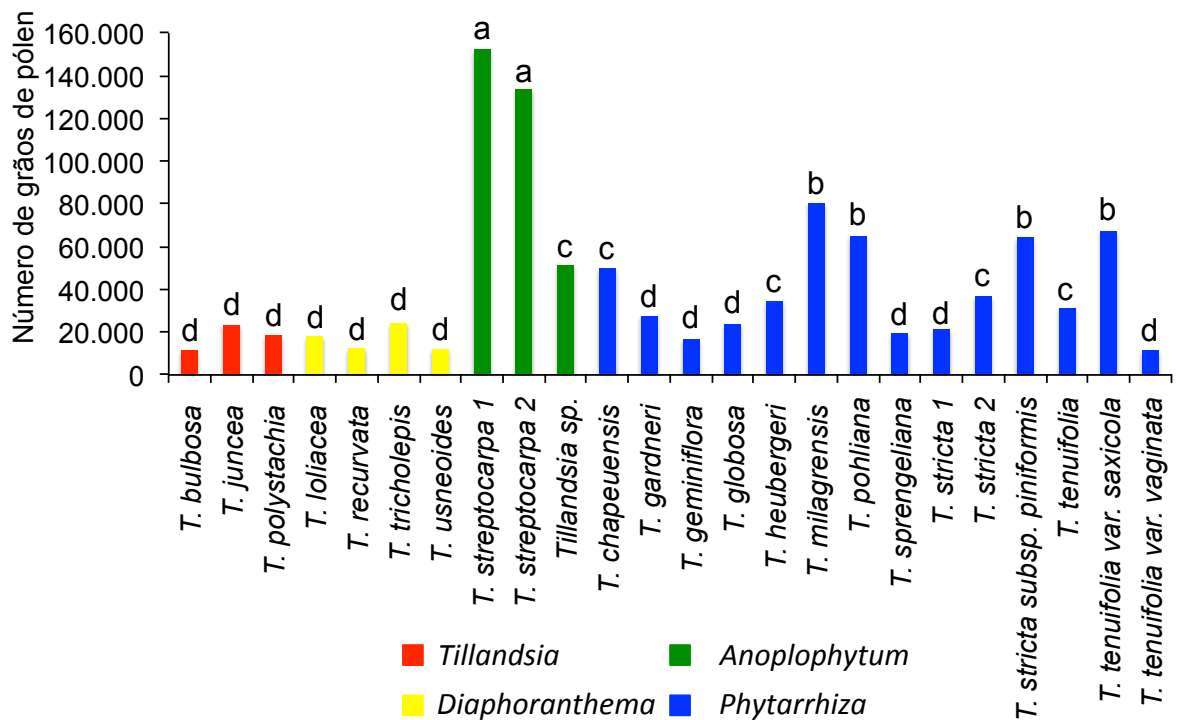


Figura 1. Quantificação dos grãos de pólen conforme metodologia de Kearns e Inouye (1993) em 24 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil.

Subgênero *Tillandsia*

As três espécies do subgênero *Tillandsia* apresentaram grãos de pólen grande (*T. juncea* e *T. polystachia*), com exceção da *T. bulbosa* que apresentou grãos de pólen médio. Todas as espécies apresentaram grãos de pólen com forma oblata, âmbito elíptico, heteropolar, simetria bilateral, monocolpados com contornos irregulares, exina semitectada, reticulada-heterobrocada, com lúmens menores em direção ao colpo e as extremidades dos polos, com poucos báculos (*T. bulbosa*) a muitos báculos (*T. juncea* e *T. polystachia*) com muros de superfície pisilado (Tabelas 2 e 3, Figura 2).

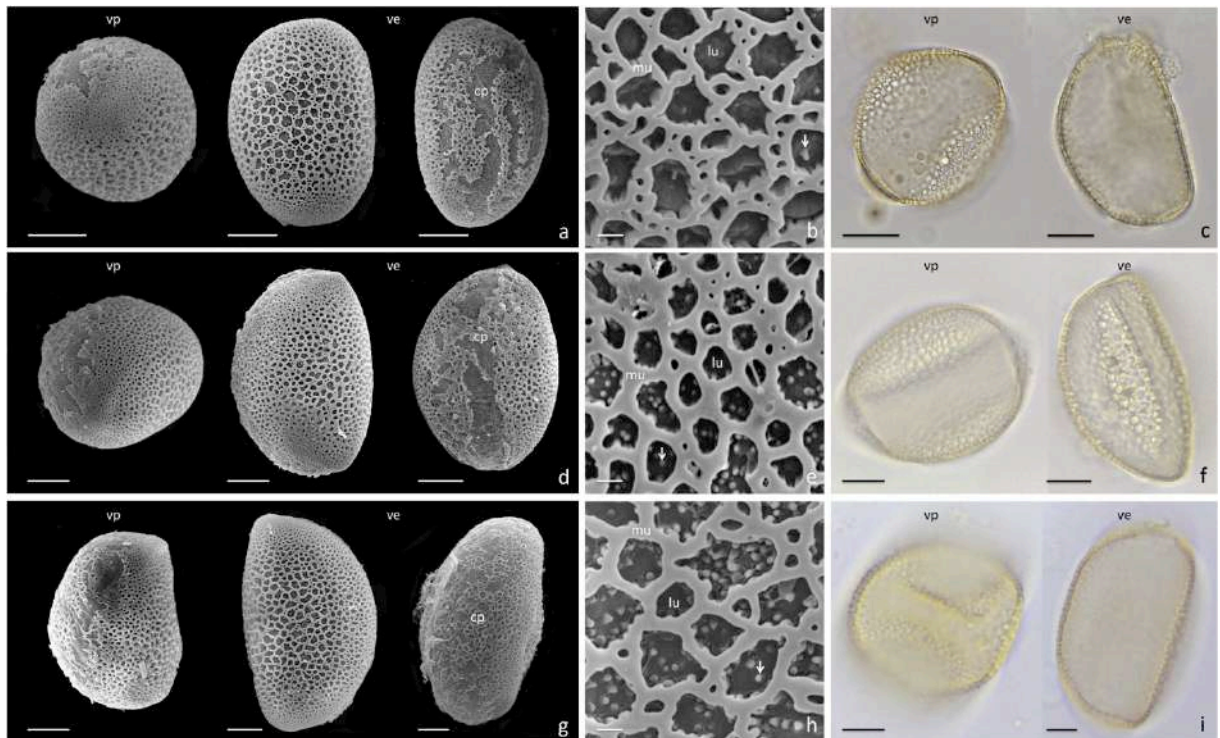


Figura 2. Morfologia dos grãos de pólen de *Tillandsia* (Bromeliaceae) subgênero *Tillandsia* ocorrentes na Bahia, Brasil. a-c) *T. bulbosa*; d-f) *T. juncea*; g-i) *T. polystachia*; a, d, g) vista polar (vp), vista equatorial (ve) e (cp) colpo obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV); b, e, h) detalhe da ornamentação da exina evidenciando o muro (mu), lumem (lu) e báculos (seta) em MEV; c, f, i) grão de pólen após acetólise lática. Barras: a, c, d, f, g, i = 10 µm; b, e, h = 1 µm.

Subgênero *Diaphoranthema*

As quatro espécies do subgênero *Diaphoranthema* apresentaram grãos de pólen pequeno, com forma suboblata, heteropolar e simetria bilateral, monocolpados com contornos irregulares, exina semitectada, reticulada, heterobrocada, com lúmens menores em direção ao colpo e as extremidades dos polos, com poucos báculos (*T. recurvata* e *T. usneoides*) a muitos báculos (*T. loliaceae* e *T. tricholepis*) com muros de superfície pisilado (Tabelas 2 e 3, Figura 3).

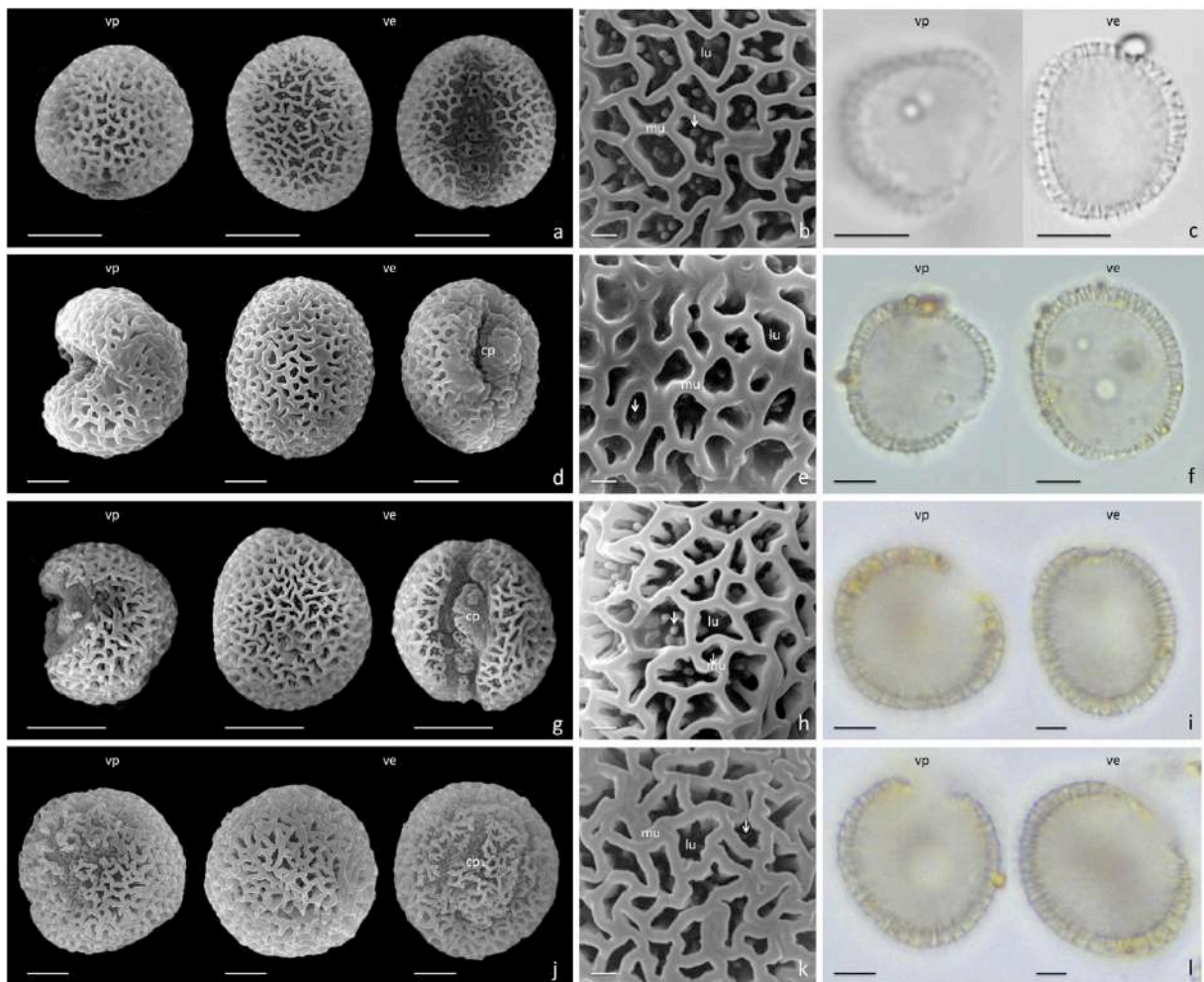


Figura 3. Morfologia dos grãos de pólen de *Tillandsia* (Bromeliaceae) subgênero *Diaphoranthema* ocorrentes na Bahia, Brasil. a-c) *T. loliaceae*; d-f) *T. recurvata*; g-i) *T. tricholepis*; j-l) *T. usneoides*; a, d, g, j) vista polar (vp), vista equatorial (ve) e colpo (cp) obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV); b, e, h, k) detalhe da ornamentação da exina evidenciando o muro (mu), lumem (lu) e báculos (seta) em MEV; c, f, i, l) grão de pólen após acetólise láctica. Barras: a, c, d, f, g, i, j, l = 10 µm; b, e, h, k = 1 µm.

Subgênero *Phytarrhiza*

As três espécies do subgênero *Phytarrhiza* apresentaram grãos de pólen pequenos, forma suboblata, heteropolar, simetria bilateral, monocolpados com contornos irregulares, exina semitectada, reticulada-heterobrocada, com lúmens menores em direção ao colpo e as extremidades dos polos, com poucos báculos e muro com superfície pisilado (Tabelas 2 e 3, Figura 4).

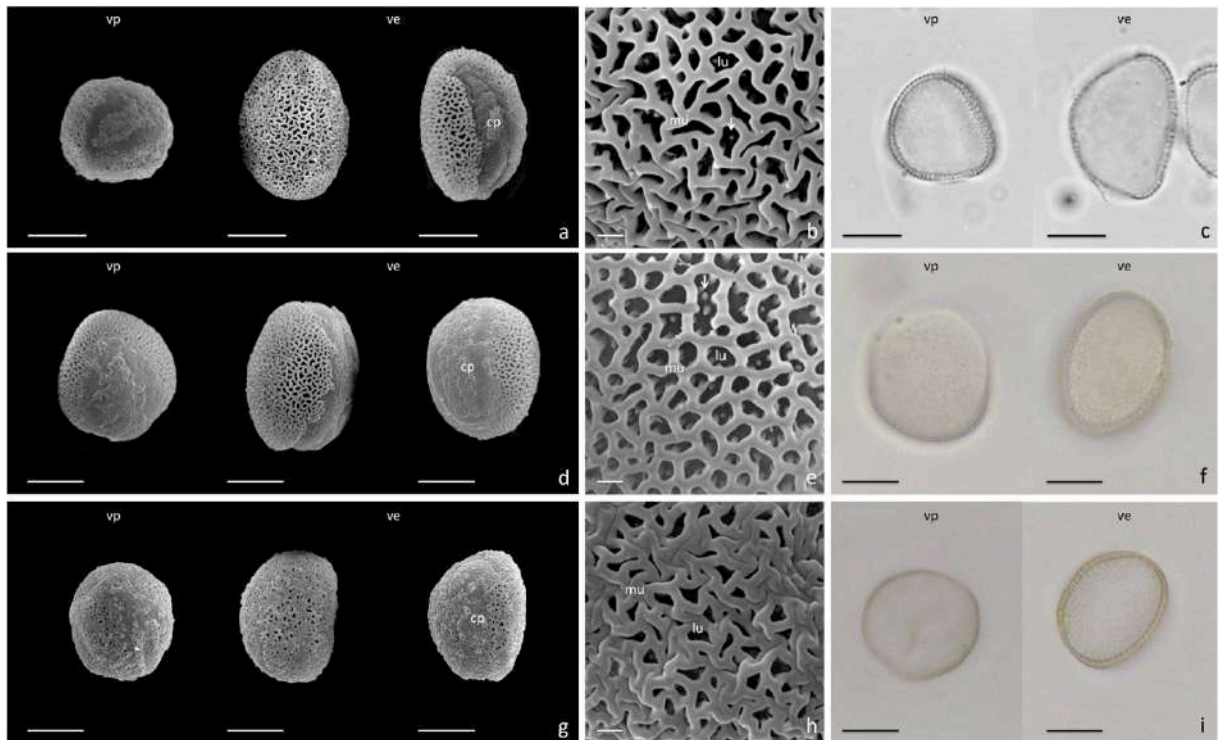


Figura 4. Morfologia dos grãos de pólen de *Tillandsia* (Bromeliaceae) subgênero *Phytarrhiza* ocorrentes na Bahia, Brasil. a-c) *T. streptocarpa* 1; d-f) *T. sprestocarpa* 2; g-i) *Tillandsia* sp.; a, d, g) vista polar (vp), vista equatorial (ve) e colpo (cp) obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV); b, e, h) detalhe da ornamentação da exina evidenciando o muro (mu), lúmen (lu) e báculos (seta) em MEV; c, f, i) grão de pólen após acetólise láctica. Barras: a, c, d, f, g, i = 10 µm; b, e, h = 1 µm.

Subgênero *Anoplophytum*

Das 14 espécies do subgênero *Anoplophytum* todas apresentaram grãos de pólen médio (Tabela 2). A forma dos grãos de pólen variou de suboblata (*T. gardneri*, *T. geminiflora*, *T. globosa*, *T. milagrensis*, *T. pohliana*, *T. stricta* 1, *T. stricta* 2, *T. stricta* subsp. *piniformis*, *T. tenuifolia*, *T. tenuifolia* var. *saxicola*) a oblata-esferoidal (*T. chapeuensis*, *T. sprengeliana*, *T. heubergeri* e *T. tenuifolia* var. *vaginata*), heteropolar e simetria bilateral, monocolpados com contornos irregulares, exina semitectada com exceção da *T. globosa* com exina eutectada (Tabela 3, Figuras 5 e 6).

A ornamentação da exina vista em MEV variou de perfurada (*T. chapeuensis*, *T. gardneri* e *T. geminiflora*), verrucada (*T. globosa*), microrreticulada (*T. stricta* 1 e *T. stricta* 2), reticulada-heterobrocada (*T. heubergeri*, *T. milagrensis*, *T. pohliana*, *T. sprengeliana*, *T. stricta* subsp. *piniformis*, *T. tenuifolia*, *T. tenuifolia* var. *saxicola* e *T. tenuifolia* var. *vaginata*), com malhas menores em direção ao colpo e as extremidades dos polos (Tabela 3, Figuras 5 e 6).

Os lúmens são irregulares com poucos báculos (*T. pohliana*, *T. sprengeliana*, *T. stricta* 1 e *T. stricta* 2, *T. tenuifolia* var. *saxicola* e *T. tenuifolia* var. *vaginata*), muitos báculos (*T. milagrensis*) e ausentes de báculos (*T. heubergeri*, *T. stricta* subsp. *piniformis* e *T. tenuifolia*) com muros de superfície pisilado (*T. heubergeri*, *T. milagrensis*, *T. pohliana*, *T. sprengeliana*, *T. stricta* 1 e *T. stricta* 2, *T. stricta* subsp. *piniformis* a *T. tenuifolia* var. *saxicola*) a estriada (*T. tenuifolia* e *T. tenuifolia* var. *vaginata*) (Tabela 3, Figuras 5 e 6).

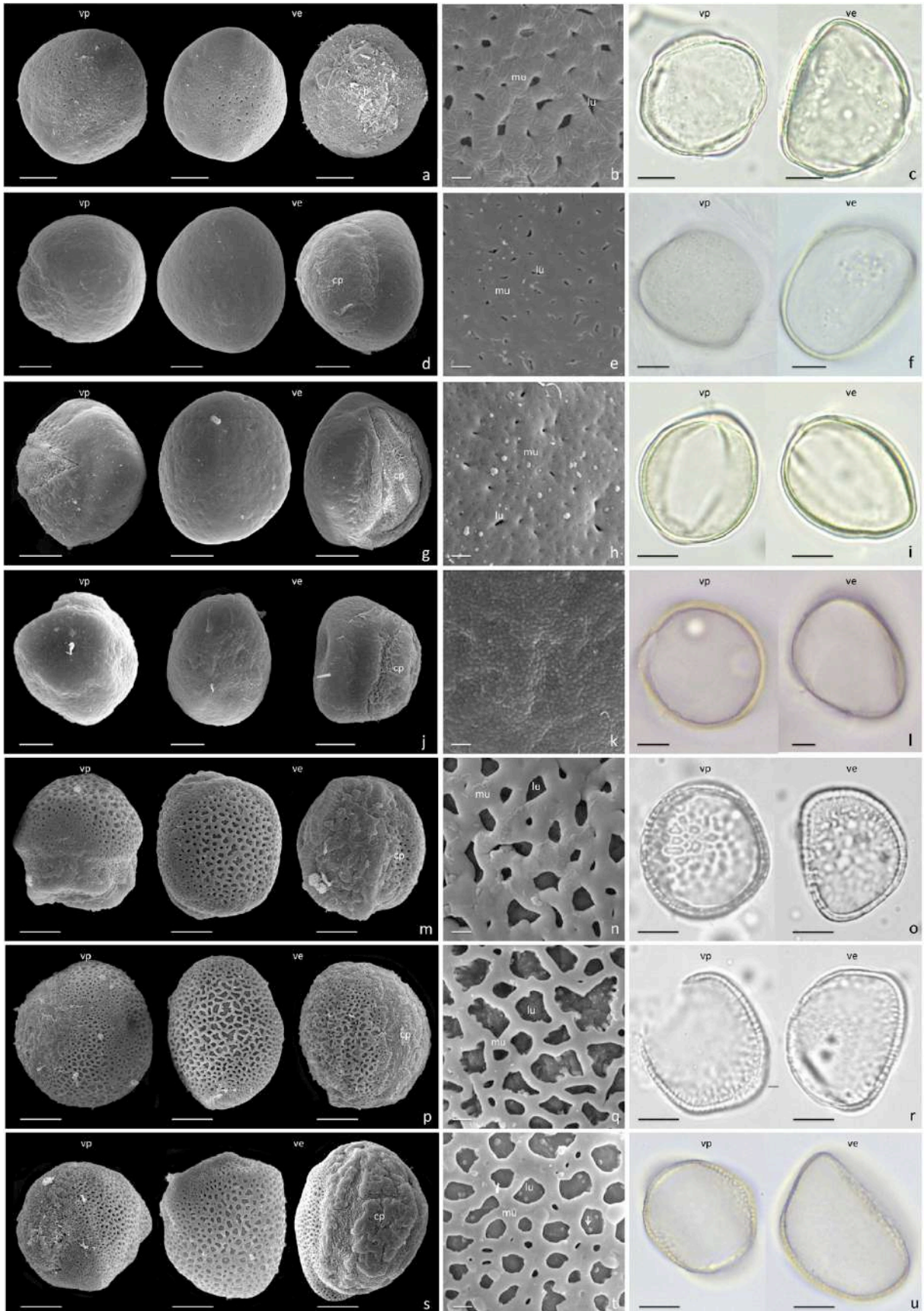


Figura 5. Morfologia dos grãos de pólen de *Tillandsia* (Bromeliaceae) subgênero *Anoplophytum* ocorrentes na Bahia, Brasil. a-c) *T. chapeuensis*; d-f) *T. gardneri* 2; g-i) *T. geminiflora*; j-l) *T. globosa*; m-o) *T. heubergeri*; p-r) *T. milagrensis*; s-u) *T.*

pohliana. a, d, g, j, m, p, s) vista polar (vp), vista equatorial (ve) e colpo (cp) obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV); b, e, h, k, n, q, t) detalhe da ornamentação da exina evidenciando o muro (mu), lumem (lu) e báculos (seta) em MEV; c, f, i, l, o, r, u) grão de pólen após acetólise láctica. Barras: a, c, d, f, g, i, j, l, m, o, p, r, s, u = 10 μm ; b, e, h, k, n, q, t = 1 μm .

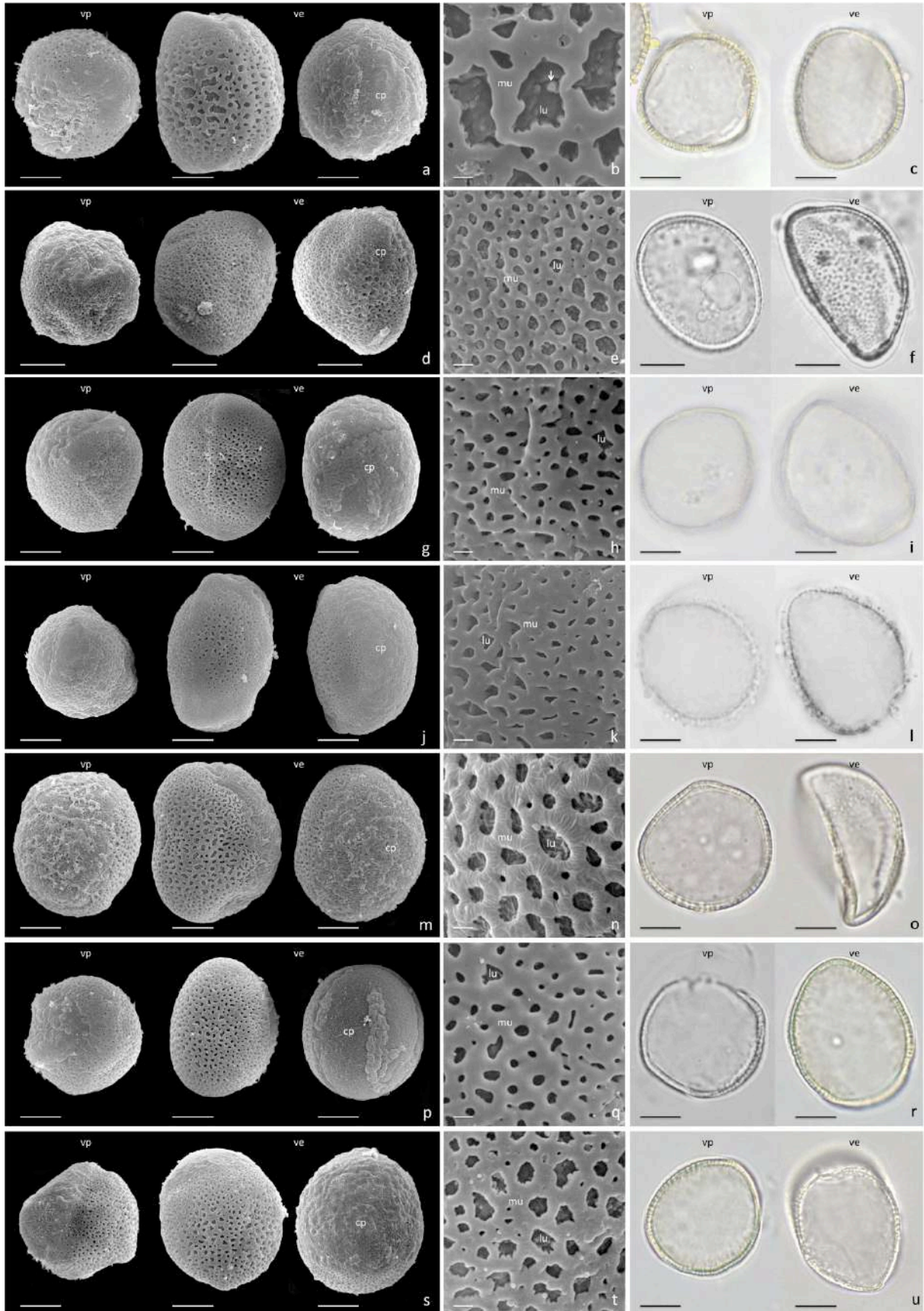


Figura 6. Morfologia dos grãos de pólen de *Tillandsia* (Bromeliaceae) subgênero *Anoplophytum* ocorrentes na Bahia, Brazil. a-c) *T. sprengeliana*, d-f) *T. stricta* 1, g-i) *T. stricta* 2, j-l) *T. stricta* subsp. *piniformis*, m-o) *T. tenuifolia*, p-r) *T. tenuifolia* var.

saxicola, s-u) *T. tenuifolia* var. *vaginata*, a, d, g, j, m, p, s) vista polar (vp), vista equatorial (ve) e colpo (cp) obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV); b, e, h, k, n, q, t) detalhe da ornamentação da exina evidenciando o muro (mu), lumem (lu) e báculos (seta) em MEV; c, f, i, l, o, r, u) grão de pólen após acetólise lática. Barras: a, c, d, f, g, i, j, l, m, o, p, r, s, u = 10 µm; b, e, h, k, n, q, t = 1 µm.

A partir da análise multicategórica (dados quantitativos e qualitativos dos grãos de pólen) realizada com as 24 espécies de *Tillandsia*, foi possível verificar a formação de quatro grupos bem consistentes (Figura 7) pelo método de agrupamento UPGMA com base no algoritmo de Gower, utilizando como ponto de corte a dissimilaridade genética média ($D_{dg} = 0,25$). O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ($r=0,82$, $P < 0,0001$, 10.000 permutações) revelou um bom ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original, conforme preconizado por (ROHLF; FISHER, 1968).

Pode-se evidenciar uma homogeneidade morfológica quanto à abertura monocolpada dos grãos de pólen para todas as 24 espécies. As características observadas no presente estudo estão de acordo com os trabalhos de Wanderley e Melhem (1991), Halbritter (1992), Ehler e Schill (1973), Souza; Mendonça; Gonçalves-Esteves (2004) e Silva et al. (2016) que observaram para subfamília Tillandsioideae grãos de pólen monocolpados com pouca variação morfológica.

O grupo G1 foi formado pelas três espécies do subgênero *Tillandsia* e apresentam características em comum, principalmente, em relação a forma oblata dos grãos de pólen, diferente de todas as demais espécies (Figura 7).

O grupo G2 foi formado com as quatro espécies do subgênero *Diaphoranthema*, com todas as espécies apresentando em comum, grãos de pólen pequeno e forma suboblata. Vale destacar que a circunscrição nesse grupo foi de 0,08 (Figura 7).

O grupo G3 compartilhou as 14 espécies do subgênero *Anoplophytum* e foi o mais heterogêneo, principalmente quanto à ornamentação da exina (Tabela 3), com quatro padrões diferentes (reticulada-heterobrocada, microrreticulada, verrucada e perfurada). Nas espécies com exina reticulada-heterobrocada foi possível verificar diferenças no número de báculos no lúmem (muitas, poucas ou ausentes), além do muro com superfície pisilado a estriado (Figura 7).

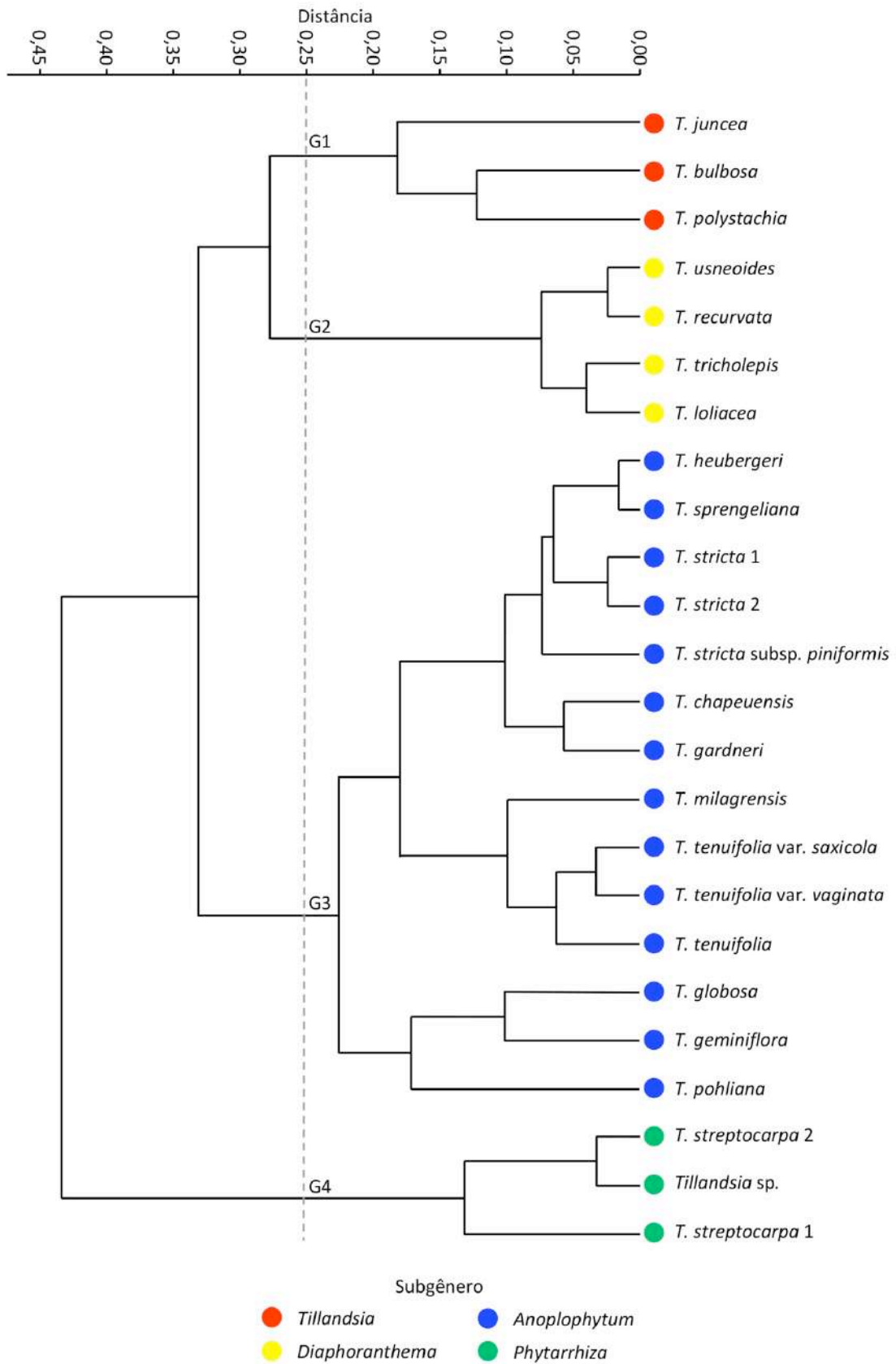


Figura 7. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 24 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil, pelo método UPGMA com base no algoritmo de Gower, a partir das características morfológicas qualitativas e quantitativas.

Tillandsia heubergeri e *T. sprengeliana*, apresentaram semelhanças entre si em relação aos grãos de pólen (Figuras 5 e 6). Estas duas espécies são muito semelhantes morfológicamente quanto à estrutura da planta e inflorescência. Fiorato (2009) realizando um estudo taxonômico das espécies de *Tillandsia* da Bahia, já sugere essa sinonimização, uma vez que, as características de brácteas florais glabras e lepidotas, nervura central na bráctea floral e sépalas posteriores carenadas são caracteres fracos para manter a espécie e pode representar um grau de variação dentro da mesma. No entanto, estudos mais aprofundados de filogenia são necessários para confirmar essa sinonimização. Espécies como *T. stricta* 1 e *T. stricta* 2, *T. tenuifolia* var. *saxicola* e *T. tenuifolia* var. *varginata* também formaram grupos semelhantes entre si.

Tillandsia stricta 1 e *T. stricta* 2 diferenciam apenas pelo ambiente em que vivem, sendo a *T. stricta* 1 de Mata Atlântica e a *T. stricta* 2 de mata semidecidual, além da coloração das brácteas florais, sendo uma de rosa encarnada e a outra laranja-esverdeada, respectivamente. As duas *T. tenuifolia* são variedades botânicas distintas e convivem também em diferentes ambientes, sendo a *T. tenuifolia* var. *saxicola* em campos rupestres na chapada Diamantina e a *T. tenuifolia* var. *varginata* em Mata Atlântica. Vale destacar que, a *T. tenuifolia* var. *varginata* foi sinonimizada e inicialmente descrita como *T. candida* (FIORATO, 2009).

O grupo G4 foi formado por três espécies pertencentes ao subgênero *Phytarrhiza* com circunscrição próxima a 0,10 (Figura 7). Os grãos de pólen dessas três espécies são muito semelhantes, quanto ao tamanho, forma, simetria, lúmen irregular com poucos báculos e muro com superfície piloso. As três espécies ocorrem no mesmo bioma Caatinga, sendo *T. streptocarpa* 1 epífita, *T. streptocarpa* 2 e *Tillandsia* sp. rupícolas.

Em estudo palinológico com 12 espécies de duas subfamílias de Bromeliaceae (Ptilairnioideae e Tillandsioideae), Souza et al. (2004) encontraram grãos de pólen predominantemente médios e monocolpados, corroborando os resultados aqui encontrados. Entretanto, para a ornamentação da exina foram observadas duas divergências, sendo *T. usneoides* com exina microreticulada e *T. globosa* com exina perfurada. Isso pode estar relacionado à baixa magnitude das imagens capturadas no estudo de Souza et al. (2004), enquanto que as imagens capturadas no presente trabalho, em relação aos detalhes da exina, foram de mais 10.000x, possibilitando assim, uma maior acurácia nos resultados, sendo a

superfície de *T. usneoides* reticulada heterobrocada e *T. globosa* com exina verrucada.

Silva et al. (2016) também analisaram a morfologia polínica de quatro espécies de *Tillandsia*, sendo que as espécies *T. geminiflora*, *T. polystachia* e *T. stricta* apresentaram os mesmos caracteres aqui analisados. *Tillandsia gardineri* foi descrita com ornamentação microrreticulada (vs. perfurada), porém esses autores observaram as imagens apenas por microscopia de luz por meio da acetólise, o que justifica essa divergência.

O uso de caracteres morfológicos é uma alternativa a ser considerada em estudos taxonômicos em substituição às características que estão mais sujeitas a alterações (cor de folhas, flores e, tamanho de estruturas) em virtude das características dos grãos de pólen serem consideradas mais conservadas e estáveis (SARWAR; TAKAHASHI, 2012; ZHANG et al., 2017).

Viabilidade polínica

As análises estatísticas mostram interação significativa entre os meios de cultura e os estádios de desenvolvimento floral, tanto para a porcentagem de germinação *in vitro* como para o comprimento do tubo polínico (Tabela 4, Figura 8a-d).

Após 24 horas de incubação, de maneira geral, verificou-se que flores em antese resultam em grãos de pólen com maior porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico, para todas as espécies estudadas, com exceção da *T. tenuifolia* que, após a antese foi significativamente superior. Algumas espécies não apresentaram diferenças significativas entre os estádios florais de desenvolvimento, a exemplo de *T. loliacea*, *T. recurvata*, *T. tricholepis*, *Tillandsia* sp. *T. globosa*, *T. milagrensis* e *T. tenuifolia* var. *saxicola*, independente do meio de cultura (Tabela 4).

Em relação ao meio de cultura, o SM (SOARES et al., 2008) promoveu maior porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico para todas as espécies estudadas, com exceção da *T. tenuifolia*. Algumas espécies (*T. stricta* subsp. *piniformis*, *T. milagrensis*, *T. tenuifolia* var. *saxicola*) não diferiram significativamente nas porcentagens de germinação entre os meios BM (PARTON et al., 2002) e SM nas três fases de antese (Tabela 4).

As espécies *T. recurvata*, *T. usneoides* e *T. loliacea* não germinaram no meio BM e obtiveram taxas de germinação abaixo de 30% nos três estádios de desenvolvimento floral no meio de cultura SM, enquanto a *T. stricta* 1 obteve as maiores porcentagens de germinação na antese nos dois meios de cultura.

O crescimento do tubo polínico variou conforme a espécie. *Tillandsia juncea* e *T. geminiflora* apresentaram os maiores comprimento do tubo polínico em meio de cultura SM (Tabela 4). O meio de cultura SM (SOARES et al., 2008) foi satisfatório para promover a germinação *in vitro* dos grãos de pólen em *Tillandsia* mesmo em espécies com baixa produção de grãos de pólen por flor como *T. recurvata*, *T. usneoides* e *T. loliacea* que não obtiveram sucesso no meio de cultura BM. Desta forma, a utilização do meio de cultura SM composto por cálcio, ácido bórico, magnésio, nitrato de potássio e sacarose, pode ser determinante para promover a germinação dos grãos de pólen nas espécies estudadas. A composição do meio de cultura BM não possui fontes de cálcio, magnésio e potássio, nutrientes do meio que pode ter afetado diretamente o desempenho na germinação e comprimento dos tubos polínicos. Souza et al. (2017a) estudando a germinação *in vitro* de 18 espécies de bromélias pertencentes a cinco gêneros, também observaram uma superioridade do meio SM em relação ao BM. Esses autores observaram germinação no meio de cultura BM em apenas oito espécies com valores inferiores a 39 %. Vale destacar que, o meio de cultura BM (PARTON et al. 2002) foi desenvolvido para bromélias do gênero *Aechmea* Ruiz & Pav., *Vriesea* Lindl., *Guzmania* Ruiz & Pav. e *Tillandsia*, mas não foi eficiente para as espécies estudadas no presente trabalho. Desta forma, um meio de cultura mais adequado para a germinação de grãos de pólen de bromélias deve incluir, além de carboidratos, elementos como ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio (TAYLOR; HEPLER, 1997).

Tabela 4. Porcentagem de germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico de 24 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil em dois meios de cultura (BM e SM) e três fases de antese floral (pré-antese, antese e pós-antese).

	Meio de Cultura	Germinação (%)			Comprimento do tubo polínico (mm)		
		Pré-antese	Antese	Pós-antese	Pré-antese	Antese	Pós-antese
<i>T. bulbosa</i>	BM	15,97 bB	30,60 bA	29,23 bA	0,22 bB	0,50 bA	0,50 bA
	SM	55,50 aC	98,77 aA	82,17 aB	0,54 aC	1,17 aA	0,97 aB
<i>T. juncea</i>	BM	57,07 bB	77,23 bA	75,13 aA	0,82 bC	1,18 bA	0,99 aB
	SM	69,40 aB	92,07 aA	73,57 aB	1,22 aB	1,38 aA	1,11 aB
<i>T. polystachia</i>	BM	33,10 bB	53,50 bA	43,77 bAB	0,40 bAB	0,52 bA	0,33 bB
	SM	60,70 aB	88,03 aA	55,20 aB	0,85 aB	1,38 aA	0,78 aB
<i>T. loliacea</i>	BM	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
	SM	7,86 aA	10,73 aA	6,77 aA	0,17 aA	0,16 aA	0,14 aA
<i>T. recurvata</i>	BM	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
	SM	15,36 aA	16,93 aA	5,13 aA	0,20 aA	0,21 aA	0,14 aA
<i>T. tricholepis</i>	BM	23,23 bA	28,20 bA	22,43 bA	0,08 aA	0,11 aA	0,15 aA
	SM	32,23 aA	41,53 aA	35,40 aA	0,09 aA	0,20 aA	0,09 aA
<i>T. usneoides</i>	BM	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA
	SM	4,03 aB	25,62 aA	5,70 aB	0,19 aA	0,24 aA	0,17 aA
<i>T. streptocarpa 1</i>	BM	21,10 bB	52,33 bA	17,63 bB	0,24 aA	0,25 aA	0,19 aA
	SM	52,37 aB	88,43 aA	21,60 aC	0,22 aA	0,31 aA	0,20 aA
<i>T. streptocarpa 2</i>	BM	64,97 aA	66,70 bA	66,83 aA	0,74 bA	0,87 bA	0,84 aA
	SM	68,17 aB	88,50 aA	64,60 aB	1,04 aA	1,08 aA	0,95 aA
<i>Tillandsia sp.</i>	BM	63,53 bB	84,57 aA	81,10 bA	0,43 aA	0,49 aA	0,37 aA
	SM	91,47 aA	95,53 aA	96,13 aA	0,33 aA	0,47 aA	0,44 aA
<i>T. chapeuensis</i>	BM	67,23 bB	85,80 aA	77,50 aAB	0,49 bA	0,58 bA	0,51 aA
	SM	77,60 aAB	87,47 aA	72,73 aB	0,62 aB	0,81 aA	0,58 aB
<i>T. gardneri</i>	BM	13,10 bB	58,00 bA	11,93bB	0,41 bB	1,05 aA	0,55 bB
	SM	61,53 aB	86,77 aA	55,50 aB	0,95 aB	1,16 aA	0,80 aB
<i>T. geminiflora</i>	BM	23,67 bC	75,47 bA	44,73 bB	0,43 bB	0,64 bA	0,58 bA
	SM	78,00 aB	91,30 aA	87,77 aAB	1,10 aA	1,24 aA	1,11 aA

<i>T. globosa</i>	BM	61,63 bB	85,00 aA	85,43 aA	0,59 bA	0,61 bA	0,60 bA
	SM	75,60 aA	85,63 aA	84,60 aA	0,90 aB	1,06 aA	1,01 aAB
<i>T. heubergeri</i>	BM	6,30 bB	58,10 bA	47,37 bA	0,44 bC	1,17 aA	0,87 bB
	SM	45,53 aB	84,70 aA	77,50 aA	0,98 aB	1,20 aA	1,10 aAB
<i>T. milagrensis</i>	BM	84,50 aA	94,57 aA	85,70 aA	0,76 aB	0,96 aA	0,63 bC
	SM	83,73 aA	95,33 aA	86,67 aA	0,60 bC	1,03 aA	0,82 aB
<i>T. pohliana</i>	BM	35,63 aB	65,50 bA	40,10 bB	0,37 aB	0,63 bA	0,47 aAB
	SM	39,83 aB	86,00 aA	54,73 aA	0,49 aB	0,78 aA	0,49 aB
<i>T. sprengeliana</i>	BM	17,00 bC	57,40 bA	44,77 bB	0,52 bC	1,10 aA	0,89 bB
	SM	66,84 aB	90,19 aA	69,03 aB	0,96 aB	1,16 aA	1,05 aAB
<i>T. stricta</i> 1	BM	53,56 bB	92,43 aA	57,43bB	0,51 aB	0,79 aA	0,45 aB
	SM	60,83 aC	100,00 aA	74,80 aB	0,40 aB	0,83 aA	0,37 aB
<i>T. stricta</i> 2	BM	17,62 bB	35,13 bA	31,57 bA	0,42 bA	0,47 bA	0,45 aA
	SM	69,70 aB	97,37 aA	77,37 aB	0,64 aAB	0,78 aA	0,56 aB
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i>	BM	74,00 aB	92,90 aA	83,13 aAB	1,03 aA	1,04 bA	0,86 aB
	SM	82,30 aB	95,97 aA	85,47 aAB	0,88 bB	1,21 aA	0,80 aB
<i>T. tenuifolia</i>	BM	22,40 bC	31,53 aB	74,50 aA	0,50 aA	0,50 aA	0,56 bA
	SM	39,90 aB	35,43 aB	77,97 aA	0,20 bB	0,35 bB	0,84 aA
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i>	BM	72,17 aA	70,67 aA	71,26 aA	1,03 bA	1,11 aA	1,01 aA
	SM	71,37 aA	74,97 aA	72,53 aA	1,18 aA	1,03 aB	1,14 aAB
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i>	BM	15,33 bC	62,70 bA	47,60 bB	0,36 aA	0,45 aA	0,39 aA
	SM	53,83 aB	91,27 aA	51,07 aB	0,37 aA	0,51 aA	0,42 aA
CV (%)			11,43			7,55	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

* Meios de cultura: BM (PARTON et al., 2002). SM (SOARES et al., 2008).

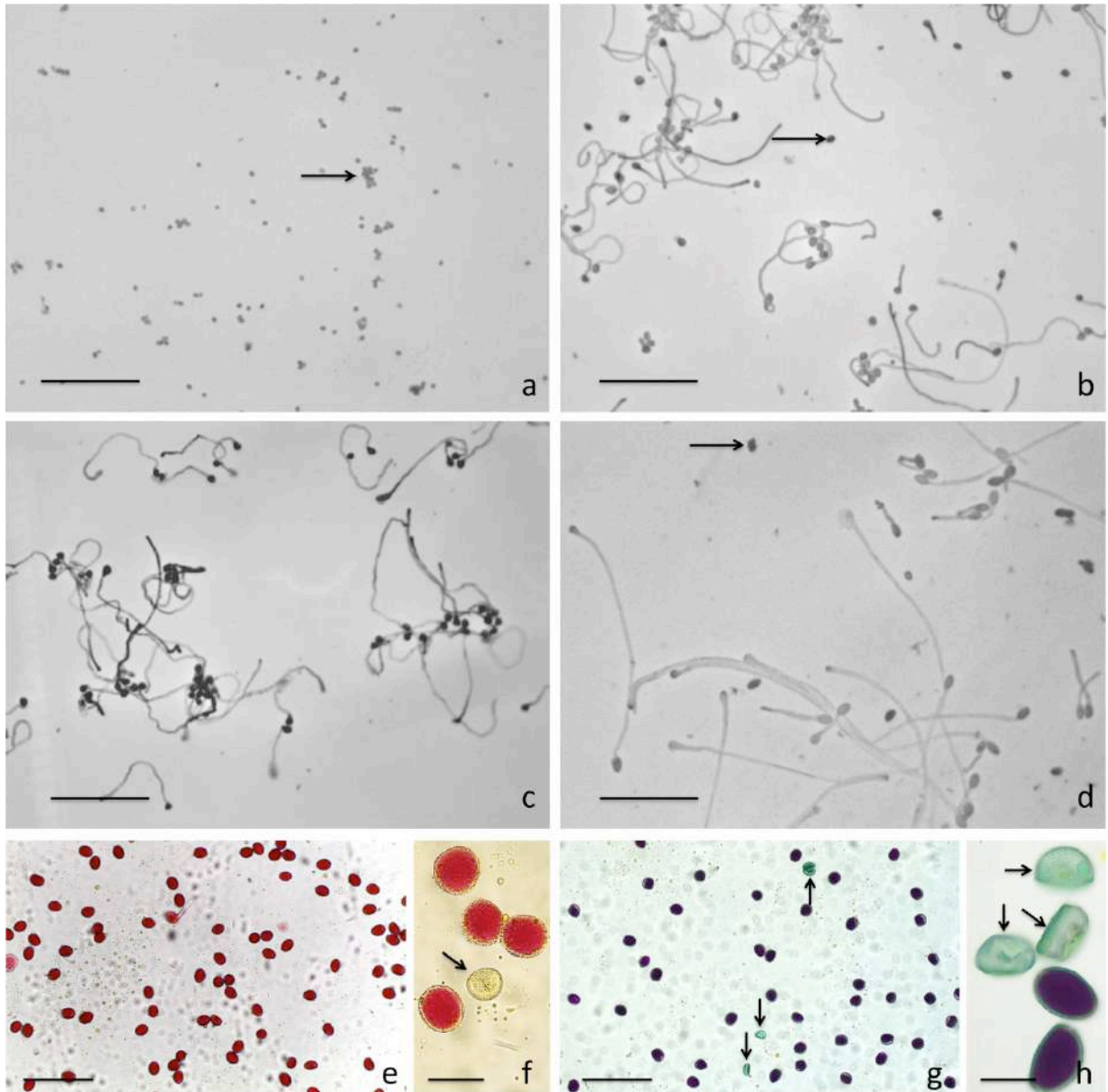


Figura 8. Viabilidade dos grãos de pólen de *Tillandsia* ocorrentes na Bahia, Brasil. a-d) germinação *in vitro* dos grãos de pólen em meio de cultura BM (PARTON et al., 2002) (a) e SM (SOARES et al., 2008) (b-d) na antese. e-f) Testes histoquímicos com carmim acético (e-f) e solução de Alexander 2% (g-h). a) *T. loliacea* evidenciando a ausência de germinação dos grãos de pólen em meio de cultura BM na antese. b) *T. milagrensis*, evidenciando alta porcentagem de germinação dos grãos de pólen em meio de cultura SM na antese. c) *T. stricta* 1, evidenciando 100 % de germinação dos grãos de pólen em meio de cultura SM na antese. d) *T. juncea*, evidenciando longos tubos polínicos em meio de cultura SM na antese. e) *T. stricta* 1, evidenciando 100% de viabilidade com carmim acético na antese. f) *T. tenuifolia*, evidenciando grãos de pólen viáveis e inviáveis (seta). g) *T. stricta* 1, evidenciando alta porcentagem de viabilidade com solução de Alexander 2%. h) *T. bulbosa*, evidenciando grãos de pólen viáveis e inviáveis corados em verde (seta). Barras: a-d) 500 μ m; e, g) 200 μ m; f-h) 50 μ m.

Com base nos resultados da viabilidade polínica pelos testes histoquímicos, verificou-se que os grãos de pólen corados com carmim acético apresentaram viabilidade superior, independente do estágio de desenvolvimento floral quando comparado com a solução de Alexander (Tabela 5, Figura 8 e-h).

As espécies *T. milagrensis* e *T. tenuifolia* var. *saxicola* obtiveram valores superiores a 70% de viabilidade nos dois corantes testados e nos três estádios de desenvolvimento. Em contrapartida, *T. recurvata*, *T. usneoides* apresentaram baixa viabilidade com valores inferiores a 46% nos dois corantes avaliados e *T. loliacea* com valores inferiores a 12% em ambos os corantes (Tabela 5). Os resultados obtidos com coloração de solução de Alexander, em sua maioria, corresponderam ao obtido com a germinação *in vitro*, enquanto os valores de viabilidade obtidos com o uso do corante carmim acético superestimaram. Souza et al. (2017a) e Soares et al., (2008) relataram que o carmim acético superestima a viabilidade polínica, pois reage principalmente com a integridade cromossômica (KEARNS; INOUE, 1993). A coloração com carmim acético tem sido pouco recomendada para estudos de viabilidade polínica, tendo em vista os resultados poucos confiáveis, embora seja um método simples e barato (PARFIT; GANESHAN, 1989; TECHIO, 2002). Os testes histoquímicos parecem revelar apenas a integridade das estruturas celulares: a integridade cromossômica revelada pelo carmim acético (KEARNS; INOUE, 1993) e a integridade do protoplasma, bem como da celulose da parede dos grãos de pólen que interagem com a fucsina ácida e o verde malaquita da solução de Alexander (ALEXANDER, 1980).

Para o sucesso das polinizações é imprescindível que os grãos de pólen estejam viáveis com altas taxas de germinação e um eficiente desenvolvimento do tubo polínico. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para os estudos de conservação e podem também subsidiar cruzamentos controlados dentro e entre as espécies de *Tillandsia*.

Tabela 5. Histoquímica para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen de 24 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil.

Espécie	Histoquímica	Pré-antese	Antese	Pós-antese
<i>T. bulbosa</i>	Alexander	18,43 bB	39,30 bA	33,96 bA
	Carmim Acético	68,50 aB	99,60 aA	86,60 aA
<i>T. juncea</i>	Alexander	60,40 bB	78,63 bA	71,10 bAB
	Carmim Acético	86,33 aA	92,23 aA	85,33 aA
<i>T. polystachia</i>	Alexander	38,53 bB	55,23 bA	45,33 bAB
	Carmim Acético	91,53 aA	96,46 aA	96,20 aA
<i>T. loliacea</i>	Alexander	5,50 aA	5,00 aA	2,76 aA
	Carmim Acético	6,30 aA	11,63 aA	6,90 aA
<i>T. recurvata</i>	Alexander	5,00 bA	4,00 bA	1,66 bA
	Carmim Acético	45,36 aA	40,26 aA	36,46 aA
<i>T. tricholepis</i>	Alexander	25,73 bA	25,09 bA	23,06 bA
	Carmim Acético	84,66 aA	90,43 aA	77,73aA
<i>T. usneoides</i>	Alexander	2,00 bA	6,66 bA	3,33 bA
	Carmim Acético	47,36 aB	72,28 aA	42,70 aB
<i>T. streptocarpa 1</i>	Alexander	22,83 bB	58,83 bA	21,13 bB
	Carmim Acético	79,13 aA	90,70 aA	54,66 aB
<i>T. streptocarpa 2</i>	Alexander	61,90 aA	71,00 bA	68,70 aA
	Carmim Acético	68,86 aB	95,06 aA	76,20 aB
<i>Tillandsia</i> sp.	Alexander	64,53 bB	87,36 aA	82,66 bA
	Carmim Acético	97,03 aA	95,10 aA	95,16 aA
<i>T. chapeuensis</i>	Alexander	68,50 bB	85,20 aA	76,32 aAB
	Carmim Acético	83,50 aAB	94,76 aA	79,36 aB
<i>T. gardneri</i>	Alexander	23,26 bB	61,76 bA	14,66 bB
	Carmim Acético	59,13 aC	97,66 aA	77,93 aB
<i>T. geminiflora</i>	Alexander	29,60 bC	79,20 bA	51,90 bB
	Carmim Acético	78,56 aA	92,03 aA	89,33 aA
<i>T. globosa</i>	Alexander	64,50 bB	86,66 aA	89,03 aA
	Carmim Acético	78,86 aB	93,76 aA	85,66 aAB
<i>T. heubergeri</i>	Alexander	6,80 bB	58,10 bA	57,60 bA
	Carmim Acético	91,76 aA	96,36 aA	93,73 aA
<i>T. milagrensis</i>	Alexander	84,43 aA	92,76 aA	85,30 aA
	Carmim Acético	88,66 aA	98,66 aA	90,83 aA
<i>T. pohliana</i>	Alexander	38,70 bB	67,73 bA	61,33 bA
	Carmim Acético	99,36 aA	99,03 aA	89,76 aA
<i>T. sprengeliana</i>	Alexander	15,67 bB	61,73 bA	49,43 bA
	Carmim Acético	86,84 aA	99,41 aA	89,02 aA
<i>T. stricta 1</i>	Alexander	56,00 bB	93,33 aA	59,33 bB
	Carmim Acético	85,66 aB	100,00 aA	82,86 aB
<i>T. stricta 2</i>	Alexander	18,43 bB	36,66 bA	38,76 bA
	Carmim Acético	91,43 aA	97,23 aA	97,73 aA
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i>	Alexander	62,30 bB	92,76 aA	79,96 aAB
	Carmim Acético	77,63 aB	96,23 aA	86,06 aA
<i>T. tenuifolia</i>	Alexander	40,10 bB	35,96 bB	74,86 bA
	Carmim Acético	82,36 aB	86,06 aAB	98,00 aA
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i>	Alexander	72,10 bA	73,20 bA	71,33 bA
	Carmim Acético	98,76 aA	94,83 aA	96,13 aA
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i>	Alexander	25,30 bC	72,26 bA	52,40 bB
	Carmim Acético	70,96 aB	96,36 aA	71,33 aB
CV (%)		10,96		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

CONCLUSÕES

O padrão de abertura monocolpado dos grãos de pólen para *Tillandsia* foi confirmado para as espécies ocorrentes na Bahia. Variações na ornamentação e no tamanho foram observadas entre as espécies estudadas, com a maioria apresentando grãos de pólen de tamanho médio. Os grãos de pólen da maioria das espécies estudadas apresentaram simetria bilateral, monocolpados com contornos irregulares, com exina semitectada, reticulada e heterobrocada. Esses estudos subsidiam futuros trabalhos taxonômicos e de conservação dessas espécies de grande importância como planta ornamental e ambiental.

Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentaram elevadas taxas de germinação, comprimento do tubo polínico e viabilidade, exceto para *T. recurvata*, *T. usneoides* e *T. loliacea*. O meio de cultura SM e a coleta dos grãos de pólen no estágio de antese floral foram os mais adequados para as espécies de *Tillandsia*.

Esse estudo demonstrou algumas características morfológicas que podem ser usadas na delimitação de espécies, além da caracterização dos subgêneros e futuros estudos de conservação.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L.; DENARDI, 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**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, 2010.
- ALEXANDER, M. P. Aversatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55. n. 1, p. 13-18, 1980.
- BARFUSS, M. H. J.; TILL, W.; LEME, E. M. C.; PINZÓN, J. P.; MANZANARES, J. M.; HALBRITTER, H.; SAMUEL, R.; BROWN, J. K. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**, Auckland, v. 279, n. 1, p.1-97, 2016.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile an Adaptive Radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 690, 2000.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, New York, v. 50, p. 859-865, 1963.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach** (the practical approach series). New York: University Press, p. 250, 1992.
- DUTRA, G. A. P.; SOUZA, M. M.; RODRIGUES, R.; SUDE, C. P.; PEREIRA, T. N. S. Viabilidade em grãos de pólen frescos e armazenados em acessos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, Dois Irmãos, v. 18, p. 729-230, 2000.
- EHLER, N.; SCHILL, R. Die Pollenmorphologie der Bromeliaceae. **Pollen et Spores**, Paris, v. 15, p. 13-45, 1973.
- ERDTMAN, G.; PRAGLOWSKI, K. A note on pollen morphology. **Flora Neotropica**, New York, v. 14, p. 1, p. 28-33, 1974.
- FERGUSON, I. K.; SKVARLA, J. J. Pollen morphology in relation to pollinators in Papilionoideae (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 84, n. 3, p. 183–193, 1982.
- FIORATO, L. **O gênero *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) no Estado da Bahia, Brasil**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 Jan. 2020.
- GOMES, P. R.; RASEIRA, M. C. B.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 14-17, 2003.
- HALBRITTER, H. Morphologie und Systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. **Grana**, Stockholm, v. 31, p. 197-212, 1992.
- HALBRITTER, H.; TILL, W. Morfologia polínica do Complexo *Nidulariódé*. In: PEREIRA, M. V. (ed.). **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro, 1998.

HESSE, M. Pollen wall stratification and pollination. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 222, p. 1-17, 2000.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; ZETTER, R. **Pollen Terminology**: an illustrated handbook. Berlin. Springer Verlag, p. 261, 2009.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138A, 1965.

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

KHANDURI, V. P. Variation in Anthesis and Pollen Production in Plants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 11, n. 6, p. 834-839, 2011.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: MARTIUS, C. F. P. **Flora Brasiliensis**, Weinheim. I.Cramer, v. 3, n. 3, p. 173-634, 1891-1894.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: CANDOLLE, C. **Monographiae Phanerogamarum**, Paris. Sumptibus Masson, v. 9, n. 61, p. 1-144, 1896.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: ENGLER, A. **Das Pflanzenreich**, Stuttgart, v. 4, n. 32, p. 38-70, 1934-1935.

MOREIRA, B. A.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; WANDERLEY, M. G. L. Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* L.B. Sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, p. 61-70, 2005.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 15, p. 27-33, 2001.

PARFITT, D.; GANESHAN, S. Comparison of procedures for estimating viability of prunus pollen. **Hortscience**, St. Joseph, v. 24, p. 354-356, 1989.

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

HILBRICK, C. T.; OSBORN, J. M. Exine reduction in underwater flowering *Callitriche* (Callitrichaceae): implications for the evolution of hydrophily. **Rhodora**, Beltsville, v. 96, n. 888, p. 370-381, 1994.

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**, Lavras, v. 31, p. 147-153, 2007.

PUNT, W.; HOEN, P. P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 143, p. 1-81, 2007.

- R CORE TEAM (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- ROHLF, F. J.; FISHER, D. L.. Teste de estrutura hierárquica em conjuntos de dados aleatórios. **Zoologia sistemática**, n. 17, p. 407-412, 1968.
- ROUBIK, D. W.; MORENO, P. J. E. Pollen and spores of Barro Colorado Island. Monograph in Systematic Botany. **Missouri Botanical Garden**, v. 36, p. 1-268, 1991.
- SANTOS, V. L.; VERSIEUX, L. M. WANDERLEY, M. G. L.; LUZ, C. F. P. Pollen morphology of *Alcantarea* giant bromeliads (Bromeliaceae, Tillandsioideae). **Grana**, Oslo, v. 57, n. 1-2, p. 117-136, 2018.
- SARWAR, A. K. M. G.; TAKAHASHI, H. Pollen morphology of *Kalmia* (Phyllodoceae, Ericaceae) and its taxonomic significance. **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy**. Bangladesh, v. 19, p.123-133, 2012.
- SCHROEDER, G. R.; JUNIOR, N. P. V.; DEC, E.; MOUGA, D. M. D. S. Caracterização palinológica de Bromeliaceae (A. Juss.) de São Francisco do Sul, Santa Catarina. **Acta Biológica Catarinense**, Santa Catarina, v. 6, n. 1, p. 46-57, 2019.
- SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology: a laboratory manual**; New York: Springer-Verlag, p.119, 1992.
- 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 Rainforest in Southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.88, p. 439-449, 2016.
- SIQUEIRA, K. M. M.; KIILL, L. H. P.; MARTINS, C. F.; LEMOS, I. B.; MONTEIRO, S. P.; FEITOSA, E. A. Ecologia da polinização do maracujá amarelo na região do Vale do Submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, p. 1-12, 2009.
- 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**, Londrina, v. 8, p. 111-118, 2008.
- SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; ROSSI, M. L.; SOUZA, F. V. D. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1744-1749, 2011.
- SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; PACKER, R. M.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; MARTINELLI, A. P. Morfologia e viabilidade do pólen em Bromeliaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 3067-3082, 2017.

- SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. D. C.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 223, p. 53-61, 2017.
- 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**, Wageningen, v. 204, p.:13–28, 2015.
- SOUZA, F. C.; MENDONÇA, C. B. F.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. Estudo polínico de espécies de Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Bromeliaceae Juss.) ocorrentes na restinga de Carapebus, Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 62, p.15-23, 2004.
- TARDIVO, R. C.; RODRIGUES, W. A. Pólen e estigma das espécies de *Nidularium* Leme e *Cansitrum* E. Morren (Bromeliaceae) ocorrentes no Estado do Paraná. **Biotemas**, Florianópolis, v. 11, p. 7-16, 1998.
- TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 461-491, 1997.
- TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Flower biology of six cultivares of the Bromeliaceae. I. Pollen, pistil, and petal appendages. **Selbyana**, Sarasota, v. 24, p. 78-86, 2003b.
- WANDERLEY, M. G. L.; MELHEM, T. S. Flora polínica da reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga- Família: 178- Bromeliaceae. **Hoehnea**, São Paulo, v.18, n. 1, p. 5-42, 1991.
- ZHANG, W.; ZHAO, M.; FAN, J.; ZHOU, T.; CHEN, Y.; CAO, F. Study on relationship between pollen exine ornamentation pattern and germplasm evolution in flowering crabapple. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 39759, 2017.

CAPÍTULO 2

MORFOANATOMIA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL¹

¹Capítulo a ser formatado e submetido ao periódico científico Scientia Horticulturae.

MORFOANATOMIA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCORRENTES NA BAHIA, BRASIL

RESUMO: *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) possui ampla distribuição em todos os ecossistemas do território brasileiro e na Bahia estão presentes, principalmente, na Mata Atlântica e na Caatinga, biomas de grande endemismo e diversidade. Estudar a biologia floral e reprodutiva dessas espécies pode auxiliar no manejo e conservação, tendo em vista que a morfologia do estigma é um caráter conservado em Bromeliaceae e, a receptividade estigmática pode influenciar na taxa de autopolinização e no sucesso da polinização. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar morfoanatomicamente e classificar os tipos de estigma das espécies de *Tillandsia* assim como, avaliar a receptividade do estigma por meio de diferentes metodologias. Foram estudadas 22 espécies de *Tillandsia* de ocorrência na Bahia. As análises morfológicas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura e as análises anatômicas foram feitas usando o microscópio de luz. A receptividade do estigma foi avaliada com peróxido de hidrogênio (3%) e α -naftil-acetato com tampão fosfato, acetona e *fast blue B salt*. Foram observados três tipos de estigma: conduplicado-espiral para as espécies do subgênero *Tillandsia*, simples-ereto para as espécies do subgênero *Diaphoranthema*, coraliforme para as espécies do subgênero *Phytahrriza*. As espécies do subgênero *Anoplophytum* apresentaram duas variações morfológicas, conduplicado-espiral e simples-ereto. Todas as espécies estudadas apresentaram estigma trifido, com epiderme uniestratificada, numerosos idioblastos contendo ráfides no parênquima fundamental e feixes vasculares individuais para cada carpelo. As duas metodologias para avaliar a receptividade do estigma foram eficientes. A maior atividade enzimática foi observada na antese, em todas as espécies estudadas. A morfoanatomia do estigma e estilete oferece informações importantes para a taxonomia de *Tillandsia* e os dados de receptividade do estigma subsidiam estudos reprodutivos e de conservação dessas espécies.

Palavras-chave: Conservação, reprodução, taxonomia, anatomia, morfologia, Tillandsioideae.

STIGMA MORPHOANATOMY AND RECEPTIVITY IN *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) OCCURRENT IN BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT: *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) has wide distribution in all ecosystems in the Brazilian territory and in Bahia is present, mainly, in the Atlantic Forest and in the Caatinga, biomes of great endemism and diversity. Studying a floral and reproductive biology of these species can assist in management and conservation, considering that morphology of the stigma is a conserved character in Bromeliaceae and, a stigmatic receptivity can influence self-pollination taxes and in the pollination success. Thus, the objective of this work was to characterize morpho-anatomically and classify the types of stigma of the *Tillandsia* species, as well as to evaluate the receptivity of the stigma through different methodologies. 22 species of *Tillandsia* occurring in Bahia were studied. Morphological analyzes were performed using a scanning electron microscope and anatomical analyzes were used using the light microscope. Stigma receptivity was assessed with hydrogen peroxide (3%) and α -naphthyl-acetate with phosphate buffer, acetone and fast blue B salt. Three types of stigma were observed: conduplicate-spiral for species of the subgenus *Tillandsia*, simple-erect for species of the subgenus *Diaphoranthema*, coraliform for species of the subgenus *Phytahrriza*. The species of the subgenus *Anoplophytum* described two morphological changes: conduplicate-spiral and simple-erect. All species studied have trifold stigma, with uni-stratified epidermis, numerous idioblasts containing raphides in the fundamental parenchyma and individual vascular bundles for each carpel. The two methodologies for assessing the receptivity of stigma were efficient. The greatest enzymatic activity was observed in antiquity, in all studied species. The morphology of the stigma and the stylis offers important information for the taxonomy of *Tillandsia* and the receptivity data of the stigma support the reproductive and conservation studies of these species.

Keyword: Conservation, reproduction, taxonomy, anatomy, morphology, Tillandsioideae.

INTRODUÇÃO

Tillandsia L. (Tillandsioideae) é o maior gênero de Bromeliaceae, com 745 espécies e de ampla distribuição em todos os ecossistemas do território brasileiro com 82 espécies (BENZING, 2000; FLORA DO BRASIL, 2020). Na Bahia, são encontradas 24 espécies ocorrendo, principalmente, na Mata Atlântica e na Caatinga, dois importantes biomas de grande endemismo e diversidade (ISLAIR et al., 2015; FLORA DO BRASIL, 2020).

O importante papel ecológico e econômico das espécies de *Tillandsia*, juntamente com seu risco de extinção devido à degradação das florestas e ao extrativismo predatório, justificam esses estudos morfológicos, podendo auxiliar no manejo e na conservação dessas espécies. O conhecimento sobre os aspectos da biologia floral e reprodutiva são fundamentais para compreender as relações ecológicas e para a definição de técnicas apropriadas para a realização de cruzamentos controlados e posterior obtenção de sementes (ALLARD, 1971; SOUZA et al., 2016).

Em relação à morfologia do estigma, Barfuss et al. (2016), estudando a subfamília Tillandsioideae apresentaram um novo caráter diagnóstico para a taxonomia. Esses autores realizaram uma síntese de suas observações juntamente com dados da literatura (BROWN; GILMARTIN; 1984; 1988; 1989; SCHILL et al., 1988; GILMARTIN et al., 1989; GORTAN, 1990; 1991; TILL et al., 1997; TILL, 2000; LEME; BROWN, 2004; LEME, 2007; 2009; SOUZA et al., 2016) e apresentam um novo tipo de estigma (urceolado) e vários subtipos a partir dos tipos básicos de conduplicado-espiral, lâmina-convoluta e simples-ereto, perfazendo um total de 16 tipos de estigma descritos para essa subfamília. A morfologia do estigma é um caráter conservado e importante para estudos taxonômicos da família Bromeliaceae (SOUZA et al., 2016; BARFUSS et al., 2016).

A fertilização, com a formação de frutos e sementes está diretamente relacionada com a produção dos exsudatos do estigma, que promovem a aderência dos grãos de pólen, hidratação, germinação e crescimento do tubo polínico (ALMEIDA, 2007). Esses exsudatos são enzimas, principalmente, as esterases e peroxidases e têm sido considerados um indicativo para a receptividade. Essas enzimas desempenham um papel fundamental na germinação dos grãos de pólen, na penetração do tubo polínico no estigma e provavelmente nas respostas de incompatibilidade (BHATTACHARYA; MANDAL, 2003; KULLOLI et al., 2010). Assim,

os métodos usados para determinar a receptividade do estigma *in vitro*, geralmente, baseiam-se na identificação da atividade enzimática (KNOX et al., 1986; DAFNI 1992).

A receptividade do estigma pode influenciar na taxa de autopolinização e, no sucesso da polinização (GALEN; PLOWRIGHT, 1987). Em experimentos envolvendo reprodução, se faz necessário o monitoramento do tempo e da duração da receptividade do estigma (STONE et al., 1995) a fim de determinar o melhor momento de deposição dos grãos de pólen na flor e obter sucesso nos cruzamentos controlados (ALMEIDA, 2007; SOUZA et al., 2016).

Dentre as metodologias mais utilizadas para a receptividade do estigma destaca-se o teste com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que indica a receptividade por meio da formação de bolhas de ar. Esse método é simples e de baixo custo, porém deve-se evitar qualquer dano ao tecido para não incorrer em resultado falso-positivo (KEARNS; INOUE, 1993). Outra metodologia eficiente é a utilização da solução de *α-naftil-acetato* com *fast blue B salt* que interagem com a enzima esterase, deixando os estigmas receptivos corados de marrom escuro (KEARNS; INOUE, 1993).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar morfoanatomicamente e classificar os tipos de estigma das espécies de *Tillandsia* de ocorrência na Bahia e avaliar a receptividade do estigma por meio de diferentes metodologias para subsidiar estudos de biologia floral e reprodutiva, estudos taxonômicos e conservacionistas, além de permitir o direcionamento de polinizações controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram estudadas 22 espécies de *Tillandsia* de ocorrência no Estado da Bahia conforme Tabela 1. Todas as espécies foram coletadas em ambientes naturais, incorporadas no Herbário HURB e no Banco de Germoplasma de Bromélias do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As coletas foram realizadas conforme autorização do SISBIO N° 69870-1 e as atividades realizadas estão devidamente cadastradas no SISGEN sob a autorização N° A9E9F8D.

Tabela 1. Espécies de *Tillandsia* ocorrentes na Bahia, Brasil, incluindo subgênero, município de coleta e voucher do Herbário HURB.

Espécie	Subgênero	Município	HURB
<i>T. bulbosa</i> Hook.f.	<i>Tillandsia</i>	Ilhéus	25395
<i>T. juncea</i> (Ruiz & Pav.) Poir.	<i>Tillandsia</i>	Santa Terezinha	22220
<i>T. polystachia</i> (L.) L.	<i>Tillandsia</i>	Milagres	22131
<i>T. loliacea</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	<i>Diaphoranthema</i>	Milagres	22130
<i>T. tricholepis</i> Baker	<i>Diaphoranthema</i>	Ibitiara	25753
<i>T. streptocarpa</i> Baker 1	<i>Phyrarrhiza</i>	Milagres	18591
<i>T. streptocarpa</i> Baker 2	<i>Phyrarrhiza</i>	Milagres	25006
<i>Tillandsia</i> sp.	<i>Phyrarrhiza</i>	Milagres	18592
<i>T. chapeuensis</i> Rauh	<i>Anoplophytum</i>	Morro do Chapéu	23983
<i>T. gardneri</i> Lindl.	<i>Anoplophytum</i>	Ilhéus	25393
<i>T. geminiflora</i> Brongn.	<i>Anoplophytum</i>	Brejões	22222
<i>T. globosa</i> Wawra	<i>Anoplophytum</i>	Muritiba	25569
<i>T. heubergeri</i> Ehlers	<i>Anoplophytum</i>	Brejões	17894
<i>T. milagrensis</i> Leme	<i>Anoplophytum</i>	Milagres	17887
<i>T. pohliana</i> Mez	<i>Anoplophytum</i>	Morro do Chapéu	23978
<i>T. sprengeliana</i> Klotzsch ex Mez	<i>Anoplophytum</i>	Palmeiras	23997
<i>T. stricta</i> Sol. 1	<i>Anoplophytum</i>	Ilhéus	25384
<i>T. stricta</i> Sol. 2	<i>Anoplophytum</i>	Milagres	22180
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i> Rauh ex. Ehlers & Heidt	<i>Anoplophytum</i>	Morro do Chapéu	23977
<i>T. tenuifolia</i> L.	<i>Anoplophytum</i>	Milagres	15626
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i> Griseb.	<i>Anoplophytum</i>	Mucugê	25755
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i> (Wawra) L.B.Sm.	<i>Anoplophytum</i>	Cruz das Almas	24541

Morfoanatomia do Estigma

Para as análises morfológicas, as amostras dos estigmas/ estiletos foram coletadas na antese e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl₂ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, em seguida desidratados em série etílica crescente. As amostras foram secas ao ponto crítico (CPD 300 Baltec) por meio de CO₂ líquido, montadas sobre suportes metálicos recobertos com fita adesiva carbonada e metalizadas com ouro por 180 segundos. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para as análises anatômicas, os estigmas/ estiletos foram fixados na mesma solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada, por uma semana,

desidratadas em série etílica crescente, por 6 horas, infiltradas e emblocadas utilizando-se o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heidelberg). A polimerização da resina foi feita em temperatura ambiente por 48 horas. Os cortes histológicos seriados (5 μ m) foram realizados em micrótomo rotativo Leica RM 2155 (Leica, Nussloch, Alemanha), dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1% p/v), seguido de azul de toluidina (0,05% p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Em seguida, os cortes histológicos foram analisados por meio das imagens obtidas em fotomicroscópio Axioskop 2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para a caracterização morfológica e anatômica utilizaram-se três estigmas de diferentes plantas, de cada espécie, e a nomenclatura utilizada descrita em Brown e Gilmartin (1984; 1989) e Barffus et al. (2016). Para as avaliações morfométricas foram utilizados os mesmos três estigmas e de diferentes plantas, de cada espécie. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e teste Scott-Knott ($p < 0,01$), por meio do programa R Core Team (2018).

Receptividade do Estigma

A receptividade do estigma foi avaliada em três estádios: pré-antese (botão - 18h), antese (7h30) e pós-antese (recém fechada - 18h), com três repetições cada. Foram usadas duas diferentes metodologias para avaliação do estigma: peróxido de hidrogênio (3%) e α -naftil-acetato com tampão fosfato, acetona e *fast blue B salt*.

Os estigmas foram removidos das flores, com cuidado para não provocar lesões que pudesse influenciar no resultado e, imediatamente, imerso em peróxido de hidrogênio (3%) durante três minutos, para a observação da liberação de bolhas de ar, uma vez que a reação do peróxido de hidrogênio com a enzima peroxidase indica que o estigma está receptivo (ZEISLER, 1933). Para a avaliação da receptividade utilizando a solução de α -naftil-acetato com tampão fosfato, acetona e *fast blue B salt* os estigmas foram imersos por cerca de cinco minutos, após, lavados em água destilada. A atividade esterásica foi observada por meio da coloração escura na superfície estigmática e/ou papilas (PEARSE, 1972; DAFNI, 1992).

Nos dois métodos utilizados a receptividade estigmática foi estimada conferindo graus, conforme adaptação de Dafni e Maués (1998) e Souza et al. (2016): (-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfoanatomia do estigma

Três tipos de estigmas foram observados nas espécies estudadas, conduplicado-espiral, simples-ereto e coraliforme (Tabela 2 e Figuras 1 e 2). As três espécies no subgênero *Tillandsia* apresentaram estigmas do tipo conduplicado-espiral (*T. bulbosa*, *T. juncea* e *T. polystachia*), as duas do subgênero *Diaphoranthema* apresentaram o tipo simples-ereto (*T. loliacea* e *T. tricholepsis*) e as três do subgênero *Phytarrhiza* apresentaram o tipo coraliforme (*T. streptocarpa* 1, *T. streptocarpa* 2, *Tillandsia* sp.) (Figura 1).

As espécies do subgênero *Anoplophytum* apresentaram duas variações morfológicas, quanto ao tipo de estigma: simples-ereto para *T. chapeuensis*, *T. gardineri*, *T. geminiflora*, *T. heubergeri* e *T. tenuifolia* var. *vaginata* e conduplicado-espiral para *T. globosa*, *T. milagrensis*, *T. pohliana*, *T. sprengeliana*, *T. stricta* 1, *T. stricta* 2, *T. stricta* var. *piniformis*, *T. tenuifolia* e *T. tenuifolia* var. *saxicola* (Figura 2). Para os estigmas do tipo conduplicado-espiral foi verificado uma variação na intensidade dos lóbulos espiralados, a exemplo da *T. tenuifolia* var. *saxicola* que foi fortemente retorcido em comparação às demais espécies (Figura 2B).

A morfologia do estigma é um caráter diagnóstico na família Bromeliaceae (BROWN; GILMARTIN, 1989; BARFUSS et al., 2016; SOUZA et al., 2016). Brown e Gilmartin (1989) estudando o gênero *Tillandsia*, observaram que nos subgêneros *Anoplophytum* e *Tillandsia* podem encontrar estigmas do tipo simples-ereto ou conduplicado-espiral, para o subgênero *Diaphoranthema* pode ser observado o tipo simples-ereto e para o subgênero *Phytarrhiza* podem ser observados os tipos conduplicado-espiral ou coraliforme. Para Barfuss et al. (2016), em sua nova classificação para o gênero *Tillandsia*, são encontrados os tipos patente-conduplicado, conduplicado-espiral, lâmina-convoluta I, simples-ereto, simples-patente ou e simples-truncado. Os resultados aqui encontrados são semelhantes aos encontrados por Pontes e Agra (2006), exceto para *T. streptocarpa* descrita como conduplicado-espiral e *T. stricta* com simples-ereto.

Tabela 2. Caracteres morfológicos do estigma e estilete de 22 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de ocorrência na Bahia.

Espécies	Tipo de estigma	Estigma (mm)		Estilete (mm)		Cor do estigma
		Comprimento	Diâmetro	Comprimento	Diâmetro	
<i>T. bulbosa</i>	conduplicado-espiral	1,220 a	0,838 a	22,378 a	0,498 a	amarelo
<i>T. juncea</i>	conduplicado-espiral	0,830 a	0,743 a	24,456 a	0,512 a	lilás
<i>T. polystachia</i>	conduplicado-espiral	1,369 a	0,936 a	28,563 a	0,426 a	lilás
<i>T. loliacea</i>	simples-ereto	0,248 c	0,469 c	0,835 d	0,305 b	branco
<i>T. tricholepis</i>	simples-ereto	0,154 d	0,337 c	0,788 d	0,330 b	amarelo
<i>T. streptocarpa</i> 1	Coraliforme	0,387 c	0,682 b	1,146 d	0,661 a	verde pálido
<i>T. streptocarpa</i> 2	Coraliforme	0,446 b	0,677 b	1,346 d	0,643 a	verde pálido
<i>Tillandsia</i> sp.	Coraliforme	0,342 c	0,687 b	1,284 d	0,635 a	verde pálido
<i>T. chapeuensis</i>	simples-ereto	0,224 c	0,182 e	15,463 b	0,214 c	amarelo
<i>T. gardneri</i>	simples-ereto	0,430 b	0,341 c	14,532 b	0,362 b	amarelo
<i>T. geminiflora</i>	simples-ereto	0,254 c	0,270 d	11,456 b	0,365 b	lilás
<i>T. globosa</i>	conduplicado-espiral	0,641 b	0,696 b	12,456 b	0,326 b	amarelo
<i>T. heubergeri</i>	simples-ereto	0,491 b	0,502 b	3,861 c	0,457 a	branco
<i>T. milagrensis</i>	conduplicado-espiral	0,543 b	0,365 d	3,231 c	0,274 c	verde pálido
<i>T. pohliana</i>	conduplicado-espiral	0,430 b	0,414 c	4,872 c	0,391 b	branco
<i>T. sprengeliana</i>	conduplicado-espiral	0,421 b	0,344 c	3,723 c	0,402 b	branco
<i>T. stricta</i> 1	conduplicado-espiral	0,526 b	0,333 c	4,523 c	0,197 c	amarelo
<i>T. stricta</i> 2	conduplicado-espiral	0,555 b	0,404 c	4,678 c	0,258 c	amarelo
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i>	conduplicado-espiral	0,287 c	0,192 e	3,104 c	0,177 c	amarelo
<i>T. tenuifolia</i>	conduplicado-espiral	0,536 b	0,587 b	5,248 c	0,222 c	amarelo
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i>	conduplicado-espiral	0,295 c	0,208 d	5,897 c	0,179 c	amarelo
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i>	simples-ereto	0,428 b	0,342 d	2,447 c	0,222 c	amarelo
CV (%)		12,57	11,06	18,58	9,21	

¹ De acordo com Brown e Gilmartin (1984; 1989) e Barffus et al. (2016).

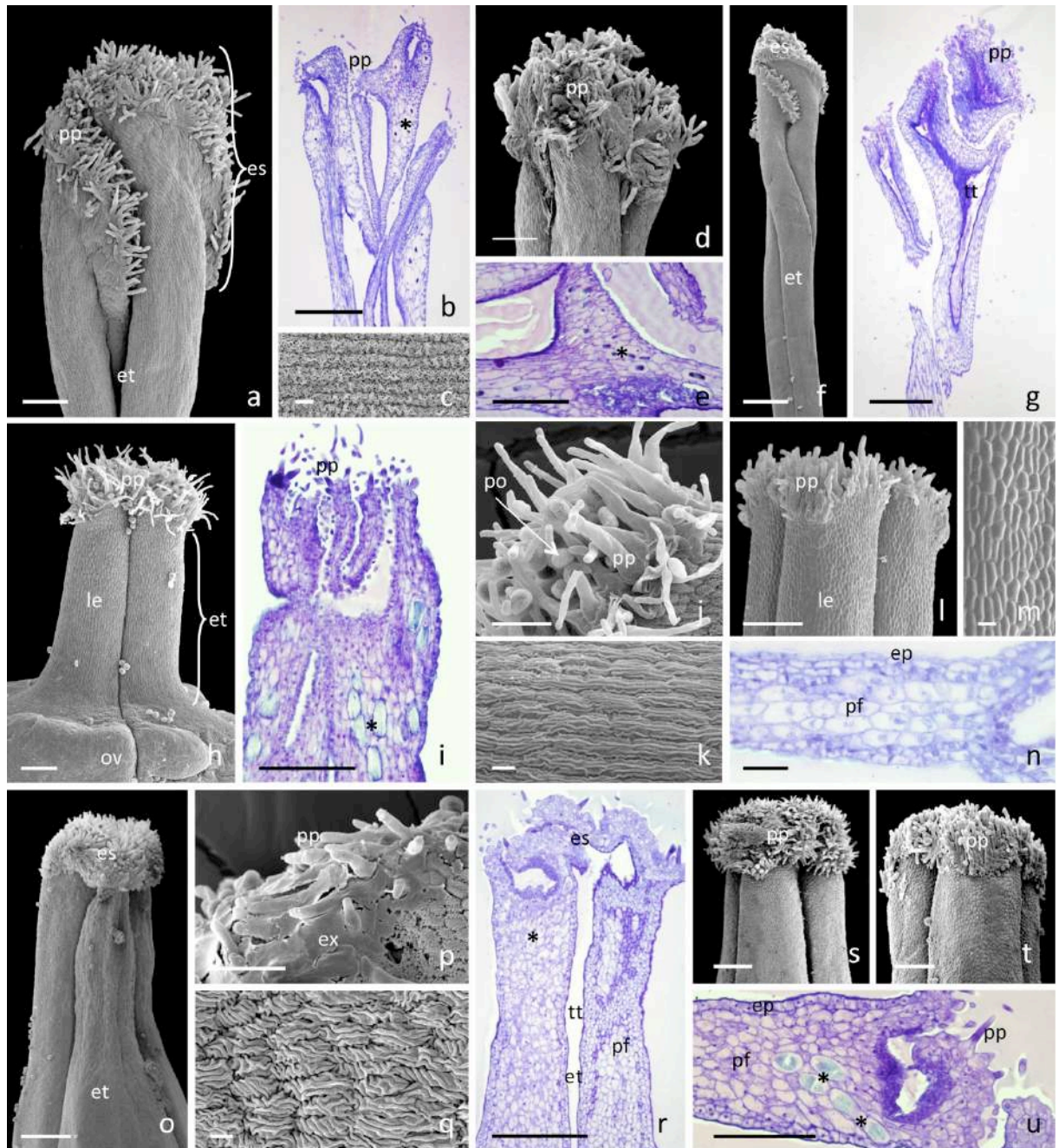


Figura 1. Morfoanatomia do estigma em *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia. Estigma do tipo conduplicado-espiral em espécies do subgênero *Tillandsia*, *T. bulbosa* (a-c), *T. juncea* (d-e), *T. polystachia* (f-g). Estigma do tipo simples-ereto no subgênero *Diaphoranthema*, *T. loliacea* (h-k), *T. tricholepsis* (l-n). Estigma do tipo coraliforme no subgênero *Phythriza*, *T. streptocarpa* 1 (o-r), *T. streptocarpa* 2 (s) e *Tillandsia* sp. (t-u). Características morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (a, c, d, f, h, j, k, l, m, o, p, q, s, t) e seções anatômicas observadas em microscópio de luz (ML) (b, e, g, i, n, r, u). ep = epiderme, es = estigma, et = estilete, ex = exsudato, le = lobos estigmáticos, ov = ovário, pf = parênquima fundamental, pp = papilas, tt = tecido transmissor, * = idioblasto contendo ráfides. Barras: a, d, e, i, o, s, u = 200 μ m; b, f, g, r = 500 μ m; c, k, m, q = 10 μ m; h, l, t = 100 μ m; j, n, p = 50 μ m.

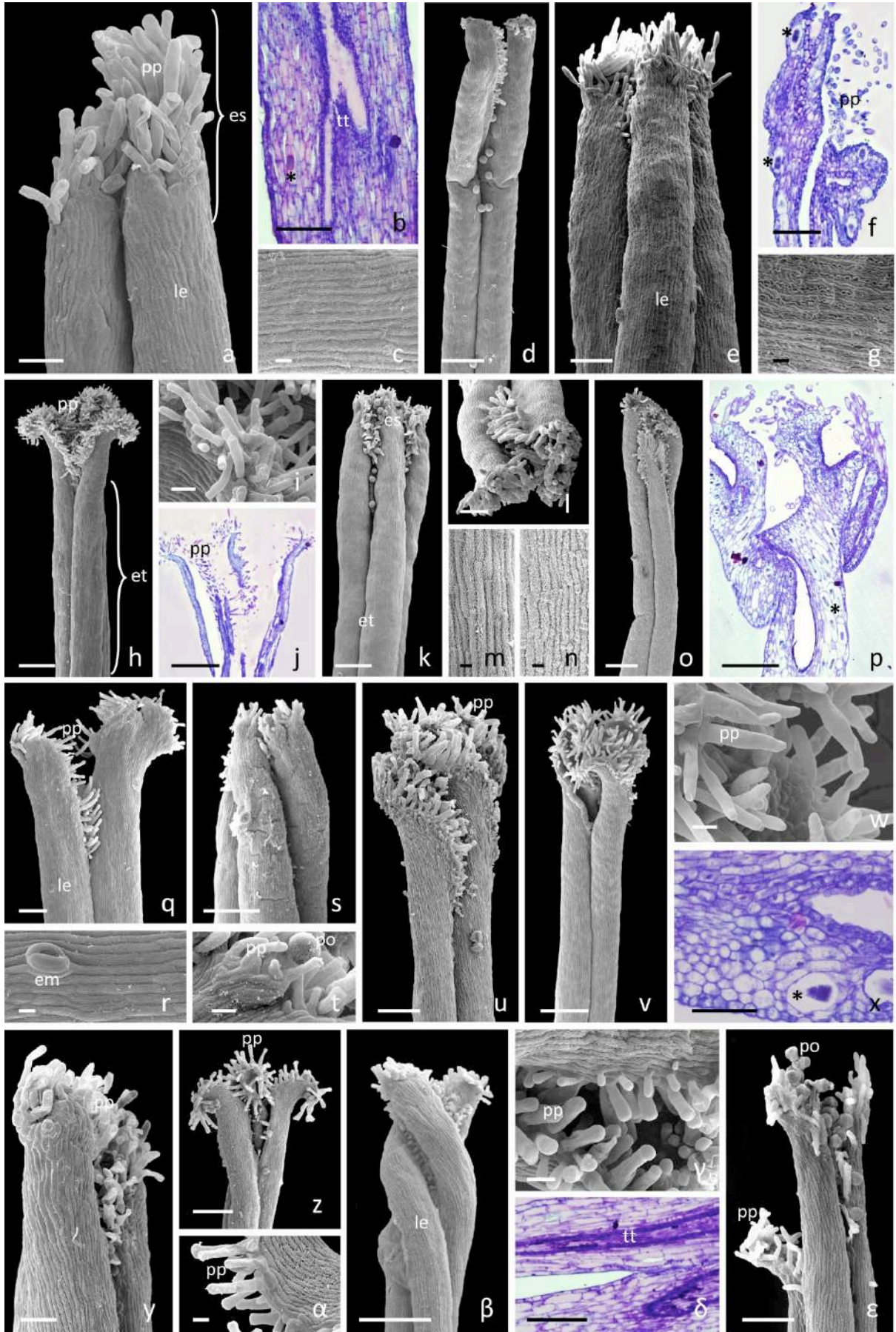


Figura 2. Morfoanatomia do estigma em *Tillandsia* (Bromeliaceae) do subgênero *Anoplophytum* ocorrentes na Bahia. Estigma do tipo simples-ereto em *T. chapeuensis* (a-c), *T. gardneri* (d), *T. geminiflora* (e-g), *T. heubergeri* (k-m), *T. tenuifolia* var. *vaginata* (ϵ) e conduplicado-espiral em *T. globosa* (h-j), *T. milagrensis* (n-p), *T. pohliana* (q-r), *T. sprengeliana* (s-t) e *T. stricta* 1 (u), *T. stricta* 2 (v-x), *T. stricta* subsp. *piniformis* (y), *T. tenuifolia* (z- β) e *T. tenuifolia* var. *saxicola* (γ - δ). Características morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (a, c, d, e, g, h, i, k, l, m, n, o, q, r, s, t, u, v, w, y, z, α , β , γ , ϵ) e secções anatômicas observadas em microscópio de luz (ML) (b, f, j, p, x, δ). em = estômato, es = estigma, et = estilete, le = lobos estigmáticos, ov = ovário, pp = papilas, tt = tecido transmissor, * = idioblasto contendo ráfides. Barras: a, y = 50 μ m; b, d, f, h, k, o, p, s, v, x, z, β , δ = 200 μ m; c, g, m, n, r = 10 μ m; e, l, q, u, ϵ = 100 μ m; i, t, w, α , γ = 20 μ m; j = 500 μ m.

O grau de retorcimento dos lobos estigmáticos no tipo conduplicado-espiral já foi também descrito no trabalho de Souza et al. (2016). Esses autores observaram diferentes graus de retorcimento entre as espécies de *Aechmea* estudadas.

Os três tipos de estigma aqui encontrados são trifidos, formados por uma epiderme uniestratificada (Figuras 1 e 2). Três feixes vasculares juntamente com células do parênquima formam o tecido transmissor, um para cada carpelo, o que pode ser facilmente visualizado ligando o ápice do estigma à cavidade ovariana. É por meio deste tecido transmissor que o tubo polínico cresce até chegar à micrópila. Foi também observado em todas as espécies a presença de numerosos idioblastos contendo ráfides por todo o estigma/ estilete (Figuras 1b, 1e, 1i, 1r, 1u, 2b, 2f, 2p, 2x). Souza et al. (2016) relatam que a presença de idioblastos com ráfides é uma estratégia de defesa contra herbivoria em Bromeliaceae, uma vez que, sob pressão, os idioblastos liberam as ráfides e substâncias cáusticas que podem ser tóxicas em muitas espécies.

Foram observadas células com citoplasma denso e núcleo proeminente na epiderme interna e nas papilas estigmáticas (Figuras 1b, 1e, 1g, 1i, 1r, 1u, 2f, 2j, 2p), também nas células do parênquima fundamental, próximas das papilas e próximo ao tecido transmissor. Souza et al. (2016) relatam que o citoplasma denso e núcleo proeminente sejam resultado de uma intensa atividade metabólica, característica de células secretoras e que possivelmente está relacionada à aderência e crescimento dos grãos de pólen.

Todas as espécies apresentaram papilas restritas à margem da lâmina estigmática, sendo tubulares, multisseriada, sem ornamentação, variando apenas no comprimento, sendo mais desenvolvidas em *T. loliacea*, *T. globosa*, *T. pohliana* e *T.*

tenuifolia e menos desenvolvidas em *T. polystachia*, *T. gardneri* e nas três espécies de *Phytarrhiza* (Figuras 1 e 2).

Brown e Gilmartin (1988) sugerem que o estigma conduplicado-espiral representa uma condição plesiomórfica e que os demais tipos de estigmas dentro da família são mais especializados, aumentando a área da superfície estigmática pela presença de papilas e assim, promovendo uma maior eficiência na aderência dos grãos de pólen. Nas três espécies do subgênero *Phytahrriza* foi observada uma mucilagem revestindo as papilas estigmáticas, sendo mais acentuada em *T. streptocarpa* 1 (Figura 1p). Provavelmente, essa mucilagem é uma secreção enzimática para aderência dos grãos de pólen.

Foi observada a presença de poucos estômatos (ca. seis) no estilete de *T. pohliana* (Figura 2r). A presença de estômato em estruturas florais já é relatada para diversas espécies (DASZKOWSKA-GOLEC; SZAREJKO, 2013; KONARSKA, 2017), mas não descrito até o presente momento em estigmas na família Bromeliaceae. Os estômatos possuem duas funções principais nas plantas, permitem a troca de gases, atuando como uma porta de entrada para o dióxido de carbono (CO₂) e liberação do oxigênio (O₂) e regula o movimento da água através da transpiração (DASZKOWSKA-GOLEC; SZAREJKO, 2013).

A coloração do estigma variou de branco em *T. loliacea*, *T. heubergeri*, *T. pohliana* e *T. sprengeliana*, verde pálido em *T. streptocarpa* 1, *T. streptocarpa* 2, *Tillandsia* sp. e *T. milagrensis*, amarelo em *T. bulbosa*, *T. tricholepsis*, *T. chapeuensis*, *T. gardneri*, *T. globosa*, *T. stricta* 1, *T. stricta* 2, *T. stricta* subsp. *piniformis*, *T. tenuifolia*, *T. tenuifolia* var. *saxicola* e *T. tenuifolia* var. *varginata* a lilás em *T. juncea*, *T. polystachia* e *T. geminiflora* (Tabela 2). Essa característica pode estar relacionada a atração de polinizadores, uma vez que as cores em flores possuem a função de atrair polinizadores específicos (ABROL, 2012; HIROTA, et al., 2012).

Foi observada diferença significativa para o comprimento e diâmetro do estigma e do estilete (Tabela 2). As três espécies do subgênero *Tillandsia* foram as que apresentaram as maiores medidas de comprimento e diâmetro. O menor comprimento do estilete foi observado para as espécies dos subgêneros *Diaphoranthema* e *Phytahrriza*. As características morfométricas do estigma/ estilete podem interferir diretamente na sua cruzabilidade em programas de melhoramento genético, devido à sua correspondência direta com o crescimento do tubo polínico

no pistilo (GOPINATHAN et al., 1986; PARTON et al., 2001; SOUZA et al., 2016; 2017) e também no sistema reprodutivo das espécies em condições naturais, pois anteras inclusas na corola ou no mesmo nível dos estigmas facilitam a autopolinização e exclusivos necessitam obrigatoriamente de algum agente polinizador para haver fecundação.

Os estiletos de todas as espécies estudadas são formados por epiderme uniestratificada e revestidas por cutícula ornamentada estriada, com exceção de *T. thicholepsis* que não possui ornamentação (Figura 1m). A densidade das estrias na cutícula varia entre as espécies, sendo mais acentuada em *T. bulbosa* (Figura 1c), *T. loliacea* (Figura 1k) e *T. streptocarpa* (Figura 1q).

Receptividade do estigma

Os dois métodos avaliados foram eficientes para determinação da receptividade do estigma nas 22 espécies estudadas de *Tillandsia* nos diferentes estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese) (Tabela 3, Figura 3). Foi observada resposta positiva muito forte na antese para ambas metodologias na maioria das espécies. Em *T. stricta* subsp. *piniformis* a resposta positiva forte foi observada em peróxido de hidrogênio enquanto em *T. globosa*, *T. heubergeri*, *T. pohliana*, *T. stricta* subsp. *piniformis* e *T. tenuifolia* var. *saxicola* a resposta positiva forte foi observada em solução de α -naftil-acetato + fast blue B salt. Não houve reação de receptividade na pré-antese para *T. loliacea* e *T. thicholepsis* para ambas as metodologias e *T. polystachia* e *T. stricta* 1 com o peróxido de hidrogênio (Tabela 3).

Tabela 3. Receptividade do estigma nas 22 espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil, avaliada na pré-antese, antese e pós-antese por duas diferentes metodologias.

Espécies	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)			α -naftil-acetato + fast blue B salt		
	Pré-antese	Antese	Pós-antese	Pré-antese	Antese	Pós-antese
<i>T. bulbosa</i>	+	+++	++	+	+++	++
<i>T. juncea</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>T. polystachia</i>	-	+++	+	+	+++	+
<i>T. loliacea</i>	-	+++	++	-	+++	++
<i>T. tricholepis</i>	-	+++	+	-	+++	+
<i>T. streptocarpa</i> 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>T. streptocarpa</i> 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Tillandsia</i> sp.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>T. chapeuensis</i>	+	+++	+++	+	+++	++
<i>T. gardneri</i>	+++	+++	+++	+	+++	+++
<i>T. geminiflora</i>	++	+++	+	++	+++	+
<i>T. globosa</i>	+	+++	+	+	++	+
<i>T. heubergeri</i>	++	+++	+++	+	++	+
<i>T. milagrensis</i>	+++	+++	+++	+	+++	++
<i>T. pohliana</i>	+	+++	+	+	++	+
<i>T. stricta</i> 1	-	+++	++	+	+++	+
<i>T. stricta</i> 2	+++	+++	++	+++	+++	+
<i>T. stricta</i> subsp. <i>piniformis</i>	+	++	+++	+	++	+
<i>T. tenuifolia</i>	+++	+++	+++	+	+++	+++
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>saxicola</i>	+	+++	+++	+	++	+
<i>T. tenuifolia</i> var. <i>vaginata</i>	+	+++	++	+	+++	++

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

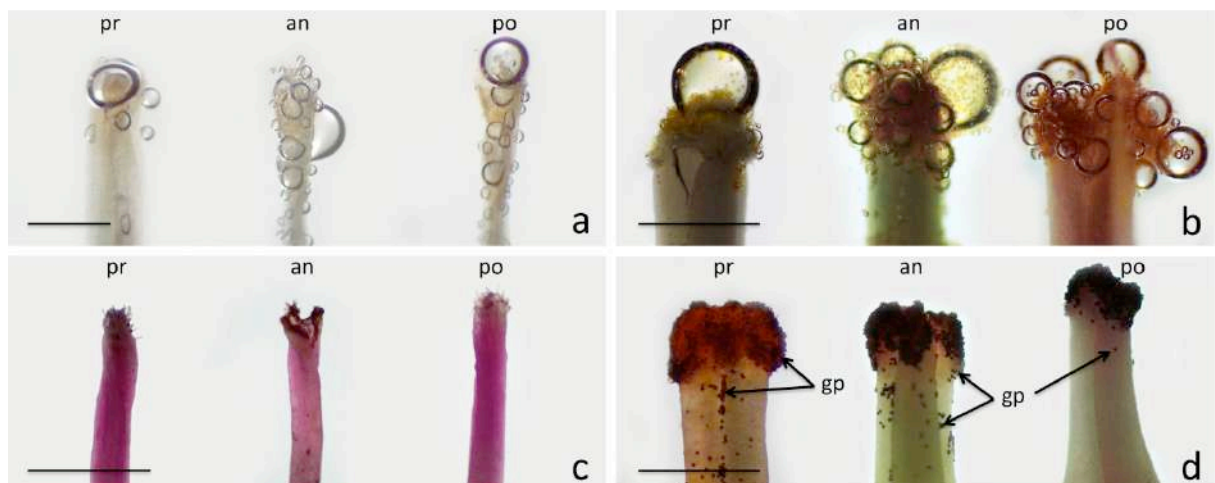


Figura 3. Receptividade do estigma com peróxido de hidrogênio (a-b) e solução de α -naftil-acetato + fast blue B salt (c-d) em *Tillandsia* (Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil. a) *T. bulbosa*. b, d) *T. streptocarpa*. c) *T. geminiflora*. pr = pré-antese, an = antese, po = pós-antese, gp = grãos de pólen aderidos no estigma/ estilete. Barras: 1 mm.

Parton et al. (2001) e Souza et al. (2016) estudando, respectivamente, barreiras reprodutivas e receptividade do estigma em espécies de bromélias, constataram que a maior receptividade foi observada na antese para a maioria das espécies. Esses autores observaram que em algumas espécies, o estigma foi receptivo até dois dias após a antese e foi possível a germinação de grãos de pólen em número suficiente para a fertilização. Entretanto, o número de óvulos fertilizados foi menor quando as polinizações foram realizadas na pós-antese. Esses mesmos autores observaram em outras espécies, elevada porcentagem de germinação de grãos de pólen e índice de fertilização, tanto anterior, quanto no dia seguinte à antese.

Independentemente da metodologia utilizada e do estágio de desenvolvimento floral, as três espécies do subgênero *Phytahrriza* apresentaram resposta positiva muito forte (Figura 3b, 3d). Vale destacar que essas espécies apresentam o estigma inserto e as flores permanecem abertas por aproximadamente 48 horas após antese. Foi possível também observar que essas mesmas espécies já possuíam grãos de pólen aderidos na superfície do estigma na pré-antese (Figura 3d) além da presença de um aroma adocicado e intenso típico de espécies melitófilas. Till (1992) sugere que a polinização por abelhas é bastante comum em espécies de *Tillandsia* de regiões xéricas. Essas características observadas podem ser estratégias para autopolinização e garantir a formação de sementes para perpetuação da espécie. Já Souza et al. (2016) relataram que a receptividade está relacionada à abertura floral e o tempo em que a flor permanece aberta.

Na pré-antese, as espécies *T. juncea*, *T. streptocarpa* 1, *T. streptocarpa* 2, *Tillandsia* sp., *T. gardneri*, *T. milagrensis*, *T. stricta* 2 e *T. tenuifolia* apresentaram resposta positiva muito forte com o peróxido de hidrogênio. Em relação à solução de α -naftil-acetato + fast blue B salt apenas a *T. stricta* 2 e as três do subgênero *Phytahrriza* apresentaram essa resposta positiva muito forte.

Na pós-antese, houve uma redução da reação de receptividade para a maioria das espécies, principalmente quando se utilizou a solução de α -naftil-acetato + fast blue B salt. Esse comportamento foi relatado por Souza et al. (2016) para algumas espécies de *Aechmea* e *Vriesea*, onde foi verificado sua redução durante o período de senescência das flores.

Ambas as metodologias identificam atividades enzimáticas, sendo que o peróxido de hidrogênio identifica peroxidase por meio da liberação de bolhas de ar (Figura 3a, 3c) (DAFNI; MAUÉS, 1998; SOUZA et al., 2016). Esses mesmos autores relatam que essa metodologia não identifica exatamente a área receptiva, tendo em vista que resultado falso-positivo pode acontecer devido a danos no tecido. Vale destacar, que todos os cuidados com os estigmas foram tomados para evitar esses resultados falso-positivos. A metodologia com α -naftil-acetato + fast blue B salt identifica atividade enzimática esterásica relacionada à presença de exsudatos nas papilas estigmáticas, sendo possível observar uma coloração marrom escuro na região exata da receptividade (Figura 3b, 3d) (DAFNI; MAUÉS, 1998; SOUZA et al., 2016).

Os estigmas de todas as espécies de *Tillandsia* permaneceram úmidos durante todo o período de abertura floral até o fechamento das flores. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Heslop-Harrison e Shivanna (1977) que classificaram os estigmas de Bromeliaceae como úmidos para a maioria dos gêneros, inclusive os da subfamília Tillandsioideae.

Os resultados aqui apresentados subsidiam estudos taxonômicos, de reprodução, assim como podem ser usados para uma abordagem na conservação e até mesmo no melhoramento genético. O conhecimento sobre a receptividade do estigma permite a realização de polinizações controladas, sejam autopolinização ou xenogamia, maximizando a produção de sementes em populações específicas, principalmente tratando-se de espécies ameaçadas de extinção.

CONCLUSÕES

Foram observados três tipos de estigma: conduplicado-espiral para as espécies do subgênero *Tillandsia*, simples-ereto para as espécies do subgênero *Diaphoranthema* e coraliforme para as espécies do subgênero *Phytahrriza*. As espécies do subgênero *Anoplophytum* apresentaram duas variações morfológicas, conduplicado-espiral e simples-ereto.

Todas as espécies estudadas apresentaram estigma trífido, com epiderme uniestratificada, numerosos idioblastos contendo ráfides no parênquima fundamental e feixes vasculares individuais para cada carpelo.

As duas metodologias para avaliar a receptividade do estigma foram eficientes.

A maior atividade enzimática foi observada na antese para todas as espécies estudadas.

A morfoanatomia do estigma e estilete oferece informações importantes para a taxonomia de *Tillandsia* e os dados de receptividade do estigma podem subsidiar futuros estudos reprodutivos e de conservação para essas espécies.

REFERÊNCIAS

- ABROL, D. P. **Pollination Biology**: Biodiversity Conservation and Agricultural Production. Springer: India, p. 792, 2012.
- ALLARD, R. W. Sistemas reprodutivos e métodos de melhoramento de plantas. In: BLUCHER, E. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, cap. 4, p. 25-35, 1971.
- ALMEIDA, O. S. **Biologia floral, tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, p. 88, 2007.
- BARFUSS, M. H. J.; TILL, W.; LEME, E. M. C.; PINZÓN, J. P.; MANZANARES, J. M.; HALBRITTER, H.; SAMUEL, R.; BROWN, J. K. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**, Auckland, v. 279, n. 1, p.1-97, 2016.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: Profile an Adaptive Radiation. Cambridge: Cambridge University Press, p. 690, 2000.
- BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Stigma form and surface in relation to *in vivo* L(Linn.) G. Don. **Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology**, Delhi, v. 53, n. 2, p. 179-185, 2003.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Comparative ontogeny of bromeliaceous stigmas. In: LEINS, P.; TUCKET, S. C.; ENDRESS, P. K. (Eds.). **Aspects of floral development**. Berlin: Stuttgart, pp. 191-204, 1988.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae neglected taxonomic characters. **Brittonia**, New York, v. 36, n. 1, p. 364-374, 1984.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma types in Bromeliaceae: a systematic survey. **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 14, n. 1, p. 110-132, 1989.
- DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach (the practical approach series). New York: University Press, p. 250, 1992.
- DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple method to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 11, n. 3, p. 177-180, 1998.
- DASZKOWSKA-GOLEC, A.; SZAREJKO, I. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, Lousanne, v. 4, n. 138, p. 1-16, 2013.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **America Journal of Botany**, New York, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 20 Jan. 2020.
- GALEN, C.; PLOWRIGHT, R. C. Testing accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 1, p. 107-111, 1987.

- GILMARTIN, A. J.; BROWN, G. K.; VARADARAJAN, G. S.; NEIGHBORS, N. Status of *Glomeropitcairnia* within evolutionary history of Bromeliaceae. **Systematic Botany**, Kent, v. 14, p. 339–348, 1989.
- GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R.; SHIVANNA, K. R. Interspecific hybridization between rice bean (*Vigna umbellata*) and its wild relative (*V. minima*): Fertility-sterility relationships. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, n. 3, p. 1017-1022. 1986.
- GORTAN, G. Narbenformen bei Bromeliaceen—Ein Merkmal von taxonomischem Wert. **Die Bromelie**, Germany, v. 2, p. 43–46, 1990.
- GORTAN, G. **Narbenformen bei Bromelien**: Variationsmöglichkeiten und Überlegungen zu systematisch-taxonomischen Korrelationen. University of Vienna, Vienna, Vienna, v. 48, p. 84, 1991.
- HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, London, v. 41, n. 6, p. 1233-1258, 1977.
- HIROTA, S. K.; NITTA, K.; KIM, Y.; KATO, A.; KAWAKUBO, N.; YASUMOTO, A. A.; YAHARA, T. Relative role of flower color and scent on pollinator attraction: experimental tests using F1 and F2 hybrids of daylily and nightlily. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. 6, e39010, 2012.
- ISLAIR, P.; CARVALHO, K. S.; FERREIRA, F. C.; ZINA, J. Bromeliads in caatinga: an oasis for invertebrates. **Biotemas**, Florianópolis, v. 28, n. 1, p. 67-77, 2015.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138A, 1965.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University of Colorado, p. 5883, 1993.
- KNOX, R. B.; WILLIAMS, E. G.; DUMAS, C. Pollen, pistil and reproductive function in crop plants. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 4, n. 1, p. 9-79, 1986.
- 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**, Agra, v. 1, n. 1, p. 106-111, 2010.
- LEME, E. M. C. Improving taxa and character sampling to support generic and infrageneric status of *Alcantarea*. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 57, n. 1, p. 208–215, 2007.
- LEME, E. M. C. Notes on *Alcantarea*: A new medium-sized species and additions to *A. roberto-kautskyi*. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 59, n. 1, p. 19-27, 2009.
- LEME, E. M. C.; BROWN, G. K. Four new lithophytic *Vriesea* species (Tillandsioideae) from southeastern Brazil. **Vidalia**, Viçosa, v. 2, n. 1, p. 3-11, 2004.

- KONARSKA, A. Comparative micromorphology and anatomy of flowers and floral secretory structures in two *Viburnum* species. **Protoplasma**, Cham, v. 254, n. 1, p. 523-537, 2017.
- PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DEROOSE, R.; DE PROFT M. P. Interspecific and intergeneric fertilization barriers in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, Melle, v. 552, p. 43-53, 2001.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 631, 1972.
- PONTES, R. A. S.; AGRA, M. F. Flora da Paraíba, Brasil: *Tillandsia* L. (BROMELIACEAE). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n.1, p.47-61, 2006.
- R CORE TEAM (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- SCHILL, R.; DANNENBAUM, C.; JENTZSCH, E. M. Untersuchungen an Bromeliennarben (Investigations on the stigma of Bromeliaceae). **Beiträge zur Biologie der Pflanzen**, Germany, v. 63, n. 1, p. 221–252, 1988.
- 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**, Wageningen, v. 203, n. 1, p. 118–125, 2016.
- SOUZA, E. H.; BERSIEUX, L. M. SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. C.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 223, n. 1, p. 53-61, 2017.
- STONE, J. L.; THOMSON, J. D.; DENT-ACOSTA, S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, New York, v. 82, n. 9, p. 1186-1197, 1995.
- TILL, W. Systematics and evolution of the tropical-subtropical *Tillandsia* subgenus *Diaphoranthema* (Bromeliaceae). **Selbyana**, Sarasota, v. 13, n. 1, p. 88–94, 1992.
- TILL, W. Tillandsioideae. In: BENZING, D.H. (Ed.) **Bromeliaceae**: Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, v. 18, pp. 555–571, 2000.
- TILL, W.; HALBRITTER, H.; GORTAN, G. Some notes on the remarkable bromeliad genus *Glomeropitcairnia*. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 47, n. 1, p. 65–72, 1997.
- ZEISLER, M. Über die Abgrenzung des eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. **Beihefte zum Botanischen Centralblatt**, Jena, v. 58, n. 1, p. 308-318, 1933.