UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

SANDRA SANTA ROSA

**Desenvolvimento floral e do óvulo e aspectos da reprodução em *Aechmea* sp.
e *Vriesea* sp. (Bromeliaceae)**

Piracicaba
2015

SANDRA SANTA ROSA

**Desenvolvimento floral e do óvulo e aspectos da reprodução em *Aechmea* sp.
e *Vriesea* sp. (Bromeliaceae)**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na
Agricultura da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente**

**Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pinheiro
Martinelli**

Co-orientadora: Dra. Pilar Sanchez Testillano

**Piracicaba
2015**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Santa-Rosa, Sandra

Desenvolvimento floral e do óvulo e aspectos da reprodução em *Aechmea* sp. e *Vriesea* sp. (Bromeliaceae) / Sandra Santa-Rosa; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli; co-orientador Pilar Sanchez Testillano. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

167 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Desenvolvimento vegetal 2. Flor 3. Gametogênese 4. Microscopia
5. Morfologia vegetal 6. Parede celular vegetal 7. Pólen 8. Reprodução vegetal
I. Título

CDU 582.548.11 : 581.162

Aos meus pais, Marinalva e José Santa Rosa, que sempre acreditaram na educação como ferramenta transformadora, mesmo sem terem tido a oportunidade de concluir o ensino fundamental, muitas vezes deixando de realizar os seus próprios sonhos em função dos meus. Aos meus irmãos, Washington e Wilson, pelas palavras de otimismo nos momentos difíceis. Aos mestres da educação que colaboraram com a minha formação.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha existência, fé, sabedoria e discernimento que me mantiveram firme durante o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família, pais, irmãos e minha cunhada Lorena Sobral Santa Rosa, por me entenderem e aceitar as minhas escolhas.

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), por todo apoio necessário durante a realização do trabalho. A todos os funcionários dessa instituição por oferecerem todo suporte aos alunos. Em especial aos funcionários Neuda Oliveira, Fábio Oliveira e Daiane Vieira, pela atenção e eficiência na prestação dos serviços.

Ao Centro de investigaciones Biológicas de Madri, pelo estágio sanduíche e pela oportunidade da realização de parte desse trabalho, disponibilizando estrutura física, financeira e humana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo de parte do doutorado e do estágio sanduíche.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudo e financiamento da pesquisa.

Agradeço à Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, pela orientação, confiança, apoio, paciência e por todos esses anos de trabalho e ensinamentos, mesmo com tempo limitado. Aprendi muito, como pesquisadora, gestora e principalmente nas relações interpessoais, certamente concluo este trabalho muito mais preparada para as adversidades da vida profissional. Que Deus ilumine sempre seu caminho!

À Dra. Pilar Sanchez Testillano pela oportunidade de realização do estágio sanduíche no seu grupo de pesquisa, pela orientação, todos os ensinamentos científicos transmitidos nas nossas longas reuniões e todo apoio durante a minha temporada em Madri. Foi uma experiência profissional e pessoal muito valiosa.

Aos Laboratórios de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas e Laboratório de Biotecnologia Vegetal por toda a infraestrutura, disponibilidade de materiais, equipamentos e profissionais que auxiliaram e apoiaram na realização do trabalho.

À bióloga técnica do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas Mônica Lanzoni Rossi pela convivência diária, por todo aprendizado das técnicas microscópicas, apoio e empolgação no trabalho, mesmo nos momentos mais difíceis. Muito obrigado pela amizade e parceria, você contribuiu grandemente na qualidade do trabalho!

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de plantas, Sylvia Rodrigues, Karina Salomão, Camila Heuser, Raquel Peron, Renan Packer, Luana Manarim, Fernando Paffaro, Mayra Camargo e Everton Hilo, pela convivência e troca de conhecimentos.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Marcelo Favareto, Renata Cruz, Eveline Tavano, Leonardo Soriano, Lígia Erpen, Fabiana Muniz, Tatiana Moraes e Carolina Rossi. Obrigada a todos pela amizade, por todo apoio, risadas, discussões durante os cafezinhos e pelo convívio prazeroso.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, em especial a Profa Tsai Siu Mui pela utilização do microscópio Leica, LMD 7000.

Agradeço ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA – ESALQ/USP), por disponibilizar toda a infraestrutura para realização desse trabalho.

Ao Centro de Microscopia e Imagem da FOP-UNICAMP Piracicaba pela utilização do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1400.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Pólen de Plantas Cultivadas do Centro de Investigaciones Biológicas, Ivett Bárány, Mayte Solís, Hector Sanches, Vanessa Cano, Ahmed El-Tantawy, Eduardo Berenguer, Profa Dra Maria del Carmen Risueño e o amigo Miguel Ángel, pela convivência, ensinamentos e paciência, principalmente com o idioma. Conviver com vocês por alguns meses foi maravilhoso!

Agradeço especialmente à técnica Dra. Ivett Bárány pelos ensinamentos da técnica de imunolocalização e manipulação do microscópio confocal a laser. À Dra. Mayte Solís por compartilhar todo o seu conhecimento sobre embriogênese de pólen.

Aos professores dos Programas de Pós-graduação do CENA/USP e ESALQ/USP, por todos os ensinamentos e contribuição profissional.

À Profa Dra. Beatriz Apezatto da Glória pela convivência e por compartilhar todo o seu conhecimento de anatomia vegetal e ensinamentos didáticos, durante os estágios do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Foi um prazer trabalhar com você!

Às funcionárias e amigas do Laboratório de Anatomia Vegetal da ESALQ/USP Maria das Graças Ongareli, Marli Soares, Aline Bombo, Magda Tessmer, Makeli Lusa, Aline Martins, Arinawa Filartiga e Michelle Alves, pela amizade e convivência.

Ao Prof. Ricardo Ribeiro Rodrigues pelos ensinamentos de morfologia vegetal e didática, durante o estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Agradecimento especial aos amigos Marcelo Bida, Sylvia Silveirão e Leonardo Soriano, juntos formamos a diretoria da APG/CENA-2012 e desse trabalho nasceu uma grande amizade. Obrigado por todos os ensinamentos, as longas discussões na sede da APG e todos os momentos de diversão.

À amiga-irmã Juliana Leles e seu marido, meu amigo Fabio Coutinho “baiano” pela grande amizade, pelos anos de convivência, por me entender e respeitar meus momentos, pelo infinito apoio e ajuda durante todo o meu doutorado. Amo vocês!

Os amigos do doutorado, Cartiane Rocha, Leonardo Martins, Andrea Ribeiro, Conan Ayade, Natália Arruda e Denis Santiago, pela grande amizade. Vocês são inesquecíveis!

Às amigas Ádila Vidal e Daniela Silveira, pela amizade, apoio, conversas e palavras de otimismo nos momentos difíceis do doutorado, mesmo estando tão distante.

Agradeço a amizade sincera das amigas, Carla Dias, Camila Dias, Sheyla Guimarães e do amigo Maurito que mesmo distante se fizeram presentes e sempre torceram por mim.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa tese e para minha formação profissional. Uma tese não pode ser realizada sozinha é um trabalho de muitas mãos.

Muito obrigada!

"Sem a curiosidade que me move, que me inquieta,
que me insere na busca, não aprendo nem ensino".

Paulo Freire

RESUMO

SANTA-ROSA, S. **Desenvolvimento floral e do óvulo e aspectos da reprodução em *Aechmea* sp. e *Vriesea* sp. (Bromeliaceae)**. 2015. 167 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A utilização de Bromélias tem sido crescente no mercado de plantas ornamentais, por outro lado, muitas espécies encontram-se ameaçadas, grande parte pelos impactos humanos no ambiente. *Aechmea correia-araujoi* E. Pereira & Moutinho, *Aechmea gamosepala* Wittm, *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer e *Vriesea saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez, espécies nativas da Mata Atlântica brasileira, têm sido alvo de extrativismo. Informações básicas sobre a espécie são essenciais para subsidiar a condução de programas de conservação e melhoramento genético, que aliados a ferramentas biotecnológicas permitem a incorporação de estratégias inovadoras aos métodos de melhoramento. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi descrever essas espécies, quanto à micromorfologia floral, aspectos reprodutivos envolvidos no processo de polinização, desenvolvimento floral e desenvolvimento gametofítico, como mecanismo de preservação e produção comercial. A caracterização morfológica e anatômica das flores das espécies de *Aechmea* e *Vriesea* contribuiu para a compreensão do processo reprodutivo. As espécies apresentam grãos de pólen com alta capacidade reprodutiva, viabilidade polínica superior a 93%, germinação *in vitro* maior que 80% e o estigma apresenta-se receptivo da antese ao final do dia. A ontogênese floral de *A. correia-araujoi* é centrípeta, os primórdios desenvolvem-se na ordem, sépala, pétala, androceu e gineceu. O apêndice petalar é formado na fase final do desenvolvimento. O primórdio de óvulo tem origem placentária e caráter trizonal, o óvulo é anátropo, bitegumentado e crassinucelado. O meristema floral de *A. gamosepala* se desenvolve de forma centrípeta, de forma unidirecional reversa. O estigma diferencia-se na fase inicial do desenvolvimento e os apêndices petalares, na fase final. O óvulo é anátropo, crassinucelado, bitegumentado, tétrade linear, megásporo calazal funcional, desenvolvimento tipo monospórico e *Polygonum*. As anteras são bitecas, tetraesporangiadas, com tapete secretor. Botões florais de 8,7 – 13,0 mm são indicados no estudo de embriogênese a partir de micrósporo. As alterações celulares e o padrão de distribuição de pectinas e AGPs foram caracterizadas por análise citoquímica com azul de toluidina, KI e DAPI e imunocitoquímica por imunofluorescência com os anticorpos para RNA, pectinas esterificadas (JIM7), não esterificadas (JIM5) e AGPs (LM2, LM6, MAC207, JIM13, JIM14) e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram caracterizados padrões de distribuição espaço-temporal de pectinas e AGP que podem ser utilizados como marcadores de desenvolvimento gametofítico masculino. As observações feitas nesse trabalho fornecem dados sobre aspectos reprodutivos das espécies que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético, conservação e desenvolvimento de haploides.

Palavras chave: AGPs. Bromélia. Desenvolvimento gametofítico. Morfologia floral. Pectinas.

ABSTRACT

SANTA-ROSA, S. **Development floral and ovule and aspects of reproduction in *Aechmea* sp. and *Vriesea* sp. (Bromeliaceae).** 2015. 167 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

The use of bromeliads has grown in the ornamental market, however many native species are threatened, mostly due to human impacts. Basic information about the species is essential to support breeding and conservation programs, which combined with biotechnological tools allow for the innovative approaches to breeding methods. The objective of this study was to characterize the floral development and reproductive aspects of the ornamental species *Aechmea correia-araujoi*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* and *Vriesea saundersii*, with details on floral morphology and anatomy, reproductive aspects involved in pollination. For the *Aechmea* species the gametophytic development was characterized, as well as the cellular changes that occur during the development of the male gametophyte, characterizing the distribution pattern of pectin and arabinogalactan proteins (AGPs), for biotechnological applications. The plants were characterized by observations of the material in the greenhouse and floral organs were described using microscopic techniques. The flowers are actinomorphic, trimerous, dichlamydeous, heterochlamydeous, with double petal appendages, six stamens, gamocarpelar, tricarpellate ovary, with septal nectaries and a large number of ovules. Aspects of the floral biology involved in reproduction were assessed by stigma receptivity, pollen morphology, viability and in vitro pollen grain germination. The species produce large amounts of pollen grains with high reproductive capacity, pollen viability higher than 93%, in vitro germination higher than 80% and stigma is receptive throughout the day. The floral ontogeny of *A. correia-araujoi* is centripetal, the primordia develop sepals, petals, stamens and pistil. The petal appendages are formed in the final stages of floral development. The cellular changes, and the distribution pattern of pectins and AGPs were characterized by cytochemical analysis with IKI and DAPI, and immunocytochemistry and immunofluorescence with antibodies for RNA, esterified pectins (JIM7) de-esterified (JIM5) and AGPs (LM2, LM6, MAC207, JIM13, JIM14) and analyzed by confocal microscopy. Various spatio-temporal distribution patterns of pectins and AGPs were characterized and may be used as male gametophyte development markers. The observations made in this work provide data on reproductive aspects of the species studied, and can be further used in breeding and conservation programs, and haploid production.

Keywords: AGPs. Bromeliad. Gametophytic development. Floral morphology. Pectin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 A família Bromeliaceae	22
2.1.1 O gênero <i>Aechmea</i>	23
2.1.2 O gênero <i>Vriesea</i>	24
2.1.3 Importância ecológica	25
2.1.4 Potencial ornamental	26
2.1.5 Espécies em estudo	27
2.1.6 Morfoanatomia floral e aspectos reprodutivos de Bromeliaceae	30
2.2 Desenvolvimento floral	32
2.3 Reprodução sexuada	33
2.3.1 Desenvolvimento do saco embrionário	34
2.3.2 Desenvolvimento do grão de pólen	35
2.4 Parede celular	37
2.4.1 Pectinas.....	38
2.4.2 Proteínas arabinogalactanas	39
2.4.3 Imunolocalização de pectinas e AGPs	41
3 MICROMORFOLOGIA FLORAL E ASPECTOS REPRODUTIVOS DE BROMELIACEAE	
ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA COM POTENCIAL A SISTEMÁTICA E HORTICULTURA	42
3.1 Introdução.....	43
3.2 Material e Métodos	45
3.2.1 Material Vegetal	45
3.2.2 Caracterização da planta	46
3.2.3 Morfoanatomia da flor e aspectos da biologia floral	46
3.2.4 Receptividade do estigma	47
3.2.5 Morfologia dos grãos de pólen.....	47
3.2.6 Determinação da viabilidade e germinação <i>in vitro</i> do grão de pólen	48
3.2.7 Micromorfologia	49
3.2.7.1 Microscopia de luz.....	49
3.2.7.2 Microscopia eletrônica de varredura	50

3.2.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão	50
3.3 Resultados	50
3.3.1 Potencial ornamental.....	50
3.3.2 Morfoanatomia e biologia floral	54
3.3.2.1 <i>Aechmea correia-araujoi</i>	54
3.3.2.2 <i>Aechmea gamosepala</i>	58
3.3.2.3 <i>Vriesea ensiformis</i>	62
3.3.2.4 <i>Vriesea saundersii</i>	64
3.3.3 Morfologia polínica	66
3.3.4 Viabilidade e germinação <i>in vitro</i> de grão de pólen	70
3.3.5 Receptividade do estigma.....	72
3.4 Discussão	73
4 DESENVOLVIMENTO FLORAL, DO ÓVULO E GRÃO DE PÓLEN EM DUAS ESPÉCIES DE AECHMEA DA MATA ATLÂNTICA	78
4.1 Introdução.....	79
4.2 Material e Métodos.....	81
4.2.1 Microscopia de luz	81
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	82
4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão	82
4.3 Resultados e Discussão	82
4.3.1 Desenvolvimento floral.....	84
4.3.2 Desenvolvimento do óvulo	92
4.3.3 Desenvolvimento do grão de pólen.....	98
5 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE COMPONENTES DE PAREDE CELULAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO GAMETOFÍTICO MASCULINO DE <i>Aechmea gamosepala</i> E <i>Aechmea correia-araujoi</i> (BROMELIACEAE).....	107
5.1 Introdução.....	109
5.2 Material e Métodos.....	110
5.3 Resultados.....	112
5.3.1 Modificações na parede celular.....	117
5.3.1.1 Distribuição de pectinas esterificadas e não esterificadas.....	117

5.3.1.2 Distribuição de proteínas arabinogalactanas (AGPs) durante a microsporogênese e microgametogênese	125
5.4 Discussão	137
5.4.1 Determinação das etapas do desenvolvimento gametofítico por modificações no núcleo e citoplasma.....	137
5.4.2 Distribuição de pectinas durante o desenvolvimento do grão de pólen de <i>Aechmea gamosepala</i> e <i>Aechmea correia-arauji</i>	139
5.4.3 Distribuição de proteínas arabinogalactanas (AGPs) durante o desenvolvimento do grão de pólen de <i>Aechmea gamosepala</i> e <i>Aechmea correia-arauji</i>	143
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
REFERÊNCIAS.....	148

1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é composta por aproximadamente 3.250 espécies e milhares de híbridos, distribuídos em 58 gêneros (LUTHER, 2010), dispersas em florestas tropicais e subtropicais úmidas da América do Sul e Central, e apenas uma única espécie nativa do Oeste da África, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed (SMITH; DOWNS, 1974; GIVNISH et al., 2007). Desde a publicação da monografia de Smith e Downs (1974; 1977; 1979), a classificação taxonômica da família tem sofrido diversas modificações. Recentemente, Givnish et al. (2007; 2011), baseando-se em análises moleculares, propuseram uma nova classificação de Bromeliaceae com oito subfamílias (Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae).

O maior centro de diversidade da família Bromeliaceae encontra-se no Brasil, nos domínios de Mata Atlântica, estima-se que o país abrigue mais de 50% das espécies e 80% dos gêneros, sendo mais de 85% das espécies existentes, endêmicas (MARTINELLI et al., 2008; FORZZA et al., 2014).

O interesse ornamental por espécies dessa família resultou em uma crescente demanda e exploração das espécies na natureza (ROE et al., 2002; BERED et al., 2008; MARTINELLI et al., 2008). A importância econômica ornamental e o papel ecológico das espécies nativas, bem como o risco de sua extinção resultante da redução da cobertura florestal, motivam estudos com Bromeliaceae. Considerando que o Brasil possui a maior diversidade de bromélias do mundo, o estabelecimento de programas de melhoramento genético e conservação, associado a ferramentas biotecnológicas são uma eficiente estratégia para o melhor aproveitamento de espécies nativas de interesse no mercado ornamental.

Como as espécies nativas *Aechmea correia-araujo* E. Pereira & Moutinho, *Aechmea gamosepala* Wittm, *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer e *Vriesea saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez, de distribuição praticamente restrita à Mata Atlântica. *A. correia-araujo* é uma espécie epífita de médio porte, encontrada exclusivamente no estado da Bahia. Apresenta inflorescência com brácteas vermelhas e folhas variegadas (LEME, 1998; FORZZA et al., 2014). *A. gamosepala* de hábito epífita e terrestre, possui inflorescência rosa e azul com durabilidade de aproximadamente trinta dias (ARAUJO; FISCHER; SAZIMA, 2004; FORZZA et

al., 2014). *V. ensiformis* é uma espécie epífita, de folhas esverdeadas que contrastam com as brácteas vermelhas da sua inflorescência, que envolvem as flores (SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006). *V. saundersii* é uma espécie endêmica do estado do Rio de Janeiro que apresenta folhas coriáceas providas de máculas vermelho vinosas na superfície e inflorescência composta de cor amarela (LEME; COSTA, 1998; FORZZA et al., 2014). Essas espécies apresentam alguma categoria de ameaça, *A. gamosepala* foi considerada extinta e em perigo (CONSEMA-RS, 2002; SMA-SP, 2002), *V. ensiformis* tem sido alvo de extrativismo seletivo de plantas ornamentais (SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006), *V. saundersii* foi considerada criticamente em perigo de extinção (MARTINELLI et al., 2008), atualmente é indicada como espécie de interesse para pesquisa e conservação, devido a sua distribuição restrita, assim como a espécie *A. correia-raujo* (MARTINELLI; MORAES, 2013).

O conhecimento prévio das espécies é um pré-requisito para o estabelecimento de programa de melhoramento, tornando estudos da morfoanatomia floral, aspectos reprodutivos envolvidos no processo de polinização, além do estudo detalhado do desenvolvimento floral e desenvolvimento gametofítico, masculino e feminino, que integram a caracterização dos processos envolvidos na reprodução, essenciais.

O estudo do desenvolvimento gametofítico masculino é importante para a realização de estudos celulares, moleculares e à aplicação de técnicas biotecnológicas visando o melhoramento genético, como a geração de plantas haploides por embriogênese a partir dos micrósporos ou pólen (SEGUÍ-SIMARRO, 2010; GERMANÀ, 2011; DWIVEDI, et al., 2015). A utilização dessa técnica requer o conhecimento prévio do desenvolvimento gametofítico masculino, porque a indução de embriogênese a partir do micrósporo é alcançada em fases específicas do desenvolvimento, nos quais o micrósporo é capaz de se reprogramar da via gametofítica para a esporofítica (TOURAEV; PFOSSER; HEBERLE-BORS, 2001; SEGUÍ-SIMARRO, 2010).

O desenvolvimento gametofítico masculino é acompanhado de diversas modificações na atividade celular e na organização estrutural dos compartimentos celulares, dependentes, aparentemente de uma rede de eventos de sinalização, em grande parte indefinida, envolvendo moléculas de diferentes tipos (PREUSS, 2002). A parede celular é um compartimento dinâmico composto principalmente por pectinas que variam o seu estado de esterificação durante a diferenciação e crescimento celular (WILLATS et al., 2001b; BÁRÁNY et al., 2010b). Proteínas arabinogalactanas (AGPs) são glicoproteínas presentes na parede

celular, com um papel fundamental em diversos processos do desenvolvimento de plantas, incluindo o desenvolvimento do grão de pólen (EL-TANTAWY et al., 2013). As modificações celulares e o padrão de distribuição de pectinas esterificadas e não-esterificadas, e AGPs durante o desenvolvimento gametofítico masculino foram caracterizadas como marcadores de fases do desenvolvimento gametofítico em espécies modelo, podendo contribuir para o aprofundamento biotecnológico em Bromeliaceae.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi descrever as bromélias ornamentais nativas da Mata Atlântica brasileira *Aechmea correia-araujoi*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *Vriesea saundersii*, quanto à micromorfologia floral, aspectos reprodutivos envolvidos no processo de polinização, desenvolvimento floral e desenvolvimento gametofítico, como mecanismos de preservação e produção comercial destas espécies. Para atingir esses os objetivos foram definidos os seguintes objetivos específicos: descrever a morfologia e anatomia floral, e aspectos reprodutivos envolvidos no processo de polinização, como estrutura floral, receptividade do estigma, morfologia, ultraestrutura, viabilidade e germinação de grãos de pólen (capítulo 3); Analisar o desenvolvimento floral, do óvulo e grão de pólen de *A. gamosepala* e o desenvolvimento floral e do óvulo de *A. correia-araujoi* e estabelecer uma relação entre o tamanho do botão floral e as fases de desenvolvimento (capítulo 4); Por fim, identificar as modificações celulares e determinar o padrão de distribuição de pectinas (esterificadas e não-esterificadas) e AGPs, durante o desenvolvimento gametofítico masculino das duas espécies de *Aechmea*, na busca de marcadores de fases com uso potencial na embriogênese a partir de micrósporos (capítulo 5).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae Juss. é considerada monofilética e integra a ordem Poales (GIVNISH et al., 2007; APG, 2009). O parentesco com os demais membros dessa ordem ainda é controverso, porém a presença de nectários septais e flores epígenas a difere das demais famílias (SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004). Diferentes hipóteses apontam para o posicionamento pleisiomórfico de Bromeliaceae, que juntamente com Typhaceae e Rapateaceae, compõe as Poales basal (LINDER; RUDELL, 2005; GIVNISH et al., 2010).

A família é composta por cerca de 3.250 espécies, 58 gêneros e milhares de híbridos (LUTHER, 2010), dispersas em grande parte dos ecossistemas americanos, desde o sudeste dos EUA a florestas tropicais e subtropicais úmidas da América Central e do Sul, e ocorrência de uma única espécie no Oeste da África, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbraed, cuja presença é atribuída a uma dispersão a longa distância em um período relativamente recente. São considerados três centros de diversidade para a família, do norte dos Andes até o México e Antilhas, Planalto das Guianas e leste do Brasil, nos domínios de Mata Atlântica (SMITH; DOWNS, 1974; GIVNISH et al., 2007; 2011).

A maioria dos representantes da família é caracterizada pela forma de vida epífita, embora existam também representantes terrestres e rupícolas (MARTINELLI et al., 2008). Apresenta caule reduzido, folhas alternas espiraladas, recobertas por tricomas especializados (escamas foliares, escamas peltadas, tricomas peltados), em geral formando uma roseta (DAHLGREN; CLIFFORD; YEO, 1985; SMITH; TILL, 1998).

O Brasil é o maior centro de diversidade da família, com maior taxa de endemismo, são registrados 44 gêneros e 1.343 espécies, das quais 1.174 são endêmicas do território brasileiro (FORZZA et al., 2014). Ocorre em todos os ecossistemas com maior concentração na Mata Atlântica, que apresenta maior riqueza de espécies e endemismo, são registradas 911 espécies, o que corresponde a mais de 65% do total (BENZING, 2000; LEME, 2003; WANDERLEY; MARTINS, 2007; WENDT et al., 2008; FORZZA et al., 2014).

Desde a publicação da monografia de Smith e Downs (1974, 1977, 1979) a classificação taxonômica da família tem sofrido diversas modificações. Ao longo do século XX a família foi tradicionalmente subdividida em três subfamílias Pitcairnioideae,

Tillandsioideae e Bromelioideae, baseada em características morfológicas, tais como posição do ovário, tipo de fruto, semente e tegumento, margem das folhas e forma de vida (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979; BENZING, 2000). Mais recentemente, Givnish et al. (2007; 2011), baseando-se em análises moleculares, propuseram uma nova classificação em oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae. Bromelioideae e Tillandsioideae se mantêm como grupos monofiléticos e Pitcairnioideae é segregada em seis subfamílias, sendo Pitcairnioideae e Navioideae re-circunscritas, e quatro novas subfamílias, Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Puyoideae são propostas.

Diversos estudos de caracterização têm sido realizados para revisão de gêneros, subgêneros e complexos de espécies (FARIA; WENDT; BROWN, 2004; FORZZA, 2005; SIQUEIRA FILHO; LEME 2006; COSTA; RODRIGUES; WANDERLEY, 2009; VERSIEUX, 2009; FARIA WENDT; BROWN, 2010). As abordagens têm fornecido importante contribuição ao conhecimento da morfologia e taxonomia da família. Porém, ainda persistem lacunas de conhecimento para a compreensão do parentesco entre os gêneros, especialmente nas subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae, aa quais pertencem as espécies estudadas neste trabalho, assim como dos relacionamentos infragenéricos, especialmente nos gêneros mais ricos, *Aechmea*, *Vriesea*, *Tillandsia* e *Neoregelia* (TARDIVO, 2002; FARIA; WENDT; BROWN, 2004; MARTINELLI et al., 2008; COSTA; GOMES-DA-SILVA; WANDERLEY, 2014; 2015). Essas inconsistências ocorrem principalmente pelo alto índice de homoplasia morfológica, bem como a baixa resolução obtida através das regiões genômicas plastidiais empregadas (GIVNISH et al., 2007).

2.1.1 O Gênero *Aechmea*

O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. é um dos maiores da família, pertence à subfamília Bromelioideae e possui mais de 280 espécies, agrupadas em oito subgêneros (LUTHER, 2010; BUTCHER; GOUDA, 2015). No Brasil são registradas 184 espécies sendo 159 endêmicas. Ocorrem do norte ao sul do Brasil, em diferentes ecossistemas, a Mata Atlântica é considerada o centro de diversidade do gênero, sendo citadas 156 espécies (MARTINELLI et al., 2008; FORZZA et al., 2014; MACIEL; LOUZADA; ALVES, 2015). A combinação de uma grande diversidade estrutural e morfológica com a precariedade do conhecimento acerca da

delimitação consistente de suas espécies e, conseqüentemente, dos próprios gêneros e subgêneros, faz de *Aechmea* um dos mais importantes desafios da pesquisa taxonômica da atualidade (SMITH; DOWNS, 1979; SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006; WANDERLEY; MARTINS, 2007; GIVNISH et al., 2011).

As plantas são epífitas, terrícolas ou rupícolas, as folhas lepidotas em ambas as faces, densamente rosuladas ou dísticas, com bainha bem desenvolvida, geralmente formando tanque e lâmina com margem serrilhada a aculeada. Apresentam inflorescências simples ou composta, excedendo ou inclusa na roseta foliar, sustentada por escapo ereto ou levemente recurvo, composta por brácteas florais geralmente livres ou parcialmente conatas com os entrenós dos ramos. As flores são sésseis ou raramente pediceladas, dísticas ou polísticas, as sépalas são livres ou conatas, as pétalas são livres providas, na face interna, de dois apêndices basais desenvolvidos, reduzidos ou rudimentares, geralmente com duas calosidades longitudinais. Estames inclusos, livres ou adnatos às pétalas com anteras dorsifixas. O ovário é ínfero, com hipanto formando ou não tubo, óvulos geralmente caudados (SMITH; DOWNS, 1979, WANDERLEY; MARTINS, 2007).

Polinização por aves, principalmente beija-flores, mas também há registros de abelhas, mamangavas, borboletas, vespas e mariposas (MARTINELLI, 1994; VARASSIN; SAZIMA, 2000; ARAÚJO; FISCHER; SAZIMA, 2004; LENZI; MATOS; ORTH, 2006; MATAALLANA et al., 2010).

2.1.2 O Gênero *Vriesea*

O gênero *Vriesea* Lindl. é o terceiro maior na família Bromeliaceae, pertence a subfamília Tillandsioideae, sendo composto por aproximadamente 280 espécies, divididas em duas seções *Vriesea* e *Xiphion*, reconhecido como polifilético (GIVNISH et al., 2011; LUTHER, 2010; FORZZA et al., 2014). A seção *Vriesea* inclui espécies com inflorescências simples e compostas, com brácteas florais infladas não involutas, alaranjadas ou amareladas e estames exsertos. A seção *Xiphion* inclui espécies com brácteas florais esverdeadas ou amarronzadas e estames inclusos na corola (BENNETT, 2000; COSTA; RODRIGUES; WANDERLEY, 2009; LUTHER, 2010).

Com espécies distribuídas em toda a América desde o México e Cuba até o sul do Brasil e nordeste da Argentina, o gênero tem dois centros de diversidade, América Central,

Caribe e norte da América do Sul, e o outro fica no leste do Brasil, nas regiões de Mata Atlântica, com 166 espécies (SMITH; DOWNS, 1977; MARTINELLI et al., 2008). Atualmente, são registradas 219 espécies, 208 endêmicas que se encontram distribuídas na costa atlântica brasileira entre o nordeste e sul do Brasil, predominantemente no Bioma Atlântico, onde é o gênero com maior número de espécies na família (SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006; MARTINELLI et al., 2008; COSTA; RODRIGUES; WANDERLEY, 2009; FORZZA et al., 2014).

São espécies de crescimento lento, epífitas, rupícolas, saxícolas ou terrestres, apresentam folhas em roseta, formando tanque, inteiras. Inflorescência simples ou composta, escapo geralmente conspicuo podendo variar de ereto a pêndulo, com bráctea floral geralmente conspicua. As flores são dísticas ou secundas com sépalas livres, simétricas ou subsimétricas, pétalas livres ou curtamente conatas com apêndices petalíneos basais na face interna, firmes, eretos ou encurvados, raramente ausentes; estames inclusos ou exsertos; ovário súpero, pluriovulado e óvulos caudados (BENZING, 2000; STRINGHETA et al., 2005; SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006; COFFANI-NUNES et al., 2010; COSTA; GOMES-DA-SILVA; WANDERLEY, 2014).

Apresenta antese diurna ou noturna, flores inodoras ou com odor, corola tubular ou campanulada, geralmente associada ao sistema de polinização por aves e morcegos (BENZING, 2000; STRINGHETA et al., 2005; SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006;).

2.1.3 Importância ecológica

As bromélias desempenham importante papel ecológico nos ecossistemas naturais e afetam muitos aspectos do ecossistema que habitam. Abrigam uma grande diversidade de organismos, contribuem com a sustentabilidade e diversidade do ecossistema, produção e ciclagem de nutrientes pelas espécies epífitas, além de servir como fonte de energia e nutrientes a diversos organismos associados, como beija-flores, morcegos, abelhas e formigas mutualistas (MARTINELLI, 1997; BENZING, 2000; OLIVEIRA, 2004).

As relações planta-polinizador estão bem documentadas para a família, sendo indicada como a família mais importante no fornecimento de néctar volumoso e concentrado, para mais de 35% das espécies de beija-flores da Mata Atlântica brasileira (MARTINELLI, 1997; BUZATO; SAZIMA; SAZIMA, 2000; SAZIMA et al., 2000; SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2006). A presença de fitotelma (tanque) em muitas espécies, formado pela

sobreposição das bainhas foliares, acumula água, matéria orgânica e inorgânica, criando um micro-ambiente propício para o estabelecimento e crescimento de outras espécies vegetais e uma fauna variada (BENZING, 2000; SCARANO, 2002; LOPEZ; ALVES; RIOS, 2009;). Atuam como indicadores ambientais, criam um ambiente para estudos observacionais e experimentais sobre uma ampla gama de questões biológicas, incluindo a botânica sistemática, interação entre plantas, ecofisiologia e mecanismos de mudança evolutiva (FOISSNER et al., 2003; GLIO; BAR; MONTEIRO, 2010; GALINDO-LEAL et al., 2011).

No entanto, a crescente demanda por bromélias ornamentais, ainda impulsiona o extrativismo predatório de muitas espécies para comercialização (NEGRELLE; MITCHELL; ANACLETO, 2012). O alto grau de endemismo da família, que concentra cerca de 27% dos táxons da família na Mata Atlântica (FORZZA et al., 2014) e à redução e fragmentação desse bioma (MYERS et al., 2000), vem provocando grandes danos ambientais, dentre estes a redução da diversidade específica, levando muitas espécies a uma erosão genética significativa, contribuindo para o aumento do número de plantas vulneráveis, ameaçadas de extinção ou até mesmo em extinção (COFFANI-NUNES, 2002; BERED et al., 2008; MARTINELLI et al., 2008). Martinelli e Moraes (2013) citam um total de 202 espécies de Bromeliaceae em alguma categoria de ameaça, sendo 111 em perigo, 30 vulneráveis e 61 criticamente em perigo. O desenvolvimento de estratégias para o aproveitamento de espécies nativas no mercado ornamental é fundamental para o estabelecimento de um sistema de cultivo racional e preservação das espécies, pois possibilita o fornecimento de plantas ao mercado, desencorajando o extrativismo (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

2.1.4 Potencial ornamental

O cultivo e comercialização de Bromeliaceae como plantas ornamentais é secular (SMITH, 1955). Nas últimas décadas, a crescente demanda de mercado tem sido responsável pelo aumento na produção e comercialização de bromélias (COFFANI-NUNES, 2002; BERED et al., 2008). Características como fácil adaptação, belas formas e cores, originalidade, durabilidade e versatilidade, tornam as espécies dessa família cada vez mais apreciadas no mundo todo, para ornamentação de interiores e exteriores, representando um segmento de importância econômica para o mercado de flores e plantas ornamentais (COFFANI-NUNES,

2002; TERAQ; CARVALHO; BARROSO, 2005; BERED et al., 2008; ANACLETO; REJANE; NEGRELLE, 2013).

A Europa detém o maior mercado produtor e consumidor de bromélias do mundo, na Holanda e Bélgica estão as maiores multinacionais. Essas empresas realizam melhoramento genético e cultivo comercial em grande escala há décadas e muitas delas possuem grande número de cultivares exclusivas protegidas por patentes. Em 2008, o volume de bromélias comercializadas na Europa atingiu 25 milhões de vasos. Apesar de ser o centro de diversidade da família a produção brasileira é considerada pequena em comparação aos grandes produtores, em 2008 o volume de bromélias comercializadas no Brasil não passou de 2 milhões de vasos (CHONE, 2011).

Apesar disso, o mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais tem registrado crescimento de 10 a 15% ao ano, na última década (IBRAFLOR, 2013). A produção de bromélias está concentrada no estado de São Paulo, especificamente na região de Campinas e Holambra. A produção consiste basicamente de híbridos desenvolvidos nos EUA e mais umas poucas espécies melhoradas. Dentre as espécies cultivadas, destacam-se espécies dos gêneros *Aechmea*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Tillandsia* e *Vriesea* (PAULA, 2005; JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Considerando a crescente demanda do mercado e a grande diversidade de formas e riqueza de espécies nativas, com fins ornamentais, existe um mercado enorme a ser explorado.

2.1.5 Espécies em estudo

Aechmea correia-araujo E. Pereira & Moutinho, *Aechmea gamossepal* Wittm, *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer e *Vriesea saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez, são espécies nativas, com distribuição praticamente restrita à Mata Atlântica, comercializadas como plantas ornamentais (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Plantas adultas de *Aechmea correi-araujoi* (A), *Aechmea gamosepala* (B), *Vriesea ensiformis* (C) e *Vriesea saundersii*.

A espécie *Aechmea correi-araujoi* é uma espécie epífita de médio porte, endêmica do Brasil, exclusivamente encontrada no estado da Bahia, onde floresce no período seco, entre outubro e dezembro. Apresenta características de planta de vaso, a presença de brácteas vermelhas na inflorescência e folhas variegadas lhes confere valor ornamental (LEME, 1998; FORZZA et al., 2014).

Aechmea gamosepala ocorre nas regiões de Mata Atlântica dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É uma planta ornamental de hábito epífita e terrestre, floresce de dezembro a fevereiro e a inflorescência rosa e azul dura aproximadamente 30 dias (ARAUJO; FISCHER; SAZIMA, 2004; FORZZA et al., 2014). A espécie

foi considerada presumivelmente extinta, pela lista vermelha da flora de São Paulo (SMA-SP, 2002) e em perigo na lista vermelha da flora do Rio Grande do Sul (CONSEMA-RS, 2002).

Vriesea ensiformis é uma espécie epífita, endêmica do Brasil, típica do sub-bosque da Mata Atlântica de Pernambuco a Santa Catarina, onde ocorre em altitudes próximas ao nível do mar até cerca de 1.000m. As folhas esverdeadas contrastam com as longas brácteas vermelhas da sua inflorescência. Possui período de floração de dezembro a abril, e de acordo com Siqueira Filho e Leme (2006), essa espécie tem sido alvo do extrativismo seletivo de plantas ornamentais que tem contribuído para o desaparecimento de muitas espécies da flora.

Vriesea saundersii é uma espécie rupícola, endêmica do estado do Rio de Janeiro, que cresce nas encostas rochosas e nas florestas úmidas do litoral até 400m de altitude. Apresenta folhas coriáceas providas de máculas vermelho-vinosas na superfície e inflorescência composta de cor amarela com período de floração de dezembro a março (LEME; COSTA, 1998; FORZZA et al., 2014). Descrita pela primeira vez por A. Carrière (1872), destacou a beleza de suas folhas, com tons purpúreos e máculas vinosas, por muitas décadas foi sistematicamente confundida com *V. botafoguensis* Mez. *V. saundersii* apresenta porte mais robusto, com inflorescência frouxamente ramificada e flores com estames inclusos (LEME; COSTA, 1998).

Muito difundida no passado, a espécie foi considerada criticamente em perigo de extinção devido à ação antrópica (MARTINELLI et al., 2008). Atualmente não é considerada ameaçada, porém é indicada como espécie de interesse para pesquisa e conservação, devido à sua distribuição restrita e carência de dados sobre a espécie (MARTINELLI; MORAES, 2013).

O melhoramento genético convencional, aliado a ferramentas biotecnológicas constituem-se em uma eficiente estratégia para o aproveitamento e conservação dessas espécies que apresentam alguma categoria de ameaça e/ou distribuição restrita. No entanto, a condução de programas de melhoramento e preservação requer obrigatoriamente o conhecimento das espécies, tornando estudos de caracterização essenciais, como o estudo da morfoanatômica floral, aspectos reprodutivos envolvidos no processo de polinização, além do estudo detalhado do desenvolvimento floral e desenvolvimento gametofítico, que integram a caracterização dos processos envolvidos na reprodução.

2.1.6 Morfoanatomia floral e aspectos reprodutivos de Bromeliaceae

Estudos de caracterização morfológica, com o objetivo de descrever espécies e/ou gênero, têm sido utilizados ao longo da história taxonômica de Bromeliaceae. A caracterização morfológica do estigma (BROWN; GILMARTIN, 1984; VARADARAJAN; BROWN, 1988), classificados em cinco tipos, simples-ereto, cupulado, conduplicado-espiral, lâmina convoluta e coraliforme (BROWN; GILMARTIN, 1989). A superfície estigmática, analisada por Heslop-Harrison e Shivanna (1977), tipos de apêndices petalares (BROWN; TERRY 1992), pólen e pistilo (VERVAEKE et al.; 2003) e a presença de apêndices nos óvulos e, conseqüentemente, nas sementes (PALACÍ; BROWN; TUTHILL, 2004), foram alguns dos critérios morfológicos estudados em espécies desta família.

Quanto à anatomia floral podemos citar os trabalhos de Okimoto (1948), sobre anatomia e histologia de inflorescência e fruto de abacaxi, Kulkarni e Pai (1982), sobre anatomia floral com referência ao nectário, Arrais (1989) sobre vascularização floral, o de Bernardello, Galetto e Juliani (1991) e Stahl et al. (2012) que estudaram a estrutura do nectário, Sajo, Prychid e Rudall (2004), que analisaram a estrutura e desenvolvimento do óvulo e Sajo, Rudall e Prychid (2004) sobre anatomia floral com referência aos nectários e posicionamento do ovário, a maioria com enfoque filogenético e taxonômico, em que o objetivo principal era descrever espécie e/ou gênero.

O grão de pólen é a unidade funcional da polinização (PACINI, 2000; PACINI; HESSE, 2004), características polínicas como tamanho, forma, ornamentação, estratificação e a presença de polenkit (HESSE, 2000), mostram uma relação entre o grão de pólen e o tipo de polinizador, como é o caso de Leguminosae (FERGUSON; SKVARLA, 1982) e Orchidaceae (LUMAGA; COZZOLINO; KOCYAN, 2006). A morfologia polínica de Bromeliaceae, estudada por diversos autores, apresenta uma diversidade de formas e tamanhos, com a presença de grãos de pólen sulcados, biporados ou poliporados e inaperturados (EHLER; SCHILL, 1973; ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974; WANDERLEY; MELHEM, 1991; HALBRITTER, 1992; SOUSA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 1997; FORZZA; WANDERLEY, 1998; HALBRITTER; TILL, 1998; LEME, 1998; TARDIVO; RODRIGUES, 1998; SOUZA; MENDONÇA; GONÇALVES-ESTEVES, 2004; MOREIRA; CRUZ-BARROS; WANDERLEY, 2005; MOREIRA, 2007). No entanto, características morfológicas específicas relacionadas com o polinizador são raras e difíceis de demonstrar (HESSE, 2000).

Uma das características do grão de pólen é a sua parede (VIZCAY-BARRENA; WILSON, 2006). O conhecimento das diferentes camadas que compõem a parede do grão de pólen é muito importante, já que estas possuem a função de proteção contra a dessecação, ataque bacteriano e fúngico e, também, por alojarem nas câmaras da columela substâncias químicas que determinam os sistemas de autoincompatibilidade (BEDINGER, 1992).

A parede do grão de pólen é resistente, composta por duas camadas, a exina e intina. A exina, composta por esporopolenina é a camada mais externa, a primeira a ser formada, é estratificada em sexina, camada ornamentada mais externa, e nexina, camada interna. A sexina compreende a columela e o teto, que pode estar ausente (sexina intectada) ou parcialmente presente (sexina semitectada). A nexina é composta pela endonexina e “foot layer”, que sustentam a columela e o teto (HESSE; HALBRITTER; ZETTER, 2009; VIZCAY-BARRENA; WILSON, 2006). A intina é a camada mais interna do grão de pólen, depositada após a formação da exina, composta por microfibrilas de celulose, pectinas, hemicelulose e polissacarídeos (OWEN; MAKAROFF, 1995).

A viabilidade germinativa dos grãos de pólen é considerada uma medida de fertilidade masculina que permite a fecundação e torna possível o cruzamento entre espécies de potencial econômico que apresentam floração em épocas distintas (OLIVEIRA; MAUÉS; KALUME, 2001), pode ser estimada por métodos colorimétricos e germinação *in vitro* (MUNHOZ et al, 2008).

Segundo Frankie et al. (1983), atributos morfológicos e anatômicos da flor estão diretamente relacionados ao processo de polinização, podendo facilitar ou dificultar a ação dos visitantes seja pela associação entre o tamanho corporal dos animais e as dimensões florais, ou pela localização dos recursos na flor, sendo que quando essas características convergem, podem resultar no sucesso reprodutivo.

Aliados aos estudos de caracterização morfoanatômica, aspectos da biologia floral relacionados ao processo de polinização, tais como variações morfológicas da flor, horário da antese, viabilidade e germinação de grão de pólen e receptividade do estigma, auxiliam na compreensão do processo reprodutivo permitindo a aplicação de práticas de manejo e melhoramento mais apropriadas (PARTON et al., 2002; VERVAEKE et al., 2003; LENZI; MATOS; ORTH, 2006; RIBEIRO, 2006; SILVA et al., 2006; SCROK; VARASSIN, 2011).

A receptividade dos estigmas é um fator fundamental para se determinar o melhor período de deposição do pólen na flor. Normalmente, o estigma receptivo produz

substâncias viscosas que facilitam a aderência do pólen, garantindo, provavelmente, a fertilização com a formação de frutos e sementes (MAUÉS; COUTURIER, 2002).

Aspectos da biologia floral relacionados ao processo de polinização e fertilização, que garantem o sucesso reprodutivo, foram estudados em diferentes espécies de Bromeliaceae, tais como variações morfológicas de flores da subfamília Pitcairnioideae (VARADARAJAN; BROWN, 1988; STAHL et al., 2012), horário da antese, receptividade do estigma, morfologia, viabilidade e germinação de grão de pólen (WEN; RAO, 1979; PARTON et al., 2002; VERVAEKE et al., 2003; SOARES et al., 2011) e a presença de recursos e atrativos florais relacionados aos polinizadores (BERNARDELLO; GALETTO; JULIANI, 1991).

2.2 Desenvolvimento floral

A flor é o órgão reprodutivo das angiospermas onde ocorre a reprodução sexual e também assexuada no caso da apomixia. O desenvolvimento floral é composto de diferentes fases que resultam na formação de uma flor ou de um dos verticilos, tecidos ou células componentes (FOSTER; GIFFORD JUNIOR, 1974).

O desenvolvimento floral é contínuo, mas para facilitar o estudo, Tucker (1993) dividiu o processo em três fases. Inicial ou organogenética, que corresponde à determinação da localização dos verticilos florais, número de cada tipo e coordenação de sua iniciação; Intermediário ou de formação, período em que os verticilos florais começam a expressar suas formas até estarem todos formados e final, ou de diferenciação, que corresponde à diferenciação de células e especializações.

O meristema floral da maioria das angiospermas produz quatro tipos de peças florais definidas espacialmente em verticilos específicos com desenvolvimento centrípeto na sequência: sépalas, pétalas, estames e carpelos. Os primórdios iniciam-se simultaneamente, ou sucessivamente. Caracteres expressos no início do desenvolvimento são usualmente estáveis e caracterizam níveis supragenéricos de hierarquia (subfamílias, tribos), enquanto estados de caráter que surgem tardiamente no desenvolvimento, geralmente caracterizam gêneros ou espécies (TUCKER, 1997).

Arabidopsis thaliana é a planta-modelo em estudos de desenvolvimento floral, o processo compreendido do início do surgimento do primórdio floral até a abertura do botão floral (antese), pode ser dividido em doze fases (SMYTH; BOWMAN; MEYEROWITZ, 1990). A

expressão e controle gênico da identidade dos órgãos florais são determinados pelo modelo ABC, que vem sendo amplamente estudado em plantas modelo como *Arabidopsis* e *Antirrhinum* (BOWMAN; SMYTH; MEYEROWITZ, 1991; SCHWARZ-SOMMER et al., 1992; SOLTIS et al., 2009; WOLLMANN et al., 2010).

Estudos de desenvolvimento floral ajudam a compreender o processo de diferenciação floral e podem ser utilizados para testar hipóteses filogenéticas, relações taxonômicas e determinação de genes envolvidos na ontogênese floral (TUCKER, 1992; TUCKER; DOUGLAS, 1994; TUCKER, 1997; MOÇO; MARIATH, 2009; AIZZA, 2010). A caracterização do desenvolvimento floral em Bromeliaceae é relatada somente para *Dyckia racinae* L.B.Sm. (DORNELES, 2013).

Caracteres provenientes do estudo desse processo em Bromeliaceae podem fornecer importantes dados morfológicos estruturais para a família. Além disso, o estudo do desenvolvimento das estruturas reprodutivas integra a caracterização dos processos envolvidos na reprodução. Essas informações são importantes para o melhor aproveitamento e preservação das espécies.

2.3 Reprodução sexuada

As angiospermas se caracterizam pela presença de uma estrutura reprodutora específica, a flor, local em que ocorre a reprodução sexual, que envolve o desenvolvimento dos gametófitos, a dupla fertilização e o desenvolvimento do embrião (KOLTUNOW, 1993).

As plantas com flores possuem dois tipos de gametófitos. O gametófito masculino ou grão de pólen, formado no interior dos sacos polínicos, nas anteras, a partir de células diploides, que se diferenciam em células mãe do micrósporo e se dividem por meiose, formando quatro micrósporos haploides que darão origem aos grãos de pólen. O gametófito feminino, ou saco embrionário é formado no ovário, no interior do óvulo, a partir de uma única célula fértil diploide, que se diferencia em célula mãe do megásporo e após meiose origina quatro megásporos haploides, três deles se degeneram e o restante sofre mitoses sucessivas, até formar o saco embrionário com sete células, a oosfera ou gameta feminino, duas sinérgides, localizadas na região micropilar do saco embrionário, três antípodas, localizadas no lado oposto e a célula central com dois núcleos polares (LERSTEN, 2004).

Após a liberação ou retirada dos grãos de pólen das anteras maduras, o grão de pólen é transferido e depositado na superfície estigmática do gineceu, onde germina formando o tubo polínico, por meio do qual as duas células espermáticas são transportadas até o saco embrionário onde ocorrerá a dupla fecundação. O núcleo de uma célula espermática se funde ao núcleo da oosfera, originando o zigoto, que posteriormente desenvolve-se em um embrião, enquanto o núcleo da outra célula espermática se funde aos núcleos polares da célula central, originando o endosperma triploide (CAETANO; CORTEZ, 2014). Após o processo de fecundação, uma série de eventos embriogênicos dará origem ao embrião que determina o início da fase esporofítica (DREWS; YADEGARI, 2002). Os mecanismos moleculares que regulam a gametogênese em angiospermas são pouco conhecidos (ESTRADA-LUNA et al., 2002).

2.3.1 Desenvolvimento do saco embrionário

O gametófito feminino, ou saco embrionário, se desenvolve dentro do ovário no interior do óvulo e é dividido em duas etapas, megasporogênese e megagametogênese. A megasporogênese tem início com a diferenciação da célula mãe do megásporo a partir da célula arqueosporial, localizada na camada subepidérmica do óvulo (DREWS; YADEGARI, 2002). Durante a megasporogênese, a célula mãe do megásporo diploide é envolvida por calose e após duas divisões meióticas forma quatro células haploides, os megásporos, que se dispõem alinhados no eixo calazal-micropilar. Três deles se degeneram e apenas um, localizado na porção calazal, sobrevive, sendo denominado megásporo funcional (ZANETTINI; LAUXEN, 2003).

Na megagametogênese, o megásporo funcional sofre três mitoses sucessivas, produzindo um saco embrionário constituído por três antípodas, duas sinérgides, uma célula central com dois núcleos polares e a oosfera (REISER; FISCHER, 1993). Depois de formadas, as antípodas migram para a região apical onde se encontra a calaza, por onde são transferidos todos os nutrientes necessários. Os núcleos polares atingem a região mediana enquanto as sinérgides e a oosfera são alojadas na região próxima à micrópila, por onde ocorre a penetração do tubo polínico conduzindo os núcleos reprodutivos responsáveis pela dupla fertilização. A análise do gametófito feminino é importante por ser parte integrante do ciclo de vida da planta. (DREWS; YADEGARI, 2002).

Poucos são os estudos relacionados ao desenvolvimento do óvulo em Bromeliaceae. Rao e Wee (1979) caracterizaram o desenvolvimento gametofítico e a semente de *Ananas comosus* cv. Masmerah. Sajo, Prychid e Rudall (2004) analisaram a estrutura do óvulo e megagametogênese de 10 gêneros, em um contexto filogenético. Palací, Brown e Tuthill (2004) descrevem a ontogenia do óvulo e da semente de *Catopsis* Griseb. e *Tillandsia* Linn, Conceição, De Toni e Costa (2007) o desenvolvimento do nucelo de *Dyckia pseudococcinea*, Sartori (2008) a ontogênese do óvulo de *Vrieseae carinata* WAWRA, Spat (2012) ontogênese do óvulo de *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L. B. Sm. e recentemente Fagundes e Mariath (2014) descreveram a ontogenia do óvulo de *Billbergia nutans* incluindo uma descrição tridimensional do gametófito feminino.

2.3.2 Desenvolvimento do grão de pólen

O desenvolvimento do gametófito masculino, ou grão de pólen, ocorre na antera, no interior de sacos polínicos, a partir de células arquesporais e compreende a microsporogênese e microgametogênese. O processo compreende modificações das células externas da antera, diferenciação das células do tapete (PACINI; FRANCHI, 1993) e desenvolvimento do grão de pólen a partir da célula mãe do micrósporo, mediante meiose e mitoses haploides (PACINI, 1997).

Durante a microsporogênese as células arquesporais diploides se diferenciam em células mãe do micrósporo. Essas células entram em divisão meiótica e originam quatro micrósporos haploides, que inicialmente permanecem unidos numa tétrade envolta por uma parede de calose. Durante a fase de tétrade ocorrem diferentes processos, um deles é a formação da exina, parede do grão de pólen. Ao longo do desenvolvimento a enzima calase é secretada e digere a parede de calose da tétrade, liberando os micrósporos (ZANETTINI; LAUXEN, 2003).

Na fase de microgametogênese os micrósporos aumentam de tamanho e sofrem grandes mudanças metabólicas e estruturais que afetam o núcleo e o citoplasma (TESTILLANO, 1991; TESTILLANO et al., 1993; TESTILLANO et al., 2000; BÁRÁNY et al., 2010a). O citoplasma do micrósporo se vacuolariza formando um grande vacúolo que polariza o núcleo. A célula do micrósporo sofre mitose, dividindo-se assimetricamente, dando origem a um grão de pólen bicelular formado por duas células, a célula vegetativa e a célula

generativa de diferentes tamanhos e estrutura (MCCORMICK, 2004). A divisão assimétrica é um acontecimento chave nos diferentes destinos das células (TWELL; PARK; LALANNE, 1998; PARK; TWELL, 2001). Esta primeira mitose marca o fim do desenvolvimento do micrósporo e início do desenvolvimento do pólen. O núcleo da célula vegetativa apresenta cromatina muito descondensada, típico de células transcricionalmente ativas e no citoplasma aparece um grande número de plastídios, que se enchem de amido e outras moléculas de reserva como lipídios ou polissacarídeos (LERSTEN, 2004). Assim, no pólen maduro, a célula vegetativa possui uma grande quantidade de carboidratos e/ou reservas lipídicas junto com transcritos e proteínas, necessárias para o rápido crescimento do tubo polínico (PACINI, 1996). A célula generativa apresenta núcleo com cromatina muito condensada, próprio de células com baixa atividade transcricional. Wagner et al. (1990) descrevem uma baixa densidade de poros nucleares, indicativo de baixa atividade transcricional da célula generativa, embora ocorra a expressão de genes relacionados à segunda mitose do pólen (JACOBS, 1992).

Nas etapas seguintes o grão de pólen sofre maturação e é liberado pela deiscência da antera. Na maioria das Angiospermas o grão de pólen é liberado na forma bicelular, constituídos pelas células vegetativa e generativa que apresentam uma organização nuclear diferente, relacionada com as diferentes funções que têm na reprodução sexual das angiospermas. Em outras espécies, a segunda mitose do pólen ocorre na antera dando lugar a um grão de pólen tricelular (MCCORMICK, 2004).

O desenvolvimento do grão de pólen tem despertado o interesse de muitos estudiosos pelo potencial biotecnológico visando ao melhoramento genético, através da geração de plantas haploides por embriogênese a partir dos micrósporos ou pólen, para geração de novos materiais com uso potencial em cruzamentos intraespecíficos e geração de novos híbridos (SEGUÍ-SIMARRO, 2010; GERMANÀ, 2011; DWIVEDI, et al., 2015). Esta metodologia tem sido utilizada principalmente em espécies de interesse agrônomo, sendo relatada em um número reduzido de espécies ornamentais, tais como antúrio, begônia, crisântemo, lírio, girassol, entre outras, não havendo relatos em Bromeliaceae, apesar do uso potencial na geração de híbridos (FERRIE; CASWELL, 2011). A utilização dessa técnica requer o conhecimento prévio do desenvolvimento gametofítico masculino, pois a indução de embriogênese a partir do micrósporo é alcançada em fases específicas do desenvolvimento, nos quais o micrósporo é capaz de alterar o seu desenvolvimento

gametofítico e se reprogramar para a via esporofítica. Na maioria das espécies estudadas, esta fase ocorre entre micrósporo vacuolado e pólen jovem bicelular (TOURAEV; PFOSSER; HEBERLE-BORS, 2001; SEGUÍ-SIMARRO, 2010).

Poucos trabalhos descrevem o desenvolvimento do pólen de Bromeliaceae, os trabalhos existentes, em sua maioria, têm sido utilizados na resolução de questões taxonômicas. Podemos destacar o estudo sobre a microsporogênese de *Lindmania pedunculiflora* (LAKSHMANAN, 1967) e de *Ananas comosus* (RAO; WEE, 1979), a microsporogênese e microgametogênese de *Aechmea recurvata* (SARTORI, 2008), *Tillandsia aeranthos* (Lois.) L. B. Sm (SPAT, 2012), *Dyckia pseudococcinea* (MENDES; COSTA; DE TONI, 2012) e de *Dyckia racinae* L.B.Sm. (DORNELES, 2013). Vale ressaltar ainda o trabalho de Sajo et al. (2005), que destaca características da microsporogênese e do desenvolvimento da antera de diferentes espécies de Bromeliaceae e o de Oliveira et al. (2015) que destaca a distribuição de amido durante diferentes fases do desenvolvimento do pólen de *Aechmea recurvata* (Klotzsch.) L.B.Sm., *Dyckia racinae* L.B.Sm. e *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm.

Todas as etapas do desenvolvimento gametofítico masculino são acompanhadas de diversas mudanças na atividade celular e na organização estrutural dos compartimentos celulares, que são aparentemente dependentes de uma rede de eventos de sinalização, em grande parte indefinida, envolvendo moléculas de diferentes tipos (PREUSS, 2002). Essas moléculas podem funcionar como marcadores de fases do desenvolvimento gametofítico masculino, podendo auxiliar em aplicações biotecnológicas.

2.4 Parede celular

A parede celular é um compartimento dinâmico com uma estrutura complexa que envolve as células vegetais e se localiza na parte exterior da membrana plasmática, influencia na determinação do tamanho e forma da célula, crescimento, desenvolvimento, comunicação intercelular e na interação da célula com seu entorno (KNOX, 2008).

Geralmente é composta por três partes fundamentais, parede primária, lamela média e parede secundária. A parede primária é a camada mais externa que se forma imediatamente depois da divisão celular, constituída por microfibrilas de celulose embebidas em substâncias pécticas e proteicas. A parede secundária é a camada adjacente à membrana plasmática, se forma em algumas células ao termino do crescimento celular e

começo da especialização de cada tipo de célula, composta basicamente de fibras de celulose e hemicelulose. Lamela média é uma estrutura formada principalmente de substâncias pécticas, responsável por unir as paredes primárias de células adjacentes (BÁRANY et al., 2010a).

A parede celular primária é composta fundamentalmente por polissacarídeos, enzimas e proteínas estruturais, que mudam sua composição e distribuição durante o crescimento e diferenciação celular. Os polissacarídeos são classificados em três grupos, celulose, hemicelulose e pectinas (BÁRANY et al., 2010a).

A complexidade estrutural dos polímeros de parede celular, aliada a existência de grandes famílias de genes envolvidos na síntese e modificações desses componentes, resulta em uma ampla diversidade de configurações macromoleculares de parede celular, com diferentes alterações em tipos específicos de células, durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (KNOX, 2008).

2.4.1 Pectinas

Os polissacarídeos pécticos são os componentes mais abundantes da maioria das paredes primárias das eudicotiledôneas e em menor extensão, das monocotiledôneas (WILLATS, et al., 2001a). As pectinas englobam uma família complexa e heterogênea de polissacarídeos que têm em comum a presença de ácido poligalacturônico (Ga1A) e rhamnogalacturonano (Rha) (WILLATS et al., 2001a). Diferenciam-se quatro domínios de polissacarídeos principais, homogalacturonano (HGA), rhamnogalacturonano I (RGI), rhamnogalacturonano II (RGII) e xilogalacturonano (XAG), que diferem na estrutura da molécula e na diversidade de suas cadeias laterais (WILLATS, KNOX; MIKKELSEN, 2006; PELLOUX; RUSTERUCCI; MELLEROWICZ, 2007; CAFFALL; MOHNEN, 2009).

As pectinas são sintetizadas no cis-Golgi, metilesterificadas no Golgi médio, modificadas por cadeias laterais nas cisternas do tras-Golgi e finalmente segregadas na parede celular, via exocitose (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Sua estrutura pode ser alterada de forma significativa, pela atividade de enzimas de parede celular (WILLATS; KNOX, 1999).

O homogalacturonano é o principal componente péctico, multifuncional e presente na parede celular primária de todas as plantas terrestres. É metilesterificado no Golgi e

secretado na parede das células na forma altamente esterificada, mas pode ser posteriormente desesterificado por uma pectina metilesterase, que catalisa a desmetilesterificação liberando pectinas ácidas e metanol (WILLATS et al., 2001b; BÁRÁNY et al., 2010b).

A função das pectinas não é muito clara (KNOX, 1997), a proporção de pectinas esterificadas e não esterificadas e sua distribuição na parede de células vegetais está relacionada a diferentes processos celulares que incluem a regulação da adesão célula-célula, expansão celular, propriedades mecânicas da parede celular e participação em eventos de diferenciação celular e organogênese (DOLAN; LINSTED; ROBERTS, 1997; HASEGAWA et al., 2000; RYDEN et al., 2003; BALUSKA et al., 2005; DOMOZYCH et al., 2006). Também estão envolvidas na formação da parede do grão de pólen, especialmente a primexina (HESS; FROSCHE, 1994; MAJEWSKA-SAWKA; RODRIGUEZ-GARCIA, 2006) e a intina (BEDINGER, 1992; VAN AELST; VAN WENT, 1992; GEITMANN et al. 1995; LI et al., 1995;) com acúmulo nas regiões de abertura do pólen (TAYLOR; HEPLER 1997). Em grãos de pólen, mudanças na distribuição de pectinas têm sido estudadas e descritas durante o desenvolvimento gametofítico de *Arabidopsis thaliana* (VAN AELST; VAN WENT, 1992), *Allium cepa* L. (GOLASZWESKA; BEDNARSKA, 1999), *Capsicum annuum* (pimentão) (BÁRÁNY et al., 2010a, 2010b) e *Quercus suber* (COSTA et al., 2014). No entanto, a distribuição e o papel das pectinas durante o desenvolvimento gametofítico masculino de Bromeliaceae ainda não são conhecidos.

2.4.2 Proteínas arabinogalactanas

Proteínas arabinogalactanas (AGPs) consistem uma classe de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, estruturalmente complexas e amplamente distribuídas no reino vegetal (SHOWALTER, 2001). Caracterizadas pela elevada proporção de carboidratos (90 a 98%), em que a galactose e a arabinose são os monossacarídeos predominantes e um pequeno núcleo polipeptídico (1-10%) geralmente rico em hidroxiprolina, alanina, serina e treonina (MAJEWSKA-SAWKA; NOTHNAGEL 2000; SHOWALTER, 2001).

As AGPs são encontradas em diferentes fases do desenvolvimento, células e tecidos, sendo particularmente abundantes em paredes celulares, membranas plasmáticas e secreções extracelulares (SHOWALTER, 2001). Podem ainda encontrar-se em corpos

multivesiculares intracelulares e corpos multilamelares nos vacúolos (FERGUSON et al., 1999).

As funções desempenhadas pelas AGPs não são muito claras, estudos têm demonstrado múltiplos papéis no desenvolvimento das plantas (MAJEWSKA-SAWKA; NOTHNAGEL, 2000). Estão relacionadas com o crescimento e desenvolvimento, como expansão, proliferação celular (SERPE; NOTHNAGEL, 1994; WILLATS; KNOX, 1996; CHAPMAN et al., 2000; VAN HENGEL et al., 2001; VISSENBERG et al., 2001;) e diferenciação de tecidos vegetativos e reprodutivos (CHEUNG; WANG; WU, 1995; WU; WANG; CHEUNG, 1995; SEIFERT et al., 2002; VAN HENGEL; ROBERTS, 2002;).

Representadas por uma grande família de genes numa ampla variedade de angiospermas, sua ampla distribuição tem despertado interesse por seu potencial envolvimento como marcador da identidade celular (KOHORN, 2000). No entanto, como as moléculas de AGPs funcionam ou interagem com outros componentes celulares, permanecem indeterminados, principalmente devido à complexidade de suas moléculas (COIMBRA; PEREIRA, 2012).

Estudos demonstram a relação das AGPs na reprodução sexual em diferentes espécies, como *Actinidia deliciosa* e *Amaranthus hypocondriacus* (COIMBRA; SALEMA, de 1997; COIMBRA; DUARTE, 2003), *Arabidopsis thaliana* (COIMBRA et al., 2005; 2007; 2009; PEREIRA et al., 2014) e *Brassica napus* (EL-TANTAWY et al., 2013), nesses estudos as AGPs foram diferentemente expressas durante o desenvolvimento gametofítico.

Li et al. (1992) e Jauh e Lord (1996) verificaram que AGPs se depositam nas paredes dos tubos polínicos e acredita-se que desempenhem importante papel no desenvolvimento da antera e do grão de pólen (PEREIRA et al., 2006; LEVITIN et al., 2008; COIMBRA et al., 2009; MA; SUNDARESAN, 2010; COSTA et al., 2013) .

Estudos mostram que a expressão das AGPs no desenvolvimento é regulada tanto espacialmente (diferentes órgãos, tecidos ou tipos de células estão associados a um subconjunto característico de AGPs) (CHASAN, 1994), como temporalmente (um tecido ou órgão produz diferentes AGPs em diferentes fases do desenvolvimento) (GELL et al., 1986; MAJEWSKA-SAWKA; NOTHNAGEL, 2000), tornando-se um importante marcador do desenvolvimento reprodutivo.

2.4.3 Imunolocalização de pectinas e AGPs

AGPs e pectinas podem ser localizadas em tecidos e células, por imunolocalização, através da utilização de anticorpos monoclonais, obtidos a partir de ratos e camundongos, que se ligam estruturalmente a antígenos/epitopos específicos e permitem visualizar a distribuição dos componentes moleculares e mapear características organizacionais (KNOX, 1997).

Os anticorpos monoclonais antipectinas JIM5 e JIM7, gerados após a imunização com protoplastos de cenoura, reconhecem respectivamente, um epitopo de homogalaturonano desterificado e um epitopo que contém metil homogalaturonano esterificado. Juntamente com os anticorpos anti-AGPs, JIM8, JIM13, JIM14, LM2, e MAC207, desenvolvidos inicialmente após procedimentos de imunização com um complexo extrato de plantas, que reconhecem predominantemente epitopos de hidratos de carbono, e o componente arabinogalactano, têm sido utilizados extensivamente, em estudos de imunofluorescência pela comunidade científica (KNOX, 1997; COIMBRA; PEREIRA, 2012), principalmente para a caracterização do grão de pólen (ABREU; OLIVEIRA, 2004; PEREIRA et al., 2006; COIMBRA et al., 2007; DARDELLE et al., 2010; NGUEMA-ONA et al., 2012; COSTA et al., 2013; MOLLET et al., 2013). Apesar da presença tecido-específica de epitopos de hidratos de carbono em AGP, estas investigações não permitem a caracterização de um único tipo de AGP, mas um conjunto de AGP com epitopos semelhantes (COIMBRA et al., 2009).

3 Micromorfologia floral e aspectos reprodutivos de Bromeliaceae endêmica da Mata Atlântica com potencial a sistemática e horticultura

RESUMO

Aechmea correia-araujoi E. Pereira & Moutinho, *A. gamosepala* Wittm, *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer e *V. saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez são espécies ornamentais nativas de ocorrência na Mata Atlântica brasileira, vulneráveis aos impactos antrópicos. Este estudo teve como objetivo caracterizar morfológicamente essas espécies, quanto à micromorfologia floral e avaliar aspectos reprodutivos, como estrutura floral, receptividade do estigma, morfologia, produção, viabilidade e germinação de grão de pólen *in vitro*, como mecanismos de produção comercial e preservação destas espécies. As plantas foram caracterizadas por observação do material em casa de vegetação, os órgãos florais e morfologia polínica foram descritos por técnicas microscópicas. Grãos de pólen em antese foram germinados em meio de cultura BK (BREWBAKER; KWACK, 1963), a viabilidade avaliada por coloração de Alexander (1969) e a receptividade do estigma testada ao longo do dia (pré-antese, antese, 4h, 10h e 24h após a antese). As flores de *A. correia-araujoi*, *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii*, são actinomorfas, trímeras, diclamídeas, heteroclamídeas, possuem apêndices petalares duplos, seis estames, ovário tricarpelar, gamocarpelar com nectários septais e muitos óvulos. As espécies de *Aechmea* compartilham estigma conduplicado-espiral, ovário ínfero e óvulos anátropos. Grãos de pólen de tamanho médio e grande, simetria bilateral, oblatos e biporados. Nas espécies estudadas de *Vriesea*, o estigma é do tipo lâmina convoluta, o ovário súpero e óvulos são hemianátropo com apêndice calazal. Grãos de pólen tamanho grande e muito grande, simetria bilateral, heteropolar, sulcados, *V. ensiformis* peroblato e *V. saundersii* oblato. A exina de todos os grãos de pólen apresentou-se mais espessa que a intina, reticulada e heterobrocada. As características morfológicas dessas espécies são compatíveis com a síndrome de ornitofilia e, *A. gamosepala*, melitofilia. As espécies apresentam alta capacidade reprodutiva com viabilidade polínica superior a 93% e germinação maior que 80%, o estigma apresenta-se receptivo da antese até 10h após. Os resultados fornecem dados suficientes para definir inicialmente técnicas de seleção e combinações das espécies para o desenvolvimento de híbridos voltados para o comércio de plantas ornamentais. Além disso, essas informações contribuem na elaboração de estratégias visando à preservação das espécies.

3.1 Introdução

Bromeliaceae possui distribuição neotropical com ocorrência de uma única espécie no continente africano. A família integra a ordem Poales e é composta por cerca de 3.248 espécies, distribuídas em 58 gêneros e oito subfamílias (APG III, 2009; LUTHER, 2010; GIVNISH et al., 2011). São reconhecidos três centros de diversidade para a família, leste do Brasil nos domínios da Mata Atlântica, Escudo das Guianas e os Andes (MARTINELLI et al., 2008; SMITH; DOWNS, 1977).

A Mata Atlântica brasileira destaca-se tanto pela riqueza como pelo endemismo de espécies (FORZZA et al., 2014). *Aechmea* e *Vriesea* são gêneros pertencentes à subfamília Bromelioideae e Tillandsioideae, cerca de 60% das espécies de *Aechmea* e 84% de *Vriesea* ocorrem no bioma Mata Atlântica. *Aechmea correia-araujoi* E. Pereira & Moutinho, *Aechmea gamosepala* Wittm, *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer e *Vriesea saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez são espécies ornamentais nativas da Mata Atlântica, comercializadas como plantas ornamentais.

A distribuição dessas espécies na Mata Atlântica é negativamente afetada pelos efeitos da perda de habitat e fragmentação desse ecossistema, que ocasionam entre outros fatores o aumento da vulnerabilidade ou até mesmo o risco de extinção de muitas espécies, como é o caso de *Aechmea gamosepala* (CONSEMA-RS, 2002) e *Vriesea ensiformis* (SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006).

A importância econômica ornamental e o papel ecológico das espécies nativas, bem como o risco de sua extinção no atual cenário de redução da cobertura florestal, motivam estudos com Bromeliaceae. Considerando que o Brasil possui a maior diversidade de bromélias do mundo, o estabelecimento de programas de melhoramento genético e conservação são uma eficiente estratégia para o melhor aproveitamento de espécies nativas de interesse no mercado ornamental.

Informações básicas sobre a espécie, como o conhecimento morfoanatômico dos órgãos reprodutivos e aspectos da biologia floral envolvidos no processo de polinização são fundamentais, pois auxiliam na compreensão do processo reprodutivo e permitem definir técnicas de seleção e hibridação apropriadas (ALLARD, 1971).

Segundo Frankie et al. (1983) atributos morfológicos e anatômicos da flor estão diretamente relacionados ao processo de polinização, podendo facilitar ou dificultar a ação dos visitantes seja pela associação entre o tamanho corporal dos animais e as dimensões florais, ou pela localização dos recursos na flor e quando essas características convergem, podem resultar no sucesso reprodutivo.

Considerando o número de espécies na família, a investigação morfoanatômica das flores é restrita na literatura, sendo a maioria dos trabalhos com enfoque filogenético e taxonômico, buscando auxiliar na melhor caracterização dessa família (OKIMOTO, 1948; SMITH; DOWNS, 1977; KULKARNI; PAI, 1982; BROWN; GILMARTIN, 1984; 1989; ARRAIS, 1989; BROWN; TERRY, 1992; PALACÍ; BROWN; TUTHILL, 2004; SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004; SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004; STAHL ET AL., 2012).

O grão de pólen é a unidade funcional da polinização (PACINI, 2000; PACINI; HESSE, 2004), portanto está diretamente relacionado com a reprodução e a perpetuação da espécie. Estudos referentes à morfologia, ultraestrutura e viabilidade polínica são de grande valia como subsídios aos programas de melhoramento genético (CHAGAS et al., 2010). Características polínicas como tamanho, forma, ornamentação, estratificação e a presença de polenkit (HESSE, 2000), mostram uma relação com o tipo de polinizador, como é o caso de Leguminosae (FERGUSON; SKVARLA, 1982; BASSO-ALVES; AGOSTINI; TEIXEIRA, 2011) e Orchidaceae (LUMAGA; COZZOLINO; KOCYAN, 2006).

A morfologia polínica de espécies de Bromeliaceae vem sendo investigada e apresenta uma diversidade de formas e tamanhos. Caracteres morfológicos como o tipo de abertura, estrutura e escultura da exina possuem grande importância na sua identificação (EHLER; SCHILL, 1973; ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974). O avanço e uso de microscopia eletrônica nos estudos de pólen tem permitido a análise mais detalhada de sua morfologia (HALBRITTER, 1992; SOUSA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 1997; FORZZA; WANDERLEY, 1998; HALBRITTER; TILL, 1998; TARDIVO; RODRIGUES, 1998; SOUZA; MENDONÇA; GONÇALVES-ESTEVEZ, 2004; MOREIRA; CRUZ-BARROS; WANDERLEY, 2005).

Aspectos da biologia floral relacionados ao processo de polinização, tais como variações morfológicas da flor (VARADARAJAN; BROWN, 1988), horário da antese, receptividade do estigma, viabilidade e germinação de grão de pólen (WEN; RAO, 1979; PARTON et al., 2002; VERVAEKE et al., 2003; SOARES et al., 2011), recursos e atrativos aos

visitantes florais (BERNADELLO; GALETTO; JULIANI, 1991; STAHL et al., 2012), que garantem o sucesso reprodutivo, foram estudados em diferentes espécies e gêneros de Bromeliaceae.

A viabilidade germinativa dos grãos de pólen mede a fertilidade masculina, indispensável à fecundação e torna possível cruzamentos entre espécies de potencial econômico (OLIVEIRA; MAUÉS; KALUME, 2001), a viabilidade pode ser estimada por métodos colorimétricos e germinação *in vitro* (MUNHOZ et al, 2008). A receptividade do estigma é um fator fundamental para se determinar o melhor período de deposição do pólen na flor. Normalmente, o estigma receptivo produz substâncias viscosas que facilitam a aderência do pólen, garantindo, provavelmente, a fertilização com a formação de frutos e sementes (MAUÉS; COUTURIER, 2002).

Considerando-se a escassez de estudos morfoanatômicos das flores de Bromeliaceae e o conhecimento básico dessas espécies, sobre morfologia da planta, micromorfologia da flor e aspectos da biologia reprodutiva, necessários para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético e conservação, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a morfologia e anatomia floral de *A. correia-araujoi*, *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii* e avaliar aspectos reprodutivos, como estrutura floral, receptividade do estigma, morfologia, produção, viabilidade e germinação de grão de pólen *in vitro*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

As espécies estudadas foram as bromélias ornamentais *Aechmea correia-araujoi* E. Pereira & Moutinho, *Aechmea gamosepala* Wittm, *Vriesea ensiformis* (Vell.) Beer e *Vriesea saundersii* (Carrière) E. Morren ex Mez. As plantas foram adquiridas em abril de 2011, no Horto Veigas, Sousas - SP e encontram-se cultivadas em casa de vegetação à temperatura ambiente, no Campus do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Um material testemunho de cada espécie foi depositado no Herbário ESA da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP. As espécies estudadas, com a distribuição geográfica e número de registro estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Espécies estudadas

Espécie	Distribuição geográfica ¹	Categoria de ameaça	Número de voucher
<i>A. correia-araujo</i> E. Pereira & Moutinho	Endêmica BA	Não ameaçada ⁴	ESA 121291
<i>A. gamosepala</i> Wittm	SP, PR, SC e RS	Em perigo ²	ESA 121278
<i>V. ensiformis</i> (Vell.) Beer	Endêmica PE, BA, AL, MG, ES, RJ, SP, PR, SC	Alvo de extrativismo ³	ESA 121288
<i>V. saundersii</i> (Carrière) E. Morren ex Mez	Endêmica RJ	Criticamente em perigo ⁴	ESA 121290

¹ Forzza *et al.*, 2014; ² Conserma-RS, 2002; ³ Siqueira Filho; Leme, 2006; ⁴ Martinelli *et al.*, 2008.

3.2.2 Caracterização da planta

A análise morfológica da planta e inflorescência foi realizada por observações do material em casa de vegetação. Pelo menos dez plantas adultas de cada espécie foram caracterizadas quanto à altura da planta florida, comprimento da folha ('D'), número de folhas, comprimento e forma do escapo floral, e comprimento da inflorescência. As medidas foram obtidas com fita métrica e paquímetro, calculando-se média e desvio padrão.

3.2.3 Morfoanatomia da flor e aspectos da biologia floral

A floração foi induzida com Ethrel (240 g L⁻¹ de etileno) na concentração de 200 ppm e após florescimento, no mínimo dez flores por espécie, em pré-antese e antese foram coletadas, dissecadas com auxílio de estereomicroscópio (Leica EZ4D, Alemanha), fixadas em solução modificada de Karnovsky (1965) (glutaraldeído 2 %, paraformaldeído 2 %, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2) por 48 horas, desidratadas em série etílica (35-70%) e armazenadas sob refrigeração (4-8°C) até serem processadas para microscopia de luz (subitem 3.2.7.1), para estudos anatômico e microscopia eletrônica de varredura (subitem 3.2.7.2). O estudo anatômico foi realizado apenas em *A. correia-araujo* e *A. gamosepala*.

A análise morfológica da flor foi feita em material fresco, com auxílio de estereomicroscópio. Medidas morfométricas da flor, cálice, corola, androceu e gineceu foram obtidas de dez flores em antese, de diferentes indivíduos. As medidas foram realizadas utilizando-se paquímetro ou obtidas de fotomicrografias das partes florais obtidas em estereomicroscópio e medidas posteriormente com o software Image J®. Calculou-se

média e desvio padrão das medidas. A análise da superfície da flor e dos botões florais foi feita em microscópio eletrônico de varredura. As estruturas florais foram descritas de acordo com Brown e Gilmartin (1989), Brown e Terry (1992) e Sajo, Rudall e Prychid (2004).

Além disso, aspectos da biologia floral, como durabilidade da inflorescência, número de flores por inflorescência, horário e duração da antese foram analisados em flores na casa de vegetação, durante o período de florescimento de cada espécie.

3.2.4 Receptividade do estigma

A receptividade do estigma das espécies de *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii* foi testada em diferentes períodos do dia, pré-antese (botão - 18:00 h), antese (flor aberta - 8:00 h), quatro horas após antese (12:00 h), 10 horas após antese (18:00 h) e 24 h pós-antese (8:00 h). Pistilos de três flores de diferentes plantas foram coletados em casa de vegetação, levados imediatamente ao laboratório e mergulhados em solução de α -naftil acetato em tampão fosfato, acetona e fast blue B salt, por cerca de três minutos (PEARSE, 1972; DAFNI, 1992). Posteriormente, foram lavados em água destilada e a atividade esterásica foi observada através de coloração marrom escura na superfície estigmática e/ou papilas, em microscópio estereomicroscópio (Leica, EZ4D, Alemanha) com câmera digital acoplada. A receptividade do estigma foi estimada conferindo graus, conforme adaptação de Dafni e Maués (1998): (-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte.

3.2.5 Morfologia dos grãos de pólen

Grãos de pólen de *Aechmea correia-araujo*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *Vriesea saundersii* proveniente de flores em antese foram coletados nas primeiras horas da manhã, fixados e processados para análise morfológica em microscopia eletrônica de varredura e análise ultraestrutural da exina em microscopia eletrônica de transmissão (item 3.2.7).

As medidas dos grãos de pólen foram realizadas por acetólise lática fraca (ACLAC 40) conforme metodologia de Raynal e Raynal (1971). Após a acetólise, os grãos foram montados em lâminas histológicas, cobertos com lamínula, observados e fotografados ao microscópio de luz (Carl Zeiss, Axiovert 35, Alemanha). Posteriormente foram medidos

aleatoriamente o diâmetro polar e diâmetro equatorial (μm) de 25 grãos de pólen, com software Image J®. Os grãos de pólen foram caracterizados conforme a nomenclatura empregada por Punt et al. (2007) e Hesse, Halbritter e Zetter (2009).

A exina foi caracterizada por observações de fotomicrografias obtidas em microscopia eletrônica de transmissão. Medidas morfométricas foram obtidas aleatoriamente de 10 grãos de pólen das camadas da intina, nexina, columela e teto, medidas com o software Image J®.

A estimativa da produção de grãos de pólen foi realizada por meio de contagem do número de grãos de pólen produzido por flor. Foram utilizadas três flores de diferentes indivíduos, as anteras de cada flor foram armazenadas em tubos eppendorf e processadas seguindo a metodologia descrita por Albuquerque Jr. et al. (2010).

3.2.6 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* do grão de pólen

A viabilidade dos grãos de pólen foi estimada com solução de Alexander (1969), com 0,02 ml de ácido acético, para grãos da espécie *V. ensiformis* e 0,01 ml ácido acético para as outras espécies, e por germinação *in vitro* de grão de pólen em meio de cultura Brewbaker e Kwack (1963) (BK) contendo 0,03% de nitrato de cálcio tetrahidratado, 0,01% de nitrato de potássio, 0,01% de ácido bórico, 0,02% de sulfato de magnésio, suplementado com 10% de sacarose, solidificado com 0,5% de ágar e pH ajustado para 6,5 antes da autoclavagem.

Anteras provenientes de três flores coletadas no início da antese e ao meio dia, foram seccionadas e os grãos de pólen cuidadosamente extraídos, montados sobre uma lâmina, imersos em uma gota de corante, coberto com lamínula e observados ao microscópio de luz (Leica, LMD 7000, Alemanha). O percentual de viabilidade foi estimado a partir da proporção entre grãos de pólen viáveis, com coloração vermelha intensa, e inviáveis, com coloração verde. Foram avaliadas três lâminas, 100 grãos de pólen por lâmina de cada espécie, totalizando 300 grãos.

Para o teste de germinação *in vitro* anteras em antese, das quatro espécies foram coletadas e com auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram distribuídos em placas de Petri contendo 35 mL do meio de cultura BK. As placas foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro até o momento de avaliação da porcentagem de germinação 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24hs após a inoculação das anteras no meio

de cultura. As placas foram observadas e fotografadas em estereomicroscópio (Leica, EZ4D, Alemanha) com câmera digital acoplada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições por tratamento, que consistiram de duas anteras por placa, provenientes de diferentes flores. A porcentagem de germinação foi determinada a partir da contagem do número de grãos de pólen germinados e não germinados de quatro quadrantes por placa, totalizando 8 campos de visão. Os grãos de pólen foram considerados germinados quando o comprimento do tubo polínico era igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

Os dados de percentual de viabilidade e porcentagem de germinação foram transformados para arc sen ($\text{raiz } x/100$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa estatístico Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2010).

3.2.7 Micromorfologia

3.2.7.1 Microscopia de luz

As amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (glutaraldeído 2 %, paraformaldeído 2 %, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2), por 48 horas, desidratadas em série etílica crescente (35, 50, 60 e 70, 85, 95% uma vez e 100% três vezes de 30 min), complementada com propanol (100%) e butanol (100%), duas trocas de 2 h (modificado por ALMEIDA et al., 2006). Infiltradas lentamente em butanol mais meio de infiltração (3:1, 1:1, 1:3 e meio de infiltração puro por ao menos uma semana em cada etapa) e emblocadas em historesina, seguindo as instruções do fabricante (hidroxietilmetacrilato, Leica Heldelberg). A polimerização foi realizada à temperatura ambiente por 48 horas. Os cortes histológicos seriados (4-5 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo (Leica, RM2155, Alemanha), dispostos em água e coletados em lâminas histológicas, secos em placa aquecedora a 40°C e corados com fucsina básica (1 % p/v), seguido de azul de toluidina (0,05 % p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em microscópio de luz (Carl Zeiss, Axioskop 40, Alemanha).

3.2.7.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram coletadas e fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (subitem 3.2.4.1) por 48 horas, desidratadas em soluções crescentes de etanol (40-100 %), secas ao ponto crítico (CPD 300 Baltec) através de CO₂ líquido, preparadas em suportes metálicos (stubs), metalizadas com ouro por 180 segundos e analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (Carl Zeiss, Alemanha).

3.2.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Os grãos de pólen foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada (subitem 4.6.1), por 24 horas. Posteriormente, foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio (1 %) no mesmo tampão, lavagens em solução salina (0,9% de cloreto de sódio) e pré-coloração em acetato de uranila (2,5 %), overnight. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (25-100 %), infiltradas lentamente em resina Spurr nas proporções 1:3 por 4 h, 1:1 por 4 h, 2:1 overnight e resina pura por 8 h. As amostras foram emblocadas em Spurr, por 48 horas, a 70 °C. Cortes semi-finos e ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (Sorval MT1-Porter-Blum). As secções ultrafinas obtidas foram depositadas sobre grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila (2,5 %) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As secções foram analisadas e imagens obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, JEM 1400 (Carl Zeis, Japão)).

3.3 Resultados

3.3.1 Potencial ornamental

As espécies florescem na natureza entre os meses de outubro a março (LEME; COSTA, 1998; SIQUEIRA FILHO; LEME, 2006). *A. gamosepala* floresceu após 45 dias e as demais espécies entre 50 e 60 dias após a indução floral em casa de vegetação.

As plantas de *A. correia-araujoii*, *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii* apresentam porte de pequeno a médio (Tabela 3.2). As folhas possuem distribuição rosulada, em número variado. As folhas de *A. correia-araujoii* são verdes, variegadas, com faixas irregulares de coloração purpúreo escuras, margem densamente espinhosa com poucas escamas em ambas as faces (Figura 3.1A). A inflorescência composta apresenta escapo verde, flores pequenas, de coloração amarela e longas brácteas escapais vermelhas (Figura 3.1B).

A. gamosepala apresenta folhas verdes, pequenos espinhos ao redor do ápice da folha (Figura 3.1C). Possui inflorescência simples do tipo espiga, com escapo verde, pouco decumbente, densamente florido, com flores de coloração lilás e rosa, número médio de 123 flores por inflorescência ($n=12$) (Figura 3.1D). As inflorescências das *Aechmea* duram em média 30 dias.

As espécies de *Vriesea* exibem inflorescências maiores ($22,18\pm2,30$ e $22,53\pm9,73$ cm) do que as de *Aechmea* ($11,60\pm3,31$ e $17,10\pm1,77$ cm) que duram em média 60 dias (Tabela 3.2). *V. ensiformis* possui inflorescência simples do tipo dística, escapo ereto com amplas brácteas escapais e florais vermelhas que envolvem quase que completamente as flores (Figura 3.1F). A coloração vermelha intensa de sua inflorescência contrasta com as flores amarelas e folhas verdes (Figura 3.1E).

V. saundersii apresenta folhas variegadas de coloração cinza levemente esverdeada, coriáceas, densamente providas de máculas vináceas na superfície (Figura 3.1G). Inflorescência composta, escapo vermelho amarronzado com brácteas dispostas espiraladamente, flores grandes, espaçadas, de coloração amarela (Figura 3.1H).

Tabela 3.2 - Caracteres morfológicos de plantas de *Aechmea correia-araujoi*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *Vriesea saundersii*.

Espécies	Planta florida ¹		Folha		Num	Escapo		Inflorescência
	Altura (cm)	Diâm. (cm)	Com. (cm)	Larg. (cm)		Com. (cm)	Forma	Com. (cm)
<i>A. correia-araujoi</i>	27,80 ±2,59	33,10 ±2,66	23,74 ±2,69	3,24 ±0,18	9-18	15,20±5,72	Ereto/Pouco Decumbente	11,60 ±3,31
<i>A. gamosepala</i>	41,10 ±8,60	50,25 ±6,99	44,24 ±7,02	3,57 ±0,26	18-23	41,15±3,42	Pouco Decumbente	17,10 ±1,77
<i>V. ensiformis</i>	22,44 ±3,66	54,55 ±8,15	43,33 ±3,81	3,57 ±0,39	19-33	21,90±5,61	Ereto	22,18 ±2,30
<i>V. saundersii</i>	17,29 ±8,88	44,90 ±14,48	32,44 ±10,52	3,69 ±0,65	8-36	22,73±4,52	Pouco Decumbente	22,53 ±9,73

Valor médio seguido de desvio padrão. n=10. ¹ Altura e diâmetro da roseta.

Figura 3.1 – A-B: *Aechmea correia-araujoii*; C-D: *Aechmea gamosepala*; E-F: *Vriesea ensiformis*; G-H: *Vriesea saundersii*; A: Inflorescência composta, com flores amarelas e longas brácteas escapais vermelhas, folhas verdes com faixas irregulares purpúreo escura e margem densamente espinhosa (seta); B: Inflorescência com flores amarelas com bracteas florais pequenas e bráctea escapal vermelha. C: Folha verde com pequenos espinhos ao redor do ápice. D: Inflorescência simples do tipo espiga com flores lilás e rosa com bráctea floral diminuta (seta branca) e presença de néctar no ápice da corola da flor fechada (seta preta). E: Roseta com folhas verdes de margem lisa. F: Inflorescência simples do tipo dística com brácteas florais vermelhas envolvendo quase que completamente as flores amarelas. G: Folhas verdes de margem lisa com máculas vinoso purpúreas na superfície. H: Inflorescência composta com brácteas escapal (seta) e flores amarelas.

3.3.2 Morfoanatomia e biologia floral

As flores de *A. correia-araujoi*, *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii* são vistosas, monoclinas, cíclicas, actinomorfas e diclamídeas, possuem pétalas e sépalas em número de três. Os aspectos morfológicos da flor e horário da antese são apresentados na tabela 3.3.

3.3.2.1 *Aechmea correia-araujoi*

Morfologia da flor. *Aechmea correia-araujoi* apresenta flores de coloração amarela, $23,50 \pm 1,18$ mm de compr., em média 44 flores ($n=8$) por inflorescência, com durabilidade média de 30 dias. Possuem sépalas de coloração verde-amarelada, pétalas amarelas no ápice, clareando em direção à base, mais curtas do que as sépalas, fracamente recurvadas e providas de dois apêndices basais com ornamentação sobreposta e ápice dentado (Figura 3.2A-B). O androceu é constituído por seis estames de mesmo tamanho, sendo os filetes antessépalos livres e antipétalos adnatos às pétalas, curtos e inclusos, com $11,49 \pm 0,50$ mm de compr. (Figura 3.2A). As anteras são bitecas, tetraesporangiadas, dorsifixas com deiscência rimosa (Figura 3.2C). O gineceu é gamocarpelar, tricarpelar e trilocular (Figura 3.2D), possui um único pistilo, sendo o estigma do tipo conduplicado-espiral com papilas curtas (Figura 3.2F-G), se localiza na altura das anteras, insertos (Figura 3.2A). É suspenso por um estilete terminal curto, com tamanho médio de $12,61 \pm 1,15$ mm de compr. O ovário é ínfero, cilíndrico, $5,50 \pm 0,43$ mm de compr., $3,22 \pm 0,19$ de diâm. com placentação axial (Figuras 3.2E). Óvulos do tipo anátropo, com apêndice calazal ausente (Figuras 3.2H). Apresenta nectário septal, interocular, ao longo de um quarto a um quinto da base do ovário, formando um ducto central tripartido labiríntico (Figura 3.2D).

A antese é diurna iniciando-se ao redor de 7h e as flores começam a murchar no final da tarde. As flores se caracterizam pelo lento afastamento das bordas da corola, permitindo acesso ao pólen e ao néctar. Há acúmulo de pequenas quantidades de néctar na base da corola.

Figura 3.2 – Aspectos morfológicos da flor de *Aechmea correia-araujo*; A: Flor mostrando sépalos (s), pétalas (p), estame (e) e gineceu (g); B: Pétala com apêndices basais (ap); C: Anteras na posição adaxial (ad) e abaxial (ab), evidenciando a inserção dorsifixa no filete (f). D: Corte transversal do ovário evidenciando o nectário septal interloocular (ne) e lóculos (lo); E: Corte longitudinal do ovário (ov), evidenciando ovário infero; F: Estigma (es) conduplicado-espiral com papilas (pa); G: detalhe das papilas; H: Óvulos (o) evidenciando a micrópila (mi), calaza (ca) e funículo (fu). Barras: B-E: 1 mm; F: 100 µm; G: 200 µm.

Anatomia da flor. As sépalas, em secção transversal, possuem epiderme uniestratificada com células alongadas, de parede espessa em ambas as faces, revestidas por cutícula na face abaxial. Estômatos ocorrem na face abaxial e escamas na face adaxial. O mesofilo é homogêneo, composto por parênquima clorofiliano, idioblastos contendo ráfides e feixes vasculares (Figura 3.3A). A pétala de *A. correia-araujo*, em secção transversal, apresenta epiderme unisseriada em ambas as faces, com células retangulares de parede fina e

celulósica, a ocorrência de estômatos não foi observada. O mesofilo é formado por parênquima clorofiliano com diversos idioblastos contendo ráfides e feixes vasculares de pequeno calibre em número variado (Figura 3.3B).

O androceu possui filete constituído de epiderme, mesofilo parenquimático e um feixe vascular central concêntrico (Figura 3.3B). A parede da antera madura é formada por epiderme e endotécio. A epiderme apresenta células arredondadas e de paredes finas, que são maiores na região do estômio. O endotécio apresenta células alongadas e espessadas (Figura 3.3C). O estigma apresenta células epidérmicas papilosas e estilete oco (Figura 3.6E). O ovário é formado por epiderme, mesofilo parenquimático e feixes vasculares, idioblastos com ráfides ocorrem em todo carpelo (Figura 3.3D-F). A epiderme externa apresenta células de parede espessa revestida por cutícula, ocorrem escamas e estômatos, a epiderme interna apresenta células alongadas de parede espessa (Figura 3.3F). A região central do ovário apresenta nectário interocular composto por três septos nectaríferos (Figura 3.3D), apresenta células secretoras alongadas de citoplasma denso com muitos feixes vasculares adjacentes (Figura 3.3G). O óvulo é anátropo, com tegumento externo e interno envolto por duas a três camadas de células, com presença de obturador na região da placenta (Figura 3.3H).

Figura 3.3 - Aspectos anatômicos da flor de *Aechmea correia-araujo*; A: Secção transversal (ST) da sépala, com estômato (seta) na epiderme abaxial (eab) e escama (esc) na epiderme adaxial (ead), parênquima clorofiliano (pc) com idioblastos (id); B: Flor em ST mostrando pétala e antera (an) com grãos de pólen (gp) e feixe vascular (fv); C: Antera em ST na região do estômio (es) com presença de ráfides (ra), antera com epiderme (ep) papilosa e endotécio (en); D: ST do ovário evidenciando septos nectaríferos (sn), óvulos (ov) e feixes vasculares (fv); E: Secção longitudinal (SL) da flor mostrando o estigma (est) oco com papilas (pa); antera (na) e ráfides (ra) na pétala; F: ST do ovário mostrando epiderme interna (epi) e externa (epe) com escama (seta); G: ST do ovário, mostrando septos nectaríferos (sn); H: Óvulo em SL com tegumento (te) e obturador placentário (seta). Barras: A, B, D = 2 mm; C = 0,5 mm; E, H = 5 mm; F, G = 1 mm.

3.3.2.2 *Aechmea gamosepala*

Morfologia da flor. As flores apresentam coloração lilás e rosa, com número médio de 123 ($n=12$) por planta, de $13,80 \pm 1,23$ mm de compr. (Figura 3.4A), distribuídas em inflorescência que dura em média 30 dias, em condições de casa de vegetação. O cálice de *A. gamosepala* como o próprio nome diz é gamossépalo, com sépalas de coloração rosa, $9,18 \pm 0,75$ mm de compr. e $2,09 \pm 0,34$ mm de larg., formando um tubo subcilíndrico com ápice mucronado espinoso marrom (Figura 3.4A). A corola é dialipétala com pétalas lilás curtas, com $9,69 \pm 0,66$ mm de compr. e $3,82 \pm 0,25$ mm de larg., apresentam ápice largo e arredondado (Figura 3.4A), providas de dois apêndices petalares na base da face adaxial, longos com franja, com $4,99 \pm 0,15$ mm de compr. e $1,62 \pm 0,08$ mm de larg. (Figuras 3.4B).

O androceu é constituído por seis estames, livres, homodínamo, incluso, com filetes antissépalos livres e antipétalos adnatos, as pétalas com comprimento médio de $6,41 \pm 0,27$ mm (Figura 3.4A). As anteras são bitecas, tetraesporangiadas, livres, com $3,48 \pm 0,22$ mm de compr., dorsifixa e deiscência rimosa (Figura 3.4C). O gineceu é gamocarpelar, tricarpelar e trilocular (Figura 3.4D). O estigma é do tipo conduplicado-espiral com papilas curtas (Figuras 3.4E-F), se localiza na altura das anteras, inserido na corola (Figura 3.4A). É suspenso por um estilete terminal curto, com tamanho médio de $8,30 \pm 0,24$ mm. O ovário é ínfero, placentação axial, $3,97 \pm 0,33$ mm de compr. por $2,91 \pm 0,37$ mm de diâm., com grande número de óvulos por lóculo (Figura 3.4G). Os óvulos são anátropos, apresentam micrópila visível e região calazal ausente de apêndices (Figura 3.4H). Apresenta nectário septal, interocular, ao longo de um quarto a um quinto da base do ovário formando um ducto central tripartido labiríntico (Figuras 3.4D).

A antese tem duração de um dia, inicia ao redor de 6h e 30min pelo lento afastamento das bordas da corola e começam a murchar por volta das 17h e 30min. Durante a manhã, foi observado o acúmulo de pequenas quantidades de néctar na ponta da corola de flores fechadas (Figura 3.1D). A espécie apresenta cheiro levemente adocicado.

Figura 3.4 - Aspectos morfológicos da flor de *Aechmea gamosepala*; A: Flor mostrando sépalas (s), pétalas (p), estigma (es) e antera (an); B: Pétala com apêndices (ap) basais; C: Anteras na posição adaxial (ad) e abaxial (ab), evidenciando a inserção dorsifixa no filete (f); D: Corte transversal do ovário evidenciando nectários (ne) septais interlocares e os lóculos (lo); E: Estigma conduplicado-espiral; F: Detalhe das papilas curtas do estigma; G: Corte longitudinal evidenciando o ovário (ov) ínfero e apêndices petalares (ap); H: Óvulos (o) evidenciando a micrópila (mi). Barras: A, B, G = 2 mm; C-E = 1 mm; F = 100 μ m; H: =200 μ m.

Anatomia da flor. A sépala de *A. gamosepala*, em secção transversal, apresenta epiderme uniestratificada em ambas as faces, com células alongadas de parede espessa, revestida por cutícula na face abaxial (Figura 3.5A). Estômato e escamas ocorrem na face abaxial. O mesofilo é pluriestratificado formado por parênquima clorofiliano, com idioblastos contendo

ráfides de oxalato de cálcio distribuídas ao longo da sépala. Apresentam número variável de feixes vasculares com fibras na bainha do feixe (Figura 3.5A).

As pétalas apresentam epiderme uniestratificada em ambas às faces com células retangulares e parede espessa. Mesofilo composto por parênquima clorofiliano, diversos idioblastos contendo ráfides e número variado de feixes vasculares (Figura 3.5B).

O androceu é composto por seis estames possui filete constituído de epiderme com células de parede espessa, córtex parenquimático e um feixe vascular concêntrico, idioblastos contendo ráfides ocorre em todo androceu (Figura 3.5B). A antera jovem é tetraesporangiada, formada por epiderme, endotécio, camada média e tapete em fase de degeneração (Figura 3.5B). A antera madura é formada por epiderme papilosa de paredes finas, com células maiores na região do estômio e endotécio com parede espessada (Figura 3.5D). A vascularização da antera é feita por um único feixe vascular (Figura 3.5B).

O estigma apresenta células epidérmicas papilosas e estilete oco (Figura 3.5G). O ovário é gamocarpelar, trilocular, formado por epiderme uniestratificada (Figura 3.5C e E), com células revestidas por cutícula, com ocorrência de escamas, tricomas e estômatos na epiderme externa (Figura 3.5E). Parênquima clorofiliano com diversos feixes vasculares e presença de idioblastos contendo ráfides, que ocorrem em todas as regiões do carpelo. A região central do ovário apresenta nectário interocular formado por três ramificações septais que se estendem até a base das pétalas (Figura 3.5C), apresenta células secretoras alongadas de citoplasma denso com muitos feixes vasculares adjacentes (Figura 3.5F). O óvulo é anátropo, com tegumento externo e interno envolto por duas a três camadas de células, apresenta obturador na região placentária (Figura 3.5H).

Figura 3.5 - Aspectos anatômicos da flor de *Aechmea gamosepala*; A: Secção transversal (ST) da sépala com estômato (seta) na epiderme abaxial (eab) e idioblasto (id) no parênquima clorofiliano (pc); B: ST da flor mostrando a pétala com idioblastos (id), filete (fi) e antera (an) composto por epiderme (ep), endotécio (en), camada média (cm) e tapete (ta); C: ST do ovário evidenciando os septos nectaríferos (sn), óvulos (ov) e feixes vasculares (fv); D: Antera em ST na região do estômio (es); E: ST do ovário evidenciando epiderme externa (epe) e epiderme interna (epi); F: SL do ovário com septos nectaríferos (sn); G: Secção longitudinal (SL) da flor mostrando o estigma (est) oco com papilas (pa); H: Óvulo (ov) em ST com obturador placentário (seta). en: endotécio; ep: epiderme; gp: grão de pólen; ra: ráfide; se: saco embrionário; te: tegumento; Barras: A, B, H = 1 mm; C, F = 5 mm; D, E = 0,5 mm; G = 2 mm.

3.3.2.3 *Vriesea ensiformis*

Morfologia da flor. *Vriesea ensiformis* apresentam flores amarelas, com $62,50 \pm 3,87$ mm de compr. (incluindo os estames), pedicelo esverdeado (Figura 3.6B), número médio de 14 flores por inflorescência ($n=10$), com durabilidade média de 60 dias, em condições de casa de vegetação. Possuem brácteas florais vermelhas, ovadas a largamente elípticas, obtusas, envolvendo quase completamente a flor (Figura 3.6A). A sépala é vermelha clara na base e amarelo em direção ao ápice, livres, estreitamente obovada, $39,60 \pm 2,76$ mm de compr. e $10,90 \pm 1,29$ mm de larg. (Figura 3.6B). A corola é tubular, com exceção do ápice subereto-recurvado na antese (Figura 3.6A), as pétalas amarelas, livres, $50,20 \pm 2,04$ mm de compr. e $10,00 \pm 0,67$ mm de larg., providas de dois apêndices basais, obovados, arredondados, inteiros, de $9,20 \pm 1,25$ mm de compr. e $3,51 \pm 0,69$ mm de larg. (Figuras 3.6B-C).

O androceu é livre, constituído por seis estames, homodínamos, esertos, com filetes livres, longos, $48,90 \pm 2,60$ mm de compr., menores que o estilete (Figura 3.6A). Apresentam anteras livres, $7,05 \pm 0,21$ mm de compr., dorsifixa, com deiscência rimosa (Figura 3.6D). O gineceu é gamocarpelar, tricarpelar e trilocular (Figura 3.6E). Possui um único pistilo, sendo o estigma do tipo lâmina-convoluta, verde-escuro, densamente papiloso, $2,59 \pm 0,26$ mm de compr. (Figura 3.6F-G). É suspenso por um estilete terminal longo com $55,80 \pm 4,52$ mm de compr., projeta-se acima das anteras nas flores em antese e o conjunto estilete-estigma fica exposto, acima da corola (Figura 3.6A). O ovário é súpero (Figura 3.6I), cônico, com placentação axial, $5,06 \pm 0,45$ mm de compr. e $3,09 \pm 0,39$ mm de diâm., apresenta muitos óvulos por lóculo, próximos uns aos outros. São do tipo hemianátropo com apêndice calazal acuminado curto (Figuras 3.6H-J). Possui nectário septal, labiríntico localizado na base do ovário (Figura 3.6E e I).

A antese é diurna iniciando ao redor de 6h e 30min, abrem-se abruptamente e começam a murchar por volta das 17h e 30min. Foi observado o acúmulo de pequena quantidade de néctar na base da corola.

Figura 3.6 - Aspectos morfológicos da flor de *Vriesea ensiformis*; A: Flor revestida pela bráctea floral (bf) evidenciando anteras e estigma exserto; B: Flor mostrando sépalas (s), pétalas (p), estame (e) e gineceu (g); C: Pétala com apêndices petalares (ap) basais; D: Anteras na posição adaxial (ad) e abaxial (ab), evidenciando a inserção dorsifixa no filete (f); E: Corte transversal do ovário trilocular (lo) evidenciando os nectários (ne); F: Estigma (es) do tipo lâmina convoluta; G: detalhe das longas papilas; H: Óvulos (o) evidenciando o apêndice calazal (ac) acuminado curto; I: Corte longitudinal do ovário supero (ov) com muitos óvulos evidenciando nectário (ne) septal labiríntico na base do ovário; J: Detalhe do óvulo (o) evidenciando a micrópila (mi). Barras: C, D, H = 2 mm; E, F = 1 mm; I = 100 µm; J = 200 µm.

3.3.2.4 *Vriesea saundersii*

Morfologia da flor. Flor amarela, subereta, tubular, cilíndrica, $47,07 \pm 2,04$ mm de compr., em número médio de 30 flores ($n=8$) por inflorescência. A inflorescência teve durabilidade média de 60 dias, em condições de casa de vegetação. O cálice é dialissépalo, as sépalas são amarelo-esverdeadas, elípticas com ápice arredondado, $29,87 \pm 1,96$ mm de compr. e $10,42 \pm 1,41$ mm de larg., as pétalas são amarelas, livres, $38,70 \pm 3,00$ mm de compr. e $4,95 \pm 0,89$ mm de larg., possuem ápice largamente arredondado (Figura 3.7A), com apêndices duplos basais, $8,66 \pm 0,99$ mm de compr. e $3,61 \pm 0,42$ mm de larg. que apresentam ápice irregular obtuso dentado (Figura 3.7B). As brácteas florais são ovais de cor verde-amarelada, envolvendo a flor (Figura 3.7A).

O androceu é constituído por seis estames, com filetes livres, de mesmo tamanho, inclusos, $30,17 \pm 1,97$ mm de compr. As anteras são bitecas, tetraesporangiadas, livres, $5,33 \pm 1,01$ mm de compr., basifixa, com deiscência rimosa (Figuras 3.7C). O gineceu é gamocarpelar, tricarpelar, trilocular (Figuras 3.7D). Estigma do tipo lâmina-convoluta, amarelo, densamente papiloso, $1,47 \pm 1,29$ mm de compr. e estilete terminal $30,00 \pm 3,00$ mm de compr. (Figura 3.7E-F). O ovário é súpero (Figura 3.7G), com placentação axial, $6,33 \pm 0,75$ mm de compr. e $2,57 \pm 0,27$ mm de diâm., apresenta nectário septal, labiríntico localizado na base do ovário. Óvulos hemianátropo, grande número por lóculo com apêndice calazal acuminado longo (Figuras 3.7H).

A antese é diurna iniciando às 7h e 45min, as flores abrem-se abruptamente e começam a murchar no fim da tarde.

Figura 3.7 - Aspectos morfológicos da flor de *Vriesea saundersii*; A: Flor envolta pela bráctea floral (bf) mostrando sépalos (s), pétalas (p) e estame (e); B: Pétala (p) com apêndices (ap) basais; C: Antera na posição adaxial (ad) e abaxial (ab) com inserção basal no filete (f); D: Corte transversal do ovário evidenciando os três lóculos (lo); E: Estigma (es) do tipo lâmina convoluta com papilas longas; F: Detalhe das papilas; G: Corte longitudinal do ovário súpero (ov) com óvulos (o); H: Óvulos (o) evidenciando funículo (fu), micrópila (mi) e apêndice calazal (ac) acuminado longo. Barras: B, F = 2 mm; C, D, E = 1 mm; E, G = 200 µm.

Tabela 3.3 - Aspectos morfológicos da flor e horário da antese de *Aechmea correia-araujoii*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *Vriesea saundersii*.

Atributos florais	<i>A.correia-araujoii</i>	<i>A.gamosepala</i>	<i>V.ensiformis</i>	<i>V.saundersii</i>
Flor				
Comprimento (mm)	23,50±1,18*	13,80±1,23	62,50±3,87	47,07±2,04
Coloração	Amarela	Lilás/rosa	Amarela	Amarela
Número/inflorescência	44	123	14	30
Cálice				
Comprimento (mm)	9,90±0,32	9,18±0,75	39,60±2,76	29,87±1,96
Largura (mm)	3,50±0,53	2,09±0,34	10,90±1,29	10,42±1,41
Corola				
Comprimento (mm)	15,80±1,23	9,69±0,66	50,20±2,04	38,70±3,00
Largura (mm)	3,10±0,32	3,82±0,25	10,00±0,67	4,95±0,89
Apêndice petalar				
Comprimento (mm)	2,92±0,34	4,99±0,15	9,20±1,25	8,66±0,99
Largura (mm)	1,29±0,44	1,62±0,08	3,51±0,69	3,61±0,42
Androceu				
Antera	3,20±0,18	3,48±0,22	7,05±0,21	5,33±1,01
Filete	11,49±0,50	6,41±0,27	48,90±2,60	30,17±1,97
Gineceu				
Estigma	1,59±0,20	1,53±0,17	2,49±0,26	1,47±1,29
Estilete	12,61±1,15	8,30±0,24	55,80±4,52	30,00±3,00
Ovário				
Comprimento	5,50±0,43	3,97±0,33	5,06±0,45	6,33±0,75
Diâmetro	3,22±0,19	2,91±0,37	3,09±0,39	2,57±0,27
Horário antese	7:22	6:35	6:47	7:45

*Valor médio seguido de desvio padrão. n=10.

3.3.3 Morfologia polínica

Os grãos de pólen de *A. correia-araujoii*, *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii* apresentam tamanho médio a muito grande, com diâmetro médio equatorial variando entre $48,76 \pm 2,36$ e $113,27 \pm 6,38$ μm e diâmetro médio polar $36,97 \pm 1,68$ e $57,97 \pm 4,10$ μm , sendo os grãos de pólen das espécies de *Aechmea* menores do que os de *Vriesea* (Tabela

3.4). O número de grãos de pólen por antera variou de 33.750 em *A. correia-araujo* a 105.833 em *V. ensiformis* (Tabela 3.4).

As espécies de *Aechmea* apresentaram grãos de pólen de tamanho médio e grande, simetria bilateral, oblatos e biporados. *A. correia-araujo*, em visão equatorial, apresenta grão de pólen com contorno plano de um lado e nitidamente convexo do outro com poros grandes situados nas extremidades equatoriais (Figura 3.8A). *A. gamosepala* possui grão de pólen isopolar com âmbito subcircular, poros pequenos quase circulares (Figura 3.8D). A ornamentação da exina é reticulada e heterobrocada, *A. correia-araujo* possui lúmen arredondado a poligonal e *A. gamosepala* lúmens pequenos, diminutamente arredondados com muros adensados (Figura 3.8A, B, D e E).

Os grãos de pólen das espécies de *Vriesea* são de tamanho grande e muito grande, com simetria bilateral, *V. ensiformis* peroblato e *V. saundersii* oblato, heteropolar, sulcado, com contorno plano de um lado e convexo do outro, com sulco de contorno irregular tão longo quanto o diâmetro equatorial (Figura 3.8G e J). Possui ornamentação reticulada, heterobrocada, lúmens variando de arredondados a poligonais, menores em direção ao sulco, com presença de grânulos, circundados por microrretículos, muro ligeiramente curvo, estreito, duplicolumelado (Figura 3.8G, H, J e K).

Todas as espécies apresentam exina mais espessas que a intina e o tamanho médio das diferentes camadas variaram muito entre as espécies (Tabela 3.5). A sexina das espécies de *Aechmea* é semitectada, columelada delgada em *A. gamosepala* e em *A. correia-araujo* de tamanho similar a nexina. Apresentam nexina com “foot layer” contínuo e delgado, endonexina contínua, esponjosa, muito espessa em *A. correia-araujo* (Figura 3.9E-F).

As espécies de *Vriesea* apresentam sexina semitectada, columelada e polenkit com diferentes densidades no interior do lúmen das duas espécies e cobrindo a parede em *V. ensiformis* (Figura 3.9G-H). *V. saundersii* apresenta teto e columela altos, a nexina de *V. ensiformis* é delgada com “foot layer” contínuo, endonexina contínua, compacta em *V. ensiformis* e esponjosa em *V. saundersii*, que se expande na região do sulco (Figura 3.9G e H).

Tabela 3.4 - Morfometria e estimativa de número de grãos de pólen de *Aechmea correia-araujoi*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *Vriesea saundersii*.

Espécies	Vista Equatorial		Tamanho ¹	Estimativa ² (grão/flor)
	Diâmetro Polar	Diâmetro Equatorial		
<i>A. gamosepala</i>	36,97 ± 1,68	48,76 ± 2,36	Médio	93.333
<i>A. correia-araujoi</i>	38,73 ± 3,09	63,21 ± 4,46	Grande	33.750
<i>V. ensiformis</i>	38,80 ± 4,21	94,04 ± 4,18	Grande	105.833
<i>V. saundersii</i>	57,97 ± 4,10	113,27 ± 6,38	Muito grande	91.666

Média seguida de desvio padrão expresso em μm , n=25. ¹Descrição empregada por Punt et al. (2007) e Hesse, Halbritter e Zetter (2009). ²Conforme metodologia de Albuquerque Jr. et al. (2010).

Tabela 3.5 - Morfometria da esporoderme de *Aechmea correia-araujoi*, *Aechmea gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *Vriesea saundersii*.

Espécies	Intina	Nexina	Columela	Teto	Exina
<i>A. correia-araujoi</i>	0,63 ± 0,05 ¹	1,28 ± 0,16	0,39 ± 0,07	0,49 ± 0,07	2,42 ± 0,24
<i>A. gamosepala</i>	0,29 ± 0,90	0,51 ± 0,09	0,25 ± 0,05	0,27 ± 0,03	1,09 ± 0,12
<i>V. ensiformis</i>	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,21	0,39 ± 0,10	0,41 ± 0,07	1,40 ± 0,18
<i>V. saundersii</i>	0,65 ± 0,17	0,88 ± 0,16	1,54 ± 0,37	0,89 ± 0,15	3,63 ± 0,85

¹ Média seguida de desvio padrão expresso em μm , n=10.

Figura 3.8 - Grãos de pólen de *A. correia-araujoii* (A-C), *A. gamosepala* (D-F), *V. ensiformis* (G-I) e *V. saundersii* (J-L). A, D, G, J: Vista polar e equatorial ao microscópio eletrônico de varredura (MEV); B, E, H, K: Detalhe da ornamentação da exina (MEV); C, F, I, L: Acetólise. Barras: A, D, G, J = 10 µm; B, E, H, K = 2 µm; C, F, I, L = 25 µm.

Figura 3.9 - Secções transversais ao microscópio eletrônico de transmissão de grãos de pólen de *A. correa-araujoi* (A e E), *A. gamosepala* (B e F), *V. ensiformis* (C e G) e *V. saundersii* (D e H). A-D: Vista geral do grão de pólen. D. Notar o espessamento da endonexina na região do sulco (seta). E-H Detalhe da esporoderme. c: columela; en: endonexina; fl: “foot layer”; i: intina; pk: polenkite; t: tetum. Barras: A-D = 500 µm; E-H = 2 µm.

3.3.4 Viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen

No momento da antese os grãos de pólen apresentam viabilidade superior a 93% (Tabela 3.6), não sendo observada diferença significativa entre a viabilidade dos grãos de pólen coletados durante a antese e ao meio dia (dados não apresentados). O corante utilizado permitiu clara diferenciação entre pólenes viáveis e inviáveis em todas as espécies (Figura 3.10A e B).

Os resultados de germinação *in vitro* confirmam a estimativa de viabilidade obtida através do método colorimétrico. Todas as espécies apresentaram boa capacidade germinativa com porcentagem de germinação maior que 80% após 24 horas de inoculação em meio de cultura BK (Figura 3.10C e D). A germinação dos grãos de pólen *in vitro*

começou nas primeiras horas após inoculação no meio de cultura. Não houve diferença significativa na porcentagem de germinação *in vitro* ao longo do tempo para as espécies de *Aechmea*, somente para a espécie de *V. saundersii*, não sendo determinada a da espécie *V. ensiformis* devido a problemas de contaminação e disponibilidade de material (Tabela 3.6). A germinação máxima foi obtida seis horas após a inoculação para as espécies *A. correia-araujoi* (92,42%), *A. gamosepala* (98,69%) e *V. saundersii* (97,69%). Os grãos de pólen da espécie *V. saundersii* germinaram mais lentamente em comparação aos de *Aechmea*. Os resultados obtidos mostraram que todas as espécies estudadas produzem grãos de pólen com boa capacidade germinativa.

Tabela 3.6 - Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen em diferentes horários após inoculação em meio de cultura BK e viabilidade de grãos de pólen de *Aechmea correia-araujoi*, *Aechmea gamosepala* e *Vriesea saundersii* corados com solução de Alexander (1969).

Espécie	Germinação <i>in vitro</i> (horas)							Viabilidade
	1	2	4	6	8	10	24	
<i>A. correia-araujoi</i>	87,78a	89,94 ^a	86,14a	92,42a	84,70a	92,00a	89,40a	93,67
<i>A. gamosepala</i>	94,85a	95,53 ^a	97,00a	98,69a	94,71a	95,00a	96,29a	95,67
<i>V. ensiformis</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	82,44	93,20
<i>V. saundersii</i>	44,83c	82,92b	90,81ab	97,69a	97,68a	86,70ab	81,91b	94,00
CV(%)							10,52	

n.d. não determinado.

Figura 3.10 - Grãos de pólen inviáveis (verde) e viáveis (vermelho) de *Aechmea gamosepala* (A) e *Vriesea ensiformis* (B) corados com solução de Alexander (1969). Grãos de pólen de *Aechmea gamosepala* (C) e *Vriesea ensiformis* (D) germinados *in vitro* em meio de cultura BK (BREWBAKER; KWACK, 1963). Barras: A-B = 50 μ m; C-D = 0.5 mm.

3.3.5 Receptividade do estigma

Os estigmas de *A.gamosepala* e *V. ensiformis* se apresentam-se receptivos na pré-antese, enquanto a receptividade do estigma de *V.saundersii* é observada somente na antese. Todas as espécies apresentam período de maior receptividade após a abertura das flores, nas primeiras horas da manhã, com diminuição ao longo do dia (Tabela 3.7 e Figura 3.14).

Tabela 3.7 - Receptividade do estigma em três espécies de Bromeliaceae avaliada em solução de acetato de α -naftil em diferentes períodos ao longo do dia.

Espécies	Períodos avaliados			
	Pré-antese	Antese	4h após antese	10h após antese
<i>A. gamosepala</i>	+	+++	++	++
<i>V. ensiformis</i>	+	+++	++	+
<i>V. saundersii</i>	—	+++	++	+

(+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte. (Adaptado de Dafni e Maués, 1998). Solução de acetato de α -naftil, conforme Pearse (1972) e Dafni (1992); n=3.

Figura 3.11 - Receptividade do estigma de *Aechmea gamosepala* (A), *Vriesea ensiformis* (B) e *Vriesea saundersii* (C) avaliada após imersão em solução de acetato de α -naftil em pré-antese, antese, quatro horas após antese e dez horas após antese (colunas da esquerda pra a direita). Barras: A = 0,5 mm; B = 2 mm; C = 1mm.

3.4 Discussão

Características observadas nas flores das espécies de *Vriesea* estudadas como coloração amarela, brácteas vermelhas, corola tubular, antese diurna e néctar protegido pelos apêndices petalares, estão relacionados à síndrome de ornitofilia, como proposto por Faegri e Van der Pijl (1979). Para alcançar o néctar o polinizador precisa ter um longo aparelho bucal, como o encontrado em beija-flores. A polinização das espécies *V. ensiformis* e *V. saundersii* por beija-flores é relatada por Siqueira Filho e Leme (2006) na Mata Atlântica nordestina e Leme e Costa (1998) em costões rochosos do Rio de Janeiro.

A diferença espacial entre pistilo e androceu, observada em flores de *V. ensiformis* pode ser um mecanismo que dificulta, ou impede a autofecundação. Já a distribuição das anteras na mesma altura do estigma e a produção de sementes observada em cápsulas de *V.*

saundersii sugerem autogamia, particularmente pelo fato das plantas desse estudo terem sido cultivadas em casa de vegetação.

Apesar de apresentar flores pequenas e nenhum relato sobre o mecanismo de polinização, as flores de *A. correia-araujo* também compartilham características morfológicas relacionadas à síndrome de ornitofilia, flores de coloração amarela, brácteas escapais vermelhas, antese diurna, nectário septal interocular com acúmulo de néctar na base das pétalas. A ausência de sementes nas bagas observada após a maturação das flores sugere dependência de polinizador, inexistente em condições de casa de vegetação, ou algum tipo de incompatibilidade.

As flores de *A. gamosepala* são pequenas, em grande número, com corola tubulosa reduzida, de coloração lilás, antese diurna e apresentam odor levemente adocicado, características associadas à polinização por abelhas (FISCHER; ARAUJO, 1995; BENZING, 2000). Araujo, Fischer e Sazima (2004) também relatam presença de odor para *A. gamosepala* com polinização exclusiva pela abelha *Bombus morio* (Apidae), na região do estuário do Rio Verde (SP). A presença de odor em flores de Bromelioideae é considerada rara, exceto em alguns poucos casos comprovados, como em *Cryptanthus* (RAMÍREZ, 1996), *Hohenbergia ridleyi*, *Hohenbergia ramageana* (SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 1998) e *Araecoccus micranthus* (NARA, 1998).

A melitofilia também foi observada em outras espécies de *Aechmea*, com características morfológicas semelhantes a *A. gamosepala*, como *Aechmea lingulata* e *A. lindenii* (E. Morren) (SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001; LENZI; MATOS; ORTH, 2006). A maioria das espécies de bromélias está relacionada à ornitofilia (MARTINELLI, 1997; MACHADO; SEMIR, 2006), em especial aos beija-flores (CANELA; SAZIMA, 2003; PIACENTINI; VARASSIN, 2007) e estas recompensam seus visitantes florais com néctar abundante (BENZING, 2000). Apesar de pouco constatada na família Bromeliaceae, a entomofilia tem sido considerada uma estratégia de polinização intermediária (SIQUEIRA FILHO, 1998; BENZING, 2000; SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001; ARAUJO; FISCHER; SAZIMA, 2004; LENZI; MATOS; ORTH, 2006).

Outra característica que pode ser relacionada à biologia reprodutiva é a relação entre número e comprimento das flores nas bromélias estudadas, sendo predominante o padrão de flores pequenas em grande número, ou flores grandes em número reduzido. A variação em pequena escala, do número e densidade de flores, pode influenciar a visitação pelos

polinizadores e, portanto, influenciar o sucesso reprodutivo (GRINDELAND; SLETVOLD; IMS, 2005; MAKINO; OHASHI; SAKAI, 2007).

A presença de nectários septais relatada em todas as espécies estudadas, ocorre em todos os representantes de Bromeliaceae (BERNADELLO; GALETTO; JULIANI, 1991; SAJO; FURNESS; PRYCHID, 2004). Segundo Givnish et al. (2000), a ocorrência de nectários septais e corola tubular para acúmulo do néctar são algumas das adaptações à polinização por beija-flores.

Os apêndices petalares em Bromeliaceae estão situados na face adaxial das pétalas, sendo caracterizados como uma estrutura única de tecido entre o filete estaminal antipétalo e a pétala, ou como um par de estruturas entre cada estame antipétalo (BROW; TERRY, 1992). Todas as espécies estudadas no presente trabalho apresentaram apêndices petalares duplos, como descrito para outras espécies de Bromeliaceae (MARTINELLI, 1997). O estudo dos apêndices petalares tem sido abordado em estudos taxonômicos, entretanto, sua função ainda não é bem definida. Entre as funções atribuídas por diferentes autores estão a de evitar a evaporação do néctar e sua diluição pela chuva, diminuir o espaço entre os filetes e estilete ao longo do tubo floral, direcionando o aparelho bucal do visitante até o nectário, garantindo assim visitas legítimas (BROWN; GILMARTIN, 1984, 1989; EVANS; BROWN, 1989; BROWN; TERRY, 1992; LEME, 1997). Sazima e Sazima (1990) sugerem que os apêndices protegem a câmara nectarífera, podendo desencorajar a visita por abelhas. No entanto, a presença de apêndices petalares em flores de *A. gamosepala*, parece não exercer a função sugerida por estes autores, já que a espécie foi relatada como sendo melitófila.

Os resultados da anatomia floral mostram a presença de obturador na placenta de *A. correia-araujo* e *A. gamosepala*, sua ocorrência pode ter significado importante na reprodução. A presença de obturador em Bromeliaceae também foi relatada na placenta das espécies *Aechmea calyculata*, *Billbergia nutans*, *Dyckia maritima*, *Pitcairnia flammea*, *Tillandsia aeranthos* e *Vriesea carinata* (FAGUNDES; MARIATH, 2010) e outros gêneros (SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004). O obturador é um tecido secretor que ocorre próximo à micrópila e tem a função principal de guiar o crescimento do tubo polínico à micrópila, podendo ser de origem funicular, placentária ou uma saliência coberta por tricomas secretores, ou simplesmente, uma região com epiderme papilosa (BOUMAN, 1984).

Todas as espécies em estudo neste trabalho produzem uma grande quantidade de grãos de pólen por flor, suficientes para a dispersão dessas espécies e utilização em

programas de melhoramento. A morfologia polínica observada foi similar à descrita para espécies de bromélias dos gêneros *Aechmea* (SOUZA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 1997; LEME, 1998) e *Vriesea* (VERVAEKE et al., 2003).

Os grãos de pólen das espécies de *Aechmea* e *Vriesea* diferiram em termos de tamanho, forma, polaridade, tipo de abertura, arranjo da parede, espessamento das camadas da parede de pólen e presença de pollenkitt, no entanto espécies do mesmo gênero apresentaram características polínicas similares. Os resultados obtidos nesse trabalho em relação à forma e tamanho dos grãos de pólen confirmaram as características observadas em outras espécies dos mesmos gêneros (SOUZA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 1997; VERVAEKE et al., 2003). Os caracteres morfológicos dos grãos de pólen das espécies de *Vriesea* estão de acordo com o respectivo grupo de polinizador descrito na literatura, exceto a presença de pollenkitt que está associada à entomofilia (HESSE, 2000; PACINI; HESSE, 2005). A presença do pollenkitt auxilia na dispersão de grãos de pólen, como parte do sistema de reconhecimento de grãos de pólen sobre o estigma, adesão do pólen no estigma e entre si durante o transporte pelos animais, e atração de polinizadores devido à volatilização de compostos (PACINI; HESSE, 2005; LIN; GOMEZ; MEREDITH, 2013).

Para se obter êxito na polinização com posterior fecundação e fertilização, um dos fatores essenciais são a viabilidade e germinação dos grãos de pólen e a receptividade do estigma. Durante a antese o estigma das espécies em estudo se apresentaram receptivos e os grãos de pólen altamente viáveis (acima de 93%) e com alta capacidade germinativa.

A coloração dos grãos de pólen com solução de Alexander (1969) permitiu clara distinção entre grãos de pólen viáveis e não viáveis. Soares et al. (2011) relatam viabilidade com carmim acético acima de 76% em acessos silvestres de *Ananas* e Salomão (2013) 83% em *Dyckia distachya*. Entretanto, esses autores relatam que os resultados obtidos por carmim acético, na sua maioria superestimaram os resultados em relação à germinação *in vitro*. O corante de Alexander (1969), utilizado neste estudo permitiu um indicativo de viabilidade polínica mais precisa, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida que por suas propriedades químicas básica e ácida, respectivamente, coram grãos de pólen viáveis e não viáveis.

Parton et al. (2002) estudaram a viabilidade de grãos de pólen de diferentes espécies de Bromeliaceae por meio de germinação *in vitro* nos meios de cultura BK (BREWBAKER; KWACK, 1963), BKM (BK modificado com 20% de sacarose) e BM (PARTON et al., 2002). Eles

observaram que não houve diferença significativa na porcentagem de germinação entre os diferentes meios, exceto para a espécie *Tillandsia cyanea* apresentou maior porcentagem (75%) de germinação em meio BK. No entanto, esses autores obtiveram diferença significativa para o comprimento de tubo polínico com médias maiores para grãos de pólen de diferentes espécies germinados em meio de cultura BK.

Os meios de cultura citados acima e o meio de cultura SM (SOARES et al., 2008) são descritos como meios ideais para germinação de grãos de pólen *in vitro* de Bromeliaceae. Todos esses meios foram testados em ensaios preliminares para as duas espécies de *Vriesea* e *Aechmea*, e o meio BK foi o que promoveu a maior porcentagem de germinação de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico *in vitro* (dados não apresentados), mostrando-se eficiente para a estimativa de viabilidade polínica das espécies.

A caracterização morfológica e anatômica de flores das espécies de *A. correia-arauji*, *A. gamosepala*, *V. ensiformis* e *V. saundersii* relacionadas a aspectos da biologia reprodutiva, obtidas nesse trabalho, permitiram a compreensão do processo reprodutivo nessas espécies. Esses dados associados à alta viabilidade apresentada pelos grãos de pólen fornecem dados suficientes para definir técnicas de seleção e combinações para o desenvolvimento de híbridos voltados para o comércio de plantas ornamentais. Além disso, essas informações contribuem na elaboração de estratégias visando à preservação de espécies de bromélias.

4 Desenvolvimento floral, do óvulo e grão de pólen em duas espécies de *Aechmea* da Mata Atlântica

RESUMO

Aechmea gamosepala Wittm e *Aechmea correia-araujo* E. Pereira & Moutinho, bromélias ornamentais nativas, de ocorrência em regiões de Mata Atlântica, têm sido alvo de extrativismo. O desenvolvimento de estratégias para o aproveitamento de espécies nativas no mercado ornamental, através do melhoramento genético e conservação, aliado a ferramentas biotecnológicas, como a geração de plantas haploides por embriogênese a partir dos micrósporos ou pólen, com grande interesse para uso potencial em cruzamentos intraespecíficos e geração de novos híbridos, constituem-se em uma eficiente estratégia. A caracterização do desenvolvimento floral e desenvolvimento gametofítico são pré-requisitos para o melhoramento e a aplicação dessa técnica biotecnológica. O objetivo deste estudo foi analisar o desenvolvimento floral, do óvulo e grão de pólen de *A. gamosepala* e o desenvolvimento floral e do óvulo de *A. correia-araujo*, e estabelecer uma relação entre o tamanho do botão floral e as fases do desenvolvimento, visando contribuir para futuros trabalhos de melhoramento dessa e de outras espécies de bromélias. Botões florais em diferentes fases do desenvolvimento foram medidos e separados em quatro grupos de acordo com o tamanho, fixados e processados para microscopia. As análises microscópicas permitiram estabelecer uma relação entre o tamanho do botão floral e as diferentes fases do desenvolvimento. Os botões foram agrupados em: *A. gamosepala*: menores que 2,0 mm, 2,1 – 4,0 mm, 4,1 – 8,6 mm e 8,7 a 13,0 mm; *A. correia-araujo*: menores que 0,1 – 1,0 mm; 1,1 – 5,0 mm; 5,1 – 10,0 mm e 10,1 a 14,0 mm. Os meristemas florais de *A. gamosepala* e *A. correia-araujo* apresentam desenvolvimento floral centrípeto na ordem: sépala (3), pétala (3), estames antipétalos (3), estames antissépalos (3) e carpelo (1). O estigma conduplicado-espiral se diferencia na fase inicial do desenvolvimento e os apêndices petalares de *A. gamosepala* na fase final e de *A. correia-araujo* na fase intermediária. O óvulo é anátropo, de origem placentária e caráter trizonal, crassinucelado, bitegumentado, o gameta feminino tem origem monospórica, do tipo *Polygonum*. As anteras de *A. gamosepala* são bitecas, tetraesporangidas. A tétrade de andrósporo se forma por meiose sucessiva com clivagem do tipo centrífuga, originando tétrades isobilaterais. Botões florais de 8,7 a 13,0 mm são indicados no estudo de embriogênese a partir de micrósporo de *A. gamosepala*. Informações detalhadas do desenvolvimento floral, desenvolvimento do óvulo e grão de pólen disponibilizadas no presente estudo contribuem para aplicações biotecnológicas, melhoramento genético e conservação desta espécie.

4.1 Introdução

O Brasil é mundialmente conhecido pela riqueza da sua biodiversidade, em que se destacam plantas ornamentais nativas, como espécies da família Bromeliaceae. O interesse ornamental por espécies dessa família resultou em uma crescente demanda e exploração das espécies na natureza. Considerando que o Brasil possui a maior diversidade de bromélias do mundo, há um grande espaço a ser explorado, sendo, no entanto, necessária à geração de conhecimentos básicos sobre as espécies de interesse.

Espécies do gênero *Aechmea*, pertencente à subfamília Bomelioideae estão entre as mais cultivadas como plantas ornamentais. *Aechmea gamosepala* Wittm ocorre nas regiões de Mata Atlântica do Sudeste e Sul. É uma planta ornamental de hábito epífita e terrestre, a inflorescência rosa e azul dura aproximadamente 30 dias (ARAUJO; FISCHER; SAZIMA, 2004; FORZZA et al., 2014). A espécie foi considerada presumivelmente extinta, pela lista vermelha da flora de São Paulo (SMA-SP, 2002) e em perigo na lista vermelha da flora do Rio Grande do Sul (CONSEMA-RS, 2002). *Aechmea correi-araujo* E. Pereira & Moutinho é uma espécie epífita de médio porte, endêmica do Brasil, encontrada somente no estado da Bahia (FORZZA et al., 2014).

Informações sobre aspectos reprodutivos, como a formação da estrutura floral e o desenvolvimento gametofítico, permitem melhor caracterização dessas espécies, com aplicação em programas de conservação e melhoramento genético, para melhor aproveitamento no mercado ornamental, além de desencorajar o extrativismo.

A flor é o órgão reprodutivo das plantas onde ocorre a reprodução sexual e também assexuada no caso da apomixia. Além de ser o local de produção e abrigo dos gametófitos, a flor está diretamente envolvida em várias etapas do processo reprodutivo (TEIXEIRA; MARINHO; PAULINO, 2014). O estudo do seu desenvolvimento consiste em diferentes fases que resultam na formação de uma flor ou de um dos verticilos, tecidos ou células componentes (FOSTER; GIFFORD, 1974).

O desenvolvimento floral é contínuo, mas para facilitar o estudo, Tucker (1993) dividiu o processo em três fases: Inicial ou organogenética, Intermediário ou de formação e final ou de diferenciação. Estudos abordando caracteres da ontogênese floral ajudam a compreender o processo de diferenciação floral e podem ser utilizados para testar hipóteses

filogenéticas, relações taxonômicas e determinação de genes envolvidos na ontogênese floral (TUCKER, 1992; TUCKER; DOUGLAS, 1994; TUCKER, 1997; MOÇO; MARIATH, 2009; AIZZA, 2010). O estudo do desenvolvimento floral em Bromeliaceae ainda é pouco conhecido, o desenvolvimento floral é relatado somente para *Dyckia racinae* L.B.Sm. (DORNELES, 2013).

O conhecimento das fases do desenvolvimento dos gametas é pré-requisito para os trabalhos de melhoramento e conservação de espécies. O desenvolvimento dos gametófitos são etapas importantes no ciclo de vida da planta, por controlarem a reprodução. No gametófito masculino desenvolve-se o grão de pólen, responsável pela fecundação do óvulo, gerando o embrião e endosperma. Nesse processo sinais são emitidos pelas sinérgides que direcionam o tubo polínico e auxiliam na dupla fertilização (DREWS; YADEGARI, 2002).

A caracterização do desenvolvimento do grão de pólen contribui para seu uso biotecnológico no melhoramento de plantas cultivadas, como a geração de plantas haploides a partir da embriogênese de micrósporos e do pólen (SEGUÍ-SIMARRO, 2010; GERMANÀ, 2011; DWIVEDI, et al., 2015). A indução de embriogênese a partir de micrósporo é alcançada em fases específicas de seu desenvolvimento. Na maioria das espécies estudadas, esta fase ocorre entre micrósporo vacuolado e pólen jovem bicelular (TOURAEV; PFOSSER; HEBERLE-BORS, 2001; SEGUÍ-SIMARRO, 2010). Uma forma de seleção eficiente é possível quando há uma relação definida entre o tamanho do botão floral e a respectiva fase de desenvolvimento do micrósporo e grão de pólen.

Considerando o número de gêneros e espécies em Bromeliaceae, poucos são os estudos relacionados ao desenvolvimento do óvulo e grão de pólen (RAO; WEE, 1979; SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004; SAJO et al., 2005; PALACÍ; BROWN; TUTHILL, 2004; CONCEIÇÃO; DE TONI; COSTA, 2007; SARTORI, 2008; SPAT, 2012; MENDES; COSTA; DE TONI, 2012; DORNELES, 2013; FAGUNDES; MARIATH, 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Essas informações têm fornecido importantes dados para a morfologia e taxonomia da família Bromeliaceae.

O objetivo deste estudo foi analisar o desenvolvimento floral, do óvulo e grão de pólen de *A. gamosepala* e o desenvolvimento floral e do óvulo de *A. correi-araujoii*, e estabelecer uma relação entre o tamanho do botão floral e as fases do desenvolvimento, visando contribuir para futuros trabalhos de melhoramento dessa e de outras espécies de bromélias. Além disso, colaborar com novos dados para a ecologia e taxonomia do gênero *Aechmea*.

4.2 Material e Métodos

Botões florais e flores de *A. gamosepala* e *A. correi-araujoi* em diferentes fases do desenvolvimento foram coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação, sob temperatura ambiente, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP. Um exemplar de cada espécie foi depositado no Herbário ESA da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP com o número ESA121278 e ESA121291. Os botões florais foram medidos com auxílio de paquímetro e separados em quatro grupos de acordo com o comprimento: *A. gamosepala*: menores que 2,0 mm; 2,1 – 4,0 mm; 4,1 – 8,6 mm e 8,7 a 13,0 mm; *A. correi-araujoi*: menores que 0,1 – 1,0 mm; 1,1 – 5,0 mm; 5,1 – 10,0 mm e 10,1 a 14,0 mm. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução modificada de Karnovsky (1965) (glutaraldeído 2 %, paraformaldeído 2 %, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, em pH 7,2), submetidas a quinze minutos de vácuo, armazenadas por 48 horas até serem processadas para microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, ou por 24 horas até serem processadas para microscopia eletrônica de transmissão.

4.2.1 Microscopia de luz

As amostras fixadas foram desidratadas em série etílica (35, 50, 60 e 70% uma vez de 30 min), dissecadas, desidratadas (85, 95% uma vez e 100% três vezes de 30 min), seguidas de propanol (100%) e butanol (100%), duas trocas de 2 h. Em seguida, infiltradas lentamente em butanol e meio de infiltração (hidroxietilmetacrilato, Histoiresin, Leica Heldelberg) nas proporções 3:1, 1:1, 1:3 (butanol:histoiresina), e resina pura, por ao menos uma semana em cada etapa (modificado por ALMEIDA et al., 2006). Após esse período, as amostras foram emblocadas em histoiresina (Histoiresin, Leica Heldelberg), seguindo as instruções do fabricante e polimerizadas à temperatura ambiente por 48 h. Cortes histológicos seriados (3-5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo (Leica, RM2155, Alemanha), dispostos em água e coletados em lâminas histológicas e corados com fucsina básica (1 % p/v), seguido de azul de toluidina (0,05 % p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Cortes histológicos do ovário e antera de *A. gamosepala* e do ovário de *A. correi-araujoi* foram analisados em microscópio de luz Axioskop 40 (Carl Zeiss, Alemanha) e micrografias foram obtidas em câmera digital.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fixadas foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (35-70%), dessecadas, desidratadas (70-100%), secas ao ponto crítico através de CO₂ líquido (Leica, EM CPD300 Baltec), preparadas em suportes metálicos (stubs), metalizadas com ouro durante 180 s e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss, LEO 435 VP, Alemanha), no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

4.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Anteras retiradas de botões florais de *A. gamosepala* foram imediatamente fixadas em solução modificada de Karnovsky (1965), por 24 h, lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1 %) no mesmo tampão, lavadas em solução salina (0,9% de cloreto de sódio) e pré-coradas em acetato de uranila (2,5 %), overnight. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (25, 30, 50, 75% uma vez de 5 min, 90% duas vezes de 10 min e 100 % três vezes de 20 min), infiltradas lentamente em resina Spurr nas proporções 1:3 por 4 h, 1:1 por 4 h, 2:1 “overnight”, resina pura por 8 h e emblocadas em Spurr, por 48 h, a 70 °C. Cortes semi-finos e ultrafinos da antera foram obtidos em ultra-micrótomo (Sorval MT1-Porter-Blum), utilizando-se navalhas de vidro e diamante, respectivamente. As secções ultrafinas obtidas foram depositadas sobre grades de cobre de 300 mesh, contrastadas com acetato de uranila (2,5 %) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As secções foram analisadas e imagens digitais obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 (Jeol, Japão), no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

4.3 Resultados e Discussão

Foram estabelecidos quatro grupos de acordo com o comprimento dos botões floral nas espécies *A. gamosepala* e *A. correia-araujoii*. O tamanho dos botões florais de *A. gamosepala* variou de menores que 2,0 a 13,0 mm, sendo o último o tamanho médio da flor em pré-antese. A escala de variação de botões florais de *A. correia-araujoii* foi maior, com tamanhos menores que 0,1 a 14,0 mm. As análises microscópicas permitiram estabelecer

uma relação entre o tamanho do botão floral e as diferentes fases do desenvolvimento floral, do óvulo e grão de pólen em *A. gamosepala* (Tabela 4.1) e desenvolvimento floral e do óvulo em *A. correia-araujo* (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 Relação entre o comprimento dos botões florais e as fases do desenvolvimento floral e gametofítico em *Aechmea gamosepala*.

Comprimento do botão floral (mm)	Fases e eventos relacionados ao desenvolvimento		
	Desenvolvimento floral	Desenvolvimento do óvulo	Desenvolvimento do grão de pólen
< 2,0	Fase inicial: estabelecimento e formação dos verticilos Fase intermediária: fusão dos carpelos, diferenciação do estigma e filete	Formação dos primórdios de óvulo	Formação dos estratos parietais
2,1 – 4,0	Fase final: alongamento e crescimento dos verticilos, diferenciação das células papilares	Formação dos tegumentos Megasporogênese	Microsporogênese
4,1 – 8,6	Fase final: formação do apêndice petalar	Formação dos tegumentos Megasporogênese	Microsporogênese
8,7 -13,0	Fase final: formação do apêndice petalar	Megagametogênese	Microgametogênese

Tabela 4.1 Relação entre o comprimento dos botões florais e as fases do desenvolvimento floral e desenvolvimento do grão de pólen em *Aechmea correia-araujo*.

Comprimento do botão floral (mm)	Fases e eventos relacionados ao desenvolvimento	
	Desenvolvimento floral	Desenvolvimento do óvulo
< 0,1 – 0,9	Fase inicial: estabelecimento e formação dos verticilos	Formação dos primórdios de óvulo
1,0 – 5,0	Fase intermediária: diferenciação do estigma e filete, formação do apêndice petalar	Formação dos tegumentos Megasporogênese
5,0 – 10,0	Fase final: alongamento e crescimento dos verticilos, formação do apêndice petalar	Formação dos tegumentos Megasporogênese
10,0 -14,0	Fase final: formação do apêndice petalar	Megagametogênese

4.3.1 Desenvolvimento floral

A inflorescência de *A. gamosepala* produz flores em ordem acrópeta em sucessão vertical, os meristemas florais são protegidos por uma bráctea floral de ápice espinescente. A fase inicial e intermediária do desenvolvimento floral é observada em botões florais menores que 2,0 mm. As brácteas florais são alongadas na fase inicial do desenvolvimento, cobrindo e protegendo os primórdios florais e flores jovens (Figura 4.1B).

Os verticilos formam-se de forma centrípeta, na ordem, cálice, corola, androceu e gineceu. Os primórdios de sépalas são os primeiros a serem formados, em número de três, surgem primeiro dois primórdios na posição adaxial, em seguida surge um primórdio abaxial, caracterizando uma iniciação unidirecional reversa. O primórdio floral torna-se nitidamente triangular (Figura 4.1A).

As sépalas se unem, alongam e exibem nas fases iniciais um ápice espinescente, semelhante ao das brácteas florais, que também protegem o botão floral (Figura 4.1B). Em seguida, três primórdios de pétalas se formam na parte interna, em posição alterna em relação às sépalas (Figura 4.1B). Os primórdios estaminais surgem de forma simultânea, primeiro formam-se três primórdios opostos às sépalas, em seguida três na parte interna oposta às pétalas (Figura 4.1C). É possível identificar uma pequena diferença de tamanho entre eles (Figura 4.1D), os primórdios antissépalos são mais desenvolvidos, possivelmente devido à limitação de espaço no botão floral no início do desenvolvimento. Os primórdios carpelares são os últimos a serem formados, surgem na região central a partir de três protuberâncias livres (Figura 4.1E). A fase inicial do desenvolvimento floral termina com a formação de todos os órgãos florais, observa-se nesta fase que o filete dos estames ainda não se diferenciou (Figura 4.1F).

A proteção da flor é proporcionada por diferentes estruturas em diferentes fases do seu desenvolvimento. Essas estruturas tendem a funcionar apenas por um curto período de tempo, sendo a função passada a outra estrutura no decorrer do desenvolvimento (TUCKER, 1992). Como observado neste trabalho, às brácteas florais são as primeiras estruturas de proteção, em seguida a função é passada para as sépalas de ápice espinescente formadas na fase inicial do desenvolvimento.

Na fase intermediária observamos simultaneamente o alongamento e início da fusão da base dos carpelos, a diferenciação do estigma e do filete (Figura 4.1G). O ápice do

estigma começa a se torcer dando a conformação em espiral, neste momento notamos na base da antera a diferenciação do filete. Ao final da fase intermediária o carpelo está unido, formando um pistilo único, estigma diferenciado em conduplicado-espiral, e anteras e filetes diferenciados (Figura 4.1H).

A fase final do desenvolvimento foi observada em botões florais de 2,1 a 13,0 mm, sendo o último, o tamanho da flor em pré-antese. Essa fase é marcada pelo alongamento e crescimento dos verticilos, diferenciação de células e especializações florais, e fusão de partes florais. A diferenciação das células papilares do estigma foi observada em botões de 2,1 a 4,0 mm (Figuras 4.1I-J).

Muitas especializações florais se desenvolvem nas fases intermediárias e finais do desenvolvimento. Uma delas é a conexão de peças florais de mesma natureza ou de naturezas diferentes, formando um aparato funcional associado diretamente aos mecanismos de polinização (TEIXEIRA; MARINHO; PAULINO, 2014).

Figura 4.1 - Eletromicrografias de botões florais dissecados de *Aechmea gamosepala*, em diferentes fases do desenvolvimento floral, observados ao microscópio eletrônico de varredura. A: Meristema floral (mf) na axila de uma bráctea (*), com primórdios de sépalas (s); B: Inflorescência com botões florais em formação com primórdios de sepálas (s), pétalas (p), sépalas e brácteas com ápice espinescente (b); C: Desenvolvimento de partes florais: primórdios de pétalas (p), estames antissépálos (es) e estames antipétálos (ep); D: Primórdios de estames com diferença de tamanho entre os estames antissépálos e estames antipétálos; E: Primórdios carpelares livres (c); F: Diferenciação da antera, antes da formação do filete (seta); G: Desenvolvimento e fusão dos carpelos (seta branca), diferenciação do estigma em espiral e formação dos filamentos (seta preta); H: Pistilo único com estigma espiral (st) e anteras (an) com filetes (fi) diferenciados; I: Alongamento das anteras, filetes e pistilo. J: Estigma com células papilares em diferenciação. Bráctea (*), pétalas (x) e estames (+) foram removidos para melhor visualização. Barras: A, C, D = 100 µm; B, E, F, H, I, J = 200µm; G = 150µm.

A formação dos apêndices petalares, alongamento das sépalas e pétalas e a conexão dos filetes antipétalos as pétalas, ocorrem tardiamente no desenvolvimento floral. Os apêndices petalares surgem como duas protuberâncias na base das pétalas em botões de 4,1 a 8,6 mm (Figuras 4.2A), células da base da estrutura se diferenciam e começam a alongar-se lentamente, em direção à base da pétala, também observa-se o alongamento do ápice (Figuras 4.2B-D). Botões de 8,7 a 13,0 mm apresentam apêndices petalares diferenciados em uma estrutura alongada com ápice dentado e franja sobreposta (Figuras 4.2E-H). Nesta fase observa-se a conexão da base do estame antipétalo adnato à pétala (Figuras 4.2F) e os estames antissépalos livres (Figuras 4.2G). Analisando todas as etapas do desenvolvimento, observamos que em algum momento as células da base direcionam o crescimento para o ápice, formando uma estrutura semelhante a franjas, porém não foi possível observar com exatidão o momento de ocorrência desta conversão. A flor em pré-antese apresenta apêndices petalares longos com franjas sobrepostas, que se dispõem unidos à base da pétala, formando uma proteção ao néctar que é secretado pelo nectários septais presentes na base do ovário, simulando uma câmara nectarífera (Figura 4.2H).

O apêndice petalar é definido como um par de estruturas na base da face adaxial das pétalas, de tecido único, entre cada estame antipétalo (BROW; TERRY, 1992). A função desses apêndices ainda não é bem definida, sendo que diferentes autores relatam sua função na proteção do néctar, relacionando-os à interação entre planta e polinizador (BROWN; GILMARTIN, 1984, 1989; EVANS; BROWN, 1989; BROWN; TERRY, 1992; LEME, 1997).

Figura 4.2 - Eletromicrografias de botões florais dissecados de *Aechmea gamosepala*, com apêndices petalares em diferentes fases do desenvolvimento, observados ao microscópio eletrônico de varredura. A: primórdio do apêndice petalar (seta) na base da pétala (p) de botão floral com 4,1 a 8,6 mm; B: Primórdio de apêndice petalar com células se diferenciando na base do primórdio (seta); C-D: Desenvolvimento da estrutura ornamentada; E: Apêndice petalar diferenciado com estrutura alongada de ápice dentado e ornamentação sobreposta em forma de franja; F: Pétala com apêndice diferenciado, evidenciando a região de conexão do filete com a pétala; G: Pétala com apêndices petalares entre filete antipétalo (ep) adnato a pétala e filetes antissépalos (es) livres; H: Flor em pré-antese com as franjas dos apêndices unidas; seta = nectário septal; ov = óvulos. Estame (*) removido para melhor visualização. Barras: A = 300 μ m; B = 150 μ m; C, D = 200 μ m; E, F, G, H = 1 mm.

O desenvolvimento floral de *A. correia-araujo* foi similar ao de *A. gamosepala*. O primórdio floral se origina na axila de uma bráctea, anteriormente à iniciação dos primórdios de sépalas, observa-se o ápice do meristema floral em formato convexo e arredondado (Figura 4.3A-B). A fase inicial do desenvolvimento floral é observada em botões florais menores que 0,1 - 1,0 mm. As brácteas se alongam na fase inicial do desenvolvimento, cobrindo e protegendo os primórdios florais, cada bráctea circundando um único meristema floral (Figura 4.3A). A iniciação dos órgãos florais ocorre de forma centrípeta, inicialmente observando-se a formação do cálice, seguido da corola, androceu e gineceu. As peças florais de cada verticilo encontram-se alternas em relação às dos verticilos adjacentes (Figura 4.3D).

Os primórdios de sépalas são os primeiros a serem formados, desenvolvem-se simultaneamente de forma unidirecional, em número de três. Os primórdios de pétala se desenvolvem em seguida, internamente às sépalas (Figura 4.3C). Os primórdios de estames iniciam-se de forma simultânea, surgindo primeiro os primórdios de estames antipétalos e, posteriormente, os de estames antessépalos (Figura 4.3C-D). Os primórdios carpelares surgem a partir de três protuberâncias na depressão central do meristema floral, logo após a formação dos seis primórdios de estames (Figura 4.3D, E).

A fase intermediária foi observada em botões florais de 1,1 – 5,0 mm (Figura 4.3 F-G) e a fase final entre 5,0 – 10,0 mm (Figura 4.3 H-I). Como observado em *A. gamosepala*, a fase intermediária é caracterizada pelo alongamento, início da fusão dos carpelos, diferenciação do estigma e filetes. Durante a diferenciação do estigma, observa-se que a altura do pistilo ultrapassa a dos estames (Figura 4.3F-G). A fase final é marcada pelo alongamento e alargamento das peças florais. Porém, diferentemente de *A. gamosepala*, primórdios de apêndices petalares foram observados em botões florais na fase intermediária.

Figura 4.3 - Eletromicrografias de botões florais dissecados de *Aechmea correia-araujo*, observados ao microscópio eletrônico de varredura. A: Meristema floral (mf) na axila de uma bráctea e meristema floral revestido por bráctea floral (b); B: Meristemas florais em formato convexo e arredondado; C: Sépalas (s), primórdios de pétalas (p) e estames (e); D: Primórdios de estames antipétalos (ep) e antissépalos (es), depressão central do meristema floral (seta); E: Desenvolvimento centrípeto dos órgãos florais, presença de três primórdios carpelares (c); F: Primórdios carpelares livres no ápice e início da curvatura do estigma (est) em espiral; G: Pistilo com carpelos fundidos, diferenciação do filete e estigma; H: Estigma diferenciado do tipo conduplicado-espiral, alargamento e alongamento da base do filete e antera; I: Flor em fase final do desenvolvimento. Brácteas, sépalas, pétalas e estames foram removidos para melhor visualização. Barras: A-D, F : 200 µm; E: 150 µm; G-H: 1 mm; I: 2 mm.

Primórdios de apêndices petalares foram observados na base da face adaxial de pétalas de botões florais de 1,0 a 5,0 mm de comprimento, nas laterais da base do filete antipétalo (Figura 4.4A). Em botões de 5,0 a 10,0 mm observamos uma diferenciação na face adaxial do apêndice, formando uma estrutura sobreposta (Figura 4.4B-D) que completa o seu alongamento e diferenciação em botões de 10,0 a 14,0 mm (Figura 4.4E). Os apêndices apresentam-se completamente diferenciados em flores em pré-antese (Figura 4.4F).

Figura 4.4 - Eletromicrografias de botões florais dissecados de *Aechmea correia-araujoii*, evidenciando o desenvolvimento do apêndice petalar, ao microscópio eletrônico de varredura. A: Primórdio de apêndice petalar (seta) na base da pétala de botão floral de 1,0 a 5,0 mm; B-D: Primórdios de apêndices petalares em botões florais de 5,0 a 10 mm; D: Diferenciação na face adaxial do apêndice petalar (seta) formando uma estrutura sobreposta; E: Alongamento do apêndice petalar em botões de 10,0 a 14,0 mm; F: Flor em pré-antese com apêndice petalar completamente formado. Barras: A, D, E, F: 500 μ m; B: 300 μ m; C: 100 μ m.

A família Bromeliaceae apresenta uma grande variação morfológica de apêndices petalares. Brown e Terry (1992) reconheceram três tipos de apêndices nas subfamílias, apêndices petalares complexos e com maiores variações ocorrem na família Bromelioideae, enquanto as subfamílias Ptilacnoideae e Tillandsioideae exibem apêndices petalares mais simples e com morfologia consistente.

A morfologia do apêndice petalar descrita neste trabalho para a espécie *A. correia-araujoii* foi semelhante ao descrito por esses autores para a subfamília Bromelioideae. O

apêndice petalar de *A. gamosepala* apresenta estrutura complexa e distinta da observada em *A. correia-araujo*, evidenciando variação morfológica entre espécies do mesmo gênero.

No final do desenvolvimento floral as flores de *A. gamosepala* e *A. correia-araujo* apresentam características típicas de Bromeliaceae (BENZING, 2000), actinomorfas, trímeras, *A. gamosepala* com três sépalas unidas (gamosépala) e três pétalas livres (dialipétala), com apêndices petalares duplos, longos, com franja sobreposta, na base da face adaxial de cada pétala. *A. correia-araujo* apresenta sépalas e pétalas livres em número de três, com apêndices petalares duplos, com sobreposição de ápice dentado, na base da face adaxial de cada pétala. Apresentam seis estames inclusos, de mesmo tamanho, três externos ou antissépalos livres e três internos, ou antipétalos adnatos às pétalas, basefixos, e um único pistilo central (gamocarpelar) com estigma do tipo conduplicado-espiral.

4.3.2 Desenvolvimento do óvulo

O início do desenvolvimento do óvulo, em *A. gamosepala* é observado em botões florais menores que 2,0 mm, no final da fase inicial, quando a base dos carpelos apresenta-se unida, com estigma em forma de espiral e formação inicial das células papilares. Os primórdios surgem na placenta a partir de divisões celulares da posição axial, a placenta apresenta estrutura trizonada (Figura 4.5A).

O primórdio do óvulo inicia-se pelo aumento da densidade citoplasmática na região placentária e por divisões periclinais da camada subdérmica, bem como divisões da camada central (Figura 4.5B-D). Ao acompanhar o desenvolvimento do óvulo, observa-se que os primórdios são constituídos por três camadas meristemáticas, camada dérmica, subdérmica e central, caracterizando a origem trizonal do óvulo (Figura 4.5C).

A camada dérmica é responsável pela formação dos tegumentos interno e externo e pela epiderme nucelar (Figura 4.5E-F). No interior do nucelo, em botões de 2,1 a 4,0 mm, a inicial arquesporial é formada na camada subdérmica e após sofrer uma divisão periclinal, dá origem à célula arquesporial e à célula parietal primária. As células adjacentes à parietal primária dividem-se periclinamente, e formam até três camadas celulares entre a epiderme nucelar e a célula arquesporial, sendo o óvulo denominado crassinucelado (Figura 4.5E,F,I). Divisões periclinais nas laterais da camada dérmica marcam o surgimento dos tegumentos,

inicialmente o interno (Figura 4.35,G), seguido do externo (Figura 4.5F,H). A curvatura anátropa é observada no início do desenvolvimento do tegumento externo (Figura 4.5F,H).

Em botões de 4,1 a 8,6 cm, a célula arquesporial diferencia-se formando a célula mãe do megásporo, que alonga-se no eixo micrópila-calaza (Figura 4.5I). Observa-se o tegumento externo se sobrepondo ao interno e óvulo em curvatura anátropa (Figura 4.5J-K), até estarem completamente formados, delineando a micrópila (Figura 4.5L). Os tegumentos são formados por duas camadas de células. Quando os dois tegumentos já se encontram em diferenciação, células da placenta alongam-se radialmente formando um obturador próximo ao nucelo (não mostrado).

O obturador é uma estrutura especial que ocorre próximo à micrópila e tem a função de guiar o crescimento do tubo polínico, podendo ser de origem funicular, placentária ou de combinação das duas (BOUMAN, 1984). Pode ser, ainda, uma saliência coberta por tricomas secretores ou simplesmente uma região com uma epiderme papilosa. O obturador cresce através da micrópila e mantém conexão com o tecido transmissor ou com a epiderme secretora do canal estilar, sendo que após a polinização se degenera (SHAMROV, 2004).

Figura 4.5 - Desenvolvimento do óvulo em *Aechmea gamosepala*, observados em secções longitudinais por microscopia de luz (A-C, E-F, I) e por eletrônica de varredura (D, G-H, J-L). A: Formação do primórdio de óvulo de caráter trizonal (I, II, II) por divisões das células da placenta. B: Primórdios de óvulo (po). C: Primórdio de óvulo trizonado, com camada dérmica (de), subdérmica (sb) e central (cc). D: Primórdios de óvulos (pr); E: Óvulo com célula arquesporial (ca) e formação do tegumento interno (ti). F: Óvulo com célula mãe do megásporo (cmm), tegumento interno (ti) e início do desenvolvimento do tegumento externo. G: Óvulo com nucelo (n) evidente e início do desenvolvimento do tegumento interno. H: Óvulos em início de curvatura, com tegumento interno e tegumento externo em formação. I: Óvulo em curvatura, com célula mãe do megásporo alongada com tegumentos e feixe vascular. J: Óvulos se curvando, com tegumento externo se sobrepondo ao tegumento interno. K: Óvulo com tegumento externo no final de formação. L: Óvulo maduro, com micrópila (mi) evidente. Barras: A, B, I = 0,5 mm; C, E, F = 2mm; D, G, H, J, L = 50µm; K = 100 µm.

A primeira divisão meiótica marca o início da megasporogênese, a célula mãe do megásporo (Figura 4.6A) se divide (Figura 4.6B). Ao final da meiose ocorre a formação da díade, com células de mesma dimensão (Figura 4.6C). Na segunda meiose, a célula calazal da díade entra em divisão, originando uma tétrade linear, o megásporo calazal se diferencia,

aumentando gradualmente em tamanho (Figura 4.6D). A presença de calose é observada ao redor da tétrade, sendo mais evidente na parede próxima à região micropilar (Figura 4.6D-E). Os demais megásporos micropilares degeneram (Figura 4.6F). Células nucelares da região calazal apresentam parede espessa, que se coram em verde com azul de toluidina. Tais características evidenciam a diferenciação inicial das células nucelares da região calazal do óvulo em hipóstase (Figuras 4.6F). Em Bromeliaceae a presença de hipóstase é relatada em *Vriesea carinata* (SARTORI, 2008) e *Ananas comosus* (RAO; WEE, 1979). Em *V. carinata*, foi visível anteriormente à antese e em *Ananas comosus* foi visível posteriormente à antese. Bouman (1984) cita várias funções para a hipóstase, desde estruturais até funcionais, como translocação de nutrientes para o saco embrionário em desenvolvimento. A hipóstase, segundo Rudall (1997), é comum em monocotiledôneas. Batygina (2002) também relata a presença de hipóstase em óvulos crassinucelados.

A megagametogênese é observada em *Aechmea gamosepala* em botões de 8,7 a 13,0 mm. O megásporo funcional ou gametófito uninucleado (Figura 4.6F) passa por três ciclos mitóticos, originando o megagametófito ou saco embrionário do tipo polygonum, constituído por sete células e oito núcleos: três antípodas (Figura 4.6G, J), duas sinérgides (Figura 4.6H-I) e a oosfera (Figura 4.6K), todas com núcleo haplóide, e uma célula central, com dois núcleos haploides denominados núcleos polares (Figura 4.6K). As sinérgides estão localizadas uma ao lado da outra, apresentam núcleos mais próximos do pólo micropilar e vacúolos diferenciados no polo calazal de suas células (Figura 4.6H, I). A oosfera apresenta vacúolo em posição inversa ao das sinérgides (Figura 4.6K).

Figura 4.6 – Megasporogênese e Megagametogênese em *Aechmea gamosepala*. Secções longitudinais observadas por microscopia de luz. A: Célula mãe do megásporo (cmm) alongada; B: Célula mãe do megásporo, observando-se a primeira meiose em metáfase; C: Após a primeira meiose, formando uma díade; D: Após a segunda meiose, tétrade com megásporo calazal funcional (mf); E: Megásporo funcional e megásporos micopilares degenerados ; F: Gametófito feminino uninucleado e formação da hipóstase (hi); G-K: Saco embrionário, composto pelas antípodas (a1 em G; a2 e a3 em J), sinérgides (si em H-I), núcleos polares (np) e oosfera (oo). Barras: A, B, C, D, E, G, H, I, J = 1 mm; F, K = 2mm.

Primórdios de óvulos em *A. correia-araujo* são observados em botões florais menores que 0,1 – 0,9 mm, os primórdios têm origem placentária e são constituídos por três camadas meristemáticas (Figura 4.7A). Botões florais de 1,0 – 5,0 mm apresentam óvulos crassinucelados, com células arquesporais e tegumentos em formação. O tegumento interno se inicia antes do externo, os tegumentos são iniciados por divisões periclinais em células da camada dérmica em torno da base do esporângio (Figura 4.7B). À medida em que

o óvulo se desenvolve, observa-se uma acentuação em sua curvatura, ao mesmo tempo ocorre a formação do tegumento externo e o desenvolvimento do tegumento interno (Figura 4.7I). A célula arquesporial se diferencia em célula mãe do megásporo e alonga-se no eixo micrópila calaza (Figura 4.7C e E).

A megasporogênese em *A. correia-araujo* ocorre em botões florais de 5,0 – 10,0 mm. A célula mãe do megásporo passa por divisões meióticas, que resultam na tétrade linear de megásporos (Figura 4.7F-G). Os megásporos micropilares degeneram e o megásporo calazal funcional inicia a megagametogênese (Figura 4.7H), observada em botões florais de 1,0 – 14,0 mm. O núcleo do megásporo funcional passa por divisões mitóticas sucessivas e origina o gametófito do tipo *polygonum* (Figura 4.7D). Foi observado o desenvolvimento de obturador placentário, formado por células alongadas da placenta.

O caracter trizonal e origem placentária dos óvulos de *A. gamosepala* e *A. correia-araujo* são semelhantes ao descrito para outras espécies da mesma família. Caráter trizonado também foi observado em *Vriesea carinata* (SARTORI, 2008) e *Dyckia pseudococcinea* (CONCEIÇÃO; DE TONI; COSTA, 2007). Placentação axial é relatada por Palací, Brown, Tuthill (2004), Sajo, Prychid e Rudall (2004) e Sajo, Rudall e Prychid (2004), em várias espécies da família Bromeliaceae.

A. gamosepala e *A. correia-araujo* apresentam óvulo anátropo, crassinucelado, bitegumentado, com desenvolvimento de obturador placentário, gameta feminino de origem monospórica, do tipo *polygonum*.

Figura 4.7 - Desenvolvimento do óvulo de *Aechmea correia-araujo* observado em seções longitudinais por microscopia de luz, e por microscopia eletrônica de varredura. A. Primórdios de óvulos de origem placentária, constituídos por três camadas meristemáticas: dérmica (de), subdérmica (sb) e camada central (cc); B. Primórdio de óvulo com célula arquestral (ca), formação dos tegumentos interno (ti) e externo (te); C. Célula mãe do micrósporo (cmm); D. Óvulo com saco embionário (se), com sinérgides (si) evidentes; E. Célula mãe do micrósporo alongada no eixo micrópila-calaza; F. Após a pimeia meiose formando uma díade; G. Após a segunda meiose formando a tétrade; H. Megásporo funcional (mf) e megásporos micropilares degenerados; I. Primórdios de óvulos com nucelo evidente (n) e início do desenvolvimento do tegumento externo; J. Óvulo em curvatura, com tegumento externo se sobrepondo ao tegumento interno; K. Óvulo maduro com micrópila (mi) evidente. Barras: A, B, C, D, F = 0,5 mm; E, G, H = 2mm; I, J = 50 μ m; K = 100 μ m.

4.3.3 Desenvolvimento do grão de pólen em *Aechmea gamosepala*

Botões florais de *A. gamosepala* menores que 2,0 mm, apresentam androceu composto por seis estames, primórdio estaminal e anteras tetralobadas com quatro esporângios bem delimitados (Figura 4.8A). No esporângio com estratos parietais jovens, o tecido esporogênico apresenta células de formato poligonal, em divisão mitótica, algumas de suas células se dividem formando o tapete (Figura 4.8B). As células esporogênicas se

proliferam até certo número, quando se diferenciam em célula mãe do micrósporo (CMM) e entram em pré-meiose. Essa fase também foi observada no segundo grupo de botões florais com 2,0 – 4,0 mm.

Os esporângios com CMM exibem cinco camadas: epiderme, endotécio, camada média e tapete, que circunda o tecido esporogênico (Figura 4.8C).

A epiderme possui células isodiamétricas com cutícula fina e persiste em todo o desenvolvimento da antera, assim como nas angiospermas em geral (BHANDARI, 1984), durante o processo de diferenciação, se tornam papilosas (Figura 4.10D). O endotécio é uniestratificado e apresenta espessamento em forma de U na microgametogênese (Figuras 4.10D). A camada média é formada por células alongadas tangencialmente e o número de camadas varia de 2-3, dependendo da localização (Figura 4.8C), se desintegram antes da diferenciação dos grãos de pólen (Figura 4.10H). O tapete, de aspecto secretor, apresenta algumas de suas células binucleadas, com vários nucléolos e vacúolos (Figura 4.8C). O tapete apresenta intensa atividade metabólica na fase meiótica e se degenera durante o desenvolvimento dos grãos de pólen (SHIVANNA, 2003). Canais citomíticos interligam as CMM, permitindo um sincronismo no desenvolvimento (Figura 4.9A-B), também observado entre células do tapete (Figura 4.9A-B).

Com início da prófase I uma parede de calose começa a ser depositada entre a membrana plasmática e a parede celular (Figura 4.8D). A profase I é facilmente identificada nas CMM devido ao espiralamento dos cromossomos (Figura 4.8E), a calose é a fina camada ao redor da célula mãe do micrósporo. Com o aumento da deposição de calose entre as células, ao longo do desenvolvimento, os meiócitos se tornam mais isolados. Durante a meiose observa-se que há um sincronismo nas células do meiócito de um mesmo lóculo, porém esse sincronismo não se repete em diferentes anteras.

O final da primeira meiose é observado em botões de 4,1 – 8,6 mm, marcada pela clivagem centrífuga do citoplasma da CMM, que separa as díades, que permanecem envoltas pela parede de calose (Figura 4.8F e 4.9D), caracterizando a meiose do tipo sucessiva, predominante entre espécies de Bromeliaceae (HESS, 1991; SAJO et al., 2005; NADOT et al., 2008; SARTORI, 2008; SPAT, 2012; MENDES; COSTA; DE TONI, 2012). O final da segunda meiose é marcado pela citocinese com formação de quatro micrósporos, organizados em tétrades com arranjo isobilateral ou decussado (Figuras 4.8F e 4.9D),

igualmente descritos para *Vriesea carinata* (SARTORI, 2008). As células do tapete adquirem uma densidade citoplasmática maior e o citoplasma se retrai (Figura 4.8F).

Figura 4.8 – Microsporogênese em *Aechmea gamosepala* observada em secções semifinas em microscopia de luz. A: Visão geral do androceu com seis anteras tetraesporangiadas (*); B: Célula arquesporial (ca) e formação do tapete (ta). C: Célula mãe do micrósporo (cmm) e camadas da antera: epiderme (ep), endotécio (en), camada média (cm) e tapete (ta); D: Célula mãe do micrósporo com calose na parede celular e células do tapete densas; E: Tapete com célula binucleada, célula mãe do micrósporo (cmm) em meiose, com deposição de calose (seta); F: Díades (di), tétrade isobilateral (ti) e tétrade decussada (td) revestidas de calose (ca). Barras: A, E = 2mm; B = 30µm; C, D, F = 500µm.

Figura 4.9 – Eletromicrografia de transmissão de anteras de *Aechmea gamosepala*. A: Canais citomíticos interligam as células mãe dos microspores (cmm) e células do tapete (ta); B-C: Detalhe do canal citomítico; D: Díade revestida por calose (ca); E: Tétrade isobilateral com primexina (seta), revestida por calose; F: Detalhe da tétrade em citocinese com clivagem centrífuga; G: Rompimento da parede celular do tapete e degradação da calose; H: Conteúdo do tapete no fluido locular, envolvendo os microspores livres (ml); I: Acúmulo de substâncias do tapete na superfície da exina (seta). J: Deposição de substâncias do tapete (seta), formando a exina (ex); K: Endotécio (en) com espessamento celulósico nas paredes anticlinais; L: Polén com exina espessa e intina (in) delgada. ep:epiderme. Barras: A = 10µm; B = 20µm; C, F, I = 2µm; D, E, H, K = 5µm; G, J = 1µm; L = 500 µm.

Após a fase de tétrade, a parede calósica é dissolvida e ocorre a liberação dos micrósporos, com núcleo central (Figura 4.10A). A dissolução da calose é a sinalização dos primeiros sinais de degeneração das células do tapete (Figura 4.9G). Antes da dissolução total da parede de calose percebe-se o início da formação da primexina, nos micrósporos dentro das tétrades (Figura 4.9E), os micrósporos livres apresentam pequenas interrupções nas regiões das futuras aberturas (Figura 4.10A). A primexina é o primeiro componente da esporoderme, relacionada com a formação e estrutura da exina. A liberação dos micrósporos no fluido locular marca o início da microgametogênese.

A liberação do micrósporo coincide com um conjunto de modificações que resultam na formação dos gametófitos masculinos. Um período de expansão celular é observado, ao mesmo tempo em que ocorre a diferenciação da esporoderme através da deposição da exina e intina. Com o rompimento da parede celular do tapete, o conteúdo citoplasmático passa a integrar o fluido locular e envolvem os grãos de pólen, principalmente os da periferia (Figura 4.10A e 4.9H). A observação ultraestrutural através de microscópio eletrônico de transmissão mostra o acúmulo de gotículas escuras no tapete e a deposição dessas substâncias na superfície da exina (Figura 4.9I-J). O principal componente da exina é a esporopolenina, material resistente, originados em células do tapete e nos micrósporos, no final da meiose (LERSTEN, 2004).

Pacini (1997) ressaltam a importância do tapete na formação do fluído locular, nutrição dos micrósporos, formação de precursores da exina, síntese e liberação de substâncias como calase, trifino e “pollenkitt”. Segundo Pacini e Franchi (1993) a atividade metabólica das células do tapete inicia-se com a primeira divisão meiótica durante a esporogênese e, após o início da degeneração das paredes do tapete, ocorre a liberação de substâncias para o interior do lóculo. Segundo Sajo et al. (2005) em espécies da família Bromeliaceae o tipo de tapete varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, o que poderia levar a interpretações equivocadas. De acordo com esses autores o tapete é secretor nas fases iniciais de desenvolvimento, mas tende a invadir o lóculo da antera com o início da meiose, caracterizando como um possível tipo intermediário. Em Poales o tipo secretor é considerado mais comum (FURNESS; RUDALL, 2001), descrito também para Bromeliaceae (JOHRI, 1992; MENDES; COSTA; DE TONI, 2012).

Vários vacúolos começam a se desenvolver no citoplasma dos micrósporos livres, presentes em anteras de botões de 8,7 – 13,0 mm (Figura 4.10B). É o primeiro sinal morfológico da diferenciação do gametófito masculino. Nesta fase, as células do tapete apresentam-se degeneradas e as células da camada média sofrem uma compressão (Figura 4.10B), que se intensifica nas etapas seguintes do desenvolvimento. Esses vacúolos se fundem, formando um vacúolo maior que desloca o núcleo central para a região polar, a limitação do citoplasma acarreta uma divisão assimétrica, formando duas células desiguais, a célula generativa e a célula vegetativa. A célula vegetativa, maior, apresenta núcleo esférico central e ocupa a maior parte do gametófito masculino, comprimindo a célula generativa menor contra a esporoderme (Figura 4.10C).

O processo de englobamento começa pelo deslizamento da célula generativa junto à esporoderme. A célula generativa apresenta forma lenticular enquanto a mesma está em posição parietal (Figura 4.10C), passando a esférica quando englobada pelo citoplasma da célula vegetativa (Figura 4.10D). O endotécio exibe um espessamento celulósico nas paredes anticlinais, que persiste até a deiscência da antera (Figura 4.10D e 4.9K). Grãos de amido são visualizados no citoplasma da célula vegetativa, marcando o início da amilogênese (Figura 4.10D). Após o englobamento, a célula generativa se aproxima gradualmente para o centro, próximo ao núcleo vegetativo, adquirindo formato fusiforme (Figura 4.10E), resultando na formação da unidade germinativa masculina (Figura 4.10F). Essa unidade morfológica persiste até a deiscência da antera, com a liberação do grão de pólen na forma bicelular, biporado, com exina espessa e intina delgada (Figura 4.6L). Pólen bicelular também foi descrito para *Lindmania penduliflora* e *Dyckia pseudococcinea* (CONCEIÇÃO; DE TONI; COSTA, 2007). A segunda divisão mitótica só vai ocorrer após a deiscência e formação do tubo polínico.

Figura 4.10 - Microgametogênese em *Aechmea gamosepala* observada ao microscópio de luz. A: Micrósporos livres (ml) com núcleo central, ausência de primexina nas regiões de abertura (seta) e presença de tapete (ta) degenerado; B: Micrósporo vacuolado (mv), camadas da antera formada por epiderme (ep), endotécio (en) e tapete (ta) em fase de degeneração; C: Grão de pólen bicelular com célula generativa (cg) e célula vegetativa (cv); D: Grãos de pólen com célula generativa (cg) englobada pela célula vegetativa (cv), parede da antera composta por epiderme papilar e endotécio com parede espessa; E: Grão de pólen bicelular com presença de grânulos no citoplasma da célula vegetativa; F: Grão de pólen bicelular com núcleo fusiforme; G: Antera bilobada com abertura na região do estômio (es); H: Abertura longitudinal na região do estômio (seta). c = conectivo; es =

estigma; ta = tapetum; v = vacuolo; A. Barras: A, C, D, E = 2mm; B = 500µm; F = 50µm; G = 1 mm; H = 30µm.

A presença de grão de amido observada no citoplasma da célula vegetativa é marcada por uma progressiva assimilação dessas reservas durante as fases seguintes, resultando em grãos de pólen maduros, com quantidade de amido reduzida. A quantidade reduzida ou ausência de amido no pólen maduro também foi relatada por Baker e Baker (1979) sendo classificado como *starchless*, rico em açúcares e óleos. Para esses autores esse tipo de pólen tende a ter tamanho reduzido, são produzidos em grandes quantidades e ricos em lipídios, servindo como parte da recompensa recebida por abelhas e moscas.

Franchi et al. (1996) sugerem que o amido do grão de pólen forma sacarose, a qual protege a membrana do grão de pólen contra dissecação. Zona (2001) em seu estudo qualitativo sobre estoque de amido no micrósporo de monocotiledôneas mostra que em Bromeliaceae, as espécies estudadas nas três subfamílias tradicionais, apresentam amido no micrósporo, exceto em espécies de *Aechmea* e *Pitcairnia*. Muitas características morfológicas do pólen podem ser significativas na dispersão e germinação em Bromeliaceae.

No final da maturação o septo esporangial é degenerado e são observados apenas dois lóculos (Figura 4.10G). A região estomial apresenta células epidérmicas de tamanho relativamente menor quando comparada à região esporangial (Figura 4.10G), característica também observada em *Dyckia pseudococcinea*, e algumas espécies de Poaceae (NAKAMURA; LONGHI-WAGNER; SCATENA, 2009). A deiscência das anteras se dá por uma abertura longitudinal na região do estômio (Figura 4.10H). Neste momento apenas epiderme e endotécio revestem a parede da antera, característica comum para esse tipo de tecido (JOHRI et al., 1992; BATYGINA, 2002) e o mesmo já descrito para Bromeliaceae (SAJO et al., 2005).

Em Bromeliaceae observa-se que há variação no tipo de espessamento, podendo ser anelar, em forma de U, ou helicoidal, ou ainda exibir os três padrões em uma mesma antera como em *V. carinata* (SARTORI, 2008). Porém o tipo em 'U' é o mais encontrado nas espécies de Bromeliaceae (SAJO et al., 2005), como descrito para *Dyckia brevifolia* Bak. (MANNING, 1996) e, *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L. B. Sm (SPAT, 2012).

O desenvolvimento do grão de pólen de *A. gamosepala* segue o padrão observado para as espécies de Bromeliaceae, tapete do tipo secretor, citocinese sucessiva, tétrade

isobilateral ou linear, e grão de pólen biporado. Botões florais de 8,7 – 13,0 mm são indicados no estudo de embriogênese a partir de micrósporo de *A. gamosepala*.

Informações detalhadas do desenvolvimento floral, desenvolvimento do óvulo e grão de pólen disponibilizadas no presente estudo contribuem para aplicações biotecnológicas, melhoramento genético e conservação, bem como caracteres úteis para a taxonomia e ecologia das *Aechmeas*.

5 Padrão de distribuição de componentes de parede celular durante o desenvolvimento gametofítico masculino de *Aechmea gamosepala* e *Aechmea correia-araujo* (Bromeliaceae)

RESUMO

Bromélias ornamentais são objeto de crescente demanda. O conhecimento do desenvolvimento do grão de pólen e mecanismos reprodutivos é essencial para aplicações biotecnológica, melhoramento genético e conservação destas espécies. A caracterização de modificações celulares e componentes da parede celular durante o desenvolvimento do grão de pólen, como pectinas e proteínas arabinogalactanas (AGPs), contribuirão na definição de marcadores de desenvolvimento do gametófito masculino, com uso potencial na embriogênese a partir de micrósporo. Neste trabalho foram caracterizadas as alterações celulares e os padrões de distribuição de pectinas (esterificadas e não-esterificadas) e AGPs durante o desenvolvimento gametofítico masculino nas bromélias ornamentais *Aechmea gamosepala* Wittm e *Aechmea correia-araujo* E. Pereira & Moutinho por análises citoquímicas e imunocitoquímicas. Coloração com azul de toluidina, iodeto de potássio para amido, DAPI para DNA, e imunofluorescência com anticorpos para RNA, pectinas esterificadas (JIM7), não esterificadas (JIM5) e AGPs (LM2, LM6, MAC207, JIM13, JIM14) e análises por microscopia confocal foram realizadas em anteras em diferentes fases de desenvolvimento. Pectinas esterificadas e não esterificadas apresentaram diferentes padrões de distribuição durante a microsporogênese e microgametogênese em paredes celulares de diferentes tipos de células da antera. Os resultados de imunofluorescência de AGPs sugerem três padrões principais de distribuição de AGPs em tecidos de antera e grãos de pólen durante o desenvolvimento gametofítico. Em conjunto, os resultados definem vários padrões de distribuição espaço-temporal de pectinas e AGPs em espécies de *Aechmea* que podem ser utilizados como marcadores de desenvolvimento, sugerindo um papel chave destes componentes da parede celular no desenvolvimento de pólen de bromélias, e dando novas perspectivas sobre o conhecimento da biologia reprodutiva dessas espécies de plantas ornamentais, ainda pouco conhecidas, com elevado potencial em programas de biotecnologia e melhoramento genético.

ABSTRACT

Ornamental bromeliads are subject of increasing demand; a better knowledge of their pollen development and reproductive mechanisms is essential for biotechnology, breeding and preservation programs of these species. A detailed characterization of cell wall components during pollen grain development, such as pectins and arabinogalactan proteins (AGPs), and other cellular components, such as starch, will contribute to biotechnological studies, defining markers of developmental stages of the male gametophyte. In the present study, we characterized the cellular changes and the distribution patterns of pectins (esterified and non-esterified) and AGPs during male gametophytic development in ornamental bromeliads *Aechmea gamosepala* and *A. correia-araujo* by a cytochemical and immunocytochemical approach. Toluidine blue staining, IKI staining for starch, DAPI for DNA, and immunofluorescence with antibodies for RNA, esterified (JIM7), non-esterified (JIM5) pectins and AGPs (LM2, LM6, MAC207, JIM13, JIM14), and confocal microscopy analyses were applied on anthers at different developmental stages. Esterified and non-esterified pectins showed different distribution patterns during microsporogenesis and microgametogenesis in the cell walls of various anther cell types. AGP immunofluorescence results suggested three main AGPs distribution patterns in anther tissues during pollen development. Taken together, results defined several spatio-temporal distribution patterns of pectins and AGPs in *Aechmea* species that can be used as developmental markers, suggesting a key role of these cell wall components in pollen development of Bromeliads, and giving new insights into the knowledge of the reproductive biology of these ornamental plant species, still poorly known, with high potential in biotechnology and breeding programs.

5.1 Introdução

A aplicação de técnicas biotecnológicas visando o melhoramento genético, como a geração de plantas haploides por embriogênese a partir de micrósporos ou pólen, é uma ferramenta importante que reduz o tempo necessário para obtenção de novas variedades (SEGUÍ-SIMARRO, 2010; GERMANÀ, 2011). Esta metodologia tem sido utilizada principalmente em espécies de interesse agrônômico, sendo relatada em um número reduzido de espécies ornamentais, tais como antúrio, begônia, crisântemo, lírio e girassol (FERRIE; CASWELL, 2011), não havendo relatos em Bromeliaceae, apesar do uso potencial na geração de híbridos.

Modificações celulares e o padrão de distribuição de componentes da parede celular, que ocorrem durante o desenvolvimento gametofítico masculino, constituem uma abordagem conveniente na busca de marcadores de desenvolvimento gametofítico com uso potencial na utilização de metodologias de embriogênese de pólen, de espécies de interesse.

Alterações na distribuição de pectinas têm sido relatadas durante o desenvolvimento gametofítico masculino em *Arabidopsis thaliana* (VAN AELST; VAN WENT, 1992), cebola (GOLASZWESKA; BEDNARSKA, 1999), lírio (AOUALI; LAPORTE; CLÉMENT, 2001), pimentão (BÁRÁNY et al., 2010a, 2010b) e *Quercus suber* (COSTA et al., 2014). A proporção de pectinas esterificadas e não esterificadas e sua distribuição na parede celular está relacionada com diferentes processos celulares que incluem a formação da parede do grão de pólen, especialmente a primexina (HESS; FROSCHE, 1994; MAJEWSKA-SAWKA; RODRIGUEZ-GARCIA, 2006) e a intina (BEDINGER, 1992; GEITMAN et al., 1995; LI et al., 1995; VAN AELST; VAN WENT, 1992), com acúmulo nas regiões de abertura do grão de pólen (TAYLOR; HEPLER, 1997).

Proteínas arabinogalactanas (AGPs) têm sido estreitamente associadas com a função reprodutiva e acredita-se que desempenham um importante papel no desenvolvimento da antera e do grão de pólen (MA; SUNDARESAN, 2010; COSTA et al., 2013; COIMBRA et al., 2009; LEVITIN et al., 2008; PEREIRA et al., 2006). Evidências implicando AGPs na reprodução sexual foram obtidas por diversos grupos, para várias espécies (COIMBRA; SALEMA, 1997; COIMBRA; DUARTE, 2003; COIMBRA et al., 2005; EL-TANTAWY et al., 2013) e têm

demonstrado ser diferencialmente expressas durante o desenvolvimento gametófito, tornando-se um importante marcador do desenvolvimento reprodutivo (COIMBRA et al., 2007, 2009; PEREIRA et al., 2014). AGPs e pectinas podem ser localizadas em tecidos e células, através da utilização de anticorpos monoclonais que permitem a sua visualização e distribuição (KNOX, 1997).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as alterações celulares e o padrão de distribuição de pectinas esterificadas e não-esterificadas e AGPs durante o desenvolvimento gametofítico masculino nas bromélias ornamentais *Aechmea gamosepala* Wittm e *Aechmea correia-araujo* E. Pereira & Moutinho, e o envolvimento dessas moléculas em etapas específicas do desenvolvimento, na busca de marcadores com uso potencial na embriogênese a partir de micrósporos de Bromeliaceae.

5.2 Material e Métodos

Botões florais em diferentes fases de desenvolvimento dos grãos de pólen das espécies *Aechmea correia-araujo* E. Pereira & Moutinho e *Aechmea gamosepala* Wittm, foram coletados de plantas cultivadas em casa de vegetação no CENA/USP, Piracicaba, SP, sob condições ambientais. Em seguida, as amostras foram fixados em paraformaldeído (4%) em tampão fosfato salino (PBS) (Fosfato-K 20 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM), sob vácuo, durante 15 min. e mantidas a 4°C durante a noite. Na sequência as amostras foram lavadas três vezes em PBS durante 15 min. e armazenadas em paraformaldeído (0,1%), a 4°C.

As anteras foram excisadas dos botões florais com auxílio de estereomicroscópio, pós-fixadas em paraformaldeído (4%) em PBS por 24 h e desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90% uma vez e 100% três vezes), a 4°C, por 60 min em cada solução. Em seguida as anteras foram infiltradas em mistura de resina (Technovit 8100, Kulzer, Alemanha) e acetona nas proporções 1:3, 1:1, 3:1, por ao menos três horas em cada solução e resina pura, por 24 horas, sob agitação. Após esse período, as amostras foram emblocadas em resina, cápsulas de gelatina (Agar Scientific) e polimerizadas a 4°C, por 48 h. Cortes longitudinais semifinos (1-5 µm) foram obtidos em ultramicrotomo (LKB Ultratome III) com navalha de vidro, dispostos em lâminas histológicas para análises citoquímicas e em pocinhos de lâminas revestidas com APTES (3-aminopropiltietoxisilano, Sigma) (RENTROP et al., 1986) para imunofluorescência.

Para observações estruturais, cortes semifinos foram corados em solução de azul de toluidina (1%), por dois minutos e em seguida lavados em água para retirada do excesso de corante. A detecção de amido foi realizada com solução de iodeto de potássio (I_2KI) (2g de KI e 0,2g de I em 100 ml de água destilada) por 10 min, ambos seguidos de lavagem com água destilada para remoção do excesso de corante. Após secos, os cortes foram cobertos permanentemente com lamínula e “Eukitt” (Kindler GmbH & Co), observados em campo claro, em microscópio óptico Carl (Carl Zeiss, Zeiss 68105, Alemanha) acoplado a câmara digital (Leica DFC 420C).

Para localização de atividade de RNA, detecção do núcleo e dos componentes de parede celular, pectinas esterificadas e não esterificadas, e proteínas arabinogalactanas, seções semifinas (1-5 μm) de anteras foram hidratadas por 5 minutos em água destilada, lavadas em PBS por 5 minutos e as regiões inespecíficas foram bloqueadas com soro bovino de albumina (BSA) (5%), por 5 minutos. Em seguida, foram encubados no escuro com os anticorpos monoclonais primários anti-RNA puro para detecção de atividade de RNA, JIM 5 e JIM 7, pectina não esterificada e esterificada, e para AGPs, JIM 13, JIM 14, LM 6 e MAC 207 (diluídos 1:5) e LM 2 (diluído 1:10 em 1% BSA em PBS), durante uma hora à temperatura ambiente (Tabela 1). Posteriormente foram lavados três vezes em PBS, por 5 minutos, revelados com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 IgG anti-camundongo para anti-RNA e Alexa Fluor 488 IgG anti-rato (Molecular Probe) para os demais anticorpos primários, ambos diluídos 1:25 em PBS, durante 45 minutos no escuro. Em seguida as seções foram lavadas em PBS, contrastadas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1 mg/mL), por 5 minutos no escuro, lavadas três vezes com água destilada e as seções recobertas com Mowiol (Polysciences, Eppelheim, Alemanha). Amostra controle para todos os anticorpos foi feita substituindo o anticorpo primário por PBS.

As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio confocal laser espectral (CLSM) (Leica TCS-SP5, Alemanha) e as imagens capturadas por câmara digital.

Tabela 5.1 – Anticorpos monoclonais primários utilizados para caracterização do padrão de distribuição de proteínas arabinoglucanas por imunofluorescência durante o desenvolvimento do gametófito masculino em anteras de espécies de *Aechmea*.

Anticorpo	Tipo	Antígeno	Diluição	Referência
Anti-RNA D44	Camundongo	RNA total celular	Puro	Eilat D. et al., 1991
JIM 5	Rato	Pectina não esterificada	1:5	Knox J.P., 1997
JIM 7	Rato	Pectina esterificada	1:5	Knox J.P., 1997
JIM 13	Rato	Proteínas arabinogalactana	1:5	Knox et al., 1991
JIM 14	Rato	Proteínas arabinogalactana	1:5	Knox et al., 1991
LM 2	Rato	(1→4) β-D-galactano	1:10	Smallwood et al., 1996
LM 6	Rato	(1 → 5) α-L-arabinanos	1:5	Willats et al., 1998
MAC 207	Rato	Proteínas arabinogalactana	1:5	Pennell et al., 1989

5.3 Resultados

Foram definidas oito fases do desenvolvimento gametofítico masculino de *A. gamosepala*, cinco fases da microsporogênese (célula mãe do micrósporo, célula mãe do micrósporo em meiose, díade, tétrade, tétrade com primexina) e três fases da microgametogênese (pólen jovem, pólen médio e pólen maduro) e duas fases da microgametogênese (pólen médio e pólen maduro) de *A. correia-araujo*.

Na fase pré-meiótica da microsporogênese de *A. gamosepala* as anteras apresentam as cinco camadas bem definidas. A célula mãe do micrósporo no centro é rodeada pelo tapete, camada média, endotécio e epiderme. As células mãe dos micrósporos têm parede celular fina, estão organizadas de forma compacta, apresentam núcleo arredondado, proeminente, nucléolo e citoplasma denso (Figura 5.1A-B). A imunofluorescência com anti-RNA mostra marcação intensa no nucléolo e citoplasma, indicativo de uma grande população ribossômica, característica de intensa atividade metabólica (Figura 5.1C). Após essa fase, a célula mãe do micrósporo entra em meiose e observa-se a formação da parede ao redor dos microsporócitos (Figura 5.1D), quando se inicia a deposição de calose. As células apresentam-se arredondadas, núcleo com cromatina descondensada e intensa atividade metabólica no tapete, marcada por imunofluorescência com anti-RNA (Figura 5.1D-F). À medida em que avança a divisão meiótica a célula permanece envolta pela

camada de calose, observando-se díades com células alongadas e tétrades em duas fases. A primeira em citocinese com os quatro micrósporos haploides envolvidos pela camada de calose (Figura 5.1J e M) e a segunda revestida por uma fina parede, a primexina, parede inicial do micrósporo (Figura 5.1 G-O).

A marcação imunofluorescente com anti-RNA, observada nas células mãe do micrósporo e ausente nos outros tecidos nesta fase (Figuras 5.1C), apresenta forte marcação nas células do tapete durante toda a fase de divisão meiótica (Figuras 5.1F, I, L, O), estando ausente nos microsporócitos da fase inicial da meiose e díades (Figuras 5.1F, I). A marcação volta a aparecer fracamente no citoplasma dos meiócitos haploides, com maior intensidade na fase de tétrades com primexina (Figuras 5.1L, O).

Figura 5.1 – Estrutura celular e atividade de RNA durante a microsporogênese de *Aechmea gamosepala*. A-C: Célula mãe do micrósporo; D-F: Célula mãe do micrósporo em meiose; G-I: Díade; J-L: Tétrade. M-N: Tétrade com primexina (seta). A, B, D, E, G, H, J, K, M, N: Citoquímica com azul de toluidina; C, F, I, L, O: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e coloração com DAP (azul). Detalhe da célula. ta: tapete; asterisco: calose; Barras: A, G = 25 μm ; B, C, D, F, I, J = 50 μm ; E, H, K, L, N = 100 μm e Detalhes C, F, I, L, O = 10 μm .

A microgametogênese se inicia após a dissolução da calose e liberação dos micrósporos. A fase de pólen jovem é formada por duas células diferentes, resultantes de uma divisão assimétrica: a célula vegetativa, maior, com núcleo esférico e central e a célula generativa, esférica e comparativamente menor (Figura 5.2A). A marcação com DAPI revela a diferença no padrão de cromatina das duas células, o núcleo vegetativo apresenta cromatina mais descondensada, enquanto o núcleo da célula generativa possui padrão de cromatina muito condensado com marcação fluorescente intensa (Figura 5.2C). Na fase de pólen médio, o núcleo vegetativo permanece no centro e a célula generativa periférica começa a se deslocar para o centro (Figura 5.2D). Finalmente, na fase de pólen maduro a célula generativa adquire uma forma fusiforme e posteriormente se dividirá formando as duas células espermáticas responsáveis pela dupla fertilização (Figura 5.2G).

Durante a microgametogênese observa-se também um padrão de acúmulo e degradação de amido. O pólen jovem apresenta grande acúmulo de amido e fraca marcação imunofluorescente com anti-RNA no citoplasma da célula vegetativa, indicando grande quantidade de reservas e baixa atividade metabólica (Figura 5.2B-C). À medida em que o pólen se desenvolve as reservas de amido presentes no citoplasma se reduzem, sendo ausente na fase de pólen maduro (Figura 5.2E,H). Por outro lado, a imunoflorescência com anti-RNA revela marcação crescente de populações de ribossomos no citoplasma (Figura 5.2F,I). Os controles negativos realizados com eliminação do anticorpo primário, anti-RNA D44, não mostrou marcação significativa (dados não apresentados).

Aechmea correia-araujo apresentou mudanças celulares semelhantes às observadas em *A. gamosepala*, durante as fases de pólen médio e pólen maduro, com redução de grãos de amido e aumento de populações de ribossomos no citoplasma à medida em que o pólen se desenvolve (Figura 5.3).

Figura 5.2 – Estrutura celular, acúmulo de amido e atividade de RNA durante a megasporogênese de *Aechmea gamosepala*. A-C: Pólen jovem; D-F: Pólen médio; G-I: Pólen maduro. A, D, G: Citoquímica com azul de toluidina; B, E, H: Citoquímica com I₂KI para amido; C, F, I: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e coloração com DAP (azul). cg: célula generativa; cv: célula vegetativa; seta: célula generativa em formato fusiforme. Barras: A, C, D, F, G, I = 25 µm; B, E, H = 20 µm;

Figura 5.3 – Estrutura celular, acúmulo de amido e atividade de RNA durante a megasporogênese de *Aechmea correia-araujo*. A-C: Pólen médio; D-F: Pólen maduro; A, D: Citoquímica com azul de toluidina; B, E: Citoquímica com I_2KI para amido; C, F: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e coloração com DAP (azul). cv: célula vegetativa; setas: célula generativa em formato fusiforme (D) e ausência de amido em pólen maduro (E). Barras: A, C, D, F = 25 μm ; B, E = 20 μm ;

5.3.1 Modificações na parede celular

5.3.1.1 Distribuição de pectinas esterificadas e não esterificadas

A distribuição das pectinas foi analisada por imunolocalização e posterior análise em microscópio confocal a laser, com os anticorpos JIM5 e JIM7 como marcadores de pectinas não esterificadas e esterificadas, respectivamente. O padrão de distribuição foi avaliado durante a microsporogênese e microgametogênese de *A. gamosepala* e microgametogênese de *A. correia-araujo*.

Pectinas não esterificadas e esterificadas estão presentes em todas as fases do desenvolvimento gametofítico de *A. gamosepala* (Tabela 5.2). Na microsporogênese, os epitopos reconhecidos por JIM5 foram detectados com elevada intensidade na parede celular das células esporogênicas e células do tapete (Figura 5.4). Na fase pré-meiótica a marcação foi seletiva para parede celular de células mãe do micrósporo (Figura 5.4A-C). À medida em que avança o desenvolvimento a intensidade de marcação diminui, sendo observada ao redor da calose até a fase de díade, não sendo mais detectadas após essa fase

(Figura 5.4D-O). A parede celular interna de células do tapete é fortemente marcada durante as fases de diferenciação celular, que compreende a fase de célula mãe do micrósporo em meiose até a fase de tétrade (Figura 5.4D-O). Nas fases finais de desenvolvimento do grão de pólen, o anticorpo JIM5 é detectado fracamente nas regiões das aberturas dos grãos de pólen. (Figura 5.5).

Figura 5.4 - Imunolocalização de pectinas não esterificadas com anticorpo JIM5 durante diferentes fases da microsporogênese de *Aechmea gamosepala*. A, D, G, J, M: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e imagem em campo claro (BF). B, C, E, F, H, I, K, L, M, N, O: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: A, B, D, E = 75 µm; C, F, I, L, O = 10 µm; G, H, J, K, M, N = 25 µm.

Figura 5.5 - Imunolocalização de pectinas não esterificadas com anticorpo JIM5 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C, E: Imagem em campo claro (BF); B, D, F: Imunofluorescência com JIM5 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

A marcação com JIM7, diferentemente de JIM5, mostra distribuição onipresente de pectinas esterificadas durante todo desenvolvimento do pólen de *A. gamosepala*, em todos os tipos celulares. Células do tapete e célula do tecido esporogênico apresentaram distribuição variada de pectinas na parede celular ao longo do desenvolvimento. Na fase de célula mãe do micrósporo, que antecede a fase de diferenciação celular, as células apresentaram fraca marcação na parede celular e ausência de marcação nas células do tapete (Figura 5.6A-C). A parede celular dessas células teve forte marcação na parte interna, nas fases de divisão meiótica e manteve-se presente até o final da divisão (Figura 5.6D-O).

A marcação imunofluorescente com o anticorpo JIM7 apresentou maior intensidade de marcação na célula mãe em meiose e foi diminuindo com o avanço da divisão mitótica, tornando quase ausente ao redor da calose da tétrade em citocinese (Figura 5.6 D-L). Porém, volta a aparecer com maior intensidade ao redor da primexina recém-formada nos micrósporos agrupados em tétrades no interior da calose e podemos observar uma fraca marcação descontínua ao redor da calose (Figura 5.6M-O).

Ao final do desenvolvimento o anticorpo JIM7, assim como JIM5, é detectado nas regiões de aberturas, porém com maior intensidade, sendo também detectado na intina e no citoplasma celular de grãos de pólen jovens, indicando um alto conteúdo de pectinas esterificadas. A intensidade de marcação na região da intina aumenta com a maturação do pólen (Figura 5.7A-F).

A distribuição de pectinas não esterificadas ao final do desenvolvimento do grão de pólen em *A. correia-araujoi* foi semelhante à *A. gamosepala* (Tabela 5.2), mostrando conservação do processo. Em grãos de pólen na fase de pólen médio a marcação imunofluorescente com o anticorpo JIM5 foi detectada fracamente nas regiões de abertura e foi mais intensa em grãos de pólen na fase de pólen maduro, nesta fase a marcação também foi detectada na região da intina, indicando elevado conteúdo de pectina não esterificada (Figura 5.8A-D).

A marcação com JIM7 nas fases de pólen médio e pólen maduro em *A. correia-araujoi* apresentou o mesmo padrão de marcação observado para *A. gamosepala*, marcação nas regiões do pólen e intina (Figura 5.8E-H). Em ambos os casos, nas duas espécies, não foi observada marcação fluorescente na exina.

Os controles negativos realizados eliminando o anticorpo primário, não apresentaram marcação significativa em nenhum dos casos.

Figura 5.6 - Imunolocalização de pectinas esterificadas com anticorpo JIM7 durante diferentes fases da microsporogênese de *Aechmea gamosepala*. A, D, G, J, M: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e imagem em campo claro (BF). B, C, E, F, H, I, K, L, M, N, O: Imunofluorescência com anti-RNA (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: A, B, D, E, G, H, J, K, M, N = 75 μ m; C, F, I, L, O = 25 μ m.

Figura 5.7 - Imunolocalização de pectinas esterificadas com anticorpo JIM7 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C, E: Imagem em campo claro (BF); B, D, F: Imunofluorescência com JIM7 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

Figura 5.8 - Imunolocalização de pectinas não esterificadas e esterificadas com os anticorpos JIM5 e JIM7 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea correia-araujoii*. A, C, E, G: Imagem em campo claro (BF); B, D: Imunofluorescência com JIM5 (verde) e coloração com DAPI (azul). F, H: Imunofluorescência com JIM7 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

5.3.1.2 Distribuição de proteínas arabinogalactanas (AGPs) durante a microsporogênese e microgametogênese

Presença e distribuição de AGPs foram analisadas por imunofluorescência com cinco anticorpos monoclonais anti-AGP, LM2, LM6, MAC207, JIM13 e JIM14 durante as mesmas fases da microsporogênese e microgametogênese de *A. gamosepala* e microgametogênese de *A. correia-arauji*. Os resultados obtidos no presente trabalho são resumidos na tabela 5.3.

A marcação com os anticorpos LM2 e LM6 foi baixa e apresentou ampla distribuição na parede da antera nas diferentes fases da microsporogênese (Figuras 5.9 e 5.11). Epitopos de AGP reconhecidos pelo anticorpo LM2 apresentou ampla distribuição na antera (Figuras 5.9) e foram ausentes nas células esporogênicas e tapete da fase pré-meiotica (Figuras 5.9A-C). Com o avanço da meiose a marcação ao redor da parede de calose desaparece das tétrades e mostra maior intensidade de marcação na parede das células do tapete (Figuras 5.9J-O). O anticorpo LM6 também apresenta ampla distribuição nos diferentes tecidos da antera (Figuras 6.11), com ausência de marcação nas células do tapete na fase de célula mãe do micrósporo, que antecede a divisão meiótica (Figuras 5.11A-C). No entanto, diferentemente de LM2 a parede celular das células esporogênicas foi marcada fracamente, evidenciando a presença dessas AGP antes mesmo da diferenciação celular, a marcação permanece ao redor da calose até o final da meiose.

Figura 5.9 - Imunolocalização de AGP com anticorpo LM2 durante diferentes fases da microsporogênese de *Aechmea gamosepala*. A, D, G, J, M: Imunofluorescência com LM2 (verde) e imagem em campo claro (BF). B, C, E, F, H, I, K, L, M, N, O: Imunofluorescência com LM2 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: A, B, D, E, G, H, J, K, M, N = 75 μ m; C, F, I, L, O = 25 μ m.

Figura 5.11 - Imunolocalização de AGP com anticorpo LM6 durante diferentes fases da microsporogênese de *Aechmea gamosepala*. A, D, G, J: Imunofluorescência com LM6 (verde) e imagem em campo claro (BF). B, C, E, F, H, I, K, L: Imunofluorescência com LM2 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: A, B, D, E, G, H, J, K = 75 µm; C, F, I, L, O = 25 µm.

Após a divisão mitótica na fase de pólen maduro, epitopos reconhecidos pelo anticorpo LM2 reaparece, em baixa intensidade, no citoplasma da célula vegetativa (Figuras 5.10C-F), enquanto LM6 é marcado durante todas as fases da microgametogênese após a mitose (Figura 5.11). As células apresentam clara marcação na região da intina, parede da célula generativa e pequenas pontuações no citoplasma (Figuras 5.12A-F). A intensidade de marcação na intina e ao redor da célula generativa aumenta progressivamente com a maturação do grão de pólen.

A marcação com LM2 e LM6 nas fases de gametogênese de *A. correia-araujoi* foi similar ao encontrado em *A. gamosepala*. O anticorpo LM2 não reconheceu nenhum epitopo de AGP, nem mesmo no citoplasma do pólen maduro (Figura 5.13A-D). LM6 também foi detectado na região da intina, citoplasma da célula vegetativa e ao redor da célula generativa (Figura 5.13E-H).

Figura 5.10 - Imunolocalização de AGP com anticorpo LM2 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C: Imagem em campo claro (BF); B, D: Imunofluorescência com LM2 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

Figura 5.12 - Imunolocalização de AGP com anticorpo LM6 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C, E: Imagem em campo claro (BF); B, D, F: Imunofluorescência com LM2 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

Figura 5.13 - Imunolocalização de AGP com anticorpos LM2 e LM6 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea correia-araujo*. A, C, E, G: Imagem em campo claro (BF); B, D: Imunofluorescência com LM2 (verde) e coloração com DAPI (azul). F, H: Imunofluorescência com LM6 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

O anticorpo MAC207 apresentou um padrão de distribuição distinto de LM2 e LM6. Epitopos reconhecidos por este anticorpo parecem estar relacionados com etapas mais avançadas do desenvolvimento do pólen. Nas fases iniciais de desenvolvimento, observou-se

marcação somente na parede da antera de *A. gamosepala* (Figura 5.14). Nas etapas finais de desenvolvimento, após a divisão assimétrica, a marcação foi detectada fracamente no citoplasma da célula vegetativa de grãos de pólen nas fases de pólen médio (Figura 5.15D) e pólen maduro, nesta fase, também foi detectada na intina e no citoplasma extracelular ao redor dos poros (Figura 5.15F). Em *A. correia-araujo* MAC207 marcou fracamente regiões da intina do pólen médio e pólen maduro, bem como pequenas pontuações no citoplasma da célula vegetativa do pólen maduro (Figura 5.16A-D).

Figura 5.14 - Imunolocalização de AGP com anticorpo MAC207 durante diferentes fases da microsporogênese de *Aechmea gamosepala*. A, D, G: Imunofluorescência com MAC207 (verde) e imagem em campo claro (BF). B, C, E, F, H, I: Imunofluorescência com LM2 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: A, B, D, E, G, H = 75 μ m; C, F, I = 25 μ m.

Figura 5.15 - Imunolocalização de AGP com anticorpo MAC207 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C, E: Imagem em campo claro (BF); B, D, F: Imunofluorescência com MAC207 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μm.

Figura 5.16 - Imunolocalização de AGP com anticorpo MAC207 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea correia-araujo*. A, C: Imunofluorescência com MAC207 (verde) e imagem em campo claro (BF); B, D: Imunofluorescência com MAC207 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

O padrão de marcação dos anticorpos JIM13 e JIM14 foram diferentes dos outros anticorpos. Durante a microsporogênese não houve marcação em nenhuma das fases iniciais de desenvolvimento do pólen em *A. gamosepala*. Durante as fases de maturação do pólen, JIM13 e JIM14 exibem padrão de distribuição similar (Figura 5.17 e Figura 5.18). Epitopos reconhecidos por JIM13 foram detectados ao redor da célula generativa e no interior de vesículas ricas em amido, no citoplasma da célula vegetativa, como evidenciado por coloração com iodeto de potássio (Figura 5.2B, E). Com o avanço do desenvolvimento do pólen a intensidade de marcação no citoplasma diminui, enquanto aumenta ao redor da célula generativa (Figura 5.17A-F). JIM14 foi detectado fracamente no citoplasma da célula vegetativa, como pontuações dispersas no citoplasma. No entanto, a intensidade da marcação aumenta à medida em que avança o desenvolvimento do pólen (Figura 5.18A-F). Na microgametogênese de *A. correia-araujo* epitopos reconhecidos pelo anticorpo JIM13 também foram detectados no citoplasma da célula vegetativa e ao redor da célula

generativa, porém a intensidade de marcação no citoplasma do pólen maduro foi maior do que a detectada em *A. gamosepala* (Figura 5.19A-D). JIM14 foi detectado no citoplasma da célula vegetativa, como ocorre em *A. gamosepala* a intensidade da marcação aumenta à medida em que avança o desenvolvimento do grão de pólen (Figura 5.19E-H).

Os controles negativos de todos os anticorpos, não apresentou marcação significativa em nenhum compartimento subcelular (dados não apresentados).

Figura 5.17 - Imunolocalização de AGP com anticorpo JIM13 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C, E: Imagem em campo claro (BF); B, D, F: Imunofluorescência com JIM13 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 µm.

Figura 5.18 - Imunolocalização de AGP com anticorpo JIM14 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea gamosepala*. A, C, E: Imagem em campo claro (BF); B, D, F: Imunofluorescência com JIM14 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

Figura 5.19 - Imunolocalização de AGP com anticorpos JIM13 e JIM14 durante diferentes fases da microgametogênese de *Aechmea correia-araujo*. A, C, E, G: Imagem em campo claro (BF); B, D: Imunofluorescência com JIM13 (verde) e coloração com DAPI (azul). F, H. Imunofluorescência com JIM14 (verde) e coloração com DAPI (azul). Barras: 25 μ m.

5.4 Discussão

5.4.1 Determinação das etapas do desenvolvimento gametofítico por modificações no núcleo e citoplasma

As modificações celulares observadas durante o desenvolvimento do gametófito masculino de *A. gamosepala* e *A. correia araujo* são semelhantes às observadas na maioria das angiospermas. O grão de pólen é desenvolvido no interior das anteras (DREWS; YADEGARI, 2002) com a diferenciação das células mãe do micrósporo que, através do processo de meiose, produzem quatro células haploides, os micrósporos, que após divisão mitótica assimétrica diferenciam-se (GOLDBERG; BEALS; SANDERS, 1993) formando o grão de pólen bicelular que é liberado pela deiscência da antera (MA, 2005) e sofre uma nova divisão mitótica formando o gameta masculino.

As mudanças na estrutura e organização celular, atividade de RNA e distribuição de amido mostraram-se excelentes marcadores de fases do desenvolvimento gametofítico de *A. gamosepala* e *A. correia-araujo*, podendo auxiliar na definição de etapas adequadas para processos biotecnológicos, como a indução de embriogênese a partir de micrósporo.

As cinco fases da microsporogênese de *A. gamosepala* mostram uma clara diferenciação na organização celular e na atividade de RNA. Antes da divisão mitótica a célula mãe do micrósporo apresenta citoplasma e nucléolos denso em intensa atividade transcricional, presente também no citoplasma das células do tapete ao longo da meiose. Quando a célula mãe entra em atividade meiótica, as células estão maiores, arredondadas, envolvidas por calose e a marcação com anti-RNA desaparece do citoplasma até reaparecer no citoplasma dos meiócitos, no final da divisão meiótica. As duas fases de tétrades se diferenciam pela presença da primexina, que coincide com a fase de degradação da calose.

A variação na atividade transcricional nas células esporogênicas reflete diferentes estados de atividade celular. Intensa atividade metabólica é característica de células em interfase, período que antecede o processo de divisão celular, após esse período a célula entra em divisão e a atividade transcricional é reduzida. Por outro lado a atividade metabólica permanente nas células do tapete revela a participação ativa desse tecido nas fases iniciais do desenvolvimento do pólen.

O tapete, tecido secretor efêmero que nutre e regula o desenvolvimento do grão de pólen, é em grande parte responsável pela síntese e deposição de esporopolenina e outros componentes de parede para a formação da esporoderme, se degenerando antes ou durante a primeira mitose haploide (MCCORMICK, 1993; PACINI, 1997). A primexina pode ser observada enquanto as tétrades ainda estão revestidas pela calose.

Na microgametogênese, o micrósporo se divide de forma assimétrica formando duas células com características bem distintas em termos de tamanho, forma, quantidade de amido e atividade transcricional. Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam claramente essas diferenças em *A. gamosepala* e *A. correia araujoi*.

Após a primeira divisão mitótica, o núcleo generativo se localiza na periferia da célula, em contato com a exina, enquanto o núcleo vegetativo se localiza no centro da célula, caracterizando a fase de pólen jovem. À medida em que o processo de maturação se avança, a célula generativa englobada pela vegetativa migra para o centro do grão de pólen até situar-se próximo ao núcleo da célula vegetativa. A célula generativa sofre uma alteração em forma, por ação de feixes de microtúbulos e torna-se fusiforme, que caracteriza o pólen maduro bicelular (TERASAKA; NIITSU, 1990).

A divisão mitótica assimétrica é determinante no processo de diferenciação celular, resultando em duas células com diferentes destinos celulares (MCCORMICK, 1993). O núcleo da célula generativa é pequeno, apresenta cromatina condensada, relacionada com atividade transcricional muito baixa, ou ausente. O núcleo da célula vegetativa, de maior tamanho, apresenta cromatina descondensada, com núcleo proeminente, associado a alta atividade transcricional durante a maturação do grão de pólen (MCCORMICK, 1993; TESTILLANO et al., 1995).

A célula generativa está inativa, à espera da segunda mitose do pólen que origina as duas células espermáticas, os gametas. Enquanto a célula vegetativa apresenta elevada atividade biossintética relacionada à formação do tubo polínico (TESTILLANO; RISUEÑO, 1998). Esta variação está relacionada com diferentes funções durante a maturação e germinação do pólen. Essas diferenças constituem-se em um bom marcador de desenvolvimento gametofítico do pólen de *A. correia-araujoi* e *A. gamosepala*.

A quantidade diferenciada de grãos de amido no citoplasma da célula vegetativa e a densidade de marcação de RNA total ao longo do desenvolvimento demonstram a dinâmica funcional do amido e atividade transcricional durante a microgametogênese.

Os resultados obtidos com a análise citoquímica para amido e imunofluorescência com anti-RNA indicaram grande quantidade de amido no citoplasma da célula vegetativa após a primeira mitose, esse amido é degradado ao longo do desenvolvimento e desaparece no pólen maduro em pré-antese, enquanto a população de RNA no citoplasma da célula vegetativa é baixa e aumenta de forma progressiva à medida em que a quantidade de amido se reduz. Durante a fase de acúmulo de amido, a síntese de proteínas é baixa, mas pouco antes da deiscência das anteras, peptídeos básicos são sintetizados para serem utilizados durante a germinação do pólen (MCCORMICK, 1993).

Esta organização estrutural coincide com a atividade metabólica característica de pólen durante o processo de maturação, que inclui elevada atividade biossintética e armazenamento proteico e energético.

O desenvolvimento de plastídios e acumulação de amido constitui uma característica diferencial durante a formação do pólen em muitas espécies (FRANCHI et al., 1996). Em algumas espécies, as reservas de carboidratos do pólen maduro não são em forma de grãos de amido, mas sim em forma de polissacarídeos citoplasmáticos, especialmente sacarose (FRANCHI et al., 1996; PACINI, 1996).

Na maioria das espécies o amido é hidrolisado antes da antese para formar sacarose que protege o pólen contra dissecação. Pólen com pouco e/ou sem amido é o tipo de pólen mais comum nas angiospermas, sendo mais frequente em pólen bicelular do que no triclular (FRANCHI et al., 1996). Isso explicaria a ausência de amido nos grãos de pólen maduros em *A. correia-araujo* e *A. gamosepala*.

5.4.2 Distribuição de pectinas durante o desenvolvimento do grão de pólen de *Aechmea gamosepala* e *Aechmea correia-araujo*

As pectinas são um dos principais componentes da parede celular de plantas e apresentam diferentes graus de esterificação. A esterificação das pectinas é realizada por enzimas pectinametilesterase envolvidas em processo de desenvolvimento específico que modulam a relação de pectinas esterificadas e não esterificadas e sua distribuição na parede celular (DOLAN; LINSTED; ROBERTS, 1997; HASEGAWA et al., 2000; WILLATS et al., 2001a, 2001b). O anticorpo JIM5 reconhece epitopos de homogalacturonano não esterificados e

JIM7 epitopos de homogalacturonano metilesterificados de paredes celulares de diversas espécies de plantas (KNOX, 1997).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram diferenças no padrão de distribuição, assim como na proporção de pectinas esterificadas e não esterificadas na parede celular de diferentes tipos de células da antera e do grão de pólen de *A. gamosepala* e *A. correia-arauji* durante a microsporogênese e microgametogênese (Tabela 5.2).

Epitopos de homogalacturonano não esterificados reconhecidos pelo anticorpo JIM5 são preferencialmente distribuídos na microsporogênese, na parede das células esporogênicas e do tapete, em diferentes proporções. Em etapas mais avançadas do desenvolvimento se distribuem fracamente na região dos poros.

A marcação de pectinas não esterificadas na microsporogênese é maior em paredes de células em proliferação, ou seja, célula mãe do micrósporo e tapete. Quando a célula mãe do micrósporo começa a se diferenciar a intensidade de marcação de pectinas não esterificadas é reduzida, sendo ausentes na parede de calose que envolve as tétrades.

Pectinas esterificadas são amplamente distribuídas na microsporogênese de *A. gamosepala*, em todos os tipos celulares com variações na parede celular das células esporogênicas e do tapete. Na microgametogênese, estão distribuídas preferencialmente na região dos poros e intina.

A quantidade de pectinas esterificadas é moderada na parede da célula mãe do micrósporo e torna-se mais intensa quando as células entram em divisão meiótica e à medida em que a célula se divide a marcação de pectinas é reduzida, sendo quase ausentes na parede de calose que está sendo degradada. No entanto, a marcação reaparece fortemente na primexina que se forma ao redor dos micrósporos, que serão liberados das tétrades. Na microgametogênese, a quantidade de pectinas esterificadas presentes nos poros e intina aumenta com a maturação do pólen.

Tabela 5.2 - Padrão de distribuição de pectinas não esterificadas e pectinas esterificadas na parede celular durante diferentes fases da microsporogênese e microgametogênese de *Aechmea gamosepala* e microgametogênese de *Aechmea correia-araujoi*.

<i>Aechmea gamosepala</i>				
Microsporogênese	Fases	Tipos Celulares	JIM5 Pectina não esterificada	JIM7 Pectina esterificada
	Célula mãe do micrósporo	Parede da antera	—	+
		Tapete	—	—
		Célula mãe do micrósporo	+++	++
	Célula mãe em meiose	Parede da antera	—	+
		Tapete	+++	+++
		Célula mãe do micrósporo em meiose	++	+++
	Díade	Parede da antera	—	+
		Tapete	+++	+++
		Díade	+	++
	Tétrade	Parede da antera	—	+
		Tapete	+++	+++
		Tétrade	—	+
Tétrade com primexina	Parede da antera	—	+	
	Tapete	+++	+++	
	Tétrade com primexina	—	+	
Microgametogênese	Fases	Local	JIM5 Pectina não esterificada	JIM7 Pectina esterificada
	Pólen Jovem	Poro	+	++
		Intina	—	+
	Pólen médio	Poro	+	++
		Intina	—	++
	Pólen maduro	Poro	+	+++
		Intina	—	+++
Microgametogênese	<i>Aechmea correia-araujoi</i>			
	Fases	Local	JIM5 Pectina não esterificada	JIM7 Pectina esterificada
	Pólen médio	Poro	+	+++
		Intina	—	++
	Pólen maduro	Poro	+++	+++
Intina		++	+++	

A intensidade de marcação varia de — (ausente) a +++.

Esse padrão de marcação observado na microsporogênese pode estar relacionado com o sinal que deve ser gerado para liberação da calase e degradação da calose pelas células do tapete, ou um tipo de sinal específico relacionado com o desenvolvimento gametofítico. A forte marcação do tapete nesta fase mostra que esse tecido sintetiza e secreta essas moléculas (COIMBRA et al., 2007).

A distribuição de pectinas esterificadas e não esterificadas na microgametogênese em *A. correia-araujoi* foi semelhante à observada em *A. gamosepala*. Pectinas não esterificadas estão fortemente presentes no poro do pólen maduro e as esterificadas no poro e intina do pólen maduro (Tabela 5.3).

O tapete é um tecido secretor que nutre e regula o desenvolvimento do pólen, a ausência de pectinas na parede celular do tapete na fase de proliferação sugere que essas substâncias são segregadas somente após a célula mãe do microsporo entrar em atividade meiótica. Aouali, Laporte e Clément (2001) analisaram a presença de pectinas durante o desenvolvimento de lírio, utilizando anticorpos monoclonais e mostraram que a pectina é produzida na parede da antera e provavelmente é segregada por células do tapete para o loco, onde é absorvido durante o desenvolvimento do pólen e torna-se um componente significativo das reservas de hidratos de carbono. Esses autores especulam que a pectina mais tarde ajuda a formar e manter a parede do tubo polínico, após a germinação.

A presença de pectinas altamente esterificadas parece estar relacionada com o processo de diferenciação do microsporo e formação da parede do grão de pólen. A posição das aberturas do grão de pólen é determinada bem cedo e a intina, ou parede interna do pólen, é produzida pelo microsporo, sendo depositada primeiramente abaixo dos poros e depois se espalha para envolver todo o microsporo, enquanto a exina, camada externa, é depositada sobre a superfície pela secreção das células do tapete e sua deposição é reduzida ou ausente ao longo das aberturas (MACCORMICK, 1993; CANKAR et al., 2014).

Padrões similares de distribuição de pectina foram observados por Costa et al. (2014) durante o desenvolvimento de pólen de *Quercus suber* que apresentou distribuição de pectinas esterificadas em todos os tipos de células e pectinas não esterificadas preferencialmente distribuídas na parede celular dos microsporócitos no início do desenvolvimento do pólen. Em *Lolium perenne* (WISNIEWSKA; MAJEWSKA-SAWKA, 2006), pectinas esterificadas foram localizadas em todas as células dentro de anteras maduras, incluindo o grão de pólen.

Barany et al. (2010a; 2010b) demonstraram que em *Capsicum annum*, pectinas altamente esterificadas foram bons marcadores de proliferação celular, enquanto que altos níveis de pectinas não esterificadas foram abundantes nas paredes das células em diferenciação. Estas observações sugerem o envolvimento de pectinas como indicadores para proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento do pólen.

Embora o desenvolvimento de pólen tenha sido descrito citologicamente, há poucos relatos sobre a composição da parede celular no desenvolvimento de pólen, embora enzimas de remodelação da parede celular estejam entre as mais abundantemente expressas durante o desenvolvimento do pólen (PINA et al., 2005).

As mudanças celulares e o padrão de distribuição de pectinas, observados na microsporogênese e microgametogênese de *A. correia-araujo* e *A. gamosepala*, obtidos nesse trabalho, podem ser considerados marcadores de fases do desenvolvimento gametofítico masculino com uso potencial na embriogênese de pólen.

5.4.3 Distribuição de proteínas arabinogalactanas (AGPs) durante o desenvolvimento do grão de pólen de *Aechmea gamosepala* e *Aechmea correia-araujo*

O resultado das marcações com anticorpos anti-AGPs sugerem três padrões de distribuição de AGPs durante o desenvolvimento gametofítico masculino de *A. gamosepala* e *A. correia-araujo* (Tabela 5.3). O elevado grau de heterogeneidade das AGPs sugere que essas proteínas apresentam mais de uma função específica (KNOX, 1997).

Epitopos de AGPs reconhecidos por LM2 foram detectados na fase inicial do desenvolvimento do pólen, sendo menos presentes, ou ausentes, na microgametogênese de *A. gamosepala* e *A. correia-araujo*. O padrão de marcação apresentado por esse anticorpo sugere que essa AGP esteja envolvida em processos relacionados à fase de microsporogênese, como também observado no desenvolvimento do pólen de *Arabidopsis thaliana* (COIMBRA et al., 2007; COSTA et al., 2014).

O anticorpo LM6 apresenta ampla distribuição ao longo do desenvolvimento gametofítico masculino, com aumento progressivo na densidade de marcação. Epitopos reconhecidos por LM6 foram fracamente marcados em todos os tecidos da antera durante a microsporogênese, com diferente grau de distribuição na parede celular do tapete e das células esporogênicas. Na microgametogênese foram detectados em toda a intina,

citoplasma da célula vegetativa e ao redor da célula generativa. Embora LM6 reconheça regiões (1-5) α -L-arabinano presentes em AGPs, essas regiões também estão presentes no domínio ramnogalacturonanos I de pectinas (WILLATS, MARCUS; KNOX, 1998). No presente trabalho, a localização de pectinas esterificadas reconhecidas por JIM7 coincidem com regiões identificadas por LM6.

A marcação de epitopos com os anticorpos MAC207, JIM13 e JIM14 indicam presença de AGPs na fase de microgametogênese, em diferentes regiões do pólen. Epitopos de AGPs reconhecidos por MAC207 foram marcados fracamente na intina e citoplasma da célula vegetativa. Observação similar com este anticorpo também foi relatada por Costa et al. (2014). JIM13 foi fortemente detectado no citoplasma da célula vegetativa, no interior de vesículas ricas em amido e ao redor da célula generativa. Com o avanço do desenvolvimento a intensidade de marcação de JIM13 diminuiu no citoplasma e aumentou ao redor da célula generativa. AGPs reconhecidas por JIM13 também foram associadas com grãos de amido de unidades reprodutivas de *Trithuria submersa* (COSTA et al., 2013) e óvulos de *Amaranthus hypochondriacus* L. (COIMBRA; DUARTE, 2003). Grãos de amido contém dois tipos de moléculas, amilose e amilopectina, composta por polímeros de glicose. A diminuição de JIM13 no citoplasma da célula vegetativa pode refletir um sistema ativo de síntese e degradação destas moléculas durante a maturação do pólen. Anti-AGPs reconhecidas por JIM14 foram detectadas no citoplasma da célula vegetativa, com aumento progressivo durante a maturação do pólen.

A identificação de AGPs por diferentes anticorpos na mesma região do pólen sugere funções semelhantes entre as diferentes AGPs. Epitopos reconhecidos por MAC207 e JIM14 no citoplasma da célula vegetativa e intina estariam envolvidos na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico, enquanto LM6 e JIM13, localizados ao redor da célula generativa, estariam relacionados com a formação dos gametas. Funções semelhantes à descrita neste trabalho foram relatadas para estes anticorpos, durante o desenvolvimento do pólen de *Brassica napus* (EL-TANTAWY et al., 2013).

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam padrões de distribuição espaço-temporais de pectinas e AGP em espécies de *Aechmea*, que podem ser utilizados como marcadores de desenvolvimento gametofítico masculino, sugerindo um papel chave destes componentes da parede celular no desenvolvimento de pólen de bromélias, dando novas perspectivas sobre o conhecimento da biologia reprodutiva destas espécies de plantas

ornamentais, ainda pouco conhecido, com elevado potencial em programas de biotecnologia e melhoramento genético.

Tabela 5.3 - Padrão de distribuição de proteínas arabinogalactanas (AGPs) identificadas por diferentes anticorpos durante diferentes fases da microsporogênese e microgametogênese de *A. gamosepala* e microgametogênese de *A. correia-arauji*.

<i>Aechmea gamosepala</i>							
Microsporogênese	Fases	Tipos Celulares	LM2	LM6	MAC207	JIM13	JIM14
	Célula mãe do micrósporo	Parede da antera	+	+	++	n.d.	n.d.
		Tapete	—	—	—	n.d.	n.d.
		Célula mãe do micrósporo	—	+	—	n.d.	n.d.
	Célula mãe em meiose	Parede da antera	+	+	++	n.d.	n.d.
		Tapete	+	+	—	n.d.	n.d.
		Célula mãe do micrósporo	+	+	—	n.d.	n.d.
	Díade	Parede da antera	+	+	++	n.d.	n.d.
		Tapete	+	++	—	n.d.	n.d.
		Célula mãe do micrósporo	++	++	—	n.d.	n.d.
	Tétrade	Parede da antera	+	+	++	n.d.	n.d.
		Tapete	++	++	—	n.d.	n.d.
		Célula mãe do micrósporo	—	++	—	n.d.	n.d.
	Tétrade com primexina	Parede da antera	+	+	++	n.d.	n.d.
		Tapete	++	++	—	n.d.	n.d.
		Célula mãe do micrósporo	—	++	—	n.d.	n.d.
Microgametogênese	Fases	Local	LM2	LM6	MAC207	JIM13	JIM14
	Pólen Jovem	Intina	—	++	—	—	—
		Citoplasma	—	+	—	+++	+
		Célula generativa	—	+	—	+	—
	Pólen médio	Intina	—	++	—	—	—
		Citoplasma	—	+	+	++	++
		Célula generativa	—	++	—	++	—
	Pólen maduro	Intina	—	+++	+	+	—
		Citoplasma	++	++	++	+	+++
		Célula generativa	—	++	—	+++	—
<i>Aechmea correia-araujoi</i>							
Microgametogênese	Fases	Local	LM2	LM6	MAC207	JIM13	JIM14
	Pólen médio	Intina	—	++	+	—	—
		Citoplasma	—	+	—	++	++
		Célula generativa	—	+	—	++	—
	Pólen maduro	Intina	—	++	+	—	—
		Citoplasma	—	+	+	+++	+++
		Célula generativa		++		+++	

A intensidade de marcação varia de — (ausente) a +++; n.d. não determinado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização morfológica e anatômica de flores das espécies de *Aechmea correia-araujo*, *A. gamosepala*, *Vriesea ensiformis* e *V. saundersii* relacionadas a aspectos da biologia reprodutiva, obtidas nesse trabalho, são compatíveis com síndrome de ornitofilia e, *A. gamosepala*, melitofilia. Esses dados associados à elevada viabilidade, superior a 93%, apresentada pelos grãos de pólen fornecem dados importantes para a definição de técnicas de seleção e combinações para o desenvolvimento de híbridos voltados para o comércio de plantas ornamentais.

Informações detalhadas entre as fases do desenvolvimento floral, desenvolvimento do óvulo e grão de pólen com o tamanho do botão floral disponibilizadas no presente estudo contribuem para aplicações biotecnológicas, melhoramento e conservação destas espécies. Botões florais de 8,7 – 13,0 mm são indicados no estudo de embriogênese a partir de micrósporo de *A. gamosepala*.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam padrões de distribuição espaço-temporais de pectinas e três principais padrões de AGP de espécies de *Aechmea*, que podem ser utilizados como marcadores de desenvolvimento gametofítico masculino, sugerindo um papel chave destes componentes da parede celular no desenvolvimento de pólen de bromélias.

As informações obtidas no presente estudo contribuem para a elaboração de técnicas de melhoramento genético convencional, biotecnológicas e conservação dessas espécies nativas, de grande potencial ornamental e ambiental.

REFERÊNCIAS

ABREU, I; OLIVEIRA, M. Immunolocalisation of arabinogalactan proteins and pectins in *Actinidia deliciosa* pollen. **Protoplasma**, v. 224, p. 123-128, 2004.

AIZZA, L.C.B. **Desenvolvimento da corona em flores do gênero *Passiflora* (Passifloraceae)**. 2010. 62p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

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 Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 1255-1260, 2010.

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

ALLARD, R.W. Sistemas reprodutivos e métodos de melhoramento de plantas. In: BLUCHER, E. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. cap. 4, p. 25-35.

ANACLETO, A.; REJANE, R.; NEGRELLE, B. Produção de bromélias no Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 121-136, 2013.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP - APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, p.105-121, 2009.

AOUALI, N.; LAPORTE, P.; CLÉMENT, C. Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development in *Lilium*, **Planta**, v. 213, p. 71-79, 2001.

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Bromeliads. In: SILVA, J. A. T. da (Org.). **Floriculture, Ornamentals and Plant Biotechnology**, Tokyo: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 644-655.

ARAÚJO, A.C.; FISCHER, E.; SAZIMA, M. As bromélias na região do Rio Verde. In: MARQUES, O.A.V.; DULEBA, W. (Ed.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins: Ambiente físico, flora e fauna**. São Paulo: Holos Editora, 2004. p. 162-171.

ARRAIS, M.G. **Aspectos anatômicos de espécies de Bromeliaceae da Serra do Cipó MG com especial referência a vascularização floral**. 1989. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências- Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, Oxford, v. 66, p. 591-600, 1979.

BALUSKA, F.; LINERS, F.; HLAVACKA, A.; SCHLICHT, M.; VAN CUTSEM, P.; MCCURDY, D. W.; MENZEL, D. Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and

accumulate within cell plates during cytokinesis. **Protoplasma**, Leipzig, v.225, p. 141-155, 2005.

BÁRÁNY I.; FADÓN, B.; RISUEÑO M.C.; TESTILLANO, P.S. Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events. Short Communication. **Plant Signaling & Behavior**, Edimburgo, v. 5, n. 4, p. 1-5, 2010a.

BÁRÁNY, I.; FADÓN, B.; RISUEÑO, M.C.; TESTILLANO, P.S. Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 1159-1175. 2010b.

BASSO-ALVES, J. P.; AGOSTINI, K.; TEIXEIRA, S. P. Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 13, p. 602-610, 2011.

BATYGINA, T.B. **Embryology of flowering plants: Terminology and concepts**. Vol. 1. Generative organs of flower. Enfield, NH: Science Publishers, 2002.

BEDINGER, P. The remarkable biology of pollen. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 4, p. 879-887. 1992.

BENNETT, B.C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: Benzing, D.H. (Ed.). **Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 587-608.

BENZING, D.H. **Bromeliaceae: profile and adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690 p.

BERED, F.; SANTOS, E. K.; SILVA, C. P.; PAGGI, G. M. Bromélias – A beleza exótica do Novo Mundo. In: BABIERI, R. H.; STUMPF, E. R. T. (Org.). **Origem e evolução de plantas cultivadas**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008. v. 1, p. 235-251.

BERNADELLO, L.M.; GALETTO, L.; JULIANI, H.R. Floral nectar, nectar structure and pollinators in some Argentinian Bromeliaceae. **Annals of Botany**, Oxford, v. 67, p. 401-411, 1991.

BHANDARI, N. The microsporangium. In: JOHR, B.M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Heidelberg: Springer Verlag, 1984. p.53-121.

BOUMAN, F. The ovule. In: JOHR, B.M. (Ed.). **Embriology of angiosperms**. Heidelberg: Springer Verlag, 1984. p.123-157.

BOWMAN, J. L.; SMYTH, D. R.; MEYEROWITZ, E. M. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. **Development**, v. 112, p. 1-20, 1991.

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.

BROWN, G.K.; GILMARTIN, A.J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic characters. **Brittonia**, New York, v. 36, n. 4, p. 364-374, 1984.

BROWN, G. K.; GILMARTIN, A.J. Stigma types in Bromeliaceae - A systematic survey. **Systematic Botany**, Kent, v. 14, p. 110-132, 1989.

BROWN, G.K.; TERRY, R.G. Petal appendages in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, New York, v. 79, n. 9, p. 1051-1071, 1992.

BUTCHER, D.; GOUDA, E. J. **The New Bromeliad Taxon List**. University Botanic Gardens, Utrecht. Available from: <http://BromTaxonList.floraPix.nl>. Accessed 4 February 2015.

BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Hummingbird-pollinated floras at three atlantic Forest sites. **Biotropica**, Washington, DC, v. 32, p. 824-841, 2000.

CAETANO, A. P. S.; CORTEZ, P. A. Reprodução assexuada. In: RECH, A.R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P.E.; MACHADO, I.C. (Org.). **Biologia da polinização**. 1. ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. p. 45-70.

CAFFALL, K.H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, n.14, p.1879-1900. 2009.

CANELA, M. B. F.; SAZIMA, M. *Aechmea pectinata*: a hummingbird– dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in south–eastern Brazil. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 731-737, 2003.

CANKAR, K.; KORTSTEE, A.; TOONEN, M. A. J.; WOLTERS-ARTS, M. et al. Pectic arabinan side chains are essential for pollen cell wall integrity during pollen development, **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 492-502, 2014.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; BETTIOL NETO, J. E. Composição de meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.231-236, 2010.

CHAPMAN, A., BLERVACQ, A. S., VASSEUR, J.; HILBERT, J. L. Arabinogalactan proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. **Planta**, v. 211, n.3, p. 305-314, 2000.

CHASAN, R. Arabinogalactan-proteins: getting to the core. **The Plant Cell**, Baltimore. v. 6, p.1519-1521. 1994

CHEUNG, A.Y.; WANG, H.; WU, H.M. A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. **Cell**, Amsterdam, v. 82, p. 383–393, 1995.

CHONE, R. M. S. Biofábrica de Bromélias. In: Gerald, L.T.S (Org.). **Biofábrica de plantas**. Produção industrial de plantas *in vitro*. 1. ed. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 208-229.

COFFANI-NUNES, J. V. Bromélias. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Senac, 2002. p. 119-132.

COFFANI-NUNES, J. V.; VERSIEUX, L.M; WANDERLEY, M.G.L.; PIRANI, J.R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Bromeliaceae – Tillandsioideae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 35-54, 2010.

COIMBRA, S.; ALMEIDA, J.; JUNQUEIRA, V.; COSTA, M.L.; PEREIRA, L.G. Arabinogalactan proteins as molecular markers in *Arabidopsis thaliana* sexual reproduction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 4027–4035, 2007.

COIMBRA, S.; ALMEIDA, J.; MONTEIRO, L.; PEREIRA, L.G.; SOTTOMAYOR, M. Arabinogalactan proteins as molecular markers for generative cell differentiation and development in *Arabidopsis thaliana*. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v. 36, supp. 1, 2005.

COIMBRA, S.; COSTA, M.; JONES, B.; MENDES, M.A.; PEREIRA, L.G. Pollen grain development is compromised in *arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p.3133–42, 2009.

COIMBRA, S.; DUARTE, C. Arabinogalactan proteins may facilitate the movement of pollen tubes from the stigma to the ovules in *Actinidia deliciosa* and *Amaranthus hypocondriacus*. **Euphytica**, Wageningen, v. 133, p. 171–178, 2003.

COIMBRA, S.; PEREIRA, L.G. Arabinogalactan proteins in *Arabidopsis* pollen development. In: Çiftçi, Y. O. ed. **Transgenic plants-advances and limitations**. Rijeka, Croatia: Inteck, 2012. p.329–352.

COIMBRA, S.; SALEMA, R. Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypocondriacus* L. ovules. **Protoplasma**, Leipzig, v. 199, p. 75–82, 1997.

CONCEIÇÃO, S.; DE TONI, K.L.G.; COSTA, C.G. Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). Revista Brasileira **Bioscience Journal**, Uberlândia. v. 5, p. 846–848, 2007.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, RIO GRANDE DO SUL. **Decreto estadual CONSEMA** n. 42.099 de 31 de dezembro de 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul e da outras providências. Porto Alegre, RS: Palácio Piratini, 2002.

COSTA, A. F.; GOMES-DA-SILVA, J.; WANDERLEY, M. G. L. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineage. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 141, p. 338-352, 2014.

COSTA, A. F.; GOMES-DA-SILVA, J.; WANDERLEY, M. G. L. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): a cladistic analysis of eastern Brazilian species based on morphological characters. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 429-440, 2015.

COSTA, A. F.; RODRIGUES, P. J. F. P.; WANDERLEY, M. G. Morphometric analysis and taxonomic revision of the *Vriesea paraibica* complex (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 159, p. 163–181, 2009.

COSTA, M. L.; PEREIRA A.M.; RUDALL P.J.; COIMBRA S. Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an earlydivergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, p. 183–190, 2013.

COSTA, M. L.; SOBRAL, R.; COSTA, M. M. R.; AMORIM, M. I.; COIMBRA, S. Evaluation of the presence of arabinogalactan proteins and pectins during *Quercus suber* male gametogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, p. 1-12, 2014.

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

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

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T.; YEO, P.F. **The families of the monocotyledons structure, evolution and taxonomy**. Heidelberg: Springer, 1985. 520p.

DARDELLE, F.; LEHNER, A.; RAMDANI, Y.; BARDOR, M.; et al. Biochemical and immunocytological characterization of *Arabidopsis* pollen tube cell wall. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, p. 1563-1576, 2010.

DOLAN, L.; LINSTED, P.; ROBERTS, K. Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 713-720, 1997.

DOMOZYCH, D. S.; KIEMLE, S.; DOMOZYCH, C. E.; GRETZ, M. R. How symmetrical are desmids? Cell wall chemistry and development in *Penium margaritaceum*. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 42, p. 47-47, 2006.

DORNELES, M. P. **Desenvolvimento inicial, caracterização estrutural da flor, androsporogênese e androgametogênese em *Dyckia racinae* L. B. Sm. (Pitcairnioideae-Bromeliaceae)**. 2013. 135p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

DREWS, G.N.; YADEGARY, R. Development and function of the angiosperm female gametophyte. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v.36, p. 99- 124, 2002.

DWIVEDI, S. L.; BRITT, A. B.; TRIPATHI, L.; SHARMA, S.; UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. **Biotechnology Advance**, v. 33, n. 1, p. 812-829, 2015.

EHLER, N.; SCHILL, R. Die Pollenmorphologie der Bromeliaceae. **Pollen et Spores**, Paris, v. 10, n. 1, p. 13-15, 1973.

EL-TANTAWY, A.A.; SOLÍS, M.T.; COSTA, M.L.; COIMBRA, S.; RISUEÑO, M.C.; TESTILLANO, P.S. Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. **Plant Reproduction**, New York, v.26, n.3, p. 231-243, 2013.

ERDTMAN, G.; PRAGLOWSKI, K. A note on pollen morphology. *In*: SMITH, L. B.; DOWNS, R.J. (Ed.). *Pitcairnioideae (Bromeliaceae)*. **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 14, n. 1. p. 28-33, 1974.

ESTRADA-LUNA, A.A.; HUANCA-MAMANI, W.; ACOSTA-GARCIA, G.; LEON-MARTINEZ, G.; BECERRA-FLORA, A.; PÉREZ-RUÍZ, R.; VIELLE-CALZADA, J.P.H. Beyond promiscuity: from sexuality to apomixis in flowering plants. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, Gaithersburg, v. 38, p. 146-151, 2002.

EVANS, T.M.; BROWN, G.K. Plicate staminal filaments in *Tillandsia* subgenus *Anoplophytum* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 76, p. 1478-1485, 1989.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L.. **The principles of pollination ecology**. 3. ed. London: Pergamon Press, 1979. 244p.

FAGUNDES, N.F.; MARIATH, J.E.A. Morphoanatomy and ontogeny of fruit in Bromeliaceae species. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 24, n. 3, p. 765-779, 2010.

FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna. v. 300, p. 1323-1336, 2014.

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

FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Cladistics Relationship of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. **Annals of the Missouri Botanic Garden**, Saint Louis, v. 91, p. 303-319, 2004.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, p. 123-142, 1968.

FERGUSON, I.K.; SKVARLA, J.J. Pollen morphology in relation to pollinators in *Papilionoideae* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 84, p. 183–193, 1982.

FERGUSON, C.; BACIC, A.; ANDERSON, M.A.; READ, S.M. Subcellular distribution of arabinogalactan proteins in pollen grains and tubes as revealed with a monoclonal antibody raised against stylar arabinogalactan proteins. **Protoplasma**, Leipzig, v.206, p.105-117, 1999.

FERREIRA, D.F. **SISVAR** - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FERRIE, A. M. R.; CASWELL, K. L. Review of doubled haploidy methodologies in ornamental species. **Propagation of Ornamental Plant**, Canada, v. 11, n. 2, p. 66-37, 2011.

FISCHER, E. A.; ARAÚJO, A. C. Spatial organization of a bromeliad community in the Atlantic rainforest, south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 11, p. 559-567, 1995.

FOISSNER, W.; STRUDER-KYPKE, M. S.; VAN DER STAAY, G. W. M.; MOON-VAN DER STAAY, S. Y.; HACKSTEIN, H. P. Endemic ciliates (Protozoa, Ciliophora) from tank bromeliads (Bromeliaceae): a combined morphological, molecular, and ecological study. **European Journal of Protistology**, v. 39, p. 365-372, 2003.

FORZZA, R. C. Revisão Taxonômica de Encholirium Mart. Ex. Schult. & Schult. F. (Pitcaimioideae – Bromeliaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, p. 1-49, 2005.

FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R.B.; VERSIEUX, L. Bromeliaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 08 dez. 2014.

FORZZA, R.C.; WANDERLEY, M.G.L. Considerações sobre a morfologia polínica de Dyckia, Encholirium e Pitcairnia. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 50-53, 1998.

FOSTER, A. S.; GIFFORD JUNIOR, E. M. **Comparative morphology of vascular plants**. 2. ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1974.

FRANCHI, G. G.; BELLANI, L; NEPI M, PACINI E. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance, **Flora**, v. 191, p. 143–159, 1996.

FRANKIE, G. W.; HARBER, W. A.; OPLER, P. A.; BAWA, K. S. Characteristics and organization of the large bee pollination systems in the Costa Rican dry Forest. In: JONES, C.E.; LITTLE, R.J. (Ed.). **Handbook of experimental pollination biology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983. p. 411-448.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. The tapetum and systematics in monocotyledons. **The Botanical Review**, v. 64, n. 3, p. 201-239, 1998.

GALINDO-LEAL, C.; CEDEÑO-VÁZQUEZ, J. R.; CALDERÓN, R.; AUGUSTINE, J. Arboreal frogs, tank bromeliads and disturbed seasonal tropical forest. **Contemporary Herpetology**, v. 1, p. 1–9, 2011.

GEITMANN, A.; HUDAK, J.; VENNIGERHOLZ, F.; WALLS, B. Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of Brugmansia suaveolens - Implications for the self-incompatibility reaction. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 225- 235, 1995.

GELL, A.C.; BACIC, A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins of the female sexual tissue of *Nicotiana glauca*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, p. 885-889, 1986.

GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, p. 283-300, 2011.

GIVNISH, T.J.; EVANS, T.M.; ZHURA, M.L.; PATTERSON, T.B.; BERRY, P.E.; SYTSMA, K.J. Molecular evolution, adaptive radiation, and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapateaceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology. **Evolution**, Lancaster, v. 54, p. 1915-1937, 2000.

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

GIVNISH, T. J.; MERCEDES, A.; MCNEAL, J. R.; MCKAIN, M. R. et al. Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 97, p. 584-616, 2010.

GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M.H.J.; VAN EE, B.; RIINA, R.; et al. 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. 1-24, 2011.

GLIO, S. A. R. F.; BAR, I. G. N. M.; MONTERO, G. M. O. The phytotelmata and foliage macrofauna assemblages of a bromeliad species in different habitats and seasons. **Diversity**, p. 92-102, 2010.

GOLASZWESKA, B.; BEDNARSKA, E. Immunocytochemical localization of pectins in the maturing anther of *Allium cepa* L. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Gdańsk, v. 37, p. 199-208, 1999.

GOLDBERG, R.B.; BEALS, T.P.; SANDERS, P.M. Anther development: basic principles and practical applications. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1217-1229, 1993.

GRINDELAND, J. M.; SLETVOLD, N.; IMS, R. A. Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 383-390, 2005.

HALBRITTER, H. Morphologie und Systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. **Grana**, Estocolmo, v. 31, p. 197-212, 1992.

HALBRITTER, H.; TILL, W. Morfologia polínica do Complexo Nidulariíde. In: PEREIRA, M. V. (Ed.). **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998.

HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, S.; UHEDA, E.; NAKAMURA, N. Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms. **Grana**, Estocolmo, v. 39, p. 46-55, 2000.

HAYASHI, T. Biochemistry of xyloglucans in regulating cell elongation and expansion. In: LLOYD, C.W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. Ed. San Diego: Academic Press, 1991. p.131-144.

HESLOP-HARRISON, J.; SHIVANNA, K. R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, Oxford. v. 41, p. 1233-1258, 1977.

HESS, M.W. Ultrastructure of organelles during microsporogenesis in *Tillandsia pallidoflavens* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 176, n. 1-2, p. 63-74, 1991.

HESS, M.W.; FROSCH, A. Subunits of forming pollen exine and ubisch bodies as seen in freeze-substituted *Lobelia socialis* roth (Hyacinthaceae). **Protoplasma**, Leipzig, v. 182, p. 10-14, 1994.

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, 2009. 261p.

HONYS, D.; OH, S.A.; RENAK, D.; DONDEERS, M.; SOLCOVA, B.; JOHNSON, J. A.; BOUDOVA, R.; TWELL, D. Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, London, v. 6, p. 31-39, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. In: **O mercado de flores no Brasil**. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=183> >. Acesso: dez. de 2013.

JACOBS, T. Control of the cell-cycle. **Developmental Biology**, Columbia, v.153, p.1-15, 1992.

JAUH, G.Y.; LORD, E.M. Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. **Planta**, Berlin, v. 199, p. 251-261, 1996.

JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. **Comparative embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v.1.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtores da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-238, 1965.

KNOX, J.P. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. **International Review of Cytology**, Waltham, v. 171, p. 79-120, 1997.

KNOX, J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 308–313, 2008.

KNOX J.P.; LINSTEAD, P.J.; PEART J.; COOPER, C.; ROBERTS K. Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation. **Plant Journal**, New York, v. 1, p. 317-326, 1991.

KOHORN, B. D. Plasma membrane-cell wall contacts. **Plant Physiology**, v. 124, p. 31–38, 2000.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1425-1437, 1993.

KULKARNI, R.A.; PAI, R. M. The floral anatomy of *Puya spathacea* Mez. (Bromeliaceae) with special reference to nectaries. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, Nova Delhi, v.91, n.6, p. 473-478, 1982.

LAKSHMANAN, K. K. Embryological studies in the Bromeliaceae. **Processing Indian Academy of Sciences**, Nova Delhi, v. 65, p. 49-55, 1967.

LEME, E. M. C. **Canistropsis** - Bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998. 143p.

LEME, E. M. C. **Canistrum** - Bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Salamandra, 1997. 107 p.

LEME, E. M. C.; COSTA, A. *Vriesea saundersii* e *V. botafoguensis*, duas espécies distintas. **Revista Bromélia**, Rio de Janeiro, p. 11-18, 1998.

LEME, E. M. C. Nominal extinction and the taxonomist's responsibility: the example of Bromeliaceae in Brazil. **Taxon**, Utrecht, v. 52, p. 299-302, 2003.

LENZI, M.; MATOS, J.Z.; ORTH, A.I. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 20, n.2, p. 487-500, 2006.

LERSTEN, N.R. **Flowering plant embryology with emphasis on economic species**. Iowa: Blackwell Publishing, 2004.

LEVITIN, B.; RICHTER, D.; MARKOVICH, I.; ZIK, M. Arabinogalactan proteins 6 and 11 are required for stamen and pollen function in arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 351–363, 2008.

LI, Y. Q.; BRUUN, L.; PIERSON, E.S.; CRESTI, M. Periodic deposition of arabinogalactan epitopes in the cell wall of pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlin, v. 188, p. 532-538, 1992.

LI, Y. Q.; FALERI, C.; GEITMANN, A.; ZHANG, H. Q.; CRESTI, M. Immunogold localization of Arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. **Protoplasma**, Leipzig, v. 189, p. 26-36, 1995.

LIN, H.; GOMEZ, I.; MEREDITH, J. C. Pollenkitt Wetting Mechanism Enables SpeciesSpecific Tunable Pollen Adhesion. **Langmuir**, Washington, v. 29, n. 9, p. 3012–3023, 2013.

LINDER, H. P.; RUDALL, P. J. Evolutionary history of Poales. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 107-124, 2005.

LOPEZ, L. C. S.; ALVES, R. R. DA N.; RIOS, R. I. Micro-environmental factors and the endemism of bromeliad aquatic fauna. **New Phytologist**, v. 625, p. 151–156, 2009.

LUMAGA, M.R.B.; COZZOLINO, S.; KOCYAN, A. Exine micromorphology of *Orchidinae* (Orchidoideae, Orchidaceae): phylogenetic constraints or ecological influences? **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, p. 237–244, 2006.

LUTHER, H.E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 12. ed. Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens, 2010. 45p.

MA, H. Molecular genetic analyses of microsporogênese and microgametogênese in flowering plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 303-434, 2005.

MA, H.; SUNDARESAN, V. Development of flowering plant gametophytes. **Current Topics in Developmental Biology**, Amsterdam, v. 91, p. 379–412, 2010.

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

MACIEL, J. R.; LOUZADA, R. ALVES, M. Aechmea Ruiz & Pavón from the northern portion of the Atlantic Forest. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 477-492, 2015.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 3-9, 2000.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. Immunodetection of pectin and arabinogalactan protein epitopes during pollen exine formation of *Beta vulgaris* L. **Protoplasma**, Leipzig, v. 228, p. 41-47, 2006.

MAKINO, T. T.; OHASHI, K.; SAKAI, S. How do floral display size and the density of surrounding flowers influence the likelihood of bumble bee revisitation to a plant? **Functional Ecology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 87-95, 2007.

MANNING, J. C. Diversity of endothelial patterns in the angiosperms. p. 136-158. In: **The anther: form, function and phylogeny**. D'ARCY, W. G.; KEATING, R. C. (Ed.). Cambridge University Press: Cambridge. 1996.

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

MARTINELLI, G. **Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic rainforest of Southeastern Brazil**. 197p. 1994. University of St. Andrews, St. Andrews, Scotland 1994.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. V. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 1100p.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C.M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A.F.DA; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p.209-258, 2008.

MATALLANA, G.; GODINHO, M.A.S.; GUILHERME, F.A.G.; BELISARIO, M.; COSER, T.S.; WENDT, T. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the contexto f sympatric occurrence. **Plant Sytematics and Evolution**, v. 289, n. 1-2, p. 57-65, 2010.

MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, n.4, p. 441-448, 2002.

MCCORMICK, S. Control of male gametophyte development. **Plant Cell**, Rockville, v. 16. Suppl: S1, p.42-53, 2004.

MENDES, S. P.; COSTA, C. G.; DE TONI, K. L. G. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), na endangered Brazilian species. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 58, p. 485-492, 2012.

MOÇO, M. C. C.; MARIATH, J. E. A. Comparative floral ontogeny in *Adesmia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.57, p.65-75, 2009.

MOLLET, J. C.; LEROUX, C.; DARDELLE, F.; LEHNER, A. Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth. **Plants**, v. 2, p. 107-147, 2013.

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

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, n. 1, p. 61-70, 2005.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodologica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n.2, p. 209-214, 2008.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTEMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NADOT, S.; FURNESS, C.A.; SANNIER, J.; PENET, L.; TRIKI-TEURTROY, S.; ALBERT, B.; RESSAYRE, A. Phylogenetic comparative analysis of microsporogenesis in angiosperms with a focus on monocots. **American Journal of Botany**, New York, v. 95, n. 11, p. 1426–1436, 2008.

NAKAMURA, A. T.; LONGHI-WAGNER, H. M.; SCATENA, V. L. Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, p. 165-176, 2009.

NARA, A. K. **Biologia floral e polinização de quatro espécies de Bromeliaceae de ocorrência em vegetação de baixo na Amazônia Central**. 1998. Pp. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas, Manaus, 1998.

NEGRELLE, R. R. B.; MITCHELL, D.; ANACLETO, A. Bromeliad ornamental species: conservation issue and challenges related to commercialization. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 34, n. 1, p. 91-100, 2012.

NGUEMA-ONA, E.; COIMBRA, S.; VICRÉ-GIBOUIN, M.; MOLLET, J. C. DRIOUICH, A. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cell: distribution and functional aspects. **Annals of Botany**, Oxford, v. 110, p. 383-404, 2012.

OKIMOTO, M. C. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 110, n. 2, p. 217-231, 1948.

OLIVEIRA, J. M. S.; MARTINS, M. S.; DORNELES, M. P.; FREITAS, C. C. Starch distribution in anthers, microspores and pollen grains in *Aechmea recurvata* (Klotzsch.) L.B.Sm., *Dyckia racinae* L.B.Sm. and *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Bromeliaceae), **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 29, n. 1, p. 103-112, 2015.

OLIVEIRA, M.S.P.; MAUÉS, M.M.; KALUME, M.A. A. Viabilidade de pólen in vitro em genótipos de açaieiro. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 27-33, 2001.

OLIVEIRA, R. R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 18, n. 4, p. 793-799, 2004.

OWEN, H. A.; MAKAROFF, C. A. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L) heynh ecotype wassilewskija (Brassicaceae). **Protoplasma**, v. 185, 7-21, 1995.

PACINI E.; FRANCHI, G.G. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 7, p. 1-11, 1993.

PACINI E. From anther and pollen ripening to pollen presentation. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 222, p. 19–43, 2000.

PACINI, E. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.9, p.362-366, 1996.

PACINI, E. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 75, p. 1448-1459, 1997.

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

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkitt – its composition, forms and functions. **Flora**, Jena, v. 200, p.399–415, 2005.

PALACÍ, C. A., BROWN, G.K.; TUTHILL, D.E. The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). **Systematic Botany**, Kent, n. 29, p. 518-527, 2004.

PARK, S. K.; TWELL, D. Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the *Arabidopsis* gemini pollen1 mutant. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p. 899-909, 2001.

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

PAULA, C. C. **Cultivo de Bromélias**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 139p.

PAULA, C. C. Cultivo de bromélias. **Informe Agropecuário**, Minas Gerais, v. 26, n. 227, p. 73-84, 2005.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1972.

PELLOUX, J.; RUSTERUCCI, C.; MELLEROWICZ, E.J. New insights into pectin methylesterase structure and function. **Trends in Plant Science**, Oxford. v.12, n. 6, p. 267-277. 2007.

PENNELL R.I.; KNOX J.P.; SCOFIELD G.H.; SELVENDRAN R.R.; ROBERTS K. A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 108, p. 1967–1977, 1989.

PEREIRA, A. M.; MASIERO, S.; NOBRE, M. S.; COSTA, M. L.; SOLÍS, M. T.; TESTILLANO, P. S.; SPRUNCK, S.; COIMBRA, S. Differential expression patterns of Arabinogalactan Proteins in *Arabidopsis thaliana* reproductive tissues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford. p. 1-13, 2014.

PEREIRA, L.G.; COIMBRA, S.; OLIVEIRA, H.; MONTEIRO, L.; SOTTOMAYOR M. Expression of arabinogalactan protein genes in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v.223, p.374–380, 2006.

PIACENTINI, V. Q.; VARASSIN, I. G. Interaction network and the relationships between bromeliads and hummingbirds in an area of secondary Atlantic rain forest in southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 23, n. 6, p. 663-671, 2007.

PINA, C.; PINTO, F.; FEIJO, J. A.; BECKER, J. D. Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. **Plant Physiology**, v. 138, p. 744-756, 2005.

PREUSS, D. Sexual signalling on a cellular level: lessons from plant reproduction. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 13, p. 1803-1805, 2002.

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

RAMIREZ, I. M. **Systematics, Phylogeny and chromosome number evolution of Cryptanthus (Bromeliaceae)**. PhD (Thesis) - University of Missouri-St.Louis, St.Louis, 1996.

RAO, A. N.; WEE, Y. C. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. **The New Phytologist**, Oxford, v.83, n.2, p.485-497, 1979.

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia**, Paris, v. 11, n. 1, p. 77-79, 1971.

REISER, L.; FISCHER, R. The ovule and the embryo Sac. **Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1291-1301, 1993.

RENTROP, M.; KNAPP, B.; WINTER, H.; SCHWEIZER, J. Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. **The Histochemical Journal**, Seattle, v. 18, p. 271-276, 1986.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

RIBEIRO, G. S. **Aspectos da biologia floral relacionada à produção de sementes e frutos de pinha (*Annona squamosa* L.)**. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2006.

RYDEN, P.; SUGIMOTO-SHIRASU, K.; SMITH, A. C.; FINDLAY, K.; REITER, W. D.; MCCANN, M. C. Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1033-1040, 2003.

ROCCA MA, SAZIMA M. Quantity versus quality: identifying the most effective pollinators of the hummingbird-pollinated *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 97-105, 2003.

ROE, D.; MULLIKEN, T.; MILLEDGE, S.; MREMI, J.; MOSHA, S.; GREIG GRAN, M. **Making a killing or making a living: wildlife trade, trade controls, and rural livelihoods**. London: IIED, 2002.

RUDALL, P. J. The nucellus and chalaza in Monocotyledons: structure and systematics. **Botanical Review**, v. 63, n. 2, p. 140-181, 1997.

SAJO, M. G.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Structure and development of the ovule and seed in Bromeliaceae. **Kew Bulletin**, Richmond, v. 59, p. 261-267, 2004.

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

SAJO, M. G.; FURNESS, C. A.; PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. **Grana**, Estocolmo, v. 44, p. 65-74, 2005.

SALOMÃO, K. **Aspectos reprodutivos e micropropagação em *Dyckia distachya* Hassler, espécie ameaçada de extinção**. 2013. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SARTORI, J. S. S. **Desenvolvimento Floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae - Bromeliaceae)**. 2008. 111p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, S.; SAZIMA, I. Polinização por beija-flores em *Nidularium* e gêneros relacionados. In: LEME, E.M.C. (Org.). ***Nidularium: Bromélias da Mata Atlântica***. Rio de Janeiro: Sextante Artes, 2000. p. 188-195.

SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Hummingbird pollination in two species of *Vellozia* (Liliiflorae: Velloziaceae) in southeastern Brazil. **Botanica Acta**, Stuttgart, v. 103, p. 83-86, 1990.

SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, p. 517-524, 2002.

SCHWARZ-SOMMER, Z.; HUE, I., HUIJISER, P.; FLOR, P. J.; et al. Characterization of the Antirrhinum floral homeotic MADS-box gene DEFICIENS: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. **EMBO Journal**, v. 11, p. 251-263, 1992.

SCROK, G. J.; VARASSIN, I. G. Reproductive biology and pollination of *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v.25, n.3, p.571-576, 2011.

SEIFERT G.J.; BARBER, C.; WELLS, B.; DOLAN, L.; ROBERTS, K. Galactose biosynthesis in Arabidopsis: genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-galactose into cell wall polymers. **Current Biology**, Cambridge, v. 12, p. 1840-1845, 2002.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, SÃO PAULO. Resolução SMA N. 48 de 2004. Lista oficial das espécies da flora do Estado de São Paulo ameaçadas de extinção. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, SP, 2004.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Androgenesis revisited. **Botanical Review**, v. 76, p. 377–404, 2010.

SERPE, M.D.; NOTHNAGEL, E.A. Effects of Yariv phenylglycosides on Rosa cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-proteins in cell proliferation. **Planta**, Berlin, v. 193, p. 542–550, 1994.

SHAMROV, I. I. Structural differentiation of the ovule in flowering plants: chalaza, funiculus, obturator. **Botanical Journal**, St. Petersburg, v. 89, p. 337-353, 2004.

SHIVANNA, K. R. **Pollen biology and biotechnology**. Boca Raton: Science Publishers, 2003.

SHOWALTER, A.M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Berlin, v. 58, p. 1399–1417, 2001.

SILVA, L. M. M.; AGUIAR, I. B.; VIÉGAS, R. A.; MENDONÇA, I. F. C. Biologia reprodutiva de *Cnidoscylus juercifolius* Paz & K. Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 2, 25-34, 2006.

SIQUEIRA FILHO, J. A. Biologia floral de *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 1-13, 1998.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; LEME, E.M.C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste – Biodiversidade, conservação e suas bromélias**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estudio, Rio de Janeiro, 2006. 360 p.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Biologia floral de *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez (Bromeliaceae). **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 3-13, 1998.

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**, Porto Alegre, v. 15, p. 427-444, 2001.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. 2006. Floração e polinização das bromélias da Mata Atlântica nordestina. In: SIQUEIRA-FILHO, J. A.; LEME, M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste – Biodiversidade, Conservação e suas Bromélias**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estudio, Rio de Janeiro, 2006. Pp. 158-189.

SMALLWOOD, M.; YATES, E.A.; WILLATS, W.G.T.; MARTIN, H.; KNOX, J.P. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. **Planta**, Berlin, v. 198, p. 452–459, 1996.

SMITH, L. B. The Bromeliaceae of Brazil. **Smithsonian Miscellaneous Collections**, v. 126, p. 1-290, 1955.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora Neotropica Monograph 14**, part 1: Pitcairnoideae. New York: Hafner Press, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora Neotropica Monograph 14**, parte 2. New York: Hafner Press, 1977.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora Neotropica Monograph 14**, parte 3: Bromelioideae. New York: Hafner Press, 1979.

SMITH, L. B.; TILL, W. Bromeliaceae. In: KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants**. Springer-Verlag, Berlin, 1998. p. 74-99.

SMYTH, D. R.; BOWMAN, J. L.; MEYEROWITZ, E.M. Early flower development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 2, p. 755-797, 1990.

SOARES, T.L.; SILVA, S.O.; COSTA, M.A.P.C.; SEREJO, J.A.S.; SOUZA, A.S.; SOUZA, E.H.; JESUS, O.N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, 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, n. 10, p. 1744-1749, 2011.

SOLTIS, P. S.; BROCKINGTON, S. F.; YOO, M. J. PIEDRAHITA, A. et al. Floral variation and floral genetics in basal angiosperms. **American Journal of Botany**, New York, v. 91, p. 1614-1626, 2009.

SOUZA, F.C.; MENDONÇA, C.B.F.; GONÇALVES-ESTEVES, V. Estudo polínico de species de Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Bromeliaceae Juss.) ocorrentes na resting de Carapebus, Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 1, p. 15-23, 2004.

SOUZA, G. M.; WANDERLEY, M. G. L.; CRUZ-BARROS, M. A. V. Morfologia polínica de *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) de Pernambuco, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 16, p. 21-30, 1997.

SPAT, C. **Embriologia de *Tillandsia aeranthes* (Lois.) L. B. Sm. (Tillandsioideae-Bromeliaceae)**. 2012. 111p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

STAHL, J. M.; NEPI, M.; GALETTO, L.; GUIMARÃES, E.; MACHADO, S. R. Functional aspects of floral nectar secretion *Ananas ananassoides*, an Ornithophilous bromeliad from the Brazilian savanna. **Annals of Botany**, Oxford, v. 109, p. 1243-1252, 2012.

STRINGHETA, A. C. O.; SILVA, D. J. H.; CARDOSO, A. A.; FONTES, L. E. F.; BARBOSA, J. G. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 165-170, 2005.

TARDIVO, R. C. **Revisão taxonômica de *Tillandsia* L. subgênero *Anoplophytum* (Beer) Baker (Bromeliaceae)**. 244p. 2002. Ph.D. Thesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 2002.

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, n. 1, 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.

TEIXEIRA, S.P.; MARINHO, C.R.; PAULINO, J.V. A flor: aspectos morfofuncionais e evolutivos. In: RECH, A.R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P.E.; MACHADO, I.C. (Org.). **Biologia da polinização**. 1. ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. p. 45-70.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P; BARROSO, T. C. S. F. **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225p.

TERASAKA, O.; T. NIITSU. Unequal cell-division and chromatin differentiation in pollen grain cells. II. Microtubule dynamics associated with the unequal cell-division. **Botanical Magazine**, Tokyo, v. 103, p. 133-142, 1990.

TESTILLANO, P. S. **Estudio citoquímico e inmunocitoquímico de la función nuclear durante la interfae postmeiótica del polen**. 1991. Tese (Doutorado) - Univesidad Complutense de Madrid, Madrid, 1991.

TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M. C. Hibridación in situ a nivel ultraestructural (com ribosondas marcadas no radiativamente) para localizar genes y ARNs. In: UNIVERSIDADE DE GRANADA. **Manual de Técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.)**. Aplicaciones biológicas. Granada, 1998.

TESTILLANO, P. S.; GONZALEZ-MELENDI, P.; AHMADIAN, P.; FADON, B.; RISUEÑO, M. C. The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. **Experimental Cell Research**, New York, v. 221, p. 41-54, 1995.

TESTILLANO, P. S.; SANCHEZ-PINA, M.A.; OLMEDILLA, A.; FUCHS, J.P.; RISUEÑO, M.C. Characterization of the interchromatin region as the nuclear domain containing SNRNPS in plant-cells - A cytochemical and immunoelectron microscopy study. **European Journal of Cell Biology**, Amsterdam, v.61, n. 349-361, 1993.

TESTILLANO, P.S.; CORONADO, M.J.; SEGUÍ, J.M.; DOMENECH, J.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; RASKA, I.; RISUEÑO, M.C. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. **Journal of Structural Biology**, Amsterdam, v.129, n.2-3, p. 223-232, 2000.

TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 35, p. 53-109, 2001.

TUCKER, S. C. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). **American Journal of Botany**, New York, v. 79, p. 318-327, 1992.

TUCKER, S. C. Floral ontogeny in Sophoreae (Leguminosae, Papilionoideae). I Myroxylon (Myroxylon group) and Castanospermum (Angylocalyx group). **American Journal of Botany**, New York, v. 80, p. 65-75, 1993.

TUCKER, S. C. Floral evolution, development, and convergence: the hierarchical-significance hypothesis. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 156, p. 143-161, 1997.

TUCKER, S. C.; DOUGLAS, A. W. Ontogenetic evidence and phylogenetic relationships among basal of legumes. In: Ferguson, I.K.; Tucker, S. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Part 6. Kew: Royal Botanic Gardens, 1994. p. 11-32.

TWELL, D.; PARK, S.K.; LALANNE, E. Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.3, p.305-310, 1998.

VAN AELST, A.C.; VAN WENT, J. Ultrastructural immunolocalization of pectin and glycoproteins in Arabidopsis Thaliana pólen grains. **Protoplasma**, Leipzig, v. 168, p. 14-19, 1992.

VAN HENGEL, A.J.; ROBERTS, K. Fucosylated arabinogalactanproteins are required for full root cell elongation in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v.32, p.105–113, 2002.

VAN HENGEL, A.J.; TADESSE, Z.; IMMERZEEL, P.; SCHOLS, H.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S.C. N-acetylglucosamine and glucosaminecontaining arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p.1880–1890, 2001.

VAN HENGEL, A.J.; TADESSE, Z.; IMMERZEEL, P.; SCHOLS, H.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S.C. N-acetylglucosamine and glucosaminecontaining arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p.1880–1890, 2001.

VARADARAJAN, G. S.; GILMARTIN, A. J. Seed morphology of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematics implications. **American Journal of Botany**, New York, v.75, n.6, p.808-818, 1988.

VARADARAJAN, G.S.; BROWN, G.K. Morphological variation of some floral features of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 149, n. 1, p. 82-91, 1988.

VARASSIN, I.G.; SAZIMA, M. Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Boletim do Museu Biológico Mello Leitão**, Santa Teresa, v. 11, p. 57-70, 2000.

VERSIEUX, L.M. **Sistemática, filogenia e morfologia de Alcantarea (Bromeliaceae)**. 252p. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

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, n. 1, p. 78-86, 2003.

VISSENBERG, K.; FEIJO, J.A.; WEISENSEEL, M.H.; VERBELEN, J.P. Ion fluxes, auxin and the induction of elongation growth in *Nicotiana tabacum* cells. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 2161–2167, 2001.

VIZCAY-BARRENA, G.; WILSON, Z.A. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, p.2709-2717. 2006.

ZANETTINI, M. H. B; LAUXEN, M. S. Reprodução sexual nas angiospermas. In: FREITAS, L. B. de; BERED, F. (Org.). **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p.13-27.

ZONA, S. Startchy Pollen in Commelinoid Monocots. **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 109-116, 2001.

WAGNER, V. T.; CRESTI, M.; SALVATICI, P.; TIEZZI, A. Changes in volume, surfacearea, and frequency of nuclear-pores on the vegetative nucleus of Tobacco pollen in fresh, hydrated, and activated conditions. **Planta**, Berlin, v.181, p.304-309, 1990.

WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E. Bromeliaceae. In: MELHEM, T. S. A.; WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS S. E.; JUNG-MENDAÇOLLI, S.; SHEPHERD, G. J.; KIRIZAWA, M. (Ed.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. vol 5. São Paulo: Instituto de Botânica, 2007. p. 39-161.

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.

WEN, Y.C.; RAO, A N. Ananas pollen germination. **Grana**, Estocolmo, v. 18, p. 33-39, 1979.

WENDT, T.; COSER, T. S; MATAALLANA, G. E.; GUILHERME, F. A. G. An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, p. 31-41, 2008.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P. Immunoprofiling of pectic polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 268, p.143-146, 1999.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 17, p. 97-104, 2006.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P. A role for arabinogalactan proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of b-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v.9, p.919–925, 1996.

WILLATS, W.G.T.; MARCUS, S.E.; KNOX, J.P. Generation of a monoclonal antibody specific to (1!5)-a-L-arabinan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 308, p. 149–152, 1998.

WILLATS, W.G.T.; MCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 9–27, 2001a.

WILLATS, W.G.T.; ORFILA, C.; LIMBERG, G.; BUCHHOLT, H.C.; VAN ALEBEEK, G.J.; VORAGEN, A.G.; MARCUS, S.E.; CHRISTENSEN, T.M.; MIKKELSEN, J.D.; MURRAY, B.S.; KNOX, J.P. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.276, p.19404–19413, 2001b

WISNIEWSKA, E; MAJEWSKA-SAWKA, A. Cell wall polysaccharides in differentiating anthers and pistils of *Lolium perenne*. **Protoplasma**, v. 228, 65-71, 2006.

WOLLMANN, H.; MICA, E.; TODESCO, M.; LONG, J. A.; WEIGEL, D. On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. **Development**, v. 137, p. 3633-3642, 2010.

WU, H.; WANG, H.; CHEUNG, A.Y. A pollen tube growth Simulator glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. **Cell**, Cambridge, v. 82, p. 395–403, 1995.

ZANETTINI, M.H.B.; LAUXEN, M.S. Reprodução nas angiospermas. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.29-40.