UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

EVERTON HILO DE SOUZA

Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental

Piracicaba

2013

EVERTON HILO DE SOUZA

Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli
Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Piracicaba

2013

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

Souza, Everton Hilo de

Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental / Everton Hilo de Souza; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli; coorientadora Fernanda Vidigal Duarte Souza. -- versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2013.

256 f. : 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. Anatomia vegetal 2. Bromeliales 3. Compostos voláteis 4. Criopreservação 5. Plantas ornamentais 6. Pólen 7. Polinização I. Título

CDU 582.548.11 **:** 581.16

"Há pessoas que são essenciais para as nossas vidas,
outras importantes, raríssimas e indispensáveis.
Algumas nos fazem felizes, muitas nos fazem rir,
outras marcam por uma vida toda."

Alcantarea nahoumii (Leme) J. R. Grant – Serra da Jibóia, Santa Terezinha, BA
Fotografia premiada em 1º Lugar no XIX Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Recife, PE, out, 2013

Aos meus pais, Samuel Souza & Nalva Souza e minha irmã
Viviane Souza, pela formação moral que se consolida no
profissional que sou, meu exemplo, meu apoio e incentivo.
Amo vocês!

Agradecimentos

Ao concluir esta tese, é fundamental reconhecer que nesta vida nada conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de um ombro amigo para alcançar nossos objetivos e sonhos, muitas vezes, simples gestos podem mudar o rumo de nossa vida.

Quero externar os meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que me permitiram chegar até aqui.

A Deus, pela minha existência, inteligência suprema e causa primeira de tudo que existe.

À Nossa Senhora, minha mãe, que sempre me deu forças nos momentos difíceis, para vencer todos os obstáculos da vida. Sem a sua proteção eu nada seria!

Aos meus pais, Samuel Souza & Nalva Souza, pela vida, amor, caráter e respeito pelo meu semelhante, tenham certeza de que o apoio de vocês foi fundamental para a concretização desta etapa em minha vida. Amo vocês!

À minha grande irmã Viviane Souza Mutti, pelo apoio, confiança e admiração que sempre depositou em mim. Além disso, me proporcionou o prazer de ser tio e padrinho e desfrutar da alegria do querido Lauro. A lembrança da alegria e do sorriso singelo de Lauro foi um incentivo constante na conclusão desta caminhada. Muito obrigado por tudo, minha irmã que amo tanto. Agradeço ao meu sobrinho Matheus Mutti e ao meu cunhado Liberato Mutti, por sempre acreditar em mim e torcer pela minha vitória.

A toda minha família, em especial às minhas mães Carmem Souza, Agnólia Souza e Luzinete Souza. Eulina Souza e aos demais tios e tias, que de alguma forma participaram da minha educação. Aos meus primos e primas em especial a minha prima e irmã Maiana Souza que amo muito.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e ao Programa de Pós Graduação em Ciências, pela oportunidade de cursar o doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente e por toda a estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro à bolsa de estudos. Processo FAPESP: 2009/18255-0. Sou muito grato e espero ser capaz de retribuir o investimento e confiança depositados em mim. Agradeço à assessoria "ad hoc" que acreditou no meu projeto e no meu trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, por aceitar a me orientar, pelo incentivo, confiança depositada, pelos seus conhecimentos, críticas e por toda a sabedoria e apoio neste período. Serei sempre grato por tudo!

Às minhas coorientadoras, Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza e Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa que acompanharam cada passo desta trajetória, desde a graduação até aqui, por compartilhar seus conhecimentos, carinho e principalmente pela atenção e amizade, me adotando como um verdadeiro filho.

À Dra. Hazel Young Wetzstein e a Justin Porter pela paciência, atenção, ensinamentos durante o estágio sanduiche realizado na University of Georgia.

Aos professores e pesquisadores das mais diversas instituições de ensino e pesquisa, Dra. Sandra Carmello-Guerreiro (Unicamp), Dr. Severino Alencar (Esalq), Dra. Maria Amélia (Instituto de Botânica - SP), Dr. Carlos Ledo (Embrapa Mandioca e Fruticultura), pelas sugestões, críticas, incentivos e ensinamentos nas diversas linhas do conhecimento. Este trabalho é fruto de grandes parcerias.

À Monica Lanzoni Rossi, técnica do laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, uma amiga e companheira em todos os momentos. É muito gratificante trabalhar com você e ver a sua dedicação, paciência, força, ânimo, interesse nas coisas que você faz e ensina. Para mim você é um exemplo de dedicação!

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas e ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, em especial à Karina Salomão, Camila Heuser, Sylvia Silveira, Raquel Peron e Talitha Joana, que compartilharam momentos de alegria, anseios e tristezas durante toda a minha pesquisa.

Aos estagiários Nathália Brancalleão e Renan Packer pela disposição e contribuição na coleta dos dados.

A todos os funcionários desta instituição, em especial a Renata Cruz, Marcelo Correia, Suzi Manesco, Cleusa Cabral e Raquel Orsi por sempre estarem disponíveis a ajudar no que for preciso.

Aos funcionários da pós-graduação, Daiane Vieira, Fábio Oliveira, Neuda Oliveira, Sônia Campos, Gilson Costa, Alzira Adão e Claudia Correia que sempre foram dispostos a me ajudar e solucionar os problemas acadêmicos.

Aos doutores Gerson Romão e Vinícius Souza que me auxiliaram nas exsicatas e deposição no Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental em nome de Adna Massarioli e Ivani Moreno que não mediram esforços para me ajudar em todas as etapas do trabalho de compostos voláteis.

Aos amigos e técnicos Eliene Narvaes e Adriano Martins pela colaboração e uso da microscopia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/ Unicamp. Vocês não mediram esforços para me ajudar nos momentos que precisei, muito obrigado!

Aos funcionários das Bibliotecas (Cena e Esalq) que sempre tiveram a disponibilidade em auxiliar nas consultas, solicitação de artigos, e correções bibliográficas, em especial a Marília Hentei, Renata Fini, Raquel Carvalho, Adriana Moretti, Vilma Zeferino, Sandra Ribeiro e Celia Marron.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP e ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA/USP pela infraestrutura para realização dos trabalhos de microscopia.

A todos os meus amigos de Piracicaba em especial a Juliana Leles, Luiz Francisco, Marcelo Volponi, Andrea Rodrigues, Tiago Godinho, Fábio Coutinho, Conan Salvador, Welligton Campos e Bruno Maiorino. Muito obrigado pelos momentos bons que passamos juntos, nunca esquecerei.

Ao casal que considero como irmãos, Leonardo Martins & Cartiane Rocha, vocês foram os primeiros amigos que Deus colocou na minha vida aqui em Piracicaba, saibam que vocês moram no meu coração para a vida eterna.

Ao casal, Carla Marques & Erasto Gama e seu pequeno Isaque, vocês para mim são companheiros de todas as horas, sendo verdadeiros irmãos mesmo que distante. Nossa amizade será para sempre!

À minha amiga e irmã, Taliane Soares, você foi uma pessoa fundamental para minha vida pessoal e profissional, saiba que, onde você estiver estaremos sempre juntos na pesquisa e como amigos.

Aos meus amigos de Cruz das Almas em especial, Patrícia Silveira, Elma Souza, Mariane Jesus, Lorenna Mattos, Cristiane Duarte, Davi Costa, Olívia Nepomuceno, Marcela Bomfim, Nicole, Marcos Paulo, Diego Carvalho, Marília Salomão, Elaine Cunha, Daniela Garcia e Ana Lúcia e aos amigos de Amargosa em especial Thadeu Andrade, Marília Cabral, Mário Junior, Viviane Oliveira, Manuela Oliveira, Alex Rodrigues, Jackson Andrade, Saint'Clair Batista e Marivanildo Borges. Tenho certeza que mesmo distante vocês me incentivaram e torceram por mim.

Ao funcionário da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Benedito Conceição (Kata), você foi fundamental para o desenvolvimento de minha pesquisa tanto no mestrado quanto no doutorado, você é um exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos professores do Cena e Esalq que contribuíram na minha formação, Dr. Paulo Viegas, Dr. Marcílio Almeida, Dra. Neusa Nogueira, Dra. Célia Montes, Dr. Lavres Junior, Dra. Beatriz Mendes e Dr. Antonio Figueira, pelos ensinamentos que guardarei para toda a vida.

Aos pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura que sempre torceram por mim, Dr. Onildo Nunes, Dra. Cristina Machado, Dra. Janay Almeida, Dr. Eder Jorge, Dra. Cláudia Fortes e Dr. Antônio Souza, muito obrigado pelos constantes ensinamentos.

Aos professores e funcionários da saudosa Escola Agrotécnica de Amargosa em especial Aurélio Antunes, Auxiliadora Passos, Geneide Maia, Celeste Muniz, Ana Cristina Cintra, Glayce Silva, Luiz Henrique, Flávio Augusto e Lourival Ramos (in memoriam) que me incentivaram a escolher esta profissão que tanto amo.

Aos amigos do Centro Sapucaia, em especial Raul Lomanto & Márcia Neves, por possibilitar o meu engajamento na luta em defesa da Mata do Timbó, hoje, Unidade de Conservação.

Aos membros da comissão examinadora de exame de qualificação, pelas críticas e sugestões dadas a este trabalho.

Aos membros da comissão julgadora, pelo aceite do convite para participar da defesa.

A todos os autores, citados nas referências bibliográficas, pelos trabalhos pioneiros que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

A todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração desta tese e para minha formação.

Meu muito obrigado!

Serei eternamente grato.

RESUMO

SOUZA, E. H. **Reprodução e hibridação interespecífica e intergenérica em bromeliáceas com potencial ornamental**. 2013. 256 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

As bromeliáceas são plantas ornamentais tropicais com uma grande diversidade de cores e formas que as tornam extremamente apreciadas. Os estudos da biologia floral, associado aos sistemas reprodutivos das espécies vegetais, são de fundamental importância para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético e conservação de espécies, além de auxiliar na determinação do grau de compatibilidade entre genótipos e eventuais barreiras reprodutivas. O objetivo da presente tese é estudar aspectos da biologia floral e reprodutiva, conservação dos grãos de pólen, estudos de compostos voláteis em flores e hibridação interespecífica e intergenérica em Bromeliaceae com potencial ornamental. Foi observada grande variabilidade genética entre as espécies estudadas, no que diz respeito à morfologia dos grãos de pólen e estigma. Altas taxas de germinação e viabilidade polínica foram obtidas para as diferentes espécies, e a receptividade do estigma está relacionada com a antese. Essas características associadas têm grande importância para a fertilização e, consequentemente, para a produção de sementes, desta forma são essenciais para a produção de híbridos e conservação de espécies. Para a conservação dos grãos de pólen, o melhor resultado foi obtido com a desidratação prévia por 3 h em sílica e conservação em nitrogênio líquido (-196°C). A partir de flores de treze espécies, foram identificados 71 compostos voláteis, alguns deles com importância na indústria de alimentos, cosméticos, perfumes, indústria química e farmacêutica. Dentre as dezessete espécies estudadas, mais de 50% apresentaram autoincompatibilidade, e algumas apresentaram autogamia, demonstrando que essas espécies apresentam autopolinização espontânea. Agamospermia foi observada em apenas duas espécies. Noventa e cinco combinações entre 17 espécies de *Aechmea* e *Ananas* (Bromelioideae) e *Alcantarea* e *Vriesea* (Tillandsioideae) foram realizadas. O sucesso nas hibridações corresponde a 33,74%, sendo que 24,96% envolveram as variedades botânicas do gênero *Ananas*. Entre as hibridações intergenéricas, apenas duas combinações foram obtidas com sucesso: *V. michaelii* x *Al. nahoumii* e *V. simplex* x *Al. nahoumii*. As possíveis causas da autoincompatibilidade e incongruência nesses cruzamentos estão relacionadas a diferentes eventos no tubo polínico, como: deposição irregular de calose no tubo polínico; enovelamento dos tubos polínicos no estilete; paralisação do crescimento do tubo polínico no estilete, entre outros. Sugere-se que a autoincompatibilidade seja gametofítica, evitando a autofertilização. Estudos mais aprofundados contribuirão para caracterizar as causas e as potenciais medidas para superar a autoincompatibilidade. Os resultados aqui apresentados trazem contribuições importantes para estudos de hibridação em Bromeliaceae, visando à obtenção de novidades para o mercado de plantas ornamentais, bem como contribuições para a caracterização e conservação de espécies dessa importante família.

Palavras-chave: *Aechmea. Alcantarea. Ananas.* Bromeliaceae. Compostos voláteis. Conservação. Grãos de pólen. Receptividade do estigma. *Vriesea.*

ABSTRACT

SOUZA, E. H. **Reproduction and interspecific and intergeneric hybridization in bromeliads with ornamental potential.** 2013. 256 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Bromeliads are tropical ornamental plants with a wide variety of colors and shapes that make them widely and extremely appreciated. The study of aspects of the floral biology, associated with the reproductive systems of these species are of fundamental importance for breeding and species conservation programs, assisting in the determination of the degree of compatibility between combination of genotypes, as well as potential reproductive barriers. The aim of this research is to study aspects of floral and reproductive biology, conservation of pollen grains, studies of volatile compounds in flowers and intergeneric and interspecific hybridization in Bromeliaceae with ornamental potential. High genetic variability was observed among the species studied, regarding the morphology of the pollen grains and stigma. High rates of germination and pollen viability were observed for the different species, and stigma receptivity showed the highest at anthesis. These characteristics are of great importance for fertilization and further seed production, thus are essential for the production of hybrids and species conservation. Preservation of pollen grains, showed the best results with a 3 h dehydration pre-treatment in silica and conservation in liquid nitrogen (-196°C). A large number of volatile compounds, totally 71, were identified from flowers of thirteen species. Some of these compounds have already been shown to be important in the food industry, cosmetics, perfumes, chemical and pharmaceutical industry. Among the seventeen species, more than 50% presented self-incompatibility and some species presented autogamy, demonstrating that these species present spontaneous self-pollination. Agamospermy was observed in only two species. Ninety-five combinations among 17 species of *Aechmea* and *Ananas* (Bromelioideae) and *Alcantarea* and *Vriesea* (Tillandsioideae) were performed, with a 33.74% rate of success, with 24.96% involving the botanical varieties of *Ananas*. Only two, among the intergeneric combinations, were successful, *V. michaelii* x *Al nahoumii* and *V. simplex* x *Al nahoumii*. Possible causes of self-incompatibility and incongruity in these combinations were related to different events during pollen tube growth, such as the irregular deposition of callose in pollen tubes; entangled pollen tubes in the style; arrest of pollen tube growth in the style, among others. We suggest that the self-incompatibility is gametophytic, preventing self-fertilization. Further studies will help to characterize the causes and potential measures to overcome self-incompatibility. The results provide important contributions to studies of hybridization in bromeliads, aiming to produce new hybrids for the ornamental plants market, as well as contributions to the characterization and conservation of this important family of plants.

Keywords: *Aechmea. Alcantarea. Ananas.* Bromeliaceae. Conservation. Pollen grains. Stigma receptivity. Volatile compounds. *Vriesea.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea* 23

Capítulo 1

Figura 1.1 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de espécies de *Aechmea*.... 77

Figura 1.2 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de *Ananas* 81

Figura 1.3 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de *Alcantarea nahoumii*..... 83

Figura 1.4 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de espécies de *Vriesea*..... 85

Figura 1.5 - Germinação *in vitro* e histoquímica de grãos de pólen de Bromeliaceae 93

Figura 1.6 - Comparação entre diferentes testes histoquímicos para avaliação da viabilidade de grãos de pólen em espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea*..... 97

Capítulo 2

Figura 2.1 - Morfoanatomia do estigma do tipo conduplicado-espiral nos gêneros *Aechmea* e *Ananas,* subfamília Bromelioideae 113

Figura 2.2 - Morfoanatomia do estigma do tipo conduplicado-espiral em *Alcantarea nahoumii* e lâmina-convoluta nas espécies do gênero *Vriesea* da subfamília Tillandsioideae/ Bromeliaceae..... 115

Figura 2.3 - Morfoanatomia do estilete em Bromeliaceae..... 123

Figura 2.4 - Avaliação da receptividade do estigma em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea* por diferentes metodologias 129

Capítulo 3

Figura 3.1 - Flor, grãos de pólen e viabilidade de grãos de pólen de *Aechmea bicolor*..... 149

Figura 3.2 - Viabilidade e comprimento do tubo polínico em *Aechmea bicolor* 153

Figura 3.3 - Grãos de pólen de *Aechmea bicolor* nos diferentes tratamentos de conservação..... 165

Capítulo 4

Figura 4.1 - Perfil cromatográfico obtido por HS-SPME/ GC-MS de compostos voláteis em flores de Bromeliaceae, indicando os compostos majoritários identificados..... 203

Figura 4.2 - Diagrama de dispersão dos escores associados aos três primeiros componentes principais obtidos por HS-SPME/GC-MS de compostos voláteis em flores de 13 espécies de Bromeliaceae..... 209

Capítulo 5

Figura 5.1 - Crescimento do tubo polínico após autopolinização manual no estigma observado através de microscopia de fluorescência em pistilos tratados com solução de azul de anilina em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Alcantarea* e *Vriesea* 237

Figura 5.2 - Crescimento do tubo polínico no estigma observado através de microscopia de fluorescência em pistilos tratados com solução de azul de anilina em Bromeliaceae evidenciando diferentes barreiras reprodutivas em hibridações interespecíficas e intergenéricas..... 243

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Táxons da subfamília Bromelioideae/Bromeliaceae ocorrentes no domínio da Mata Atlântica, suas respectivas obras e categorias de ameaça, bem como distribuição geográfica e Corredores de Biodiversidade 31

Tabela 2 - Táxons da subfamília Tillandsioideae/Bromeliaceae ocorrentes no domínio da Mata Atlântica, suas respectivas obras e categorias de ameaça, bem como distribuição geográfica e Corredores de Biodiversidade 33

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Características morfométricas de grãos de pólen de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea,* tamanho e estimativa de número de grãos por flor..... 71

Tabela 1.2 - Características morfométricas das camadas da exina dos grãos de pólen de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea*..... 73

Tabela 1.3 - Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea,* em quatro meios de cultura..... 89

Tabela 1.4 - Comprimento do tubo polínico em grãos de pólen cultivados em quatro meios de cultura em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea* 91

Capítulo 2

Tabela 2.1 - Caracterização do pistilo em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea* 119

Tabela 2.2 - Receptividade do estigma em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea, Ananas, Alcantarea* e *Vriesea* avaliada entre a pré-antese e pós-antese, por diferentes metodologias..... 127

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Características morfométricas dos órgãos florais e grãos de pólen de *Aechmea* 151

Tabela 3.2 - Comportamento dos grãos de pólen de *Aechmea bicolor* nos diferentes ambientes e períodos de avaliação..... 155

Tabela 3.3 - Germinação e comprimento do tubo polínico de Aechmea bicolor nos diferentes tratamentos de conservação e períodos de avaliação..... 159

Tabela 3.4 - Características dos grãos de pólen de *Aechmea bicolor* observados em microscopia eletrônica de varredura após diferentes tratamentos de conservação e períodos de avaliação..... 161

Tabela 3.5 - Dados morfométricos da espessura das camadas da exina através da microscopia eletrônica de transmissão nos diferentes tratamentos de conservação e períodos de avaliação 163

Tabela 3.6 - Frutos e sementes produzidas após polinização cruzada com *Aechmea bicolor* com grãos de pólen conservados por um ano sob diferentes condições de conservação 167

Capítulo 4

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/GC-MS 189

Tabela 4.2 - Categorias aromáticas de componentes voláteis identificados no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Alcantarea* e *Vriesea* por HS-SPME/GC-MS..... 201

Tabela 4.3 - Contribuição dos principais compostos voláteis para a diversidade seguindo o Método de Singh (1981) obtidos por HS-SPME/GC-MS de compostos voláteis em flores de 13 espécies de Bromeliaceae 205

Tabela 4.4 - Autovalores, porcentagem de variância total, autovalor acumulado e porcentagem acumulada dos cinco primeiros componentes principais obtidos por HS-SPME/GC-MS de compostos voláteis em flores de 13 espécies de Bromeliaceae 207

Capítulo 5

Tabela 5.1 - Características do florescimento de diferentes espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Alcantarea* e *Vriesea* após a indução ao florescimento com 30 mL de solução de ethrel® (etefon) a 240 mg mL^{-1} 227

Tabela 5.2 - Produção de frutos e sementes em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas*, *Alcantarea* e *Vriesea*, sob diferentes tratamentos de polinização 233

Tabela 5.3 - Hibridações interespecíficas e intergenéricas em espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea e Vriesea* 241

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. OBJETIVOS 25
3. REVISÃO DE LITERATURA 27
3.1. As bromeliáceas 27
3.2. A floricultura 37
3.3. Biologia reprodutiva e hibridações 39
3.4. Palinologia 42
3.5. Receptividade do estigma 43
3.6. Conservação de grãos de pólen 44
3.7. Compostos voláteis 46
Referências 48

4. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de Bromeliaceae 59
Resumo 61
Abstract 62
4.1. Introdução 63
4.2. Material e Métodos 66
4.3. Resultados e Discussão 69
4.4. Conclusões 99
Referências 99

5. Morfoanatomia e receptividade do estigma em Bromeliaceae 105
Resumo 107
Abstract 108
5.1. Introdução 109
5.2. Material e Métodos 110
5.3. Resultados e Discussão 112
5.4. Conclusões 132
Referências 132

6. Viabilidade e conservação de grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (Bromeliaceae) 135
Resumo 137
Abstract 138
6.1. Introdução 139
6.2. Material e Métodos 141
6.3. Resultados 147
6.4. Discussão 169
6.5. Conclusões 173
Referências 174

7. Identificação de compostos voláteis através de HS-SPME/GC-MS em flores de Bromeliaceae 179
Resumo 181
Abstract 182
7.1. Introdução 183
7.2. Material e Métodos 184
7.3. Resultados e Discussão 186
7.4. Conclusões 211
Referências 211

8. Sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas e intergenéricas em Bromeliaceae com potencial ornamental 217
Resumo 219
Abstract 220
8.1. Introdução 221
8.2. Material e Métodos 224
8.3. Resultados e Discussão 227
8.4. Conclusões 248
Referências 248

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS 255

1. INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae apresenta grande número de espécies e gêneros, e está distribuída em todo o território nacional e em todos os ecossistemas, sendo que a maior diversidade está na região da Mata Atlântica. Esta família apresenta grande potencial, tanto para plantas ornamentais, foco deste estudo, quanto plantas para alimentação, produção de fibras, enzimas de ação proteolítica e metabólitos secundários, além de desempenhar importante papel ecológico nos ecossistemas naturais.

A busca por novas espécies de plantas ornamentais tem crescido muito nos últimos anos, principalmente, aquelas marcadas pela originalidade, durabilidade e beleza. A inovação na floricultura pode ocorrer pela identificação de novas espécies ou genótipos com potencial ornamental no recurso genético existente, ou pela geração de novos híbridos. A exploração indiscriminada desta família no seu habitat natural, para os diversos usos, principalmente para fins ornamentais, resultou em diversas espécies ameaçadas ou potencialmente vulneráveis a entrarem em extinção (BRASIL, 2008).

Atualmente, as flores tropicais, dentre elas, as bromélias, têm se destacado no setor de floricultura, com vantagens na comercialização em relação às flores de regiões temperadas, devido, principalmente ao aspecto exótico, exuberância, beleza, alta durabilidade pós-colheita e grande aceitação do mercado externo (AKI; PEDROSA, 2002; LOGES et al., 2005).

Considerando o número de espécies e gêneros que compõem a família Bromeliaceae, poucos são os estudos publicados a respeito da biologia floral, conservação de grãos de pólen, estudos reprodutivos e hibridações interespecíficas e intergenéricas. Neste trabalho, foram estudadas espécies de duas subfamílias: Bromelioideae com cinco representantes do gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. (Figura 1 A-E), duas espécies e quatro variedades botânicas do gênero *Ananas* Mill. (Figura 1 F-K) e para a subfamília Tillandsioideae, foram estudadas a espécie *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (Figura 1 L) e cinco espécies do gênero *Vriesea* Lindl. (Figura 1 M-R).

Esta tese está subdividida em cinco capítulos e abrange estudos da morfoanatomia das flores, estudos de conservação de grãos de pólen, compostos voláteis e hibridações interespecíficas e intergenéricas em Bromeliaceae.

O **capítulo I** trata da morfoanatomia e viabilidade de grãos de pólen de Bromeliaceae, visando obter subsídios aos programas de melhoramento genético, identificando possíveis parentais para futuras hibridações, além de contribuir para a taxonomia desta família. Este capítulo tem como objetivo caracterizar os padrões da morfoanatomia polínica e avaliar a fertilidade masculina por meio da análise da viabilidade polínica através de testes histoquímicos e da germinação *in vitro* de grãos de pólen em dezoito espécies de Bromeliaceae.

No **capítulo II** apresenta estudos sobre a morfoanatomia e a receptividade do estigma em Bromeliaceae. A receptividade do estigma é fator fundamental para a determinação do melhor período de polinização e sucesso nas hibridações controladas. Dependendo da espécie, o estigma produz substâncias viscosas que promovem a aderência dos grãos de pólen, hidratação, germinação e crescimento do tubo polínico no estigma e estilete, essa característica contribui para provável fertilização, com formação de frutos e sementes. Desta forma este capítulo teve como objetivo, caracterizar morfoanatomicamente o estigma de dezoito espécies pertencentes a quatro gêneros de Bromeliaceae, bem como avaliar a receptividade do estigma verificando a eficiência de diferentes metodologias para dar subsídios aos programas de melhoramento genético desta família.

No **capítulo III** estudou-se a conservação de grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (Bromeliaceae), avaliando-se a eficiência de diferentes formas de conservação de grãos de pólen por meio de diferentes testes de viabilidade e estudos de morfologia e ultraestrutura polínica, para dar subsídio aos programas de melhoramento genético e minimizar a assincronia nos períodos de florescimento, além de servir como base para a conservação de recursos genéticos, produção de haploides, estudos com pólen recalcitrante, bioquímicos, fisiológicos e alergênicos.

No **capítulo IV** foi estimado os compostos voláteis através de HS-SPME/GC-MS em flores de treze espécies de Bromeliaceae, os quais desempenham um papel vital no ciclo de vida das plantas, principalmente na visitação de polinizadores, garantindo assim a reprodução das plantas e o sucesso evolutivo, possuem atividade biológica antimicrobiana e anti-herbivoria. Outra grande importância é a utilização desses compostos na indústria de alimentos, cosméticos, perfumaria, química e farmacêutica. Desta forma, este capítulo tem como objetivo identificar os compostos voláteis de flores de treze espécies de Bromeliaceae

utilizando microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Além disso, este manuscrito traz uma nova contribuição revelando o potencial que estas plantas possuem tanto na indústria, na síntese de produtos naturais, quando aos futuros estudos de processos ecológicos envolvendo a interação planta-animal.

Por fim, no **capítulo V** são apresentados resultados dos estudos reprodutivos e hibridações interespecíficas e intergenéricas em Bromeliaceae com potencial ornamental na busca de novos produtos para a floricultura e paisagismo. Concomitantemente apresentam-se as potenciais presenças de barreiras reprodutivas naqueles cruzamentos nos quais observou-se ausência de produção de sementes.

Figura 1 - Plantas dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill.*, Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl. A) *Ae. Bicolor* L. B. Sm*;* B) *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f.*;* C) *Ae. distichantha* Lem.*;* D) *Ae. fasciata* Baker*;* E) *Ae. nudicaulis* Griseb.*;* F) *An. macrodontes* E. Morren*;* G) *Ananas* sp. (L.) Merr.; H) *An. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal*;* I) *An. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal*;* J) *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal*;* K) *An. comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Sm.) Coppens & F. Leal*;* L) *Al. nahoumii* (Leme) J. R. Grant*;* M) *V. carinata* Wawra; N) *V. friburgensis* Mez*;* O) *V. michaelii* W. Weber*;* P) *V. paraibica* Wawra*;* Q) *V. simplex* Beer*;* R*) V. unilateralis* Mez

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é estudar aspectos da biologia floral e reprodutiva, conservação dos grãos de pólen, estudos de compostos voláteis em flores e hibridação interespecífica e intergenérica em Bromeliaceae com potencial ornamental. Para isto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Estudar aspectos da biologia floral de espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea*;
2. Estudar os aspectos morfoanatômicos de espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea*;
3. Estabelecer um protocolo de conservação de grãos de pólen para Bromeliaceae;
4. Estudar os compostos voláteis de flores de espécies de Bromeliaceae utilizando microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas;
5. Identificar os sistemas reprodutivos de espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea*, *Ananas, Alcantarea* e *Vriesea*;
6. Obtenção de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos envolvendo espécies de Bromeliaceae, avaliando-se a presença de barreiras pré ou pós-zigóticas na eventual ausência de produção de sementes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. As bromeliáceas

A família Bromeliaceae Juss, pertence à ordem Poales (APG III, 2009), com cerca de 58 gêneros e 3.352 espécies (LUTHER, 2012), constitui a maior família de distribuição natural restrita ao Novo Mundo, com exceção da *Pitcairnia feliciana* (Aug. Chev.) Harms e Mildbr, nativa da Guiné (SMITH, 1934; SMITH; DOWNS, 1979; BENZIN, 2000).

No Brasil são encontrados cerca de 40 gêneros e 1.500 espécies, sendo 650 espécies endêmicas do território brasileiro. A família tem ocorrência praticamente em todo território nacional, de Norte a Sul e em todos os ecossistemas, sendo que na região Sudeste apresenta maior diversidade, principalmente, na região da Mata Atlântica, destacando o país como o que apresenta a maior riqueza desta família de plantas (LEME; SIQUEIRA FILHO, 2006).

Tradicionalmente são aceitas três subfamílias em Bromeliaceae (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979): Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae, sendo as duas primeiras monofiléticas (TERRY; BROWN; OLMSTEAD, 1997; HORRES et al., 2007; GIVINISH et al., 2004; 2007; 2011). Assim, baseando-se nas hipóteses filogenéticas e moleculares, Givinish et al. (2007; 2011) propuseram uma nova divisão para a família, na qual os diferentes clados referentes à antiga Pitcairnioideae, são tratados como diferentes subfamílias. Desta forma, esta família passa a ter oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae.

A família Bromeliaceae apresenta plantas herbáceas, perenes, raramente arborescentes ou arbustivas, epífitas, rupícolas ou terrícolas, com caules pouco desenvolvidos, folhas alternas, espiraladas, formando tanques, recobertas por tricomas especializados, denominados escamas peltadas ou foliares (BENZING, 2000; VERSIEUX, 2009).

As inflorescências são racemosas, dispostas em espigas, panículas, ou flores solitárias, em geral terminais, partindo do interior da roseta e sustentada por um pedúnculo com diferentes tamanhos, normalmente apresentando brácteas coloridas. As flores são bissexuais, raramente unissexuais, actimorfas ou levemente zigomorfas, trímeras, hipóginas ou epíginas, envolvidas por uma bráctea. As pétalas e sépalas são livres, ou conatas, de cores

variadas, algumas espécies apresentam apêndices petalares. Os estames estão distribuídos em dois verticilos, normalmente livres, podendo ser encontrados adnatos à corola ou conatos, formando um tubo. As anteras são tetrasporangiadas, bitecas com deiscência rimosa (BENZING, 2000; VERSIEUX, 2009).

Os grãos de pólen podem ser porados, monocolpados ou inaperturados. O gineceu apresenta três carpelos unidos, ovário trilocular, súpero, ínfero ou semi-ínfero com nectários septais, normalmente formando labirinto. O estilete é terminal, localizado acima do ovário. O estigma normalmente é trífido, sendo que os ramos, ou lobos estigmáticos, são classificados em: conduplicado-espiral, lâmina-convoluta, ereto-simples, cupulado e coraliforme. O ovário apresenta placentação axilar com poucos ou muitos óvulos. Os óvulos são anátropos ou campilótropos, crassinucelados, bitegumentados com endosperma helobial. Os frutos podem ser cápsula septicida, loculicida, baga, ou composto, como no gênero *Ananas*. As sementes são pequenas, aladas, plumosas ou com mucilagens. O número básico de cromossomos normalmente é (n=25), porém há registros de poliploides e aneuploides (BENZING, 2000; VERSIEUX, 2009).

A subfamília Bromelioideae é a mais diversa da família, composta por 32 gêneros e mais de 934 espécies. A maioria das espécies são epífitas e é caracterizada por uma roseta central formando um tanque de água. Normalmente, possuem folhas espinhosas e frutos tipo baga. É a subfamília de maior importância econômica pois inclui o gênero *Aechmea,* que apresenta espécies de grande potencial ornamental, bem como o gênero *Ananas*, o representante de maior impacto econômico pelo consumo *in natura* dos frutos, indústria, valor ornamental, produção de fibras e metabólitos secundários (SMITH; DOWNS, 1979; LUTHER, 2012; SASS; SPECHT, 2010).

A subfamília Tillandsioideae possui apenas nove gêneros e aproximadamente 1.337 espécies, a maioria dos membros desta subfamília são epífitas. Todos os representantes possuem ausência de espinhos nas folhas, o fruto é uma cápsula seca contendo sementes plumosas que são geralmente dispersas pelo vento. Esta subfamília possui adaptações especiais para sobreviver em condições muito xéricas (SMITH; DOWNS, 1977; TERRY; BROWN; OLMSTEAD, 1997; BARFUSS et al., 2005; LUTHER, 2012).

Pitcairnioideae, sofreu uma subdivisão, na antiga classificação, a subfamília era composta de 17 gêneros e mais de 1.077 espécies e na nova classificação passou a ter seis gêneros e 623 espécies. As demais espécies foram redistribuídas nas outras subfamílias

sendo: Brocchinioideae composta de um gênero com 20 espécies; Hechtioideae com um gênero e 62 espécies, Lindmanioideae com dois gêneros e 45 espécies, Navioideae com cinco gêneros e 107 espécies e Puyoideae com um gênero e 218 espécies (LUTHER, 2012). Essas subfamílias, normalmente apresentam espécies terrestres e um sistema radicular extenso para absorção de água e nutrientes, geralmente possuem folhas com espinhos, frutos tipo cápsula seca, com pequenas sementes sem asas (SMITH; DOWNS, 1974; VERADARAJAN; GILMARTIN, 1988).

As bromélias desempenham um importante papel ecológico nos ecossistemas naturais, como no ciclo de nutrientes e de água, além de constituir um habitat e fontes de água para diversos animais (BENZING, 2000).

O uso comercial de bromélias como plantas ornamentais teve início na década de setenta, quando uma bromélia nativa do Rio de Janeiro, *Ae. fasciata* Baker, despertou o interesse comercial e curiosidade por compradores de plantas. A utilização destas espécies no mercado internacional teve início no século XVIII com a introdução da espécies como a *Guzmania lingulata* Mez. Assim, diferentes espécies começaram a chegar na Inglaterra, França, Alemanha e outros países europeus em número sempre crescente. A apreciação era tamanha que em 1811, a coleção do Royal Botanical Garden (Inglaterra) contava com 16 espécies (BENZING, 1980; 2000; STEENS, 2003). Atualmente as bromélias são consideradas um novo "*ornamental fashion hit*", contribuindo para jardins luxuosos ao redor do mundo (STEENS, 2003).

Outros potenciais são explorados nas plantas dessa família, a exemplo como fonte de alimento. O abacaxi é o representante de maior importância econômica, sendo uma das frutas tropicais mais exploradas economicamente no mundo (FAO, 2013); produção de fibras para fabricação de cordas e tecidos; na indústria automotiva e para a fabricação de papel, como no caso de *Ae. magdalenae* (André) André ex Baker (TICKTIN; NANTEL, 2004), *Neoglaziovia variegatta* (Arr. Cam.) Mez (SILVEIRA et al., 2011) e *An. comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & Leal (MARQUES; GUTIÉRREZ; DEL RIO, 2007; LEÃO et al., 2009); enzimas de ação proteolítica e metabólitos secundários com atividades biológicas antioxidantes e de grande valor para a indústria farmacêutica e cosmética (BENNETT, 2000; HARVEY, 2000; MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JUNIOR, 2009).

Grande parte do comércio de bromélias ornamentais, envolve plantas produzidas por cultura de tecidos ou multiplicação por brotos laterais, no entanto, há ainda centenas de

plantas comercializadas de forma predatória, incluindo espécies raras ou ameaçadas, o que representa uma ameaça para a biodiversidade (NEGRELLE; MITCHELL; ANACLETO, 2012).

Várias espécies de bromélias brasileiras encontram-se em risco de extinção devido à exploração indiscriminada, bem como a degradação do seu habitat. Entre as 472 espécies de plantas oficialmente listadas como extintas ou ameaçadas de extinção no Brasil, 38 são bromélias, além de 135 espécies da lista apresentarem deficiência de dados quanto ao seu risco (BRASIL, 2008).

Das 18 espécies estudadas no presente trabalho algumas são vulneráveis ou encontram-se em perigo de extinção. As informações taxonômicas, suas respectivas obras, categorias de ameaça, bem como a distribuição geográfica e os corredores da biodiversidade estão listadas na Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Táxons estudados da subfamília Bromelioideae/ Bromeliaceae ocorrentes no domínio da Mata Atlântica, suas respectivas obras e categorias de ameaça, bem como distribuição geográfica e Corredores de Biodiversidade

Espécies	Obra original	Categoria de ameaça	Ocorrência	Corredores da biodiversidade	Voucher
Aechmea bicolor L. B. Sm.	Smithsonian Misc. Collect. 126(1): 12, fig. 100. 1955	-	Endêmica, BA	CC	ESA 120990
Ae. bromeliifolia Baker ex Benth. & Hook.f.	Gen. Pl. 3(2): 664. 1883	VU (RS 2002)	América do Sul	CC, CSM, CNE	ESA 121275
Ae. distichantha Lem.	Jard. Fleur. 3: ad. t. 269. 1853	VU (RS 2002)	MG, RJ, SP, PR, SC, RS, Extra-Brasil	CC, CSM	ESA 121281
Ae. fasciata Baker	J. Bot. 17: 231. 1879	-	Endêmica, RJ	CSM	ESA 120987
Ae. nudicaulis Griseb.	Fl. Brit. W.I. 593. 1864	VU (RS 2002)	BA, PB, PE, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS, Extra-Brasil	CC, CSM, CNE	ESA 120991
Ananas macrodontes E. Morren	Belgique Hort. xxviii. 140. t. 4 et 5. 1878	-	MS, GO, BA	-	ESA 121286
Ananas sp.	Espécie não identificada	-	-	-	ESA 120988
Ananas comosus (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F.Leal	Bot. Mus. Leafl. 7: 79. 1939 Pineapple: Bot., Prod. & Uses 25 (2003 publ. 2002).	-	AM, AP, PI, Centro-Oeste, GF	CC, CSM,CNE	ESA 121274
An. comosus (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F.Leal	Syst. Veg., ed. 15 bis 7(2): 1286. 1830 Pineapple: Bot., Prod. & Uses 28 (2003 publ. 2002)	-	GO, MG, BA, ES, SP, PR, SC, RS, GF	CSM, CNE	ESA 121284
An. comosus (L.) Merr. var. *erectifolius* (L.B.Sm.) Coppens & F.Leal	Bot. Mus. Leafl. 7: 78. 1939 Pineapple: Bot., Prod. & Uses 26 (2003 publ. 2002)	-	Norte do Brasil e GF	-	ESA 121285
An. comosus (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L.B.Sm.) Coppens & F.Leal	Phytologia xvi. 464 (1968) Pineapple: Bot., Prod. & Uses 26 (2003 publ. 2002)	-	Norte do Brasil e GF	-	ESA 121405

Adaptado: Martinelli et al. (2008), outras contribuições incorporadas de Souza et al. (2012). CNE = Corredor do Nordeste; CC = Corredor Central; CSM = Corredor da Serra do Mar. VU = Vulnerável; RS (SEMA, 2002). GF = Guiana Francesa; Estados Brasileiros: AP = Amapá, AM = Amazonas, BA = Bahia, ES = Espírito Santo, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MG = Minas Gerais, PB = Paraíba, PR = Paraná, PE = Pernambuco, RJ = Rio de Janeiro, RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, SP = São Paulo

Tabela 2 - Táxons estudados da subfamília Tillandsioideae/ Bromeliaceae ocorrentes no domínio da Mata Atlântica, suas respectivas obras e categorias de ameaça, bem como distribuição geográfica e Corredores de Biodiversidade

Espécies	Obra original	Categoria de ameaça	Ocorrência	Corredores da biodiversidade	Voucher
Alcantarea nahoumii (Leme) J.R. Grant	Trop. Subtrop. Pflanzenwelt 91: 13 1995	VU (BRASIL, 2008)	BA	CC	ESA 120986
Vriesea carinata Wawra	Oesterr. Bot. Z. 12: 349. 1862	VU (RS 2002)	BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS	CC, CSM	ESA 121404
V. friburgensis Mez	Fl. Bras. 3(3): 537. 1894	VU (RS 2002)	PE, BA, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS, Extra-Brasil	CC, CSM	ESA 121282
V. michaelii W. Weber	Feddes Repert. 93(5): 349. 1982	-	Desconhecida	-	ESA 121280
V. paraibica Wawra	Itin. Princ. S. Coburgi i. 160. 1883	-	RJ, MG	CSM	ESA 121276
V. simplex Beer	Fam. Brom. 97. 1856	-	BA, ES, RJ, SP, Extra-Brasil	CC, CSM	ESA 120989
V. unilateralis Mez	Fl. Bras. 3(3): 545. 1894	EP (SP 2004)	ES, RJ, SP, PR, SC	CC, CSM	ESA 121283

Adaptado: Martinelli et al. (2008), outras contribuições incorporadas de Versieux e Wanderley (2010). CC = Corredor Central; CSM = Corredor da Serra do Mar. EP = Em Perigo; VU = Vulnerável; RS (RIO GRANDE DO SUL, 2002); SP (SÃO PAULO, 2004); Revisão da Lista Oficial do Brasil (BRASIL, 2008). Estados Brasileiros: AP = Amapá, AM = Amazonas, BA = Bahia, ES = Espírito Santo, GO = Goiás, MS = Mato Grosso do Sul, MG = Minas Gerais, PB = Paraíba, PR = Paraná, PE = Pernambuco, RJ = Rio de Janeiro, RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, SP = São Paulo

***Aechmea* Ruiz & Pav.**

O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. é um dos mais complexos gêneros da família Bromeliaceae, pertence à subfamília Bromelioideae e reúne cerca de 276 espécies, distribuídas por toda a América Tropical, sendo 70% na Mata Atlântica (FARIA; WENDT; BROWN, 2010; LUTHER, 2012). Smith e Downs (1979) dividiram este gênero em oito subgêneros: *Aechmea* Ruiz & Pav., *Podaechmea* Mez, *Platyaechmea* (Baker) Baker, *Ortgiesia* (Regel) Mez, *Pothuava* (Baker) Baker, *Lamprococcus* (Beer) Baker, *Macrochordion* (de Vriese) Baker e *Chevaliera* (Glaudich ex Beer) Baker.

***Ananas* Mill.**

O gênero *Ananas* tem como centro de diversidade a região Amazônica (FERREIRA; CABRAL, 1993; SOUZA et al., 2012) e sua história taxonômica é uma das mais conturbadas da família, uma síntese pode ser obtida em Leal, Coopens d'Eeckenbrugge e Holst (1998), que ressaltam o status insatisfatório da taxonomia do gênero. Pouquíssimas contribuições foram incorporadas à taxonomia após as propostas de Smith (1939; 1971) e Smith e Downs (1979). No entanto, Coppens d'Eeckembrugge e Leal (2003), baseando-se em características morfológicas, bioquímicas, moleculares e em dados de biologia reprodutiva, propuseram uma nova classificação que reconhece um único gênero com duas espécies, a saber: *An. macrodontes* Morren *e An. comosus* (L.) Merril, que inclui cinco variedades botânicas, *An. comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & Leal, *An. comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & Leal, *An. comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal, *An. comosus* var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Smith) Coppens & Leal, *An. comosus* var. *comosus* (L. Merril) Coppens & Leal.

O abacaxi é o representante de maior importância econômica da família Bromeliaceae e se constitui uma das fruteiras tropicais mais exploradas economicamente no mundo, alcançando uma produção de 21,86 milhões de toneladas em 2011, sendo produzido principalmente na Tailândia, Brasil, Costa Rica, Filipinas e Índia (FAO, 2013). A produção brasileira de abacaxi é crescente, tendo alcançado a cifra de 1,58 bilhões de frutos em 2011 (IBGE, 2013).

O uso ornamental de abacaxizeiros vem se destacando nos últimos anos, gerando uma demanda, principalmente no mercado externo, que se deve ao exotismo e ao colorido dos pequenos abacaxis (SOUZA et al., 2009; 2012), ainda que sua exploração comercial seja menos significativa que as cultivares voltadas para a alimentação (LEME; MARIGO, 1993).

***Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms**

O gênero *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, está intimamente relacionado ao gênero *Vriesea*, *stricto sensu*, sendo considerado como um subgênero (MEZ, 1934-1935; SMITH; DOWNS, 1977) até recentemente. É considerado como endêmico da Mata Atlântica e secundariamente no Cerrado. O bioma Mata Atlântica é considerado um *hotspot* e com mais de 90% de área original devastada, possui 32 espécies, e frequentemente empregadas por paisagistas como plantas ornamentais em jardins (GRANT, 1995; LUTHER, 2012; VERSIEUX et al., 2012).

Normalmente estas espécies ocorrem nos afloramentos rochosos, nos domínios da Mata Atlântica dos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, desde o nível do mar até 1.900 metros de altitude, e em áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço, na Bahia e Minas Gerais (VERSIEUX; WANDERLEY, 2007a; 2007b).

***Vriesea* Lindl.**

O gênero *Vriesea* é composto de aproximadamente 281 espécies, sendo um dos maiores na subfamília Tillandsioideae e o terceiro na família Bromeliaceae e é dividido em duas seções, *Vriesea* e *Xiphion*. Este gênero tem dois centros de diversidade, um no leste do Brasil com 84% das espécies, e outro mais ao norte, na América do Sul, América Central e Caribe (COSTA; RODRIGUES; WANDERLEY, 2009).

As plantas são, em sua maioria epífitas, de tamanho variável, com folhas sem espinhos, pêndulas ou firmes, totalmente verdes ou com manchas densas, cobertas por tricomas. As inflorescências são duradouras e possuem flores de diferentes colorações. As inflorescências podem ser em forma de espiga, panícula, curvadas ou pêndulas (SMITH; DOWNS, 1977). Este gênero apresenta grande potencial ornamental, com várias espécies e híbridos já disponíveis no mercado.

3.2. A floricultura

A floricultura comercial é uma atividade profissional e empresarial de produção, comércio e distribuição de flores e plantas ornamentais, representa um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). Além do aspecto social, principal gerador de empregos, renda e fixação do homem no campo, a floricultura é uma atividade agrícola de exploração intensiva, que envolve uma complexa cadeia produtiva. Engloba, a produção e comercialização de folhagens e flores de corte, plantas de vaso e de mudas, cujo mercado tem potencial para obter bons retornos econômicos, com grandes possibilidades de expansão futura (CURTI, 2011).

Entre os aspectos que contribuem para sua expansão estão as condições climáticas do Brasil que favorecem o cultivo de flores, tanto de clima temperado como tropical. Em função dessa diversidade climática é possível produzir flores, folhagens e outros derivados, durante todo o ano (FRANÇA; MAIA, 2008).

A capacidade de geração de emprego e renda da floricultura é muito grande, empregando aproximadamente 120 mil pessoas, com 80% da mão de obra formada por mulheres, além de 18,7% do total, ser de origem familiar (VENCATO, 2006; JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). Entre as atividades agrícolas, a floricultura destaca-se por empregar, em média, de 10 a 15 funcionários por hectare, superando em dez vezes os demais cultivos (VENCATO, 2006). Um adicional importante é a geração de empregos permanentes, devido às peculiaridades do manejo, que exige mão de obra especializada em muitas etapas do cultivo não compensando, dessa forma o uso de mão de obra temporária (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

Segundo estimativas, nos últimos anos, a atividade passou a agregar perto de 8 mil produtores, em propriedades com tamanho médio de 1,45 hectares, em área de 11.400 hectares (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011), geram ao redor de 170.000 empregos diretos, divididos em 49,4% na produção, 3,5% na distribuição, 40,0% no varejo e 7,1% em outras funções de apoio (VENCATO, 2006).

O mercado mundial de flores e plantas ornamentais, incluindo o mercado interno dos diferentes países e suas exportações, está atualmente avaliado em US$ 107 bilhões anuais, com uma produção mundial de flores ocupando uma área estimada de 190 mil hectares (JUNQUEIRA; PEETZ, 2012).

Segundo o “United Nations Commodity Trade Statistics Database”, em 2012, o fluxo no comércio internacional dos produtos da floricultura, foi de US$ 16,5 bilhões, com concentração de importações pela ordem decrescente de valor, pela Alemanha (18,19%), Estados Unidos (11,28%), Holanda (10,68%), Reino Unido (9,20%), França (7,65%), entre outros. As exportações movimentaram em torno de US$ 15,7 bilhões, com concentração da Holanda (66,06%), Alemanha (5,78%), Bélgica (5,55%), Estados Unidos (2,53%), Espanha (2,05%), entre outros (COMTRADE, 2013).

A balança comercial brasileira de flores e plantas ornamentais somaram em 2012, o total de exportações de US$ 26,07 milhões, uma redução de 7,81% sobre os valores vendidos no mercado internacional no ano anterior (US$ 28,28 milhões). As importações atingiram US$ 40,33 milhões, com um saldo negativo de US$ 14,26 milhões (COMTRADE, 2013).

O mercado de produtos da floricultura está segmentado em quatro grupos, flores e botões cortados frescos ou secos (40,72%), plantas ornamentais e suas mudas (43,24%), bulbos, tubérculos e raízes (9,90%) e as folhagens, folhas e ramos cortados frescos (6,14%) (COMTRADE, 2013).

Os países em desenvolvimento são os que mais se destacam no aumento da produção e oferta. Alguns países da América Central e do Sul lograram ganhar espaço no mercado mundial e elevaram a produção de flores em um ritmo superior à média. Isso deve-se, segundo o “Ministry of Agriculture, Food & Fisheries” do Canadá (2003), a custos de produção menores, seja em razão de condições climáticas favoráveis, baixos salários e também, baixos custos de transporte, como é o caso da Colômbia, o segundo maior exportador de flores de corte, depois da Holanda.

Atualmente, as flores tropicais, com destaque às bromélias, orquídeas e helicônias, têm se destacado no setor de floricultura, com vantagens na comercialização em relação às flores de regiões temperadas, devido, principalmente ao aspecto exótico, exuberância, beleza, alta durabilidade pós-colheita e grande aceitação do mercado externo. O custo de aquisição é menor e são muito valorizadas para decoração de grandes e pequenos espaços (AKI; PEDROSA, 2002; LOGES et al., 2005).

De acordo com Cathcart (1995), a Europa é um polo importante na produção de bromélias, tendo como destaque a Holanda e Bélgica. Outros centros importantes de produção e comercialização de bromélias são os estados da Flórida, Califórnia e Hawaii, com

uma produção comercial de aproximadamente oito espécies e alguns híbridos movimentando um mercado estimado de US$ 20 milhões por ano. Infelizmente, não há nenhuma informação atualizada desde Cathcart (1995).

3.3. Biologia reprodutiva e hibridações

Na floricultura, a hibridação é uma importante fonte de variação genotípica (VERVAEKE; DEROOSE; DE PROFT, 2003; VERVAEKE et al., 2002a; 2003a; 2004a). Hibridações interespecíficas e intergenéricas permitem criar genótipos com novas combinações de formas e cores (VERVAEKE et al., 2001; 2004a). Uma etapa primordial para o sucesso na hibridação interespecífica e intergenéricas refere-se à viabilidade dos cruzamentos, somente podendo ser confirmada através da realização dos mesmos e confirmação da obtenção de sementes.

Os primeiros registros de hibridações em Bromeliaceae foram relatados em 1879, por Eduard Morren com o gênero *Vriesea* (SAMYN, 1995). Em anos subsequentes, alguns relatos foram apresentados pela Sociedade Internacional de Bromélias "Bromeliad Society International" no "Journal of the Bromeliad Society" sobre a obtenção de alguns híbridos interespecíficos e intergenéricos. Ainda assim, apenas uma pequena porcentagem entre as numerosas combinações possíveis já foram testadas, e dentre elas, nem todas apresentaram sucesso.

Smith (1983) apresenta um levantamento detalhado de híbridos intergenéricos disponíveis na literatura e em coleções particulares, no qual relata algumas combinações envolvendo as espécies e gêneros relatados neste trabalho, a exemplo: *Anamea* (*Aechmea* x *Ananas*), *Anagelia* (*Ananas bracteatus* x *Neoregelia carolinae*), *Androleachmea* (*Androlepis skinmeri* x *Aechmea fasciata*), *Cryptmea* (*Achmea fasciata* x *Cryptantus beickeri*), *Nidumea* (*Nidularium* ssp. x *Aechmea fasciata*), *Orthomea* (*Orthophytum navioides* x *Aechmea fasciata*), *Quesmea* (*Quesnelia marmorata* x *Aechmea fasciata*; *Quesnelia testudo* x *Aechmea distichantha*), entre outros. Esse mesmo autor relata a dificuldade de obtenção de informações e sua preocupação com o detalhamento das informações descritas.

A maioria das espécies de bromélias é polinizada por beija flores, pela atração das brácteas vistosas e coloridas e pela presença de néctar abundante. Morcegos também são importantes agentes polinizadores, pela presença de odor forte em muitas flores de antese

noturna. Além da ornitofilia e quiropterofilia são referidos outros tipos de polinização por borboletas, abelhas e besouros (SAZIMA; BUZATO; SAZIMA, 1995; SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001).

Cruzamentos entre *Vriesea splendens* (Bobgn.) Lem. x *Tillandsia cyanea* E. Morren e *V. splendens* x *Guzmania lingulata* Mez, produziram híbridos estéreis (VERVAEKE et al., 2004a). A falta de informações a respeito da sua biologia floral e desenvolvimento reprodutivo tem sido uma barreira para a obtenção de novas combinações entre as Bromeliaceae.

Matallana et al. (2010) em estudo com 40 espécies de 11 gêneros e duas subfamílias, verificou que dentro da subfamília Bromelioideae, 40% das espécies são autoincompatíveis. Para a Tillandsioideae, apenas uma espécie (6%) foi autoincompatível. Esses mesmos autores fizeram um levantamento bibliográfico em 20 artigos e observaram que 26% (10/39) das espécies das subfamílias Bromelioideae (6/8), Tillandsioideae (3/22) e Pticarnioideae (1/9) são autoincompatíveis. Muitas espécies apresentam alogamia como sistema reprodutivo preferencial, além de serem dependentes de agentes polinizadores para a fertilização (SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001; CASCANTE-MARÍN et al., 2005; LENZI; MATOS; ORTH, 2006).

Siqueira Filho e Machado (2001), observaram que *Canistrum aurantiacum* é autocompatível, porém a produção de sementes é maior quando ocorre polinização por beija-flores, em relação à autopolinização. Algumas espécies autocompatíveis, como *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer, liberam seu pólen ainda na pré-antese (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006). Há também espécies cuja antese ocorre em período noturno (*Vriesea gamba* F. J. Mueller), sendo estas polinizadas por morcegos (SAZIMA; BUZATO; SAZIMA, 1995).

Em abacaxi vários cruzamentos vêm sendo realizados na Embrapa Mandioca e Fruticultura, com êxito no que diz respeito ao potencial ornamental desta espécie (SOUZA, et al., 2009; SOUZA, 2010). Estes autores buscam híbridos para vaso, paisagismo, folhagens, flores de corte e minifrutos. O sucesso destes depende diretamente dos parentais envolvidos nos cruzamentos. Para minifrutos os autores utilizaram a variedade de abacaxi *ananassoides,* por possuir porte reduzido e frutos pequenos, a variedade *bracteatus* foi utilizada para paisagismo e folhagem, ambas com espinhos. A ausência de espinho em abacaxi está na variedade *erectifolius*, parental indicado para todos os cruzamentos envolvendo esta espécie.

Nas hibridações voltadas para ornamentais buscam-se plantas com maior durabilidade e longevidade na inflorescência, cores mais acentuadas, porte reduzido, resistência às principais pragas e doenças, florescimento uniforme, maior adaptabilidade em diferentes condições ambientais além da ausência de espinhos, sendo este um entrave no manejo e comercialização dessas espécies.

Estudos sobre possíveis barreiras à hibridação em Bromeliaceae e formas de superá-las foram descritas por Vervaeke et al. (2001; 2002a; 2002b) que observaram barreiras pré e pós-zigóticas como algumas anomalias no estilete principalmente na região basal; comprimento desigual do estilete e tubo polínico; morfologia e tamanho do grão de pólen; não germinação do grão de pólen sobre o estigma devido à hidratação insuficiente, ou descontrolada, ou a falta de nutrientes (principalmente cálcio e boro); ausência de fatores quimiotrópicos na região da micrópila; degeneração precoce do embrião e endosperma, além de outros fatores referentes à polinização como horário de maior receptividade do estigma e polinizadores. Estes autores relatam a necessidade de novas investigações quanto às barreiras, principalmente sobre as formas para superá-las.

De forma geral, o grau de parentesco indicado pela posição taxonômica é o critério mais útil para orientar as hibridações. Falhas na obtenção de híbridos F1 pode ser resultado da não fertilização ou aborto do embrião em diferentes fases de desenvolvimento, desde as primeiras divisões embrionárias até a maturidade, devido à incompatibilidade de genes (alelo-S) presentes no núcleo ou mesmo no citoplasma (VERVAEKE et al., 2001). Estas falhas costumam ser classificadas como barreiras pré-zigóticas, as quais, ocorrem pela incapacidade de germinação do grão de pólen no estigma, ou pela inibição do crescimento do tubo polínico no estilete (VERVAEKE et al., 2002b).

No caso das barreiras pré-zigóticas algumas metodologias vêm sendo utilizadas em plantas ornamentais para superá-las, como a remoção parcial do estilete antes da polinização (VERVAEKE et al., 2004b; 2004c; 2005), polinização placental *in vitro* (CASTANHO; DE PROFT, 2000) e enxertos placentais *in vitro* (LEDUC; DOUGLAS, MONNIER, 1992).

Segundo Allard (1971) o aborto do zigoto ou embrião é considerado uma barreira pós-zigótica e pode ser gerado pela incompatibilidade de tecidos do embrião com o endosperma ou do óvulo com o ovário da planta mãe. Essas barreiras podem ser superadas pelo cultivo *in vitro* do embrião híbrido ou do óvulo (VERVAEKE et al., 2004a; 2004b).

Outro fator limitante para a ampliação da produção de híbridos em bromélias é a falta de informações a respeito de sua biologia floral e sistema reprodutivo (MARTINELLI, 2000).

3.4. Palinologia

Características morfopolínicas foram usadas pela primeira vez para a sistemática de Bromeliaceae por Mez (1891-1894; 1896). Mez (1934-1935) caracterizou três subfamílias de acordo com o padrão de abertura do grão de pólen.

Considerando o tamanho desta família, poucos são os estudos publicados sobre a morfologia e ultraestrutura polínica a exemplo de Ehler e Schill (1973), Erdtman e Praglowski (1974), Wanderley e Melhem (1991), Halbritter (1992), Halbritter e Till (1998), Tardivo e Rodrigues (1998), Vervaeke et al., (2003b), Souza, Medonça e Gonçalves-Mendonça (2004) e Moreira, Cruz-Barros e Wanderley (2005). Esses autores estudaram aproximadamente 750 espécies e utilizaram diferentes técnicas microscópicas para a caracterização dos grãos de pólen com o intuito de dar subsídios à taxonomia desta família.

A morfologia e a ultraestrutura polínica tem oferecido importantes dados para a taxonomia e melhoramento genético de Bromeliaceae, auxiliando na melhor definição da delimitação genérica e de espécies, como pode ser observado nos trabalhos desenvolvidos por Erdtman e Praglowski (1974); Wanderley e Melhem (1991); Souza, Medonça e Gonçalves-Mendonça (2004); Moreira, Cruz-Barros e Wanderley (2005).

A viabilidade do grão de pólen, medida da fertilidade masculina, pode ser determinada através de diferentes técnicas. Estas podem ser agrupadas em métodos diretos, tais como a indução da germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; PARTON et al., 2002; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007) e *in vivo* (OLIVEIRA; MAUÉS, KALUME, 2001) ou métodos indiretos baseados em parâmetros citológicos como a coloração (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; KEARNS; INOUYE, 1993).

Dentre os corantes mais utilizados destacam-se o carmim acético, sudan IV, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (STANLEY; LINSKENS, 1974) e 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo.

Apesar de serem procedimentos simples, rápidos e baratos, os testes histoquímicos não fornecem informações sobre a capacidade de germinação dos grãos de pólen. Esse aspecto pode ser determinado através da germinação *in vitro* (SOARES et al., 2008).

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado para determinar a fertilidade dos grãos de pólen, permitindo o desenvolvimento do tubo polínico. O sucesso da germinação *in vitro* depende de vários fatores como: espécie vegetal, estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e composição do meio de cultura (TAYLOR; HEPLER, 1997; SOARES et al., 2008). Ajustes na composição dos meios de cultura devem ser feitos para cada espécie (BREWBAKER; KWACH, 1963; DAFNI, 1992).

Para se obter estimativas confiáveis de viabilidade do grão de pólen, é necessário dispor de um meio de cultura que possibilite a expressão do seu potencial fisiológico para a formação do tubo polínico. Diferentes meios de cultura para a germinação *in vitro* de grãos de pólen são relatados para um grande número de espécies, com considerável variação intra e interespecífica (PFAHLER; PEREIRA; BARNETT, 1997; PARTON et al., 2002).

A germinação *in vitro* de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais é realizada em meio de cultura contendo carboidratos e substâncias estimulantes da germinação (micronutrientes e hormônios). Muitas substâncias orgânicas e inorgânicas como sacarose, ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio exercem efeitos na germinação *in vitro* dos grãos de pólen (BREWBAKER; KWACK, 1963; PARTON et al., 2002).

Entretanto, algumas observações devem ser consideradas na escolha do teste de viabilidade, já que no caso do uso de corantes, estes podem reagir com estruturas ou constituintes químicos, confundindo os resultados obtidos (STANLEY; LINSKENS, 1974). Por outro lado, a germinação *in vitro* não é um método conclusivo, não garantindo a fertilização, sendo a fertilização *in vivo* o método mais eficiente.

3.5. Receptividade do estigma

A receptividade do estigma também é fator fundamental para determinar o melhor período de deposição dos grãos de pólen na flor e obtenção de sucesso nas hibridações. O estigma, normalmente, dependendo da espécie de planta, produz substâncias viscosas que promovem a aderência dos grãos de pólen, hidratação, germinação e crescimento do tubo

polínico dentro do estigma, essa característica contribui para provável fertilização, com formação de frutos e sementes (ALMEIDA, 2007). A presença de esterases e peroxidases na superfície do estigma tem sido considerada um indicativo de receptividade (DAFNI; MAUES, 1998).

Dentre os testes mais utilizados destaca-se o teste com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por sua facilidade de condução, aplicabilidade, obtenção de material, diagnóstico facilitado e baixo custo. O peróxido de hidrogênio indica a receptividade através da formação de bolhas de ar, é um método simples e barato, porém a presença de qualquer dano ao tecido, pode levar a um falso resultado (KEARNS; INOUYE, 1993). Outros métodos de receptividade do estigma são descritos na literatura, como o caso da reação de benzidina + peróxido de hidrogênio (DAFNI, 1992), cuja reação forma uma coloração azul escuro com presença de bolhas de ar e a reação de α-naftil-acetato com fast blue B salt que com a reação de esterase, apresentam estigmas receptivos corados de preto, ou uma coloração escura (KEARNS; INOUYE, 1993).

3.6. Conservação de grãos de pólen

A possibilidade de conservação de grãos de pólen pode contribuir grandemente para a realização de hibridações interespecíficas e intergenéricas, considerando-se que a falta de sincronia nos períodos de florescimento está entre os principais problemas detectados para a realização de cruzamentos nesta família, além de que, esses mesmos estudos podem servir para a conservação de recursos genéticos, produção de haploides, estudos com pólen recalcitrante, bioquímicos, fisiológicos e alergênicos (CONNOR; TOWILL, 1993; BAJAJ, 1995; GROUT; ROBERTS, 1995).

Métodos convencionais de armazenamento de grãos de pólen envolvendo baixas temperaturas e umidades são descritos para várias espécies (GANESHAN, 1986; YATES; SPARKS, 1989; SACKS; ST'CLAIR, 1996; HONDA; WATANABE; TSUTSUI, 2002; LORA et al., 2006; VENDRAME et al., 2008; BETTIOL NETO et al., 2009). Estudos com criopreservação de pólen também foram aplicados para diferentes espécies, considerando-se diferentes métodos de crioproteção (TAI; MILLER, 2002; VENDRAME et al., 2008). Ainda que existam poucos trabalhos com conservação de grãos de pólen de bromeliáceas, alguns resultados foram obtidos por Parton, Deroose e De Proft (1998) e Parton et al. (2002) em *Ae. fasciata,*

Ae. chantinii, *Vriesea* 'Leen', *Vriesea* 'Christiane', *Tillandsia cyanea*, *Pitcairnia herdee,* com bons resultados, utilizando temperaturas ultrabaixas. A comprovação da viabilidade foi realizada pela germinação *in vitro.*

Na maioria dos estudos sobre conservação de grãos de pólen de diferentes espécies, no entanto, os testes de viabilidade são limitados apenas à germinação *in vitro* ou avaliações histoquímicas, sem a avaliação sobre a capacidade de geração de sementes através de cruzamentos e hibridações.

A manutenção da viabilidade de grãos de pólen além do período de conservação depende principalmente de fatores como o estágio fisiológico da flor, temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, do grau de umidade do grão de pólen, dentre outros (AKIHAMA; OMURA; KOSAKI, 1979; SOARES et al., 2008).

A conservação, seja para fins de melhoramento ou de preservação de germoplasma, tem por objetivo preservar a viabilidade de grãos de pólen armazenados e, por isso, é importante o monitoramento dessa capacidade antes, durante e depois da conservação. Dessa forma, pode-se estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem ser conservados sem perder a capacidade de germinação e fertilização, tornando-se uma importante ferramenta para o melhoramento e para o intercambio de germoplasma (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008; GANESHAN et al., 2008).

Em casos de ultracongelamento, o teor de umidade no grão de pólen pode ser determinante para sua sobrevivência e para a manutenção de sua viabilidade, pois a formação de cristais de gelo durante o período de armazenamento pode causar rompimento de tecidos, danificando sua estrutura (YATES; SPARKS, 1989; TAYLOR; HEPLER, 1997; GANESHAN et al., 2008). Tratamentos de desidratação são indicados para evitar este evento, ainda que a retirada excessiva de água dos tecidos possa inviabilizar o grão de pólen, ficando evidente a necessidade de cuidados nesta etapa (BENSON, 2008).

Para atingir o ponto ideal de desidratação, vários estudos prévios devem ser realizados com o material vegetal. Parton, Deroose e De Proft (1998) e Parton et al. (2002) reduziram a umidade das anteras por quatro horas em sílica gel e obtiveram resultados satisfatórios. Na germinação, Towill (1985) relatou que para uma criopreservação eficiente de grãos de pólen o teor de umidade deve ser reduzido para 15 a 20%.

A viabilidade dos grãos de pólen conservados para cruzamentos deve estar em torno de 50 a 80% e apresentar tubos polínicos bem desenvolvidos (SCORZA; SHERMAN, 1995). À

medida em que o grão de pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. O objetivo, com a conservação é que não ocorra esse processo de envelhecimento e o pólen possa manter sua viabilidade dentro dos limites para seu posterior uso.

3.7. Compostos voláteis

As plantas são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas e têm a capacidade de sintetizar substâncias para as principais funções vitais, através do metabolismo primário, tais como produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares, entre outras moléculas. No metabolismo secundário, uma das principais funções, é a biossíntese de estruturas complexas como alcaloides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides (ALVES, 2001).

Estes metabólitos secundários ou compostos voláteis desempenham um papel vital no ciclo de vida das plantas, principalmente na atração de polinizadores e disseminadores de sementes, garantindo assim a reprodução das plantas e o sucesso evolutivo (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002; REINHARD; SRIVIVASAN; ZHANG, 2004), além disso, possuem atividade biológica antimicrobiana e anti-herbivoria, que podem diretamente repelir microrganismos e animais ou atrair predadores naturais, protegendo indiretamente a planta através de interações tritróficas (MORAES; MESCHER; TUMLINSON, 2001; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; ARAB; BENTO, 2006), sugerindo seu envolvimento na proteção das partes reprodutivas das plantas durante a floração.

Outra grande importância é a utilização desses compostos na indústria de alimentos, de cosméticos, perfumaria, química e farmacêutica (CHENG, 2010; DARJAZI, 2011; PAIBON et al., 2011; VERMA; PADALIA; CHAUHAN, 2011), particularmente com o aumento da preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais e outros compostos de origem biológica (HUANG; LEE; CHOU, 2001).

A maioria das Bromeliaceae possuem flores inodoras, exceto em alguns poucos casos relatados por Siqueira Filho (1998), Siqueira Filho e Machado (2001), Araújo, Fischer e Sazima (2004) e Canela e Sazima (2005). Nestas espécies o odor é geralmente doce e suave e está associado à polinização por abelhas. Por sua vez, *Encholirium glaziovii* Mez. e algumas

espécies de *Vriesea*, apresentam odor desagradável e copiosa quantidade de néctar, sendo visitadas por morcegos (SAZIMA; VOGEL; SAZIMA, 1989; SAZIMA; BUZATO; SAZIMA, 1995) já *Bromelia antiacantha* Bertol. apresentou um odor forte e adocicado que diminuiu ao longo do dia (CANELA; SAZIMA, 2005).

Vários estudos com o intuito de identificar e quantificar compostos voláteis em flores vêm sendo realizadas para diversas espécies, a exemplo: *Echinacea* Moench (MAZZA; COTTRELL, 1999); *Caesalpinia echinata* Lam. (REZENDE et al., 2004); *Rosa rugosa* Thunb. (FENG et al., 2010); *Gentiana* L. (LEE et al., 2010). Estes compostos voláteis são constituídos principalmente por terpenóides, fenilpropanóides, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e ésteres e derivados de ácidos graxos, e representam cerca de 1% dos metabólitos secundários conhecidos de plantas (DUDAREVA; PICHERSKY; GERHENZON, 2004).

Compostos voláteis em Bromeliaceae têm sido estudados há mais de 60 anos e está restrito apenas para o gênero *Ananas*, especificamente relacionados aos frutos. Diversos autores já identificaram mais de 280 compostos, e os mais abundantes são os ésteres, terpenos, cetonas e aldeídos (TEAI et al., 2001; TOKITOMO et al., 2005; TOKITOMO, 2007; LIU et al., 2008; WEI et al., 2011). Com o melhor dos nossos conhecimentos, está é a primeira vez que estudos relacionados a compostos voláteis em flores de Bromeliaceae é apresentado.

REFERÊNCIAS

AKI, A.; PEROSA, J. M. Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, p. 13-23, 2002.

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agricultural Research**, Peradeniya, Sri Lanka, v. 13, p. 238-241, 1979.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381 p.

ALMEIDA, O. S. **Biologia floral. Tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.).** 2007. 88 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2007.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 3, p. 10-15, 2001.

APG - Angiosperm Phylogeny Group. 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.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 151-158, 2006.

ARAÚJO, A. C.; FISCHER, E. A.; 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.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Cryopreservation of plant germplasm I. New York: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 3-18.

BARFUSS, M. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, New York, v. 92, p. 337-351, 2005.

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.

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation**. A practical guide. New York: Springer, 2008. p. 15-32.

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

BENZING, D. H. **The biology of the Bromeliads**. Eureka, California: Mad River Press. 1980. 228 p.

BETTIOL NETO, J. M.; NERO, M. D.; KAVATI, R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 68, p. 825-837, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa nº 6**, de 23 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033 615.pdf>. Acesso em: 10 Jul. 2012.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal Botany**, New York, v. 50, p. 859-865, 1963.

CANADA. Ministry of Agriculture, Food & Fisheries. **An overview of the BC floriculture industry**. FactSheet. British Columbia, Canada, Oct. 2003. Disponível em: <http://www.agf.gov.bc.ca/ornamentals/publications/documents/overview_floriculture_2003oct28.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2012.

CANELA, M. B. F.; SAZIMA, M. The Pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil: *Ornithophilous* versus *Melittophilous* Features. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 411-416, 2005.

CASCANTE-MARÍN, A.; OOSTERMEIJER, J. G. B.; WOLF, J. H. D.; DEN NIJS, J. C. M. Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a Premontane Tropical Forest. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 203-209, 2005.

CASTANHO, C. I.; DE PROFT, M. P. *In vitro* pollination of isolated ovules of *Cichorium intybus*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 616-621, 2000.

CATHCART, D. J. C. The importance of maintaining bromeliad imports. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, p. 6-21, 1995.

CHENG, H. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 50, p. 938-950, 2010.

COMTRADE. **United Nations Commodity Trade Statistics Database**. Disponível em: <http://comtrade.un.org/db/> Acesso em: 22 ago. 2013.

CONNOR, K. F.; TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica,** Wageningen, v. 68, p. 77-84, 1993.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K.G. (Ed.). **The pineapple**: botany, production and uses. New York: CABI Publishing, 2003. p. 13-32.

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

CURTI, G. L. Flores e plantas ornamentais. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**, Florianópolis, v. 32, p. 89-93, 2010-2011.

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

DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple method to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 2, p. 117-180, 1998.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ceres**, Viçosa, v. 55, p. 433-438, 2008.

DARJAZI, B. B. A comparison of volatile components of flower of page mandarin obtained by ultrasound-assisted extraction and hydrodistillation. **Journal of Medicinal Plants Research**, Victoria Island, Lagos, v. 5, p. 2839-2847, 2011.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

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

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

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

FAO. **FAOSTAT**. Agricultural statistics database. Rome, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor.> Acesso em: 22 ago. 2013.

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

FENG, L. G.; CHEN, C.; SHENG, L. X.; LIU, P.; TAO, J.; SU, J. L.; ZHAO, L. Y. Comparative analysis of headspace volatiles of Chinese *Rosa rugosa*. **Molecules**, Basel, v. 15, p. 8390-8399, 2010.

FERREIRA, F. R.; CABRAL. J. R. S. Pineapple germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 334, p. 23-26, 1993.

FRANÇA, C. A. M.; MAIA, M. B. R. **Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais do Brasil**. Rio Branco: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008. 10 p.

GANESHAN, S. Cryogenic preservation of papaya pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 28, p. 65-70, 1986.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of Pollen. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation**: a practical guide. New York: Springer, 2008. p. 281-332.

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

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

GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; EVANS, T. M.; HALL, J. C.; PIRES, J. C.; BARRY, P. E.; SYTSAM, K. J. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal. Inferences about phylogeny and south american-african disjunctionsin Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 165, p. 35-54, 2004.

GOMES, P. R.; RASEIRA, M. C. B.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, p. 14-17, 2003.

GRANT, J. R. A synopsis of the genus *Alcantarea*. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 24-26, 1995.

GROUT, B. W. W.; ROBERTS, A. V. Storage of free pollen, pollen embryos and the zygotic embryos of seed by cryopreservation and freeze drying. In: GROUT, B. W. W. (Ed.). **Genetic preservation of plant cells *in vitro***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 63-74.

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

HALBRITTER, H.; TILL, W. Morfologia polínica do Complexo Nidularioide. In: PEREIRA, M. V. (Ed.). **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998. p. 141-121

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 853-860, 2003.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, London, v. 5, p. 294-300, 2000.

HONDA, K.; WATANABE, H.; TSUTSUI, K. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30 ^{o}C. **Euphytica**, Wageningen, v. 126, p. 315-320, 2002.

HORRES, R.; SCHULTE, K.; WEISING, K.; ZIZKA, G. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - evidence from molecular and anatomical studies. **Aliso**, Claremont, v. 23, p. 27-43, 2007.

HUANG, C. J.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production of 2-phenylethanol, flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Research International**, Essex, v. 34, p. 277-282, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1612&z=t&o=11&i=P> Acesso em: 22 ago. 2013.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil (janeiro a dezembro de 2004). São Paulo: Hórtica Consultoria e Treinamento, 2004. 4p. Disponível em: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=18>. Acesso em: 06 fev. 2012.

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, p. 37-52, 2008.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Panorama Socioeconômico da Floricultura no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 17, p. 101-108, 2011.

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

LEAL, F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; HOLST, B. K. Taxonomy of the genera *Ananas* and *Pseudananas* - A historical review. **Selbyana**, Sarasota, v. 19, p. 227-235, 1998.

LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, p. 227-238, 2009.

LEDUC, N.; DOUGLAS, G. C.; MONNIER, M. Methods for non stigmatic pollination in *Trifolium repens* (Papolionaceae): seed set with self and cross-pollinations *in vitro*. **Theoretical and Applied Genetics,** New York, v. 83, p. 1078-1080, 1992.

LEE, J.; SUGAWARA, E.; YOKOI, S.; TAKAHATA, Y. Genotypic variation of volatile compounds from flower of gentians. **Breeding Science**, Tokyo, v. 60, p. 9-17, 2010.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromelias na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual Ltda, 1993. 183 p.

LEME, E. M. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: SIQUEIRA FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste -** Biodiversidade, conservação e suas Bromélias. Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio Editorial, 2006. p. 191-381.

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, p. 487-500, 2006.

LIU, S. H.; WEI, C. B.; SUN, G. M.; ZANG, X. P. Analysis of aroma components of three ripe pineapple cultivars. **Food Science**, Beijing, China, v. 29, p. 614-617, 2008.

LOGES, V.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, A. C. R.; COSTA, A. S. Colheita, pós- colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 699-702, 2005.

LORA, M. A. J.; OTEYZA, P.; FUENTETAJA, P.; HORMAZA, J. I. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 1, p. 91-94, 2006.

LUTHER. H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J. C. Chemical characterization of lignin and lipophilic fractions from leaf fibers of curaua (*Ananas erectifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 1327-1336, 2007.

MARTINELLI, G. The bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific American**, Madison, v. 282, p. 86-93, 2000.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALES, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F.; FORZZA, R. C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, 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 context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 289, p. 57-65, 2010.

MAZZA, G.; COTTRELL, T. Volatile components of roots, stems, leaves, and flower of *Echinacea* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 3081-3085, 1999.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: MARTIUS, C. F. P.; EICHLER, A. G.; URBAN, I. (Ed.). **Flora Brasiliensis**. Leipsig, 1891-1894. v. 3, p. 173-634, t. 51-114.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: ENGLER, H. G. A. **Monographiae Phanerogamarum Prodromi.** Paris: G. Masson, 1896. v. 9. 990 p.

MEZ, C. Bromeliaceae. **Das Pflanzenreich**: Regni Vegetabilis Conspectus. Berlin: Academie Verlag, 1934-1935. v. 4. 667 p.

MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, London, v. 410, p. 577-580, 2001.

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

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

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

PAIBON, W.; YIMNOI, C. A.; TEMBAB, N.; BOONLUE, W.; JAMPACHAISRI, K.; NUENGCHAMNONG, N.; WARANUCH, N.; INGKANINAN, K. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 33, p. 150-156, 2011.

PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Cryostorage of *Aechmea fasciata* pollen. **CryoLettes**, Bedfordshire, v. 19, p. 355-360, 1998.

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

PFAHLER, P. L.; PEREIRA, M. J.; BARNETT, R. D. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 1218-1222, 1997.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology,** London, v. 5, p. 237-243, 2002.

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

REINHARD, J.; SRIVIVASAN, M. V.; ZHANG, S. Scent-triggered navigation in honeybees. **Nature**, London, v. 427, p. 411, 2004.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 414-416, 2004.

RIO GRANDE DO SUL (Estado). Assembléia Legislativa. 2002. **Lista oficial das espécies plantas ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <http://www.al.rs.gov.br/legis/M010/M0100099.ASP?Hid_Tipo=TEXTO&Hid_TodasNormas=320&hTexto=&Hid_IDNorma=320> Acesso em: 12 jul. 2012.

SACKS, E. J.; ST'CLAIR, D. A. Cryogenic storage of tomato pollen: Effect on fecundity. **HortScience**, St. Joseph, v. 31, p. 447-448, 1996.

SAMYN, G. *Vriesea* hybrids of today and yesteryear. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 45, p. 99-109, 1995.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Resolução SMA 48. Lista oficial das espécies da flora do estado de São Paulo ameaçadas de extinção. **Diário Oficial do Estado de São Paulo. Meio Ambiente**, São Paulo, 22 set. 2004. Disponível em: <http://www.ibot.sp.gov.br/pesquisa_cientifica/restauracao_ecologica/resolu%C3%A7%C%A3o_%20sma48.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2012.

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

SAZIMA, I.; VOGEL, S.; SAZIMA, M. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. **Plant Systematics and Evolution,** Vienna, v. 168, p. 167-179, 1989.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat pollination of *Vriesea* in Southeastern Brazil. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 29-37, 1995.

SCORZA, R.; SGERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK, J.; MORRE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John Wiley & Sons, 1995. p. 325-440.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. A laboratory manual. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 119 p.

SILVEIRA, D. G.; PELACANI, C.; ANTUNES, C. G. C.; SANTA ROSA, S.; SOUZA, F. V. D.; SANTANA, J. R. F. Germinative response of *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 948-955, 2011.

SIQUEIRA FILHO, J. A. Biologia floral of *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 3-13, 1998.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. S. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v.15, p. 427-443, 2001.

SMITH, L. B. **Bromeliaceae**: Flora de Venezuela XII. Caracas: Instituto Botânico, 1971.

SMITH, L. B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. **Botanische Jahrbulche frur Systematic Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**, Leipizig, v. 66, p. 446-468, 1934.

SMITH, L. B. Notes on the taxonomy of *Ananas* and *Pseudananas*. **Botanical Museum Leaflet**, Cambridge, v. 7, p. 73-81, 1939.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae. Part 3). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 1493-2141, 1979.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae. Part 1). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 1-658, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae. Part 2). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 663-1492, 1977.

SMITH, E; L. Bigeneric hybrids – A listing. **Journal of the Bromeliad Society**, Florida, v. 33, p. 69-75, 1983.

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

SOUZA, E. H. **Pré-melhoramento e avaliação de híbridos de abacaxi e banana para fins ornamentais**. 2010. 156 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JR., D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, p. 1357-1376, 2012.

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

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; FERREIRA, F. R.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, p. 79-84, 2009.

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

STEENS, A. **Bromeliads for the contemporary gardens**. Portland: Timber, 2003. 198 p.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. *In vivo* viability assay of sugarcane pollen stored at ultra low temperature following preservation treatments. **Journal of the American Society of Sugarcane Technologists**, Baton Rouge, v. 22, p. 135-136, 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, 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.

TEAI, T.; CLAUDE-LAFONTAINE, A.; SCHIPPA, C.; COZZOLINO, F. Volatile compounds in fresh pulp of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) from French Polynesia. **Journal of Essential Oil Research**, Wheaton, v. 13, p. 314-318, 2001.

TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. **American Journal of Botany**, New York, v. 84, p. 664-670, 1997.

TICKTIN, T.; NANTEL, P. Dynamics of harvested populations of the tropical understory herb *Aechmea magdalenae* in old-growth versus secondary forests. **Biological Conservation**, Barking, v. 120, p. 461-470, 2004.

TOKITOMO, Y. Aroma of pineapple. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, Osaka, Japan, v. 212, p. 949-956, 2007.

TOKITOMO, Y.; STEINHAUS, M.; BUTTNER, A.; SCHIEBERLE, P. Odor-active constituents in fresh pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by quantitative and sensory evaluation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, p. 1323-1330, 2005.

TOWILL, L. E. Low temperature and freeze-vacuum-drying preservation of pollen. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 171-198.

VARADARAJAN, G. S.; GILMARTIN, A. J. Taxonomic realigments within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 13, p. 294-299, 1988.

VENCATO, A. **Anuário Brasileiro das Flores 2006**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2006. 112 p.

VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* Hybrids using Cryopreserved Pollen. **HortScience**, St. Joseph, v. 43, p. 264-267, 2008.

VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; CHAUHAN, A. Chemical investigation of the volatile components of shade-dried petals of damask rose (*Rosa damascena* Mill.). **Archives of Biological Sciences**, Belgrad, YU, v. 63, p. 1111-1115, 2011.

VERSIEUX, L. M.; **Sistemática, fologenia e morfologiaa de *Alcantarea* (Bromeliaceae)**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 2009. 252 p.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Flora da Bahia: Bromeliaceae - *Alcantarea*. **Sitientibus Série Ciências Biologicas**, Feira de Santana, v. 10, p. 147-151, 2010.

VERSIEUX, L. M.; BARBARÁ, T.; WANDERLEY, M. G. L.; CALVENTE, A.; FAY, M. F.; LEXER, C. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 64, p. 177-189, 2012.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. A new species of *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, Bromeliaceae. **Hoehnea,** São Paulo, v. 34, p. 409-413, 2007b.

VERSIEUX, L. M.; WANDERLEY, M. G. L. Two new species of *Alcantarea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from Brazil. **Brittonia**, New York, v. 59, p. 57-64, 2007a.

VERVAEKE, I; DELEN, R.; WOUTERS, R. DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Division of the generative nucleus in cultured pollen tubes of the Bromeliaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, p. 17-28, 2004a.

VERVAEKE, I; DELEN, R.; WOUTERS, R. DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Semi *in vivo* pollen tube growth of *Aechmea fasciata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, p. 67-73, 2004b.

VERVAEKE, I.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Interespecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 624, p. 77-83, 2003.

VERVAEKE, I.; LONDERS, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. *In vitro* pollination and fertilization in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 612, p. 23-25, 2003a.

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

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Flower biology of six cultivares of the Bromeliaceae. I. Pollen, pistil, and petal appendages. **Selbyana**, Sarasota, v. 24, p. 78-86, 2003b.

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

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; MAENE, R.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Pollen tube growth and fertilization after different *in vitro* pollination techniques of *Aechmea fasciata*. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, p. 75-83, 2002a.

VERVAEKE, I.; STICHELBOUT, L.; LONDERS, E. DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Influence of arginine, ornithine, DMFO and polyamines on division of the generative nucleus in culture pollen tubes of *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 77-82, 2005.

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

VOSGUERITCHIAN, S. B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, p. 433-442, 2006.

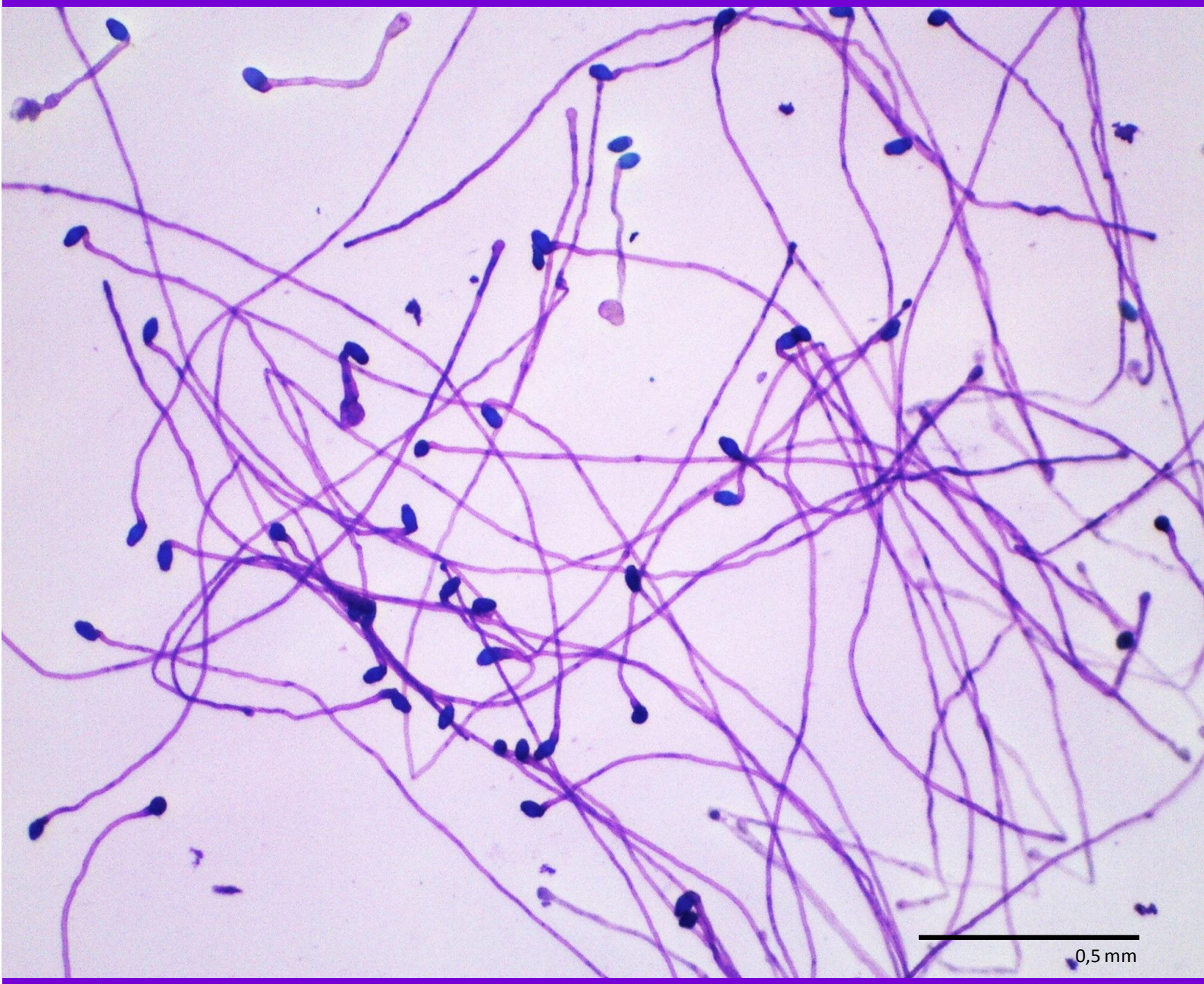
WANDERLEY, M. G. L.; MELHEM, T. S. Flora Polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - Família 178- Bromeliaceae. **Hoehnea**, São Paulo, v. 18, p. 5-42, 1991.

WEI, C. B.; LIU, S. H.; LIU, Y. G.; LV, L. L.; YANG, W. X.; SUN, G. M. Characteristic aroma compounds from different pineapple parts. **Molecules**, Basel, v. 16, p. 5104-5112, 2011.

YATES, I. E.; SPARKS, D. Hydration and temperature influence *in vitro* germination of pecan pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 114, p. 599-605, 1989.

Capítulo 1

Morfologia e viabilidade de grãos de pólen em Bromeliaceae



Aechmea fasciata Baker – Germinação *in vitro* de grãos de pólen observados em estereomicroscópio

4. MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM BROMELIACEAE

RESUMO

A caracterização morfológica dos grãos de pólen é importante na taxonomia, conservação e melhoramento, assim como, os estudos da viabilidade polínica fornecem subsídios ao melhoramento genético. Este estudo investigou a morfologia polínica e a fertilidade masculina de 18 espécies de Bromeliaceae: *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas macrodontes*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *Alcantarea nahoumii*, *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. michaelii*, *V. paraibica*, *V. simplex* e *V. unilateralis*. Para caracterização morfológica, grãos de pólen foram preparados por acetólise lática (ACLAC 40) e observados em microscópio de luz. A caracterização da exina foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A germinação *in vitro* dos grãos de pólen foi realizada em quatro meios diferentes (BM, BK, MBK e SM) e a viabilidade foi comparada em três testes histoquímicos (Alexander, carmim acético e Sudan IV). As espécies dos gêneros *Aechmea* e *Ananas* apresentaram grãos de pólen de tamanho médio, com exceção de *Ae. fasciata* e *An. macrodontes* com grãos de pólen de tamanho grande. *Al nahoumii* e as espécies de *Vriesea* apresentaram grãos de pólen de tamanho grande, com exceção da *V. carinata* com grãos de pólen muito grandes. Grãos de pólen de *Aechmea* e *Ananas* apresentaram simetria bilateral, âmbito de ovalado a esferoidal, 2-porados com exina variando de tectada (*Ae. bicolor, Ae. bromeliifolia* e *Ae. distichantha*) a semitectada (*Ae. fasciata, Ae. nudicaulis* e *Ananas*). *Al. nahoumii* e as espécies de *Vriesea* possuem grãos de pólen 1-colpado, com simetria bilateral, âmbito elíptico com exina semitectada, reticulada e heterobrocada. As maiores porcentagens de germinação e comprimento do tubo polínico foram obtidas em meios de cultura SM e BK quando comparadas com os meios BM e MBK, para todas as espécies. Os testes histoquímicos resultaram em altas taxas de viabilidade dos grãos de pólen para todas as espécies, com valores acima de 70%, com exceção do *Ananas* sp. com viabilidade abaixo de 40%. A caracterização morfopolínica constitui um importante elemento na identificação de gêneros e espécies, especialmente nesta família que apresentam grande número de espécies com controvérsias taxonômicas. Altas taxas de germinação e de viabilidade polínica favorece a fertilização e consequentemente produção de sementes, características essas, essenciais para a produção de híbridos e conservação de espécies.

Palavras-chave: *Aechmea. Alcantarea. Ananas.* Germinação *in vitro* de grãos de pólen. Histoquímica. *Vriesea*.

MORPHOLOGY AND VIABILITY OF POLLEN GRAINS IN BROMELIACEAE

ABSTRACT

Pollen morphology characterization is important in taxonomy, conservation and plant breeding, and pollen viability studies can support breeding programs. This study investigated pollen morphology and male fertility in 18 species of Bromeliaceae: *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas macrodontes*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *Alcantarea nahoumii*, *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. michaelii*, *V. paraibica*, *V. simplex* and *V. unilateralis*. For morphological characterization, pollen grains were prepared by lactic acetolysis (ACLAC 40) and observed under the light microscope. Characterization of exine was done using scanning and transmission electron microscopy. Pollen germination was analyzed *in vitro* in four different media (BM, BK, MBK and SM), and viability was done comparing three histochemical tests (Alexander, acetocarmine and Sudan IV). Species belonging to *Aechmea* and *Ananas* genera presented medium size pollen grains, except for *Ae. fasciata* and *An. macrodontes,* with large pollen grains. *Al. nahoumii* and the *Vriesea* species analyzed showed large pollen grains, except for *V. carinata* with very large pollen grains. Pollen grains of *Aechmea* and *Ananas* presented bilateral symmetry, ovate shape, biporate, exine, varying from tectate (*Ae. bicolor, Ae. bromeliifolia* and *Ae. distichantha*) to semitectate (*Ae. fasciata, Ae. nudicaulis* and *Ananas*). *Al. nahoumii* and *Vriesea* species presented pollen grains with bilateral symmetry, elliptical shape, monocopate; exine is semitectate, reticulate and heterobrochate. Germination percent and tube growth were higher in SM and BK media than in BM and MBK, for all species. Histochemical tests showed pollen viability above 70% for all species, except for *Ananas* sp., with viability below 40%. Pollen morphology characterization is important in the identification of genera and species, especially in this family with a large number of species, still with some controversies in its taxonomy. High rates of pollen germination and viability favor fertilization and consequently seed production, essential for efficient hybrid production and species conservation.

Keywords: *Aechmea. Alcantarea. Ananas. In vitro* pollen germination. Histochemical. *Vriesea.*

4.1. Introdução

A família Bromeliaceae Juss, pertence à ordem Poales (APG III, 2009), possui cerca de 58 gêneros e 3.352 espécies (LUTHER, 2012) e constitui a maior família de distribuição natural restrita ao Novo Mundo, com exceção de *Pitcairnia feliciana* (Aug. Chev.) Harms & Mildbr, nativa da Guiné (SMITH; DOWNS, 1974; 1977, 1979; GIVINISH et al., 2007; 2011). A família tem ocorrência praticamente em todo território nacional e em todos os ecossistemas, sendo que na região Sudeste apresenta a maior diversidade, principalmente, na região da Mata Atlântica, destacando o país como o que apresenta a maior biodiversidade desta família de plantas (LEME; SIQUEIRA FILHO, 2006).

Tradicionalmente são aceitas três subfamílias em Bromeliaceae (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979): Bromelioideae, Tillandsioideae e Pitcairnioideae, porém apenas as duas primeiras são monofiléticas (TERRY; BROWN; OLMSTEAD, 1997; HORRES et al., 2007; GIVINISH et al., 2004; 2007; 2011). Assim, baseando-se nas hipóteses filogenéticas e moleculares, Givinish et al. (2007; 2011) propuseram uma nova divisão para a família na qual os diferentes clados referentes à antiga Pitcairnioideae, são tratados como diferentes subfamílias. Desta forma, esta família passa a ter oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae.

O grão de pólen como estrutura responsável pela transferência do material genético masculino, por suas características únicas e pelo papel que representa para as espécies, tem sido foco de estudos variados para muitas espécies (HESSE et al., 2009).

Em Bromeliaceae, os estudos referentes à morfologia polínica têm oferecido importantes dados para a taxonomia, auxiliando na melhor definição da delimitação genérica e de espécies muito semelhantes (HALBRITTER, 1992; BARFUSS et al., 2005).

Características morfopolínicas foram usadas pela primeira vez para a sistemática de Bromeliaceae por Mez (1891-1894; 1896). Entretanto, considerando o tamanho desta família, e que alguns estudos sobre morfologia polínica já foram relatados na literatura, a exemplo de Ehler e Schill (1973), Erdtman e Praglowski (1974), Wanderley e Melhem (1991), Halbritter (1992), Halbritter e Till (1998), Tardivo e Rodrigues (1998), Vervaeke et al. (2003), Souza, Mendonça e Gonçalves-Mendonça (2004) e Moreira, Cruz-Barros, Wanderley (2005), a demanda por ampliar estes conhecimentos para mais espécies é significativa. Esses

autores estudaram aproximadamente 750 espécies e utilizaram diferentes técnicas microscópicas para a caracterização dos grãos de pólen com o intuito de dar subsídios à taxonomia desta família.

Por outro lado e em adição aos estudos de morfologia, os conhecimentos sobre a viabilidade e longevidade do grão de pólen são cruciais para os trabalhos de conservação e subsidiam o melhoramento genético de várias espécies. Além deste aspecto, a conservação de pólen também é importante para pesquisas básicas, estudos de alergenicidade, estudos de cruzabilidade, assim como para o intercâmbio e preservação de germoplasma (HANNA, 1994; VOLK, 2011).

O grão de pólen conservado, por sua vez, deve ter sua viabilidade preservada e por isso a necessidade de monitoramento dessa capacidade antes, durante e depois do armazenamento. Dessa forma, pode-se estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder suas propriedades e, portanto, sua capacidade de germinação e seu uso.

A viabilidade polínica pode ser determinada por meio de diferentes técnicas, que podem ser agrupadas em métodos diretos, tais como a germinação *in vitro* (DUTRA et al., 2000; PARTON et al., 2002; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007) e *in vivo* (OLIVEIRA; MAUÉS; KALUME, 2001), ou métodos indiretos baseados em parâmetros citológicos como a coloração (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; KEARNS; INOUYE, 1993). Apesar de serem procedimentos simples, rápidos e baratos, os testes histoquímicos não fornecem informações sobre a capacidade de germinação dos grãos de pólen. Esse aspecto pode ser determinado através da germinação *in vitro* e *in vivo* (SOARES et al., 2008).

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado para determinar a fertilidade dos grãos de pólen, permitindo o desenvolvimento do tubo polínico. O sucesso da germinação *in vitro* depende de vários fatores, como a espécie vegetal, o estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e composição dos meios de cultura (TAYLOR; HEPLER, 1997), além de ajustes dos meios de cultura para cada espécie (BREWBAKER; KWACH, 1963; DAFNI, 1992). Para a obtenção de estimativas confiáveis de viabilidade do grão de pólen, é necessário à definição de um meio de cultura que possibilite a expressão do seu potencial fisiológico para a formação do tubo polínico. Diferentes meios de cultura para a germinação *in vitro* de grãos

de pólen são relatados para um grande número de espécies, com considerável variação intra e interespecífica (PARTON et al., 2002).

A germinação *in vitro* de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais é realizada em meio de cultura contendo carboidratos e substâncias estimulantes da germinação (micronutrientes e hormônios). Muitas substâncias orgânicas e inorgânicas como sacarose, ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio exercem efeito na germinação *in vitro* do grão de pólen (PARTON et al., 2002). A sacarose tem por finalidade proporcionar um equilíbrio osmótico entre o grão de pólen e o meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (CHAGAS et al., 2010). Já os nutrientes, boro e cálcio são elementos essenciais para a germinação e desenvolvimento do tubo polínico, minimizando a sensibilidade a variações do meio de cultura, participando na permeabilidade da membrana e conferindo rigidez ao tubo polínico (BHOJWANI; BHATNAGAR, 1974).

À semelhança dos estudos morfopolínicos, pouco foi publicado sobre a viabilidade de grãos de pólen em Bromeliaceae. Wee e Rao (1979) avaliaram a germinação dos grãos de pólen de duas espécies do gênero *Ananas*, em diferentes concentrações de vitaminas e hormônios e obtiveram porcentagens de germinação abaixo de 33% e comprimento do tubo polínico inferior a 1.843 µm; Parton et al. (2002) estudaram três diferentes meios de cultura na germinação de sete espécies dos gêneros *Aechmea*, *Vriesea*, *Guzmania* e *Tillandsia* e obtiveram porcentagens de germinação variando de 0% em *Guzmania* 'Daniel' a 95% em *Ae. fasciata,* em meio de cultura contendo apenas ácido bórico (0,01%) e sacarose (20%); Palma-Silva et al. (2004), avaliaram a viabilidade por histoquímica através do corante Alexander (1980) em dez espécies de *Vriesea* e obtiveram resultados superiores a 90% de viabilidade; e Soares et al. (2011), estudaram diferentes variedades do gênero *Ananas* utilizando duas temperaturas de incubação (25°C e 30°C) na germinação *in vitro* de grãos de pólen e observaram que a temperatura de 25°C foi a mais adequada para o *A. macrodontes*, enquanto que para as demais variedades não houve diferença entre as temperaturas.

Com vistas a obter subsídios que possam auxiliar na taxonomia da família, em trabalhos de conservação de espécies e também subsidiar programas de melhoramento genético, este trabalho teve como objetivo estudar os padrões da morfologia polínica e avaliar a fertilidade masculina de espécies da família Bromeliaceae.

4.2. Material e Métodos

Foram estudadas 18 espécies e/ou variedades botânicas de Bromeliaceae, sendo que um exemplar de cada foi depositado no herbário ESA (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo - ESALQ/USP): *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (voucher ESA 120990), *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f. (ESA 121275), *Ae. distichantha* Lem. (ESA 121281), *Ae. fasciata* Baker (ESA 120987), *Ae. nudicaulis* Griseb. (ESA 120991), *Ananas macrodontes* E. Morren (ESA 121286), *Ananas* sp. (L.) Merr. (ESA 120988), *An. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (ESA 121274), *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal (ESA 121284), *An*. *comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121285), *An*. *comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121405), *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (ESA 120986), *Vriesea carinata* Wawra (ESA 121404), *V. friburgensis* Mez (ESA 121282), *V. michaelii* W. Weber (ESA 121280), *V. paraibica* Wawra (ESA 121276), *V. simplex* Beer (ESA 120989) e *V. unilateralis* Mez (ESA 121283).

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos (13 cm de altura por 10 cm de diâmetro) com substrato Basaplant®, sob temperatura ambiente e umidade relativa de 70%, no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Os grãos de pólen foram coletados de flores na antese.

Ultraestrutura polínica

Para caracterização morfológica e ultraestrutural, os grãos de pólen foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), $CaCl_2$ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, em seguida desidratados em série etílica (35-100%), 20 min cada. As amostras foram secas em HMDS (hexametildisilazano) e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os grãos de pólen foram fixados na mesma solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada, por 24 horas. Posteriormente, foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e imediatamente pós-fixados em

tetróxido de ósmio (1%), por 1 h, seguido de lavagens em solução salina (0,9%, cloreto de sódio) e pré coloração em acetato de uranila (2,5%). Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (35-100%), 20 min cada. A infiltração foi gradual em resina Spurr e o emblocamento em resina pura, por 48 horas, a 70°C. Os blocos foram seccionados em ultramicrótomo (Sorvall Porter Blum MT2, Norwalk, USA). As secções ultrafinas (60 nm) obtidas foram depositadas sobre grades de cobre previamente recobertas com Formvar®, contrastadas em acetato de uranila (2,5%) e citrato de chumbo, segundo Reynolds (1963). As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Produção e tamanho de grãos de pólen

A estimativa do número de grãos de pólen foi realizada por meio da contagem do número de grãos produzidos por flor, considerando a existência de seis anteras. Foram coletadas três flores de diferentes plantas e as anteras armazenadas individualmente em tubos eppendorf, seguindo metodologia descrita por Kearns e Inouye (1993). As medidas dos grãos de pólen foram realizadas em grãos submetidos à acetólise lática fraca (ACLAC 40), conforme Raynal e Raynal (1979) pelo programa ImageJ 1.46r (RASBAND, 2012). Foram medidos aleatoriamente o diâmetro polar e equatorial de 25 grãos de pólen. Os grãos de pólen foram caracterizados conforme nomenclatura descrita por Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

Germinação *in vitro* de grãos de pólen

Os grãos de pólen foram inoculados em placas de Petri contendo 35 mL de quatro meios de cultura descritos a seguir:

- BM: H_3BO_3 (0,01%); sacarose (20%); ágar (0,5%); pH 6,5 (PARTON et al., 2002);
- BK: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (10%); ágar (0,5 %); pH 6,5 (BREWBAKER; KWACK, 1963);
- MBK: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (20%); ágar (0,5%); pH 6,5 (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado);

- SM: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (15%); ágar (0,8%); pH 6,5 (SOARES et al., 2008);

Com auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram distribuídos nos meios de cultura em placas de Petri, que foram mantidas em incubadora à temperatura de 27 ± 1 ^{o}C. O delineamento experimental utilizado para a germinação do grão de pólen foi inteiramente casualizado com quatro meios de cultura e 12 repetições, sendo cada repetição representada por três placas de Petri, cada uma subdividida em quatro quadrantes.

A contagem dos grãos de pólen germinados e a medida do comprimento do tubo polínico foram realizadas 24 horas após a inoculação em meio de cultura. Foram obtidas microfotografias com auxílio de estereomicroscópio Leica EZ4 D (Leica, Wetzlar, Alemanha).

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

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arc sen ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste Scott-Knott ($p<0,01$), através do programa SAS (2004).

Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados mediante o uso de três corantes: solução de Alexander, 2% de ácido lático (ALEXANDER, 1980), carmim acético (1%) (KEARNS; INOUYE, 1993) e Sudan IV (1%) (BAKER; BAKER, 1979). Anteras de três flores coletadas de três diferentes plantas foram distribuídas sobre lâminas de vidro, adicionando-se uma gota do respectivo corante, cobrindo-se com lamínula e avaliando-se em seguida. A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura da lâmina em microscópio óptico, sendo contabilizados 100 grãos de pólen por lâmina com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen para cada corante.

4.3. Resultados e Discussão

Morfologia polínica

Observaram-se variações entre as espécies em relação ao tamanho dos grãos de pólen, podendo-se classificá-los em tamanho médio para as espécies do gênero *Aechmea* e variedades botânicas do gênero *Ananas,* com exceção da *Ae. fasciata* e *An. macrodontes* que, juntamente com *Al. nahoumii* e as espécies de *Vriesea,* apresentaram grãos de pólen com tamanho grande. *V. carinata* foi a única espécie que apresentou grãos de pólen de tamanho muito grande (Tabela 1.1).

O número de grãos de pólen produzidos por flor (Tabela 1.1) variou consideravelmente entre os gêneros e, em alguns casos, entre espécies de um mesmo gênero. Em *Aechmea* observaram-se aproximadamente 30.000 grãos por flor para *Ae. bicolor* e *Ae. bromeliifolia*, enquanto que *Ae. distichantha* apresentou, em média, 221.666 grãos de pólen por flor. Entre as espécies do gênero *Vriesea* a variação foi menos acentuada, com uma estimativa entre 112.000 e 126.000 grãos para *V. carinata*, *V. friburgensis*, *V. paraibica, V. simplex* e *V. unilateralis*, e cerca de 158.000 grãos para *V. michaelii* (Tabela 1.1).

A variação observada nas espécies avaliadas parece confirmar os resultados encontrados por Hmeljevski et al. (2007), que estudaram a espécie *Dyckia ibiramensis* e obtiveram uma média de 54.675 grãos de pólen, enquanto Rogalski et al. (2009) contabilizaram uma média de 70.700 grãos de pólen em *Dyckia brevifolia*, destacando uma variação significativa entre duas espécies do mesmo gênero. A produção de grãos de pólen aliados à viabilidade e outros fatores, influenciam diretamente no sucesso da fertilização, gerando maior número de sementes (SIQUEIRA et al., 2009), por isso a importância de estudos desta natureza.

Em secções ultrafinas da esporoderme dos grãos de pólen por microscopia eletrônica de transmissão pode-se observar as camadas da exina externamente e a intina internamente. Verificou-se uma variação da espessura das camadas da exina conforme a espécie estudada de 1,41 ± 0,09 µm para *Ae. bicolor* a 4,00 ± 0,34 µm para *V. unilateralis* (Tabela 1.2).

Tabela 1.1 - Características morfométricas de grãos de pólen de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl., tamanho e estimativa de número de grãos por flor

Espécies/ Variedades	Vista Equatorial[1]		Tamanho[2]	Número de grãos de pólen[3]
	Diâmetro Polar (µm)	Diâmetro Equatorial (µm)		
Aechmea bicolor	21,95 ± 1,56	31,63 ± 1,34	Médio	32.916
Ae. bromeliifolia	35,39 ± 1,64	44,09 ± 2,06	Médio	32.080
Ae. distichantha	34,58 ± 2,04	47,16 ± 2,15	Médio	221.666
Ae. fasciata	57,32 ± 1,66	79,34 ± 3,83	Grande	119.167
Ae. nudicaulis	32,97 ± 2,87	42,64 ± 2,89	Médio	59.167
Ananas macrodontes	45,29 ± 1,98	51,12 ± 2,13	Grande	71.128
Ananas sp.	29,29 ± 2,39	36,10 ± 2,11	Médio	58.300
An. comosus var. *ananassoides*	31,28 ± 2,58	39,10 ± 2,15	Médio	61.083
An. comosus var. *bracteatus*	39,23 ± 2,24	47,80 ± 3,41	Médio	90.830
An. comosus var. *erectifolius*	37,64 ± 1,92	44,70 ± 3,03	Médio	68.900
An. comosus var. *parguazensis*	36,24 ± 2,37	46,16 ± 2,48	Médio	63.167
Alcantarea nahoumii	45,32 ± 2,04	67,78 ± 4,19	Grande	112.333
Vriesea carinata	44,42 ± 2,78	100,17 ± 6,11	Muito grande	115.416
V. friburgensis	49,71 ± 2,76	87,77 ± 4,31	Grande	112.083
V. michaelii	39,39 ± 2,68	88,17 ± 7,51	Grande	158.333
V. paraibica	53,49 ± 1,74	89,90 ± 3,98	Grande	118.833
V. simplex	52,05 ± 3,33	74,13 ± 3,34	Grande	126.666
V. unilateralis	45,83 ± 3,27	66,31 ± 4,43	Grande	114.550

[1] Os grãos de pólen foram acetolizado conforme Raynal e Raynal (1979); Os resultados correspondem à média de 25 repetições ± desvio padrão. [2] De acordo com Hesse et al. (2009), médio (25 – 50 µm), grande (50 - 100 µm) e muito grande (> 100 µm); [3] Conforme metodologia de Kearns e Inouye (1993)

Tabela 1.2 - Características morfométricas das camadas da exina dos grãos de pólen de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl.

Espécies/ Variedades	Teto	Columela	Sexina	Nexina	Exina
			µm		
Aechmea bicolor	0,64 ± 0,06	0,23 ± 0,03	0,87 ± 0,07	0,54 ± 0,08	1,41 ± 0,09
Ae. bromeliifolia	0,00	0,95 ± 0,21	= columela	1,11 ± 0,11	2,06 ± 0,24
Ae. distichantha	0,43 ± 0,08	0,51 ± 0,09	0,94 ± 0,13	0,71 ± 0,10	1,69 ±0,19
Ae. fasciata	0,56 ± 0,16	0,37 ± 0,09	0,93 ± 0,18	1,07 ± 0,06	2,00 ± 0,20
Ae. nudicaulis	0,93 ± 0,12	0,69 ± 0,11	1,62 ± 0,17	1,14 ± 0,09	2,76 ± 0,21
Ananas macrodontes	0,91 ± 0,11	0,28 ± 0,03	1,19 ± 0,10	1,98 ± 0,18	3,17 ± 0,14
Ananas sp.	0,56 ± 0,09	0,22 ± 0,04	0,77 ± 0,07	1,79 ± 0,15	2,50 ± 0,14
An. comosus var. *ananassoides*	0,54 ± 0,07	0,23 ± 0,06	0,77 ± 0,07	1,72 ± 0,15	2,50 ± 0,14
An. comosus var. *bracteatus*	0,78 ± 0,08	0,27 ± 0,07	1,04 ± 0,08	1,37 ± 0,10	2,41 ± 0,15
An. comosus var. *erectifolius*	0,38 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,58 ± 0,07	1,54 ± 0,15	2,12 ± 0,14
An. comosus var. *parguazensis*	0,62 ± 0,06	0,31 ± 0,08	0,93 ± 0,11	1,04 ± 0,13	1,97 ± 0,19
Alcantarea nahoumii	0,86 ± 0,18	1,89 ± 0,22	2,75 ± 0,25	0,70 ± 0,24	3,45 ± 0,36
Vriesea carinata	0,47 ± 0,08	0,51 ± 0,09	0,98 ± 0,13	0,72 ± 0,10	1,70 ±0,19
V. friburgensis	0,47 ± 0,11	1,17 ± 0,17	1,63 ± 0,15	0,98 ± 0,17	2,62 ± 0,25
V. michaelii	0,35 ± 0,06	0,87 ± 0,11	1,22 ± 0,11	0,46 ± 0,06	1,68 ± 0,11
V. paraibica	0,35 ± 0,07	0,85 ± 0,09	1,20 ± 0,10	0,96 ± 0,14	2,16 ± 0,16
V. simplex	0,43 ± 0,05	0,66 ± 0,09	1,09 ± 0,10	0,78 ± 0,08	1,87 ± 0,13
V. unilateralis	0,48 ± 0,09	1,21 ± 0,19	1,69 ± 0,22	2,31 ± 0,24	4,00 ± 0,34

Os resultados correspondem à média de 25 repetições ± desvio padrão

Gênero *Aechmea*

Ae. bicolor: grãos de pólen de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, com um lado mais convexo e o outro mais plano, exina tectada, psilada (Figura 1.1 A-D).

Ae. bromeliifolia: grãos de pólen de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, exina tectada, verrugada (Figura 1.1 E-H).

Ae. distichantha: grãos de pólen de tamanho médio com simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, com um lado mais convexo e o outro mais plano, exina tectada, rugulada com perfurações (Figura 1.1 I-L).

Ae. fasciata: grãos de pólen de tamanho grande, simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, exina semitectada, reticulada, heterobrocada, lúmens variando de arredondados a poligonais, com granulações (Figura 1.1 M-P).

Ae. nudicaulis: grãos de pólen de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, exina semitectada, reticulada, heterobrocada, muros esparsamente perfurados, lúmens variando de arredondados a poligonais, sem granulações (Figura 1.1 Q-T).

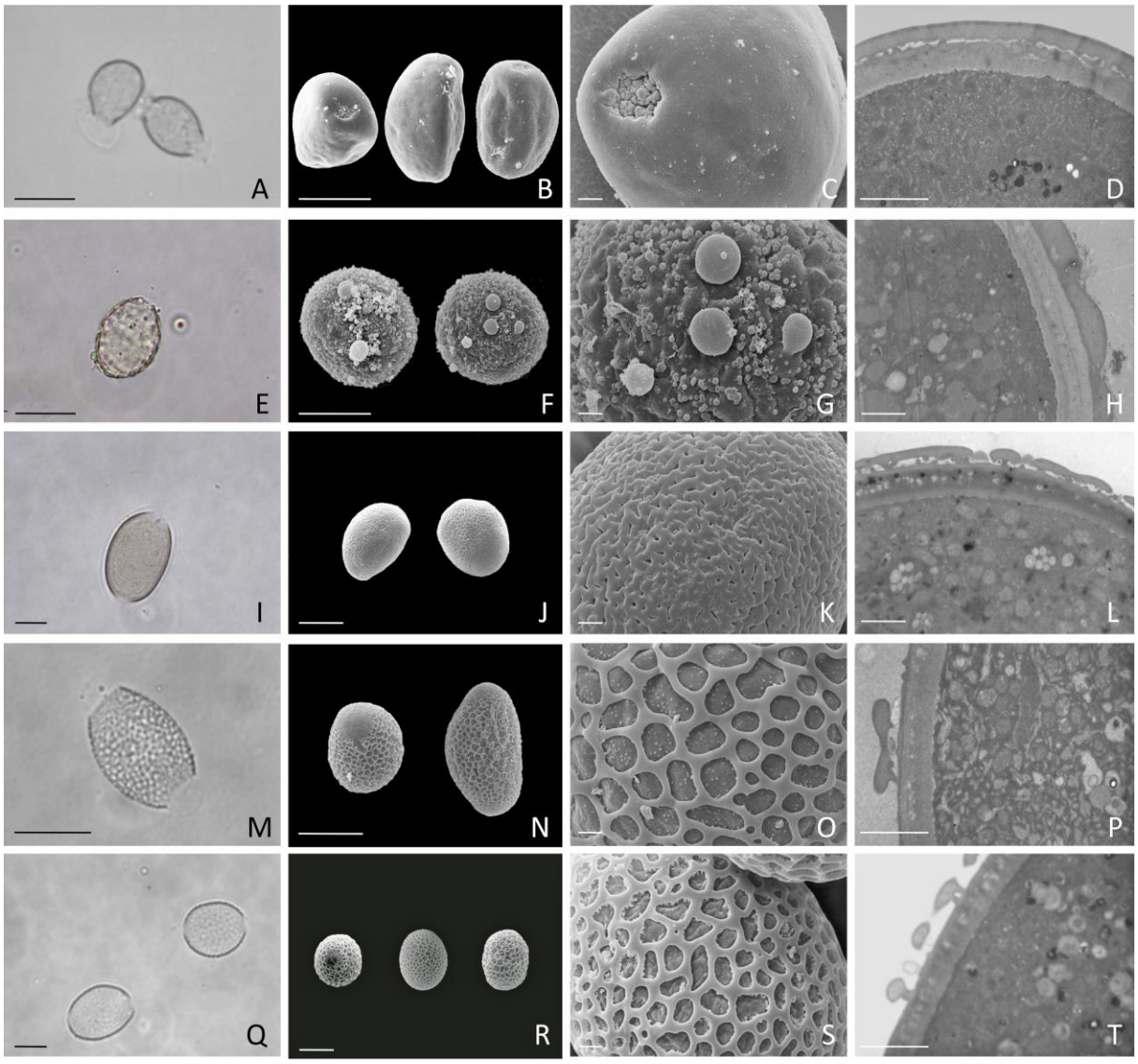


Figura 1.1 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav. A-D) *Ae. bicolor* L. B. Sm.*;* E-H) *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f.*;* I-L) *Ae. distichantha* Lem.*;* M-P) *Ae. fasciata* Baker*;* Q-T) *Ae. nudicaulis* Griseb.*;* A, E, I, M, Q) grãos de pólen após acetólise lática; B, F, J, N, R) vista polar e equatorial; C, G, K, O, S) detalhe da ornamentação da exina; D, H, L, P, T) detalhe da parede do grão; A, E, I, M, Q) imagens obtidas em microscopia de luz, acetólise lática; B, C, F, G, J, K, N, O, R, S) microscopia eletrônica de varredura; D, H, L, P, T) microscopia eletrônica de transmissão. Barras: A, E, I, M, Q = 50 µm; B, F, J, N, R = 20 µm; C, D, G, H, K, L, O, P, S, T = 2 µm

Gênero *Ananas*

As variedades de *An. comosus* e *Ananas* sp. apresentaram grãos de pólen de tamanho médio e *An. macrodontes* apresentou grãos de pólen de tamanho grande. As duas espécies apresentaram grãos de pólen com simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, exina semitectada, reticulada a faveolada (em *An. comosus* var. *parguazensis*), com perfurações, retículos heterobrocados, lúmens com contorno variando de arredondados a poligonais, com granulações (Figura 1.2).

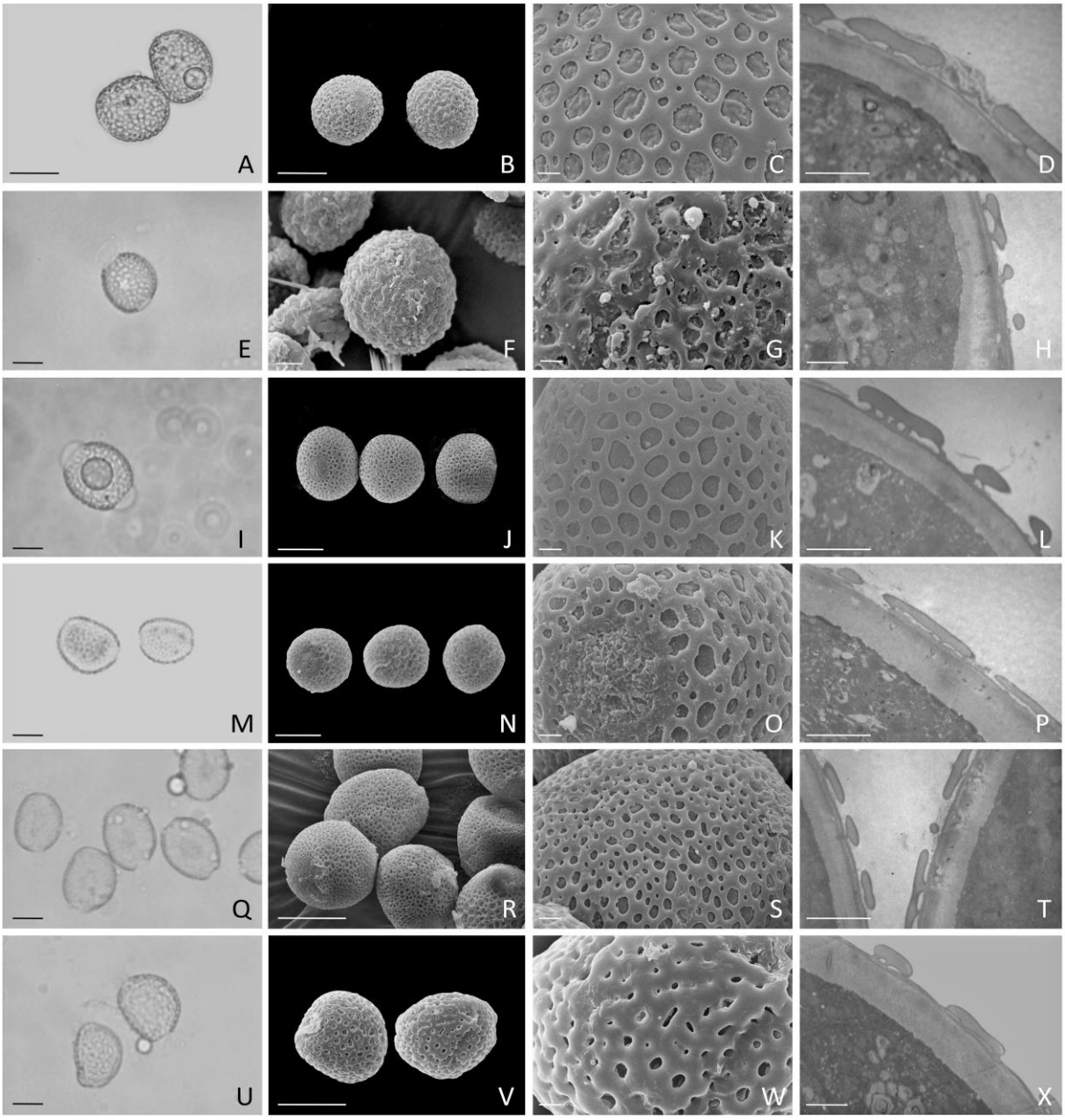


Figura 1.2 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de *Ananas* Mill. A-D) *An. macrodontes* E. Morren; E-H) *Ananas* sp. (L.) Merr.; I-L) *An. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal; M-P) *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal; Q-T) *An. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal; U-X) *An. comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Sm.) Coppens & F. Leal; A, E, I, M, Q, U) grãos de pólen após acetólise lática; B, F, J, N, R, V) vista polar e equatorial; C, G, K, O, S, W) detalhe da ornamentação da exina; D, H, L, P, T, X) detalhe da parede do grão; A, E, I, M, Q, U) imagens obtidas em microscopia de luz, acetólise lática; B, C, F, G, J, K, N, O, R, S, V, W) microscopia eletrônica de varredura; D, H, L, P, T, X) microscopia eletrônica de transmissão. Barras: A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R, U, V = 20 µm; C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, W, X = 2 µm

Gênero *Alcantarea*

Os grãos de pólen de *Al. nahoumii* são de tamanho grande, simetria bilateral, âmbito elíptico, equatorialmente apresentam contorno plano de um lado e convexo do outro, 1-colpado, colpo apresenta contorno irregular, aproximadamente do mesmo comprimento do diâmetro polar ou maior, exina semitectada, reticulada, heterobrocada, sem granulações, com malhas menores em direção ao colpo e as extremidades do diâmetro equatorial, lúmens variando de arredondados a poligonais (Figura 1.3).

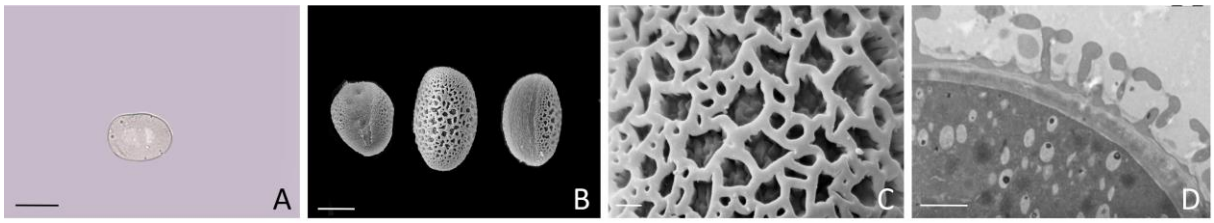


Figura 1.3 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant. A) grão de pólen após acetólise lática; B) vista polar e equatorial; C) detalhe da ornamentação da exina; D) detalhe da parede do grão. Imagens obtidas em microscopia de luz, acetólise lática (A); microscopia eletrônica de varredura (B, C) e microscopia eletrônica de transmissão (D). Barras: A = 50 µm; B = 20 µm; C, D = 2 µm

Gênero *Vriesea*

Todas as espécies do gênero *Vriesea* apresentaram grãos de pólen de tamanho grande, com exceção da *V. carinata* que apresentou grãos de pólen de tamanho muito grande, simetria bilateral, âmbito elíptico, equatorialmente apresentam contorno plano de um lado e convexo do outro, 1-colpado, colpo apresenta contorno irregular, aproximadamente do mesmo comprimento do diâmetro equatorial ou maior, exina semitectada, reticulada, heterobrocada, com granulações e malhas menores em direção ao colpo e em direção as extremidades do diâmetro equatorial, lúmens variando de arredondados a poligonais (Figura 1.4).

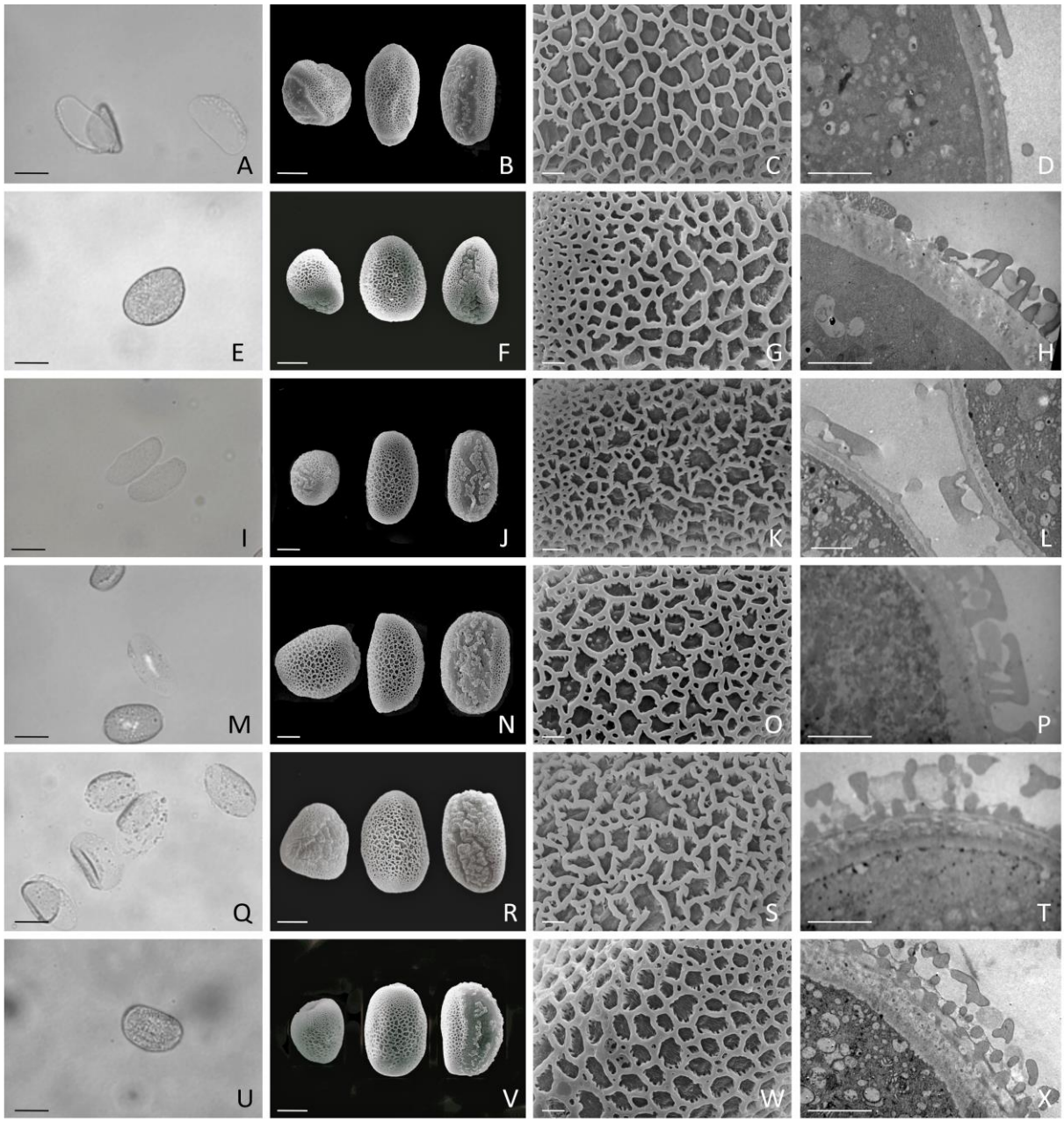


Figura 1.4 - Morfologia e características da exina de grãos de pólen de espécies de *Vriesea* Lindl. A-D) *V. carinata* Wawra*;* E-H) *V. friburgensis* Mez; I-L) *V. michaelii* W. Weber; M-P) *V. paraibica* Wawra*;* Q-T) *V. simplex* Beer*;* U-X) *V. unilateralis* Mez; A, E, I, M, Q, U) grão de pólen após acetólise lática; B, F, J, N, R, V) vista polar e equatorial; C, G, K, O, S, W) detalhe da ornamentação da exina; D, H, L, P, T, X) detalhe da parede do grão; A, E, I, M, Q, U) imagens obtidas em microscopia de luz, acetólise; B, C, F, G, J, K, N, O, R, S, V, W) microscopia eletrônica de varredura; D, H, L, P, T, X) microscopia eletrônica de transmissão. Barras: A, E, I, M, Q, U = 50 µm; B, F, J, N, R, V = 20 µm; C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, W, X = 2 µm

Constatou-se variabilidade morfopolínica quanto às aberturas dos grãos de pólen (colpadas e poradas) e quanto à ornamentação da exina. As características observadas estão de acordo com a literatura para a família Bromeliaceae (MEZ, 1891-1894; WANDERLEY; MELHEM, 1991; VERVAEKE et al., 2003; MOREIRA; CRUZ-BARROS; WANDERLEY, 2005).

As observações feitas para as espécies do gênero *Vriesea* estão de acordo com Halbritter (1992), que afirma que as espécies da subfamília Tillandsioideae apresentam, em geral, grãos de pólen monocolpados, com pouca variação morfológica. Os resultados observados no presente trabalho estão de acordo com resultados de análise de grãos de pólen acetolizados realizados por Moreira, Cruz-Barros e Wanderley (2005).

Moreira, Cruz-Barros e Wanderley (2005), trabalhando com espécies dos gêneros *Neoregelia* e *Nidularium*, ambos da subfamília Bromelioideae, descrevem grãos de pólen com exina de 4,28 a 4,67 µm, valores superiores aos observados para os gêneros *Aechmea* e *Ananas* neste trabalho e próximos aos encontrados para o gênero *Vriesea* da subfamília Tillandsioideae. No entanto, os grãos de pólen estudados em ambos os trabalhos se enquadram nas mesmas classes de tamanho, de médios a grandes.

Segundo Benzing (2000), o emprego de caracteres morfopolínicos para estudos taxonômicos é uma alternativa ao uso de outras características, como cor de folhas e flores e tamanho de estruturas, que estão mais sujeitos a alterações quando comparada às características dos grãos de pólen, consideradas mais conservadas.

Viabilidade polínica

As análises estatísticas mostram interação significativa entre os diferentes meios de cultura e as espécies estudadas, tanto para a porcentagem de germinação *in vitro* como para o comprimento do tubo polínico (Tabelas 1.3 e 1.4).

Após 24 horas de incubação, de maneira geral, verificou-se que os meios BK e SM resultaram em maior porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico para todas as espécies estudadas. O meio de cultura BM (PARTON et al., 2002), desenvolvido para bromélias do gênero *Aechmea*, *Vriesea*, *Guzmania* e *Tillandsia*, não foi eficiente para a germinação de grãos de pólen, sendo que grãos de pólen de apenas oito espécies germinaram neste meio com valores inferiores a 39% (Tabela 1.3). A presença de cálcio, magnésio, nitrato de potássio e menores concentrações de sacarose parecem ter sido

determinantes para promover a germinação dos grãos de pólen das espécies estudadas. Entre as espécies do gênero *Vriesea*, a que apresentou melhores resultados para a germinação e comprimento do tubo polínico foi *V. simplex, V. michaelii* e *V. friburgensis* nos meios BK e SM.

O crescimento do tubo polínico também foi variável, conforme a espécie e o meio de cultura (Tabela 1.4, Figura 1.5 A-E). *Ae. fasciata* apresentou os maiores valores em meio BK e SM, com médias de 1,14 mm (Figura 1.5 E), enquanto que os menores valores foram obtidos em meio BM para todas as espécies estudadas (Tabela 1.4, Figura 1.5 A).

Tabela 1.3 - Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill*., Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl*.,* em quatro meios de cultura

Espécies/ Variedades	Meios de cultura*			
	BM	BK	MBK	SM
Aechmea bicolor	0,00 eD	61,66 dB	39,66 cC	91,00 aA
Ae. bromeliifolia	0,57 eD	82,67 bA	36,33 cC	72,33 cB
Ae. distichantha	29,60 bC	90,60 aA	53,23 bB	88,73 aA
Ae. fasciata	39,00 aC	70,16 cA	57,83 aB	77,03 bA
Ae. nudicaulis	12,00 cD	80,33 bA	29,00 dC	58,66 dB
Ananas macrodontes	0,00 eD	80,00 bA	51,66 bC	68,33 cB
Ananas sp.	0,00 eB	22,33 fA	19,66 eA	29,27 eA
An. comosus var. *ananassoides*	0,00 eD	71,16 cA	38,36 cB	77,86 bA
An. comosus var. *bracteatus*	2,66 dD	85,67 aA	42,67 cC	63,33 dB
An. comosus var. *erectifolius*	2,33 dD	85,66 aA	55,33 aC	73,33 cB
An. comosus var. *parguazensis*	0,00 eC	69,66 cA	42,67 cB	67,66 cA
Alcantarea nahoumii	1,73 dC	47,67 eB	31,00 dB	74,00 cA
Vriesea carinata	0,00 eD	74,33 cB	55,33 aC	80,33 bA
V. friburgensis	0,12 eC	90,43 aA	59,93 aB	87,93 aA
V. michaelii	0,00 eD	77,67 bB	47,67 bC	90,03 aA
V. paraibica	0,00 eC	80,00 bA	40,20 cB	88,73 aA
V. simplex	0,00 eD	80,73 bB	60,60 aC	90,46 aA
V. unilateralis	0,00 eC	81,33 bA	41,00 cB	86,33 aA
CV (%)	6,90			

Os resultados correspondem à contagem de todos os grãos de pólen após 24 horas de inoculação em meio de cultura. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. * Meios de cultura: BM (PARTON et al., 2002), BK (BREWBAKER; KWACK, 1963), MBK (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado), SM (SOARES et al., 2008)

Tabela 1.4 - Comprimento do tubo polínico em grãos de pólen cultivados em quatro meios de cultura em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl.

Espécies/ Variedades	Meios de cultura*			
	BM	BK	MBK	SM
	mm			
Aechmea bicolor	0,00 cC	0,30 hA	0,12 fB	0,24 fA
Ae. bromeliifolia	0,19 bD	0,72 eA	0,53 bC	0,61 dB
Ae. distichantha	0,24 aD	0,86 dA	0,57 bC	0,65 dB
Ae. fasciata	0,29 aB	1,14 bA	0,48 cB	1,13 aA
Ae. nudicaulis	0,12 bD	1,04 bA	0,38 dC	0,72 cB
Ananas macrodontes	0,00 cD	1,12 bA	0,71 aB	0,59 dC
Ananas sp.	0,00 cC	0,48 gA	0,33 dB	0,50 eA
An. comosus var. *ananassoides*	0,00 cC	0,54 fB	0,73 aA	0,73 cA
An. comosus var. *bracteatus*	0,09 cC	1,07 bA	0,55 bB	0,46 eB
An. comosus var. *erectifolius*	0,05 cC	1,09 bA	0,48 cB	0,52 eB
An. comosus var. *parguazensis*	0,00 cC	0,89 dA	0,47 cB	0,51 eB
Alcantarea nahoumii	0,03 cC	0,28 hB	0,24 eB	0,55 eA
Vriesea carinata	0,00 cC	0,77 eA	0,34 dB	0,61 dA
V. friburgensis	0,01 cD	1,09 aA	0,44 eC	0,72 cB
V. michaelii	0,00 cC	0,83 dA	0,35 dB	0,85 bA
V. paraibica	0,00 cD	0,60 fB	0,23 eC	0,87 bA
V. simplex	0,00 cC	0,96 cA	0,43 cB	0,88 bA
V. unilateralis	0,00 cC	0,71 eA	0,36 dB	0,66 dA
CV (%)	24,36			

Os resultados correspondem à média do comprimento do tubo polínico de 60 grãos de pólen após 24 horas de inoculação em meio de cultura. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. * Meios de cultura: BM (PARTON et al., 2002), BK (BREWBAKER; KWACK, 1963), MBK (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado), SM (SOARES et al., 2008)

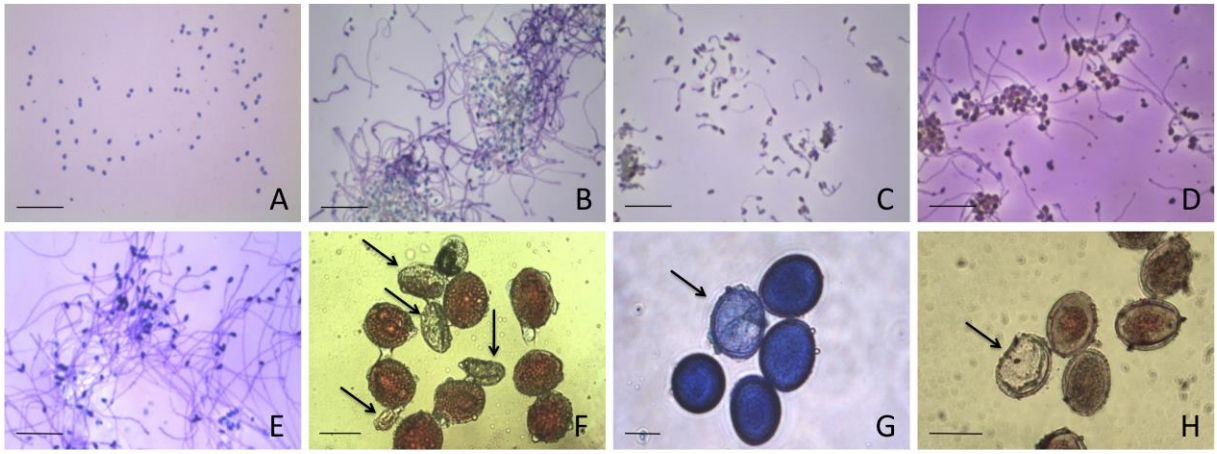


Figura 1.5 - Germinação *in vitro* e histoquímica de grãos de pólen de Bromeliaceae. A-E) Germinação de grãos de pólen em espécies de Bromeliaceae. A) *Aechmea bicolor* L. B. Sm em meio BM, evidenciando a não germinação dos grãos de pólen; B) *Ae. distichantha* Lem. em meio BK; C) *Vriesea michaelii* W. Weber em meio MBK; D) *V. simplex* Beer em meio SM; E) *Ae. fasciata* Baker em meio BK, evidenciando maior comprimento do tubo polínico; F-H) Viabilidade por teste histoquímico em grãos de pólen. F) grãos de pólen de *Ae. fasciata* Baker corados com carmim acético (1%); G) grãos de pólen de *Ae. nudicaulis* Griseb. corados com solução de Alexander com 2% de ácido lático; H) grãos de pólen de *Ae. distichantha* Lem. corados com Sudan IV (1%). (setas = grãos de pólen inviáveis). BM (PARTON et al., 2002), BK (BREWBAKER; KWACK, 1963), MBK (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado), SM (SOARES et al., 2008). Barras: A-E = 0,5 mm; F, H = 50 µm; G = 20 µm

A germinação *in vitro*, embora forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*, podendo ocorrer interações entre a composição do meio de cultura e os diferentes materiais vegetais e as condições ambientais. Entretanto, apesar destas inferências, a germinação *in vitro* é a que apresenta resultados mais próximos aos que, provavelmente, ocorrem *in vivo* (DAFNI; FIRMAGE, 2000; SOARES et al., 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho foram diferentes dos obtidos por Parton et al. (2002) para as espécies *Ae. fasciata*, *Ae. chantinii*, *Vriesea* 'Cristiane', *V. splendens*, *Guzmania lingulata* e *Tillandsia cyanea*, que obtiveram os melhores resultados utilizando meio BM, em relação aos meios BK e MBK, o que confirma a necessidade de adequação destes protocolos para cada espécie, reforçando as respostas diferenciadas a depender das espécies. Alguns autores consideram que o meio de cultura deve incluir, além de carboidratos, elementos como ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio, (TAYLOR; HEPLER, 1997).

Segundo Pfahler, Pereira e Barnett (1997), o boro maximiza a germinação e suas respostas são variáveis conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. Thompson e Batjer (1950) verificaram aumento da porcentagem de germinação e do comprimento do tubo polínico de grãos de pólen de várias espécies frutíferas de clima temperado com a adição de boro ao meio de cultura. Entretanto os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a necessidade de adição de outros elementos ao meio de cultura.

A adição do cálcio, por exemplo, pode propiciar condições fisiológicas como menor permeabilidade, crescimento em forma linear e aparência rígida do tubo polínico (BHOJWANI; BHATNAGAR, 1974).

Outros fatores ambientais podem interferir na viabilidade polínica. Quando a abertura da antera coincide com elevada umidade do ar, a alta pressão osmótica do conteúdo celular do grão de pólen, aliada à baixa resistência de sua parede diminuem a viabilidade polínica (SOUSA, 1994).

Para os testes histoquímicos foi observada alta taxa de viabilidade de grãos de pólen para a maioria das espécies estudadas, nos três corantes testados com valores superiores a 70%, destacando-se *An. comosus* var. *erectifolius* com 100% de viabilidade em Carmim Acético e Sudan IV. Em contrapartida, *Ananas* sp. apresentou baixa viabilidade com valores inferiores a 40% nos três corantes avaliados (Figura 1.6). Esses resultados coincidem com observações realizadas por microscopia eletrônica de varredura, onde foi possível observar uma grande porcentagem de grãos de pólen mal formados. Esse acesso de *Ananas* sp., está passando por outros estudo moleculares, reprodutivos e morfológicos, com o intuito de identificar a real taxonomia. Os resultados obtidos com coloração, em sua maioria, não corresponderam ao obtido com a germinação *in vitro*, apresentando valores superestimados para a maioria das espécies estudadas. Dados semelhantes foram observados por Soares et al. (2011) para seis acessos de abacaxizeiros ornamentais, com resultados superestimados a partir de testes de viabilidade com coloração.

Para Parfitt e Ganeshan (1989) o uso de coloração com carmim acético para verificar a viabilidade polínica não produz resultados confiáveis. Estes autores inviabilizaram os grãos de pólen de *Prunus* por meio de altas temperaturas e, ainda assim, o teste com este corante detectou alto nível de viabilidade polínica. A coloração, embora seja um procedimento

simples e barato, poderá superestimar os valores de viabilidade (TECHIO, 2002) e tem sido pouco recomendado para estudos desta natureza.

Kearns e Inouye (1993) relataram que os testes histoquímicos são utilizados como indicativos de viabilidade polínica, porém estes testes refletem somente a integridade de estruturas celulares. O carmim acético indica a integridade cromossômica (KEARNS; INOUYE, 1993), o Sudan IV a presença de lipídios (BAKER; BAKER, 1979) e a solução de Alexander contém fucsina ácida e verde malaquita que reagem com o protoplasma e a celulose da parede dos grãos de pólen (ALEXANDER, 1980).

Para que a polinização tenha mais garantia de sucesso é importante que os dois fatores (porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico) sejam os maiores possíveis, aumentando a probabilidade de que ocorra, de fato, o encontro de gametas. Dessa forma, o estabelecimento de meios de cultura eficientes mostra-se importante, visto que, o conhecimento das taxas de germinação e de viabilidade polínica são importantes para o planejamento de um programa de melhoramento genético visando à produção de híbridos.

Por outro lado, para os trabalhos de conservação de pólen, o estabelecimento de um método que possibilite os testes de viabilidade antes e depois da conservação são determinantes para o uso desta estratégia, e os meios de cultura são métodos fáceis e que podem ser utilizados de forma rotineira.

Dessa forma os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a caracterização das espécies de bromeliáceas estudadas, assim como podem subsidiar a conservação e o melhoramentos genético das espécies avaliadas, com ganhos substanciais para ambas as áreas.

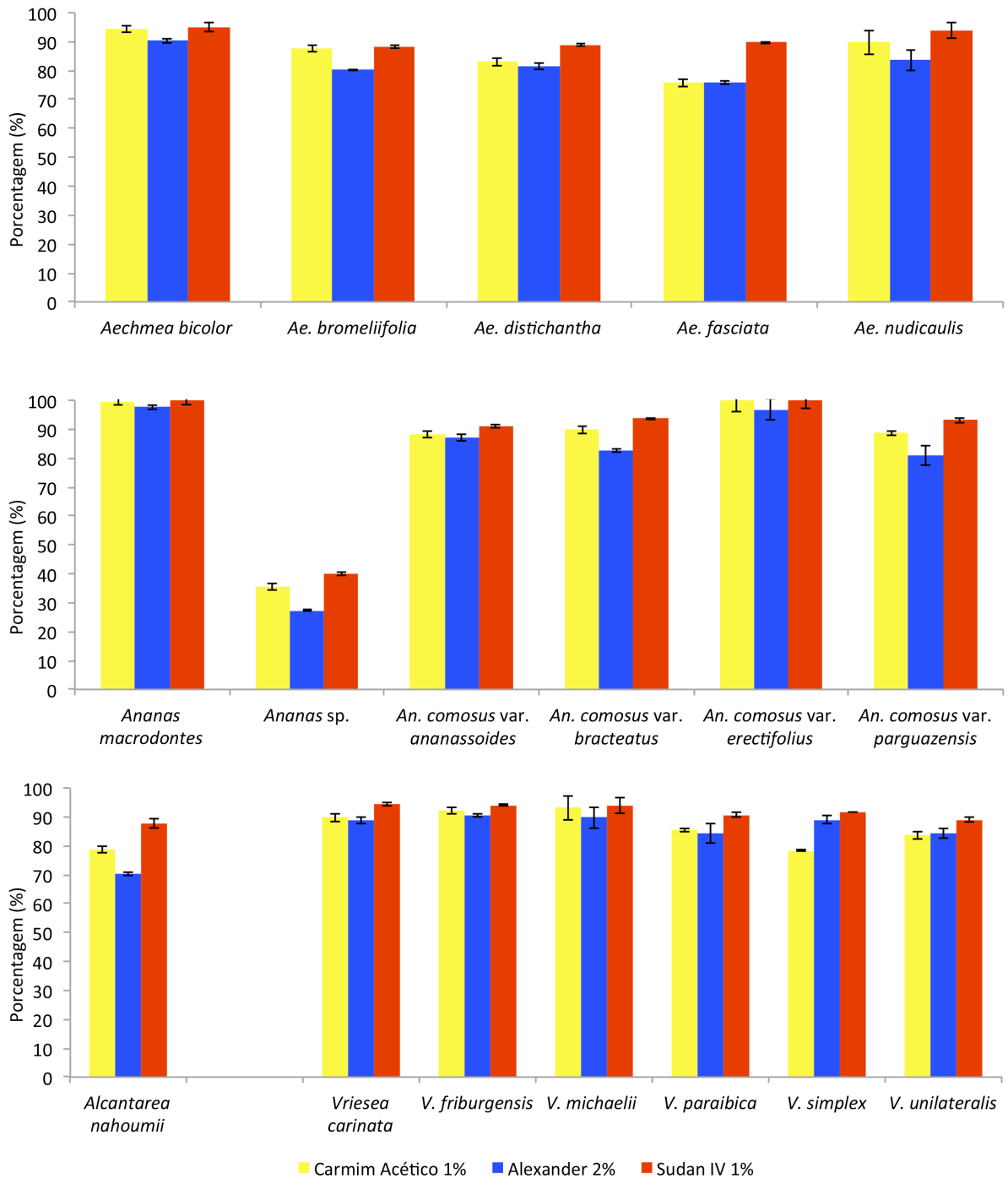


Figura 1.6 - Comparação entre diferentes testes histoquímicos para avaliação da viabilidade de grãos de pólen em espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl.

4.4. Conclusões

Variações em forma e tamanho foram observadas na morfologia polínica entre as espécies estudadas; *Aechmea* e *Ananas* apresentaram grãos de pólen de tamanho médio, com exceção de *Ae. fasciata* e *An. macrodontes* com grãos de pólen de tamanho grande. *Al nahoumii* e as espécies de *Vriesea* apresentaram grãos de pólen de tamanho grande, com exceção da *V. carinata* com grãos de pólen muito grandes.

Grãos de pólen de *Aechmea* e *Ananas* apresentaram simetria bilateral, âmbito de ovalado a esferoidal, 2-porados com exina variando de tectada a semitectada. *Al. nahoumii* e as espécies de *Vriesea* possuem grãos de pólen 1-colpado, com simetria bilateral, âmbito elíptico com exina semitectada, reticulada e heterobrocada.

Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentaram elevadas taxas de germinação, comprimento do tubo polínico e viabilidade, exceto pelo acesso de *Ananas* sp. O uso de diferentes meios de cultura e testes histoquímicos permitiu a definição dos meios SM e BK, como os mais adequados para as bromélias e demonstrou que todos os corantes apresentam resultados semelhantes. Os estudos referentes à morfologia dos grãos de pólen oferecem uma caracterização detalhada das espécies que podem ser importantes para a taxonomia, auxiliando na melhor definição da delimitação genérica e de espécies muito semelhantes. Por outro lado, os estudos da viabilidade polínica subsidiam trabalhos de conservação e melhoramento genético das espécies.

Referências

ALEXANDER, M. P. Aversatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55. n. 1, p. 13-18, 1980.

APG - Angiosperm Phylogeny Group. 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.

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

BARFUSS, M. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany,** New York, v. 92, p. 337-351, 2005.

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

BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The embryology of angiosperms.** New Delhi: Vikas Publishing House, 1974. 264 p.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal Botany**, New York, v. 50, p. 859-865, 1963.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; BETTIOL NETO, J. E. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 261-266, 2010.

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

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 222, p. 113-132, 2000.

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

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

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

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

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

GIVNISH, T. J.; MILLAM, K. C.; EVANS, T. M.; HALL, J. C.; PIRES, J. C.; BARRY, P. E.; SYTSAM, K. J. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal Inferences about phylogeny and south american-african disjunctionsin Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 165, p. 35-54, 2004.

GOMES, P. R.; RASEIRA, M. C. B.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, p. 14-17, 2003.

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

HALBRITTER, H.; TILL, W. Morfologia polínica do Complexo Nidularioide. In: PEREIRA, M. V. (Ed.). **Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998. p. 114-121.

HANNA, W. N. Pollen storage in frostless and conventional frost forming freezers. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1681-1682, 1994.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCH-RADIVO, A.; ULRICH, S. **Pollen terminology.** An illustrated handbook. Wien: Springer, 2009. 259 p.

HMELJEVSKI, K. V.; REIS, A.; REIS, M. S.; ROGASLSKI, J. M.; NETO, C. D.; LENZI, M. Resultados preliminares da biologia reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae): uma espécie rara e endêmica de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Biociências,** Porto Alegre, v. 5, p. 267-269, 2007.

HORRES, R.; SCHULTE, K.; WEISING, K.; ZIZKA, G. Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - evidence from molecular and anatomical studies. **Aliso**, Claremont, v. 23, p. 27-43, 2007.

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

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

LEME, E. M. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: SIQUEIRA FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste -** Biodiversidade, Conservação e suas Bromélias. Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio, 2006. p. 191-381.

LUTHER. H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: CANDOLLE, A.; CANDOLLE C. **Monographiae Phanerogamarum:** Prodromi**,** Paris: Masson, 1896. v. 9, p. 1-990.

MEZ, C. Bromeliaceae. In: MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G.; URBAN, I. (Ed.). **Flora Brasiliensis.** Lipsiae: Typographia Regia, 1891-1894. v. 3, p. 173-634, t. 51-114.

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

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

PALMA-SILVA, C.; SANTOS, D. G.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Botany,** New York, v. 91, n. 6, p. 804-807, 2004.

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

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

PFAHLER, P. L.; PEREIRA, M. J.; BARNETT, R. D. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 1218-1222, 1997.

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

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

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

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia**, Paris, v. 2, n. 11, p. 77-79, 1979.

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.

ROGALSKI, J. M.; REIS, A.; REIS, M. S. HMELJEVSKI, K. V. Biologia reprodutiva da reófita *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 691-702, 2009.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/Stat user´s guide**: statistics. Version 9.1. 3. ed. Cary, NC, 2004.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. A laboratory manual. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 119 p.

SIQUEIRA, K. M. M.; KIILL, L. H. P.; MARTINS, C. F.; LEMOS, I. B.; MONTEIRO, S. P.; FEITOSA, E. A. Ecologia da polinização do maracujá amarelo na região do Vale do Submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, p. 1-12, 2009.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae. Part 3). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 1493-2141, 1979.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae. Part 1). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 1-658, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae. Part 2). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 663-1492, 1977.

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

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; ROSSI, M. L.; SOUZA, F. V. D. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1744-1749, 2011.

SOUSA, P. J. S. Polinização em maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá**: produção e mercado. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 65-70.

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

TARDIVO, R. C.; RODRIGUES, W. A. Pólen e estigma das espécies de *Nidularium* Leme e *Cansitrum* E. Morren (Bromeliaceae) ocorrentes no Estado do Paraná. **Biotemas**, Florianópolis, v. 11, 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.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp**. 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

TERRY, R. G.; BROWN, G. K.; OLMSTEAD, R. G. Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. **American Journal of Botany**, New York, v. 84, p. 664-670, 1997.

THOMPSON, A. H.; BATJER, L. P. The effect of boron in the germination medium on pollen germination and pollen tube growth of several deciduous tree fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** Geneva, v. 56, p. 227-230, 1950.

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.

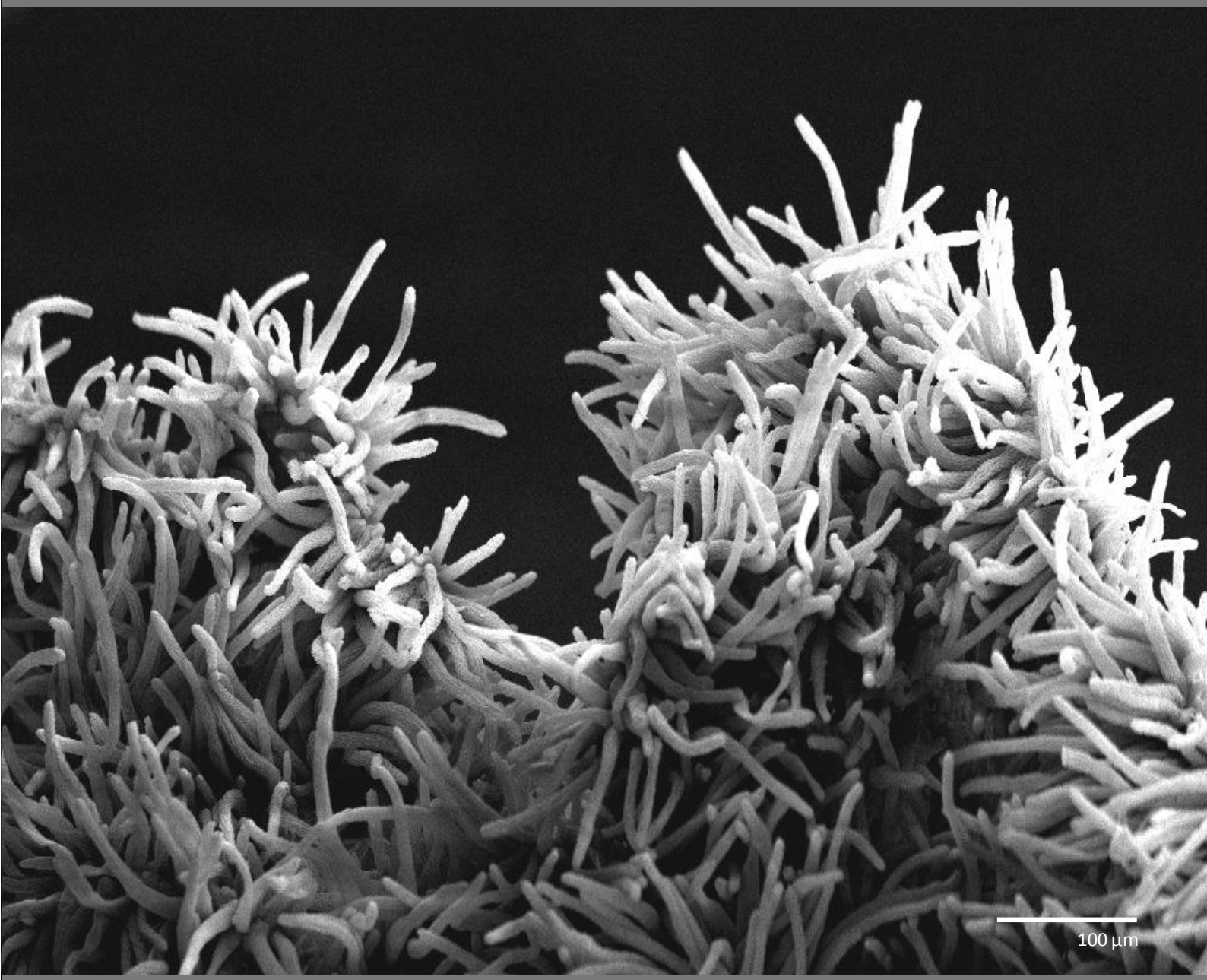
VOLK, G. M. Collecting pollen for genetic resources conservation. In: GUARINO, L.; RAMANATHA, R. V.; GOLDBERG, E. (Ed.). **Collecting plant genetic diversity**: Technical guidelines - 2011 Update. chap. 25. Rome, Italy: Bioversity International, 2011. Disponível em: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=654> Acesso em: 18 jun. 2012.

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, p. 5-42, 1991.

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

Capítulo 2

Morfoanatomia e receptividade do estigma em Bromeliaceae



Vriesea michaelii W. Weber – Papilas estigmáticas observadas em microscopia eletrônica de varredura

5. MORFOANATOMIA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM BROMELIACEAE

RESUMO

A caracterização morfoanatômica do estigma em diferentes espécies têm oferecido importantes dados para a taxonomia em Bromeliaceae. A receptividade do estigma é fundamental para a reprodução das plantas e produção de híbridos por meio da polinização controlada. Desta forma, este trabalho teve como objetivos caracterizar a morfoanatomia do estigma de 18 espécies de Bromeliaceae, por meio da microscopia de luz e eletrônica de varredura, bem como, a receptividade do estigma dessas espécies. Foram estudadas espécies de quatro gêneros: *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas macrodontes*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *Alcantarea nahoumii*, *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. michaelii*, *V. paraibica*, *V. simplex* e *V. unilateralis*. Três metodologias foram comparadas e usadas para determinar a receptividade do estigma durante a abertura floral: peróxido de hidrogênio, benzidina e α-naftil-acetato com fast blue B salt. Dois tipos de estigma foram observados: conduplicado-espiral em *Aechmea, Ananas* e *Alcantarea* e lâmina-convoluta em *Vriesea*. O estigma é trífido, formado por epiderme uniestratificada, parênquima fundamental com numerosos idioblastos contendo ráfides, e três feixes vasculares um para cada carpelo. Nos estigmas do tipo conduplicado-espiral as células epidérmicas internas apresentaram citoplasma denso e um núcleo proeminente, característica esta, não observada nos estigmas do tipo lâmina-convoluta. As papilas estigmáticas variam conforme a espécie, bem como a presença de cutícula ornamentada. O maior comprimento do pistilo foi observado em *Al. nahoumii* (91,75 mm) e o menor em *Ae. bromeliifolia* (4,19 mm). A receptividade do estigma está relacionada com a antese para todas as espécies estudadas, sendo maior receptividade às 8 horas permanecendo até às 12 horas, com exceção da *V. unilateralis,* cuja maior receptividade foi observada às 24 horas, prolongando-se até o início da manhã. O uso da solução de α-naftil-acetato foi o mais eficiente para detecção da receptividade do estigma, além de identificar exatamente a área receptiva.

Palavras-chave: *Aechmea. Alcantarea*. *Ananas.* Esterase. Estilete. Peroxidase. *Vriesea*.

MORPHOANATOMY AND STIGMA RECEPTIVE IN BROMELIACEAE

ABSTRACT

The morphoanatomy characterization of the stigma in different species generates important information for Bromeliaceae taxonomy. Stigma receptivity is fundamental for plant reproduction and for hybrid production, through controlled pollination. This study aimed to characterize the morphology and anatomy of the stigma of eighteen species of Bromeliaceae, through light and scanning electron microscopy, and to evaluate stigma receptivity of these species. The species studied belong to four genera: *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas macrodontes*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *Alcantarea nahoumii*, *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. michaelii*, *V. paraibica*, *V. simplex* and *V. unilateralis*. Three methodologies were compared to characterize stigma receptivity during the period that flowers were opened: hydrogen peroxide, benzidine and a-naphthyl-acetate with fast blue B salt. Two types of stigma were observed: conduplicate-spiral in *Aechmea*, *Ananas* and *Alcantarea* and convolute-blade in *Vriesea*. We observed a trifid stigma, with an uniseriate epidermis, parenchyma with numerous idioblasts containing raphides and three vascular bundles, one for each carpel. In conduplicate stigmas the internal epidermal cells presented dense cytoplasm and a proeminent nucleus which were not observed in convolute-blade stigmas. The stigmatic papillae and cuticle ornamentation vary according to the species. Pistil length was highest in *Al. nahoumii* (91.75 mm) and shortest in *Ae. bromeliifolia* (4.19 mm). Stigma receptivity for all species, except *V. unilateralis*, was observed at anthesis, around 8 am, lasting until 12 pm. For *V. unilateralis*, the highest stigma receptivity was observed at 12 am lasting until early morning. The use of α-naphthyl-acetate was the most efficient methodology for the detection of stigma receptivity, and to identify the receptive areas of the stigma.

Keywords: *Aechmea. Alcantarea*. *Ananas.* Esterase. Peroxidase. Style. *Vriesea.*

5.1. Introdução

A família Bromeliaceae apresenta grande importância econômica e ecológica, principalmente pelo seu valor ornamental e alimentício, além de importantes componentes que contribuem para a manutenção da biodiversidade do bioma da Mata Atlântica (BENZING, 2000). Essa família, composta por 58 gêneros e 3.352 espécies (LUTHER, 2012) apresenta grande variabilidade de formas e cores.

A compreensão da morfologia e biologia floral é fundamental para se poder avaliar as interações entre grãos de pólen e estigma, flores e polinizadores, bem como o sucesso reprodutivo das espécies vegetais (LENZI; ORTH, 2004). Outros aspectos considerados nos estudos de biologia floral se referem ao subsídio que esses conhecimentos geram para auxiliar nos trabalhos de manejo, melhoramento genético, domesticação de espécies nativas, taxonomia, relações ecológicas entre plantas e ambiente em que vivem, contribuindo também na interpretação de mecanismos relacionados à polinização (OLIVEIRA; COUTURIER; BESERRA, 2003).

Em bromeliáceas, os estudos referentes à morfologia do estigma têm oferecido importantes dados para a taxonomia, auxiliando na melhor definição da delimitação genérica e de espécies (BROWN; GILMARTIN, 1989).

Considerando a diversidade genética desta família, e que alguns estudos já foram publicados sobre a morfologia do estigma, a exemplo de Brown e Gilmartin (1984; 1989), Gardner (1986), Varadarajan e Brown (1988), Gortan e Till (1998), Vervaeke et al. (2003), é notória a necessidade de ampliar estes conhecimentos para mais espécies. Esses autores estudaram aproximadamente 400 táxons e classificaram o estigma de Bromeliaceae como trífido, sendo que os ramos ou lobos estigmáticos apresentam diferenciações conferindo cinco categorias aceitas atualmente: conduplicado-espiral, lâmina-convoluta, simples-ereto, cupulado e coraliforme.

A receptividade do estigma é fundamental para determinação do melhor período para deposição dos grãos de pólen na flor e obtenção de sucesso na polinização controlada, além de interferir diretamente no ciclo de vida da planta, na visitação de polinizadores e na seleção gametofítica (GALEN; PLOWRIGHT, 1987). O estigma, dependendo da espécie vegetal, produz exsudatos que promovem a aderência dos grãos de pólen, hidratação, germinação e crescimento do tubo polínico, essa característica contribui para a fertilização,

com formação de frutos e sementes (HESLOP-HARRISON; SHIVANNA, 1977; KULLOLI et al., 2010).

A receptividade do estigma está relacionada à presença de atividades enzimáticas de peroxidase, esterase e desidrogenases (HESLOP-HARRISON; SHIVANNA, 1977; GALEN; PLOWRIGHT, 1987; DAFNI; MAUÉS, 1998). Estigmas receptivos apresentam alta atividade enzimática, de ocorrência em diferentes fases de desenvolvimento da planta (KNOX, 1984; SHIVANA; RANGASWAMY, 1992). A maioria dos métodos para determinar a receptividade do estigma é baseada na identificação dessas atividades (KNOX; WILLIAMNS; DUMAS, 1986; DAFNI, 1992; KEARNS; INOUYE, 1993). Essas enzimas desempenham papel fundamental na germinação dos grãos de pólen, na penetração do tubo polínico no estigma e provavelmente nas respostas de incompatibilidade (BHATTACHARYA; MANDAL, 2003; KULLOLI et al., 2010). A metodologia utilizada deve ser adequada para cada espécie de planta e se possível comparada com a germinação dos grãos de pólen sobre o estigma (STONE; THOMSON; DENT-ACOSTA, 1995).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar morfoanatomicamente e classificar os tipos de estigma em dezoito espécies de Bromeliaceae e avaliar a receptividade do estigma por meio de diferentes metodologias para dar subsídios a programas de melhoramento genético e contribuir para estudos taxonômicos desta família.

5.2. Material e Métodos

Foram utilizados estigma/estilete de 18 espécies e/ou variedades botânicas de Bromeliaceae, sendo que um exemplar de cada foi depositado no herbário ESA (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Universidade de São Paulo - Esalq/ USP): *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (voucher ESA 120990), *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f. (ESA 121275), *Ae. distichantha* Lem. (ESA 121281), *Ae. fasciata* Baker (ESA 120987), *Ae. nudicaulis* Griseb. (ESA 120991), *Ananas macrodontes* E. Morren (ESA 121286), *Ananas* sp. (L.) Merr. (ESA 120988), *An. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (ESA 121274), *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal (ESA 121284), *An. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121285), *An. comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121405), *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (ESA 120986), *Vriesea carinata* Wawra (ESA 121404),

V. friburgensis Mez (ESA 121282), *V. michaelii* W. Weber (ESA 121280), *V. paraibica* Wawra (ESA 121276), *V. simplex* Beer (ESA 120989) e *V. unilateralis* Mez (ESA 121283).

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos (13 cm de altura por 10 cm de diâmetro) com substrato Basaplant®, sob temperatura ambiente e umidade relativa de 70%, no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Morfoanatomia do estigma

Para caracterização morfológica os estigmas/estiletes coletados na antese, foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), $CaCl_2$ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, em seguida desidratados em série etílica (35-100%). As amostras foram secas ao ponto crítico através de CO_2 líquido e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para as análises anatômicas, os estigmas/estiletes foram fixados na mesma solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada, por uma semana, desidratadas em série etílica (35-100%), por 6 horas, infiltradas e emblocadas utilizando-se o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heldelberg). A polimerização da resina foi feita à temperatura ambiente por 48 horas. Cortes histológicos seriados (4-5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM 2155 (Leica, Nussloch, Alemanha), dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1% p/v), seguido de azul de toluidina (0,05% p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em fotomicroscópio Axiosckop 2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para os dados morfométricos foram utilizados 10 estigmas de diferentes plantas e as medidas foram calculadas com o auxílio do programa ImageJ 1.46r (RASBAND, 2012). Para a caracterização morfológica e anatômica utilizaram-se três estigmas de diferentes plantas, de cada espécie, e a nomenclatura descrita em Brown e Gilmartin (1984; 1989).

Receptividade do estigma

A receptividade do estigma foi determinada em cinco tempos diferentes utilizando três repetições cada. Pré-antese (botão - 18:00 h); antese (8:00 h); pós-antese (12:00 h e 18:00 h) e flor recém fechada (8:00 h). Em *V. unilateralis,* por apresentar antese noturna,

realizaram-se ajustes nos horários de cada etapa: pré-antese (botão - 12:00 h; 18:00 h); antese (24:00 h); (8:00 h) e (flor recém fechada - 12:00 h).

Foram usadas três diferentes metodologias para avaliação do estigma, descritas a seguir:

Metodologia 1. Os estigmas foram imersos em peróxido de hidrogênio (3%) por três minutos para a observação da liberação de bolhas de ar, uma vez que a reação do peróxido de hidrogênio com a enzima peroxidase indica que o estigma está receptivo (ZEISLER, 1933);

Metodologia 2. Solução de benzidina (1%), etanol (60%) e peróxido de hidrogênio (3%) por três minutos, o estigma receptivo é indicado pela presença de peroxidase (bolhas) e a oxidação da benzidina resulta em coloração azul (DAFNI, 1992);

Metodologia 3. Solução de α-naftil-acetato com tampão fosfato, acetona e fast blue B salt por cerca de cinco minutos. Em seguida, os estigmas foram lavados em água destilada e a atividade esterásica foi observada através de coloração escura na superfície estigmática e/ou papilas (PEARSE, 1972; DAFNI, 1992).

A receptividade do estigma nas diferentes metodologias foi estimada conferindo graus, conforme adaptação de Dafni e Maués (1998): (-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte.

5.3. Resultados e Discussão

Morfoanatomia do estigma

Dois tipos de estigma foram observados nas espécies estudas. O tipo conduplicado-espiral foi observado em *Aechmea, Ananas* (Bromelioideae) e *Alcantarea* (Tillandsioideae) e as espécies do gênero *Vriesea* (Tillandsioideae) apresentaram estigma do tipo lâmina-convoluta (Figuras 2.1 e 2.2). Brown e Gilmartin (1984; 1989) relataram que o tipo conduplicado-espiral é observado na subfamília Bromelioideae com exceção dos gêneros *Cryptanthus* e *Orthophtum,* que apresentam o estigma do tipo simples-ereto, enquanto que na subfamília Tillandsioideae os cinco tipos de estigma são observados (conduplicado-espiral, lâmina-convoluta, simples-ereto, coraliforme e copulado).

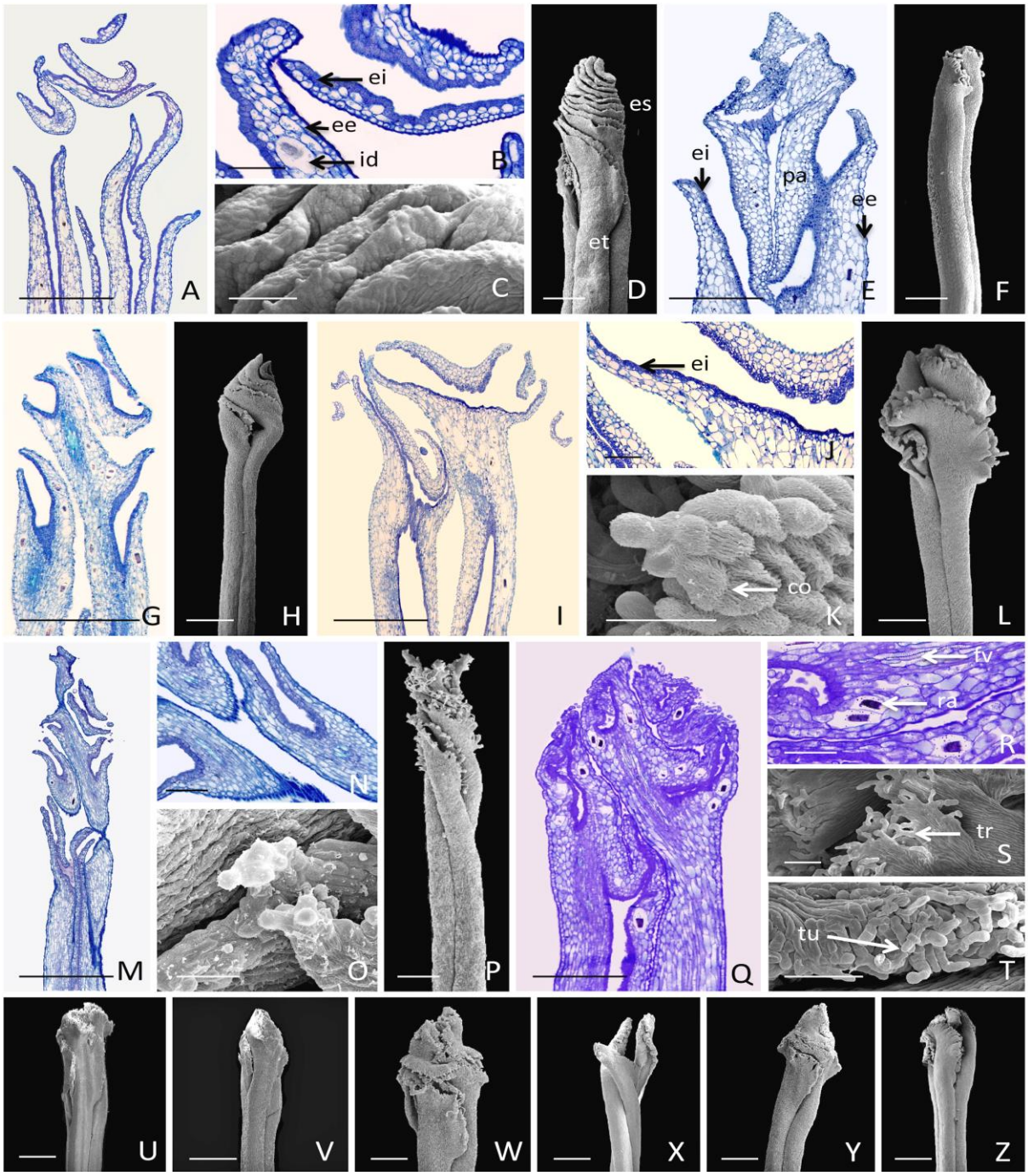


Figura 2.1 - Morfoanatomia do estigma do tipo conduplicado-espiral nos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav. e *Ananas* Mill., subfamília Bromelioideae. A-D) *Ae. bicolor* L. B. Sm.; E-F) *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f.; G-H) *Ae. distichantha* Lem.; I-L) *Ae. fasciata* Baker; M-P) *Ae. nudicaulis* Griseb.; Q, R, T, V) *Ananas* sp. (L.) Merr.; S, U) *An. macrodontes* E. Morren; W) *An. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal; X) *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal; Y) *An. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal; Z) *An. comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Sm.) Coppens & F. Leal. Secções anatômicas observadas em microscópio de luz (ML) (A, B, E, G, I, J, M, N, Q, R) e características morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (C, D, F, H, K, L, O, P, S-Z). co = cutícula ornamentada, ee = epiderme externa, ei = epiderme interna, es = estigma, et = estilete, fv = feixe vascular, id = idioblasto, pa = parênquima fundamental, ra = ráfides, tr = tubular ramificada, tu = tubular. Barras: A, D, E, F, G, H, I, L, M, P, Q, U, V, W, X, Y, Z = 500 µm; B, C, J, N, R, S, T = 100 µm; K, O = 30 µm

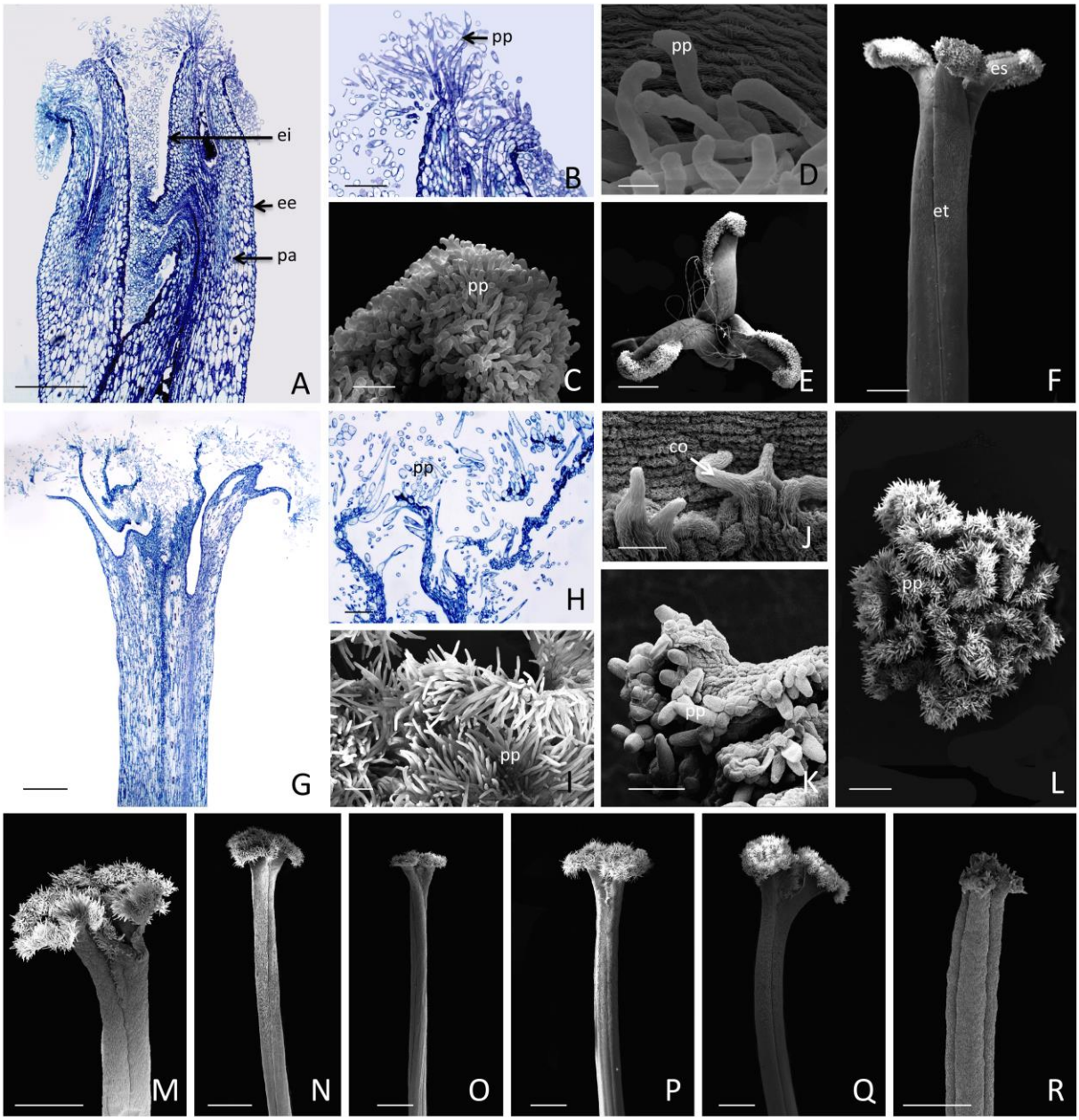


Figura 2.2 - Morfoanatomia do estigma do tipo conduplicado-espiral em *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant e lâmina-convoluta nas espécies do gênero *Vriesea* Lindl. da subfamília Tillandsioideae/ Bromeliaceae. A-F) *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant; G, I, M) *Vriesea carinata* Wawra; N) *V. friburgensis* Mez; O) *V. michaelii* W. Weber; J, P) *V. paraibica* Wawra; L, Q) *V. simplex* Berr; K, R) *V. unilateralis* Mez. Secções anatômicas observadas em microscópio de luz (ML) (A, B, G, H) e características morfológicas observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (C-F, I-R). co = cutícula ornamentada, ee = epiderme externa, ei = epiderme interna, es = estigma, et = estilete, pa = parênquima fundamental, pp = papilas. Barras: A, G, = 500 µm; B, C, H, I, K = 100 µm; D, J = 30 µm; E, F, L, M, N, O, P, Q, R = 1 mm

Em ambos os tipos, o estigma é trífido, formado por epiderme uniestratificada, parênquima fundamental caracterizado pela presença de numerosos idioblastos contendo ráfides, principalmente no gênero *Ananas* (Figura 2.1 Q), e três feixes vasculares, um para cada carpelo. Nos estigmas do tipo conduplicado-espiral as células da epiderme da face interna apresentam citoplasma denso e núcleo proeminente (Figura 2.1 A, B, E, G, I, J, M, N, Q, R; Figura 2.2 A, B), características não observadas em estigmas do tipo lâmina-convoluta (Figura 2.2 G, H). A presença de células com citoplasma denso e núcleo proeminente na epiderme interna do estigma sugere intensa atividade metabólica característica de células secretoras, relacionadas à aderência dos grãos de pólen, considerando que este tipo de estigma não apresenta papilas especializadas como os estigmas do tipo lâmina-convoluta. Essa característica é também confirmada por testes histoquímicos que detectam a receptividade do estigma, pois, nessas regiões é mais evidente a reação provocada por α-naftil-acetato e fast blue B salt, diferentemente das demais regiões do estigma. Brown e Gilmartin (1988) sugerem que o estigma conduplicado-espiral representa uma condição plesiomórfica dentro da família e que o estigma do tipo lâmina-convoluta é mais especializado, apresentando um aumento na área da superfície estigmática pela presença de papilas, promovendo assim uma maior eficiência na aderência dos grãos de pólen.

As espécies *Ae. bicolor*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata* e *Ae. nudicaulis* apresentam lobos estigmáticos recobertos por cutícula ornamentada (Figura 2.1 K) e fortemente contorcidos (Figura 2.1 D, H, L, P), sendo que em *Ae. bromeliifolia* esta característica foi menos evidente (Figura 2.1 F). As margens das lâminas estigmáticas são lobadas, variando de intensamente lobada para *Ae. bromeliifolia* (Figura 2.1 F), *Ae. distichantha* (Figura 2.1 H), *Ae. fasciata* (Figura 2.1 K, L) e *Ae. nudicaulis* (Figura 2.1 O, P) a subinteiras em *Ae. bicolor* (Figura 2.1 C, D). Todas as espécies apresentam papilas restritas à margem da lâmina estigmática, sendo tubular em *Ae. bicolor* e *Ae. bromeliifolia* e bulbosa em *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata* e *Ae. nudicaulis*, variando de poucas em *Ae. bicolor* (Figura 2.1 C) a muitas em *Ae. nudicaulis,* sem ornamentação de cutícula (Figura 2.1 O). A coloração do estigma varia de branco em *Ae. bicolor*, *Ae. bromeliifolia, Ae. distichantha* e *Ae. nudicaulis*, a lilás claro em *Ae. fasciata* e amarelo claro em *Ae. nudicaulis* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Caracterização do pistilo em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill*, Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl.

Espécies/ Variedades	Tipo [1]	Estigma (mm)		Estilete (mm)		Coloração
		Comp.	Diâmetro	Comp.	Diâmetro	
Aechmea bicolor	Conduplicado-espiral	1,07 ± 0,12	0,70 ± 0,06	4,06 ± 0,05	0,72 ± 0,02	Branco
Ae. bromeliifolia	Conduplicado-espiral	0,61 ± 0,07	0,52 ± 0,02	3,58 ± 0,07	0,50 ± 0,03	Branco
Ae. distichantha	Conduplicado-espiral	1,40 ± 0,09	0,84 ± 0,02	6,26 ± 0,18	0,46 ± 0,02	Branco
Ae. fasciata	Conduplicado-espiral	1,63 ± 0,10	1,23 ± 0,04	14,03 ± 0,15	0,49 ± 0,05	Lilás claro
Ae. nudicaulis	Conduplicado-espiral	1,13 ± 0,07	0,42 ± 0,04	9,12 ± 0,16	0,40 ± 0,04	Amarelo claro
Ananas macrodontes	Conduplicado-espiral	1,12 ± 0,12	1,02 ± 0,13	7,17 ± 0,14	0,85 ± 0,08	Branco
Ananas sp.	Conduplicado-espiral	1,17 ± 0,07	0,87 ± 0,03	4,80 ± 0,34	0,52 ± 0,03	Branco
An. comosus var. *ananassoides*	Conduplicado-espiral	1,48 ± 0,19	1,71 ± 0,07	5,08 ± 0,10	0,92 ± 0,05	Branco
An. comosus var. *bracteatus*	Conduplicado-espiral	1,28 ± 0,18	1,45 ± 0,13	6,98 ± 0,17	0,63 ± 0,07	Branco
An. comosus var. erectifolius	Conduplicado-espiral	1,38 ± 0,23	1,63 ± 0,05	5,30 ± 0,06	0,89 ± 0,11	Branco
An. comosus var. parguazensis	Conduplicado-espiral	1,21 ± 0,12	1,05 ± 0,08	5,11 ± 0,05	0,65 ± 0,08	Branco
Alcantarea nahoumii	Conduplicado-espiral	1,75 ± 0,25	4,59 ± 0,09	89,99 ± 0,71	1,49 ± 0,05	Branco
Vriesea carinata	Lâmina-convoluta	1,61 ± 0,17	2,55 ± 0,09	27,97 ± 0,24	0,69 ± 0,03	Amarelo claro
V. friburgensis	Lâmina-convoluta	0,83 ± 0,07	1,76 ± 0,04	22,38 ± 0,45	0,50 ± 0,03	Amarelo claro
V. michaelii	Lâmina-convoluta	1,05 ± 0,14	1,47 ± 0,05	20,56 ± 0,15	0,44 ± 0,02	Amarelo claro
V. paraibica	Lâmina-convoluta	1,81 ± 0,16	2,75 ± 0,07	25,99 ± 0,25	0,74 ± 0,03	Amarelo claro
V. simplex	Lâmina-convoluta	1,98 ± 0,14	3,42 ± 0,08	31,90 ± 0,38	0,84 ± 0,02	Verde claro
V. unilateralis	Lâmina-convoluta	0,57 ± 0,08	1,84 ± 0,20	18,85 ± 0,41	1,39 ± 0,22	Amarelo claro

[1.] Conforme terminologia de Brown e Gilmartin (1984; 1989)

Em *Ananas* os estigmas são brancos, com lobos recobertos por cutícula ornamentada e fortemente contorcidos (Figura 2.1 U-Z); as margens das lâminas são lobadas, papilosas variando de tubular ramificada em *An. macrodontes* (Figura 2.1 S) e tubular não ramificada nas demais variedades do *An. comosus,* sem ornamentação de cutícula (Figura 2.1 T).

Al. nahoumii apresentou estigma branco, do tipo conduplicado (Figura 2.2 A-F), com lobos ligeiramente contorcidos e ápices recurvados, com papilas curtas (99,26 $\pm$ 29,18 μm), densamente distribuídas, uni ou multicelulares, com cutícula lisa, sem ornamentação (Figura 2.2 C). Este gênero, antes pertencente ao subgênero *Vriesea,* foi classificado por Grant (1995) como apresentando estigmas do tipo lâmina-convoluta, porém Leme (2007) sugeriu o tipo conduplicado para todas as espécies desse gênero, com variações na forma entre as espécies.

As espécies de *Vriesea* apresentam lobos estigmáticos com papilas tubulares unicelulares (Figura 2.2 H), revestidas por cutícula ornamentada, compridas (169,25 $\pm$ 77,93 μm) e finas (8,42 $\pm$ 1,21 μm) (Figura 2.2 I-J), com exceção de *V. unilateralis* que apresentou papilas menores (59,29 $\pm$ 20,42 μm) e mais grossas (21,32 $\pm$ 6,37 μm) (Figura 2.2 K, R). A coloração variou de verde claro em *V. simplex* a amarelo claro para as demais espécies (Tabela 2.1).

Os estigmas de todas as espécies permaneceram úmidos durante todo o dia até o fechamento das flores. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Heslop-Harrison e Shivanna (1977), que classificaram os estigmas de bromélias como úmidos para os gêneros *Aechmea*, *Bilbergia, Bromelia, Canistrum, Fosterella, Nidularium, Pitcairnia, Portea, Quesnelia* e *Vriesea* e secos para as espécies do gênero *Abromeitiella (Deuterocohnia)*, *Dyckia* e *Neoregelia*.

Os maiores valores para comprimento e diâmetro do estigma e estilete foram observados em *Al. nahoumii* (estigma/ estilete com 91,75 mm de comprimento e 4,59 mm de diâmetro). Para as espécies de *Vriesea* os tamanhos variaram de 19,42 mm em *V. unilateralis* e 33,88 mm em *V. simplex* e para as espécies de *Aechmea* foram observados 4,19 mm em *Ae. bromeliifolia e* 15,65 mm em *Ae. fasciata* (Tabela 2.1). As características morfométricas do pistilo de diferentes espécies podem interferir diretamente na sua cruzabilidade devido à sua correspondência direta com o crescimento do tubo polínico (GOPINATHAN; BABU; SHIVANNA, 1986; PARTON et al., 2001).

Os estiletes de todas as espécies estudadas são formados por epiderme uniestratificada (Figura 2.3 A-D), sendo que as células da face externa apresentam paredes periclinais externas levemente convexas, revestidas por cutícula estriada. Na face interna as células epidérmicas apresentam citoplasma denso, núcleo proeminente e cutícula lisa (Figura 2.3 A-B). O estilete apresenta feixes vasculares, um para cada carpelo imerso no parênquima fundamental (Figura 2.3 A-C). A densidade das estrias na cutícula varia entre as espécies, sendo mais acentuada nas espécies de *Vriesea* (Figura 2.3 E-F) e menos nas espécies de *Aechmea* e *Ananas* (Figura 2.3 G), sendo quase que ausente em *Al. nahoumii* (Figura 2.3 H). Numerosos idioblastos contendo ráfides são observados em todo o tecido parenquimático do estilete, em todas as espécies estudadas (Figura 2.3 D-I).

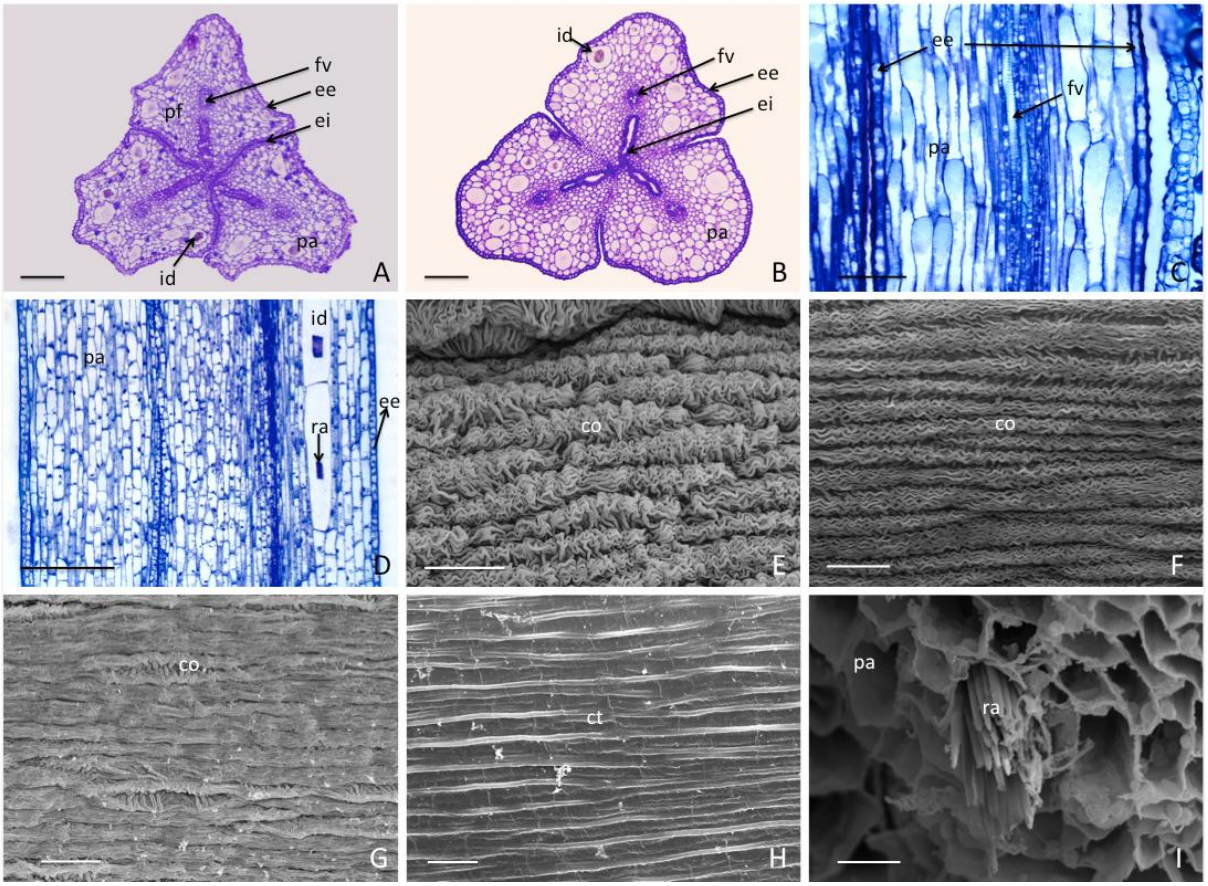


Figura 2.3 - Morfoanatomia do estilete em Bromeliaceae. Secção transversal em microscopia de luz (ML) do estilete em *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (A) e *Ae. nudicaulis* Griseb. (B); Secção longitudinal em ML do estilete de *Ananas* sp. (L.) Merr. evidenciando os feixes vasculares (C); Secção longitudinal em ML do estilete em *An. macrodontes* E. Morren evidenciando os idioblastos e ráfides (D); Diferentes morfologias das estrias na cutícula no estilete em *V. carinata* Wawra (E), *V. michaelii* W. Weber (F), *Ae. fasciata* Baker (G) e *Al. nahoumii* (Leme) J. R. Grant (H), em MEV; Ráfides em *Vriesea simplex* Berr em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (I). co = cutícula ornamentada, ee = epiderme externa, ei = epiderme

interna, fv = feixe vascular, id = idioblasto, pa = parênquima fundamental, ra = ráfides. Barras: A-C = 100 μm; D = 500 μm; E-I = 20 μm

Receptividade do estigma

As três metodologias utilizadas no presente trabalho foram eficientes na avaliação da receptividade do estigma. Foi observada reação positiva muito forte das oito horas (antese) até as doze horas, havendo a partir daí, um decréscimo na reação, atingindo um mínimo em horário diferente para cada espécie e metodologia testada (Tabela 2.2). *V. unilateralis* foi a única espécie estudada que apresentou reação positiva muito forte às 24:00 h, prolongando-se até o início da manhã seguinte. Este resultado está relacionado à abertura floral, pois, nesta espécie a antese ocorre à noite por volta das 21:00 h, enquanto nas demais espécies ocorre nas primeiras horas da manha. *V. unilateralis* é polinizada por morcegos e a mesma apresenta um odor forte nas suas flores (BENZING, 2000). Na pré-antese (botão) não foi verificada reação em nenhuma das espécie e metodologias testadas.

Dafni e Maués (1998), estudando a receptividade do estigma utilizando quatro metodologias em 14 espécies de diferentes famílias, observaram respostas diferenciadas entre as espécies, com algumas metodologias não apresentando reação para algumas espécies.

No caso do presente trabalho, o uso de peróxido de hidrogênio identificou resposta positiva muito forte até a pós-antese para a maioria das espécies. Esta metodologia é considerada simples e barata e identifica a reação da enzima peroxidase presente no estigma no qual promove a liberação de bolhas de ar (Figura 2.4 A-B). Entretanto, a presença de qualquer dano ao tecido, pode levar a um falso positivo. Dafni e Maués (1998), relataram que a utilização do peróxido de hidrogênio, apresenta resultados não tão confiáveis, pois o mesmo pode reagir diferentemente conforme a idade da planta, além de não identificar exatamente a área receptiva. Esses autores aconselham não utilizar apenas essa metodologia como um único indicador e sim associar esta a outras técnicas.

A associação da benzidina com o peróxido de hidrogênio, permitiu identificar além da presença de bolhas de ar, uma coloração variando do azul claro ao azul escuro, sendo que, quanto mais receptivo o estigma mais intensa foi a coloração (Figura 2.4 C-D). A benzidina oxida quando reage com a enzima peroxidase, mudando a cor do tecido (GALEN; PLOWRIGHT, 1987). *Ae. bromeliifolia*, *Ae. nudicaulis* e *V. carinata* apresentaram uma diminuição na reação nesta metodologia às 18:00 h, com resultado semelhante à reação com α-naftil-acetato e fast blue B salt.

Tabela 2.2 - Receptividade do estigma em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill*, Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl. avaliada entre a pré-antese e pós-antese, por diferentes metodologias

Espécies/ Variedades	H_2O_2	benz.	∝-naftil	H_2O_2	benz.	∝-naftil	H_2O_2	benz.	∝-naftil	H_2O_2	benz.	∝-naftil	H_2O_2	benz.	∝-naftil
	18:00 h (Pré-antese)			8:00 h (antese)			12:00 h (Pós-antese)			18:00 h (Pós-antese)			8:00 h (Pós-antese)		
Aechmea bicolor	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	-
Ae. bromeliifolia	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+
Ae. distichantha	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Ae. fasciata	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	-
Ae. nudicaulis	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+
Ananas macrodontes	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
Ananas sp.	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
An. comosus var. *ananassoides*	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
An. comosus var. *bracteatus*	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
An. comosus var. *erectifolius*	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
An. comosus var. *parguazensis*	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
Alcantarea nahoumii	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Vriesea carinata	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
V. friburgensis	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
V. michaelii	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	-
V. paraibica	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+
V. simplex	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	12:00 h (Pré-antese)			18:00 h (Pré-antese)			24:00 h (Antese)			8:00 h (Pós-antese)			12:00 h (Pós-antese)		
V. unilateralis	-	-	-	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

(-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta positiva muito forte. Metodologias adaptadas de Dafni e Maués, 1998); benz. = solução de benzidina e peróxido de hidrogênio; ∝-naftil = solução de ∝-naftil-acetato e fast blue B salt

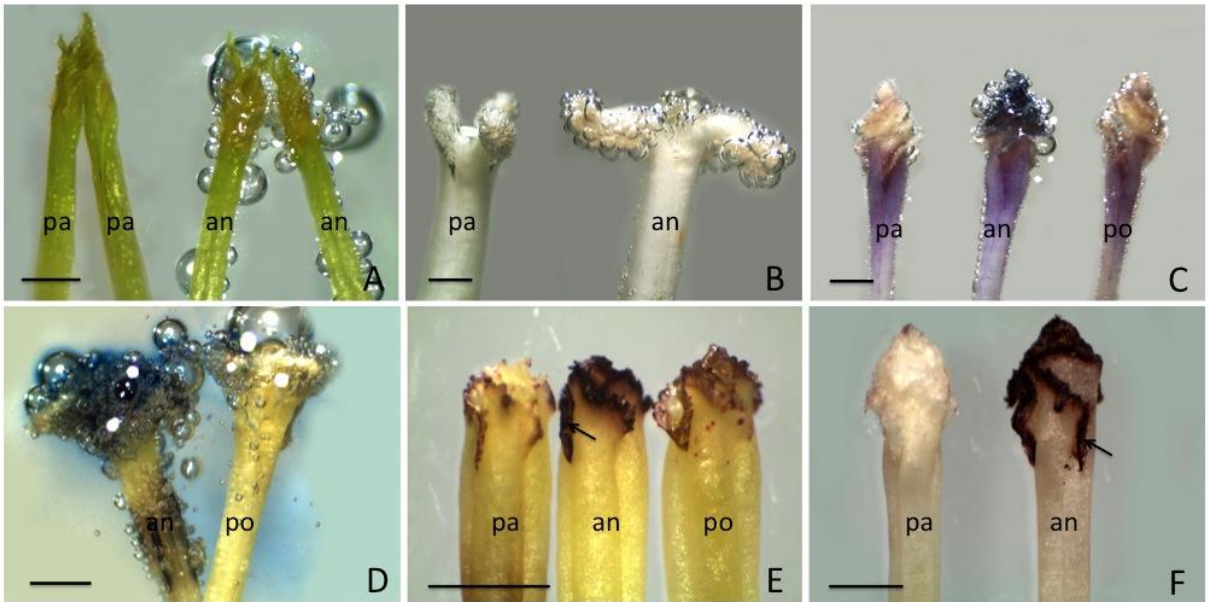


Figura 2.4 - Avaliação da receptividade do estigma em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill*, Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl. por diferentes metodologias. A) *Ae. nudicaulis* Griseb. em peróxido de hidrogênio; B) *Al. nahoumii* (Leme) J. R. Grant em peróxido de hidrogênio; C) *Ae. fasciata* Baker em solução de benzidina e peróxido de hidrogênio; D) *V. michaelii* W. Weber em solução de benzidina e peróxido de hidrogênio; E) *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f. em solução de α-naftil-acetato; F) *Ananas* sp. (L.) Merr. em solução de α-naftil-acetato. pa = pré-antese, an = antese (8 h), po = pós-antese; seta = região da receptividade. Barras: 1 mm

A reação do α-naftil-acetato associada ao fast blue B salt identificou uma coloração marrom escuro principalmente na região das papilas estigmáticas (Figura 2.4 E-F), identificando assim elevada atividade enzimática esterásica que pode estar relacionada à presença de exsudatos que ocorrem normalmente nas papilas dos estigmas. Essa metodologia foi a que apresentou resultados que parecem representar melhor a receptividade, além de identificar exatamente a região da área receptiva. Kulloli et al. (2010), avaliando a atividade esterásica em três espécies de *Impatiens* observaram atividade principalmente nos lobos estigmáticos e na ponta do estigma. Resultados semelhantes ao encontrado nas espécies estudadas de Bromeliaceae neste trabalho. A resposta positiva muito forte coincidiu com a antese, sendo observada para todas as espécies em todo o período da manhã com exceção de *V. unilateralis* que apresentou resposta à noite, por volta das 24:00 horas.

Para cada espécie estudada, houve uma redução na reação ao longo do dia, indicando a diminuição na receptividade do estigma. No final da tarde, algumas espécies como *Ae. bicolor*, *Ae. fasciata*, *V. carinata* e *V. michaelii*, apresentaram reação fraca ou ausente na pós-antese. Para *V. simplex* e *Al. nahoumii* observou-se resposta positiva forte e muito forte (respectivamente), mesmo na pós-antese, nas três metodologias testadas. A receptividade do estigma possivelmente está também relacionada ao tempo de duração da flor, visto que nessas duas espécies as flores permaneceram abertas por aproximadamente 36 horas, enquanto que nas outras espécies estudadas as flores permaneceram abertas por cerca de 24 horas após a antese.

Siqueira Filho e Machado (2001) estudando a biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren, e Canela e Sazima (2003) estudando *Aechmea pectinata* Baker, ambos aplicando peróxido de hidrogênio observaram que o estigma permaneceu receptivo desde o momento da abertura até o fechamento da flor.

Parton et al. (2001), estudando as barreiras reprodutivas em nove espécies de bromélias de quatro diferentes gêneros, também observaram que a maior receptividade do estigma foi observada na antese. Esses autores relataram que em uma espécie do gênero *Vriesea* o estigma foi receptivo até dois dias após a antese e obteve a germinação de grãos de pólen em número suficiente para a fertilização, no entanto, o número de óvulos fertilizados decresceu de 90% para 10% quando as polinizações foram realizadas na pós-antese. Em outra espécie de *Vriesea* os mesmos autores relatam que observaram porcentagem de germinação de grãos de pólen e índice de fertilização suficientemente alto um dia antes, até um dia após a antese.

Os resultados obtidos neste trabalho subsidiam programas de melhoramento genético das espécies avaliadas, identificando assim o melhor horário para a realização de polinizações controladas, assim como na caracterização das espécies e estudos da taxonomia desta família.

5.4. Conclusões

Foram observados dois tipos de estigma: conduplicado-espiral para as espécies dos gêneros *Aechmea, Ananas* e *Alcantarea* e lâmina-convoluta para as espécies do gênero *Vriesea*.

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

O estigma apresenta maior atividade enzimática coincidindo com a antese, em todas as espécies estudadas, com maior receptividade às 8:00 h permanecendo até às 12:00 h, e em *V. unilateralis*, que apresenta antese noturna, a maior receptividade foi às 24:00 h, se prolongando até o início da manhã.

A morfologia do estigma oferece informações que podem ser importantes para a taxonomia de espécies. Adicionalmente, os estudos da receptividade do estigma subsidiam trabalhos de melhoramento genético das espécies, possibilitando maior eficiência nas hibridações pretendidas.

Referências

BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: Profile an Adaptive Radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690 p.

BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Stigma form and surface in relation to *in vivo* pollen germination in *Butea monosperma* (Lamk.) Taub. and *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don. **Phytomorphology**, Delhi, v. 53, p. 179-185, 2003.

BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Comparative ontogeny of bromeliaceous stigmas. In: LEINS, P.; TUCKET, S. C.; ENDRESS, P. K. (Ed.). **Aspects of floral development**. Berlin: Stuttgart, 1988. p. 191-204.

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

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

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, p. 731-737, 2003.

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

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

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.

GALEN, C.; PLOWRIGHT, R. C. Testing accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, p. 107-111, 1987.

GARDNER, S. **A systematic study of Tillandsia subgenus Tillandsia**. 1986. 505 p. Thesis (Ph.D.) - Texas A&M University, Austin, 1986.

GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R.; SHIVANNA, K. R. Interespecific hybridization between rice bean (*Vigna umbelatta*) and its wild relative (*V. minima*): fertility-sterility relationships. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, p. 1017-1022, 1986.

GORTAN, G.; TILL, W. Stigma morphology of *Nidularium* and related genera. In: LEME, E. M. C. (Ed.). **Canistropsis** - Bromélias da Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Salamandra, 1998. p. 124-131.

GRANT, J. R. A Synopsis of the genus *Alcantarea*. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 24-26, 1995.

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

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

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

KNOX, R. B. Pollen-pistil interaction. In: LINSKENS, H. F.; HESLOP-HARRISON, J. (Ed.). **Cellular interactions**. Berlin: Springer, 1984. (Encyclopedia of Plant Physiology, 17).

KNOX, R. B.; WILLIAMS, E. G.; DUMAS, C. Pollen, pistil and reproductive function in crop plants. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 4, p. 9-79, 1986.

KULLOLI, S. K.; RAMASUBBU, R.; SREEKALA, A. K.; PANDURANGAN, A. G. Cytochemical localization of stigma-surface esterase in three species of *Impatiens* (Balsaminaceae) of Western Ghats. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, Agra, India, v. 1, p. 106-111, 2010.

LEME, E. M. C. Improving taxa and character sampling to support generic and infrageneric status of *Alcantarea*. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 57, p. 208-215, 2007.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 17, p. 67-89, 2004.

LUTHER. H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.

OLIVEIRA, M. S. P.; COUTURIER, G.; BESERRA. P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** Porto Alegre, v. 17, p. 343-353, 2003.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Interspecific and intergeneric fertilization barriers in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 552, p. 43-54, 2001.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1972. 631 p.

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

SHIVANA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**: a laboratory manual. Berlin: Springer, 1992. 119 p.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. S. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 15, p. 427-443, 2001.

STONE, J. L.; THOMSON, J. D.; DENT-ACOSTA, S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, New York, v. 82, p. 1186-1197, 1995.

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, p. 82-91, 1988.

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Floyer biology of six cultivares of the Bromeliaceae. I. Pollen, pistil, and petal appendages. **Selbyana,** Sarasota, v. 24, p. 78-86, 2003.

ZEISLER, M. Über die Abgrenzung des eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. **Beihefte zum Botanischen Centralblatt**, Jena, v. 58, p. 308-318, 1933.

Capítulo 3

Viabilidade e conservação de grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. SM. (Bromeliaceae)

Aechmea bicolor L. B. Sm. – Grão de pólen observado em microscopia eletrônica de transmissão
Foto: Rossi, ML

6. VIABILIDADE E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (BROMELIACEAE)

RESUMO

A conservação de grãos de pólen é importante para o melhoramento e conservação de recursos genéticos de plantas, ampliando as possibilidades de cruzamentos em espécies alógamas e obtenção de híbridos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes formas de conservação de grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (Bromeliaceae) por meio de diferentes testes de viabilidade e estudos de morfologia e ultraestrutura polínica por microscopia eletrônica. Foram utilizados grãos de pólen de *Ae. bicolor* oriundos de flores coletadas na antese. As flores e grãos de pólen foram caracterizados para subsidiar os ensaios de conservação, bem como o ajuste do melhor meio de cultura para germinação *in vitro* [MSM - H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (12%); ágar (0,8%); pH 6,5] e o melhor procedimento de desidratação (3 horas em sílica). As amostras foram depositadas em tubos criogênicos e submetidas aos ensaios de conservação, utilizando três ambientes (freezer a -5 ^{o}C, ultrafreezer a -80 ^{o}C e nitrogênio líquido a -196 °C), em ausência ou presença de desidratação em diferentes intervalos de tempo. Avaliaram-se a germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico nos períodos de 1 hora, 24 horas, 8 dias, 30 dias, 6 meses e 1 ano. Morfologia e ultraestrutura polínica foram avaliadas nos períodos de 24 horas, 30 dias e 1 ano. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 + 1 (2 desidratações, 3 ambientes de conservação e 1 controle) e parcela subdividida no tempo, sendo as parcelas compostas pelo fatorial e as subparcelas compostas pelo tempo e suas interações com os tratamentos da parcela. Os melhores resultados foram obtidos com o tratamento advindo da desidratação e conservação em nitrogênio líquido (-196 °C), tanto para a germinação *in vitro*, comprimento do tubo polínico, quanto para a fertilização *in vivo*, além das outras variáveis estudadas, como a integridade morfológica e ultraestrutural do conteúdo citoplasmático, deixando evidente o quanto é determinante a desidratação prévia ao congelamento. Todos os frutos produzidos com grãos de pólen conservados apresentaram sementes viáveis, e as sementes produzidas apresentaram taxa de germinação acima de 92% em meio de cultura aos 8 dias.

Palavras-chave: Bromélias. Germinação *in vitro* de grãos de pólen. Fertilização *in vivo.* Nitrogênio líquido. Microscopia.

VIABILITY AND STORAGE OF *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (BROMELIACEAE) POLLEN GRAINS

ABSTRACT

Pollen grain storage is important for plant breeding and genetic resource conservation, increasing the possibilities of crosses between allogamous species and further hybrid production. The present study aimed to evaluate pollen storage methodologies for *Aechmea bicolor* L. B. Sm (Bromeliaceae) using different viability tests and characterizing changes in pollen grain morphology and ultrastructure by electron microscopy. *Ae. bicolor* pollen was collected from flowers at anthesis, when flowers and pollen grains were morphologicaly characterized. Preliminary studies were done to define the best germination medium [MSM - H_3BO_3 (0.01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0.03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0.02%); KNO_3 (0.01%); sucrose (12%); agar (0.8%); pH 6.5] and dehydration conditions (3 h on silica). Pollen grain samples were then placed in cryogenic tubes and subjected to storage using three conditions: -5 °C in freezer; -80 °C in ultrafreezer and -196 °C in liquid nitrogen), with or without dehydration at different intervals. *In vitro* germination and pollen tube length were assessed at 1 h, 24 h, 8 days, 30 days, 6 months and 1 year. Pollen grain morphology and ultrastructure were assessed at 24 h, 30 days and 1 year. The experimental design was completely randomized in a 2 x 3 + 1 (two dehydration conditions, three storage conditions and one control condition) factorial scheme, and the plot was subdivided by storage time, with the plots defined by the factorial scheme and the subplots by storage time and their interaction with plot treatments. The best results were obtained with dehydration and storage in liquid nitrogen (-196 °C) with regard to *in vitro* germination, pollen tube length, *in vivo* fertilization, and other variables studied, including morphological and ultrastructurae cytoplasmic integrity. These results highlight the crucial role of dehydration prior to freezing. All fruits produced from stored pollen produced viable seeds that exhibited a germination rate above 92% in culture medium after 8 days.

Keywords: Bromeliads. *In vitro* pollen germination. *In vivo* fertilization. Liquid nitrogen. Microscopy.

6.1. Introdução

As bromélias têm se destacado no setor de floricultura, devido principalmente ao aspecto exótico, exuberância, beleza, alta durabilidade e grande aceitação de mercado em todo mundo. A inovação na floricultura pode vir pela identificação de novas espécies ou genótipos com potencial ornamental no recurso genético existente ou pela geração de novos híbridos em programas de melhoramento genético a partir de espécies já reconhecidas (SOUZA et al., 2009a).

Poucas informações estão disponíveis sobre a compatibilidade e a possibilidade da realização de cruzamentos com bromélias, demandando desta forma estudos mais detalhados. Dentre essas demandas, destacam-se a conservação de grãos de pólen, considerando-se que a falta de sincronia nos períodos de florescimento está entre os principais problemas detectados para a realização de cruzamentos, além de que, esses mesmos estudos podem servir para a conservação de recursos genéticos, produção de haploides, estudos com pólen recalcitrante, bioquímicos, fisiológicos e alergênicos (CONNOR; TOWILL, 1993; BAJAJ, 1995; GROUT; ROBERTS, 1995).

Métodos convencionais de conservação de grãos de pólen envolvendo baixas temperaturas e umidades são descritos para várias espécies vegetais (GANESHAN, 1986a; YATES; SPARKS, 1989; SACKS; ST'CLAIR, 1996; HONDA; WATANABE; TSUTSUI, 2002; LORA et al., 2006; VENDRAME et al., 2008; BETTIOL NETO et al., 2009). Estudos com criopreservação de grãos de pólen também foram aplicados para diferentes espécies, considerando-se diferentes métodos de crioproteção (TAI; MILLER 2002; VENDRAME et al., 2008; ALBA et al., 2011). Poucos estudos são descritos com conservação de grãos de pólen de Bromeliaceae. Parton, Deroose e De Proft (1998) e Parton et al. (2002) obtiveram resultados satisfatórios utilizando temperaturas ultrabaixas nas espécies *Ae. fasciata, Ae. chantinii, Vriesea* 'Leen', *Vriesea* 'Christiane', *Tillandsia cyanea* e *Pitcairnia herdee*. A comprovação da viabilidade foi realizada pela germinação *in vitro*. Na maioria dos estudos sobre conservação de grãos de pólen de diferentes espécies, no entanto, os testes de viabilidade são limitados apenas à germinação *in vitro* ou avaliações histoquímicas, sem a avaliação sobre a capacidade de geração de sementes através de cruzamentos e hibridações.

A manutenção da viabilidade de grãos de pólen além do período de conservação depende principalmente de fatores como o estágio fisiológico da flor, temperatura e

umidade relativa do ambiente de armazenamento, do grau de umidade dos grãos de pólen, dentre outros (AKIHAMA; OMURA; KOSAKI, 1979; SOARES et al., 2008). O monitoramento da viabilidade antes, durante e depois da conservação é essencial para um protocolo eficiente. Dessa forma, pode-se estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem ser conservados sem perder a capacidade de germinação e fertilização, tornando-se uma importante ferramenta para o melhoramento e para o intercambio de germoplasma (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008; GANESHAN et al., 2008).

Em casos de ultracongelamento, o teor de umidade nos grãos de pólen pode ser determinante para sua sobrevivência e para a manutenção de sua viabilidade, pois a formação de cristais de gelo durante o período de armazenamento pode causar rompimento de tecidos, danificando sua estrutura (YATES; SPARKS, 1989; TAYLOR; HEPLER, 1997; GANESHAN et al., 2008). Tratamentos de desidratação são indicados para evitar este evento, ainda que, a retirada excessiva de água dos tecidos possa inviabilizar os grãos de pólen, ficando evidente a necessidade de cuidados nesta etapa (BENSON, 2008). Para atingir o ponto ideal de desidratação, vários estudos prévios devem ser realizados com o material vegetal. Parton, Deroose e De Proft (1998) e Parton et al. (2002) lograram reduzir a umidade das anteras por quatro horas em sílica gel e obtiveram resultados satisfatórios. Na germinação Towill (1985) relatou que para uma criopreservação eficiente de grãos de pólen o teor de umidade deve ser reduzido para 15 a 20%.

O monitoramento da viabilidade dos grãos de pólen conservados pode ser realizado por vários métodos, entre eles, métodos histoquímicos, germinação *in vitro*, polinização *in vivo* e a porcentagem de frutificação efetiva (GALETTA, 1983). A viabilidade dos grãos de pólen conservados para cruzamentos deve estar em torno de 50 a 80% e apresentar tubos polínicos bem desenvolvidos (SCORZA; SHERMAN, 1995). Normalmente a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem com o tempo. O objetivo, com a conservação é que não ocorra esse processo de envelhecimento e o pólen possa manter sua viabilidade dentro dos limites para seu posterior uso. Entretanto, algumas observações devem ser consideradas na escolha do teste de viabilidade, já que no caso do uso de corantes, estes podem reagir com estruturas ou constituintes químicos, confundindo os resultados obtidos (STANLEY; LINSKENS, 1974). Por outro lado, a germinação *in vitro* não é um método conclusivo, não garantindo a fertilização, sendo a fertilização *in vivo* o método mais eficiente.

Aechmea bicolor L. B. Sm. é uma espécie de bromélia nativa do Brasil e está distribuída na Mata Atlântica no Corredor Central da Biodiversidade (MARTINELLI et al., 2008). As espécies de *Aechmea* estão entre as bromélias de maior valor econômico (ZHANG et al., 2012) com muitas espécies neste gênero listadas como vulneráveis e ameaçados de extinção (MARTINELLI et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as diferentes condições de conservação de grãos de pólen de *Ae. bicolor* (Bromeliaceae) por meio de diferentes testes de viabilidade e estudos de morfologia e ultraestrutura polínica. Inicialmente, as flores foram morfometricamente caracterizadas e a viabilidade dos grãos de pólen foi testada utilizando diferentes meios de cultura e testes histoquímicos. Foram realizados ensaios de desidratação dos grãos de pólen utilizando três métodos de desidratação, seguido pela determinação da germinação dos grãos de pólen em quatro temperaturas, com e sem desidratação prévia dos grãos de pólen. A eficiência de armazenamento dos grãos de pólen foi avaliada pela germinação dos grãos de pólen e análise ultraestrutural, a fim de caracterizar os danos causados pela conservação dos grãos de pólen em diferentes tratamentos.

6.2. Material e Métodos

Plantas de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (voucher ESA 120990, herbário Esalq/ USP) foram cultivadas em casa de vegetação em temperatura ambiente e umidade relativa de 70%. O florescimento foi induzido através da pulverização de 30 mL da solução de Ethrel® (etefon) a 240 mg mL^{-1}, na roseta da planta, conforme metodologia empregada por Souza et al. (2009b). Foi realizada uma análise morfométrica das flores, utilizando 10 flores de três plantas, com o objetivo de descrever os verticilos florais.

Foram utilizadas anteras oriundas de flores coletadas na antese, que ocorre ao redor de 7:30 horas. A estimativa do número de grãos de pólen foi realizada por meio da contagem do número de grãos produzidos por flor seguindo metodologia descrita por Kearns e Inouye (1993).

As medidas dos grãos de pólen foram obtidas por meio da acetólise lática (ACLAC 40), conforme Raynal e Raynal (1979). Os diâmetros polar e equatorial foram obtidos a partir de 25 grãos de pólen escolhidos de forma aleatória utilizando o programa ImageJ 1.46r

(RASBAND, 2012). Os grãos de pólen foram caracterizados conforme nomenclatura descrita por Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

Germinação* in vitro *dos grãos de pólen

Os grãos de pólen foram inoculados em placas de Petri contendo 35 mL de cinco meios de cultura descritos a seguir:

- BM: H_3BO_3 (0,01%); sacarose (20%); ágar (0,5%); pH 6,5 (PARTON et al., 2002);
- BK: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (10%); ágar (0,5%); pH 6,5 (BREWBAKER; KWACK, 1963);
- MBK: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (20%); ágar (0,5%); pH 6,5 (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado);
- SM: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (15%); ágar (0,8%); pH 6,5 (SOARES et al., 2008);
- MSM: H_3BO_3 (0,01%); $Ca(NO_3)_2 * 4H_2O$ (0,03%); $MgSO_4 * 7H_2O$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (12%); ágar (0,8%); pH 6,5 (SOARES et al., 2008, modificado).

Com auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram distribuído nos meios de cultura em placas de Petri, que foram mantidas em incubadora à temperatura de 27 ± 1 ^{o}C. A contagem dos grãos de pólen germinados e a medida do comprimento do tubo polínico foram realizados 24 horas após a inoculação em meio de cultura. Foram obtidas microfotografias com auxílio de estereomicroscópio Leica EZ4 D (Leica, Wetzlar, Alemanha).

O delineamento experimental utilizado para a germinação do grão de pólen foi inteiramente casualizado com cinco meios de cultura (BM, BK, MBK, SM, MSM), em 12 repetições, sendo cada repetição representada por três placas de Petri, cada uma subdividida em quatro quadrantes. Para a porcentagem de germinação foram contabilizados todos os grãos de pólen de cada quadrante. Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. O comprimento do tubo polínico foi determinado pelo comprimento médio de cinco tubos em cada uma das 12 repetições, escolhidos aleatoriamente. Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arc sen ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste Tukey ($p \leq 0,01$), através do programa SAS (2004).

Testes histoquímicos para a viabilidade dos grãos de pólen

Os testes histoquímicos foram realizados mediante o uso de três corantes: solução de Alexander, 2% de ácido lático (ALEXANDER, 1980), carmim acético (1%) (KEARNS; INOUYE, 1993) e Sudan IV (1%) (BAKER; BAKER, 1979). Anteras de três flores coletadas de três diferentes plantas foram distribuídas sobre lâminas de vidro, adicionando-se uma gota do respectivo corante, cobrindo-se com lamínula e avaliando-se em seguida ao microscópio de luz, Zeiss Axioscop 2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Foram contabilizados 100 grãos de pólen por lâmina com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen para cada corante.

Os dados de viabilidade foram transformados para ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste Tukey ($p \leq 0,01$), através do programa SAS (2004).

Desidratação dos grãos de pólen

O grau de umidade das anteras com grãos de pólen foi determinado através da pesagem de recortes de papel alumínio (Pt) em balança de precisão com quatro casas decimais, depositando-se em seguida sobre o papel as anteras com os grãos de pólen, procedendo-se então a uma segunda pesagem para determinação do peso úmido (Pu). As amostras (anteras com os grãos de pólen no papel alumínio) foram submetidas à desidratação em quatro ambientes (câmara de climatização com 27 ± 1 ^{o}C, câmara de fluxo laminar, sílica em ambiente fechado e estufa a 37 ± 1 ^{o}C) em oito intervalos de tempo (1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 horas e 8 dias). Após esse procedimento, os recortes foram fechados como envelopes e pesados em balança analítica para a obtenção do peso seco (Ps). As amostras então foram colocadas para germinar no melhor meio de cultura (MSM), resultado do ensaio anterior. A umidade das anteras foi determinada por meio da seguinte equação:

$$U = [(Pu - Ps)/(Pu - Pt)] \times 100$$

Na qual: U = grau de umidade das anteras com grãos de pólen (%); Pu = peso úmido (g); Ps = peso seco (g); Pt = peso da tara (g).

O delineamento experimental utilizado para os ensaios de desidratação dos grãos de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 8 (ambientes x intervalos de tempo) com 12 repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri, cada uma subdividida em quatro quadrantes.

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

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arc sen ($\sqrt{x}/100$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e utilizou-se o teste Tukey ($p<0,01$), através do programa SAS (2004).

Conservação dos grãos de pólen

As anteras foram removidas das flores e depositadas em recortes de papel alumínio que foram fechados como envelopes e depositados em tubos criogênicos (3 mL). Após seleção do melhor resultado de desidratação e meio de cultura (acima), foi montado o ensaio de conservação, utilizando-se três ambientes de conservação (freezer a -5 ^{o}C, ultrafreezer a -80 ^{o}C e nitrogênio líquido a -196 ^{o}C), na ausência e presença de desidratação em diferentes intervalos de tempo. Avaliaram-se a germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico nos períodos de 1 hora, 24 horas, 8 dias, 30 dias, 6 meses e 1 ano em três placas de Petri, cada uma subdividida em quatro quadrantes, totalizando 12 repetições. A porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico foram determinados conforme descrito anteriormente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 + 1 (2 desidratações, 3 ambientes de conservação e 1 controle). O tratamento controle consistiu em grãos de pólen recém coletados (temperatura ambiente, 27 ± 1 ^{o}C) e processados imediatamente para as demais avaliações. Antes e após a conservação, foi realizado o teste de viabilidade polínica através de germinação *in vitro* utilizando o meio de cultura MSM. Como testemunha absoluta foram utilizados grãos de pólen frescos sem armazenamento e desidratação previa.

Os dados avaliados foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida no tempo, em que as parcelas foram compostas pelo fatorial e as subparcelas pelo tempo e suas interações

com os tratamentos da parcela. Os dados de porcentagem foram transformados para arc sen ($\sqrt{x}/100$), visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Para as médias dos ambientes de conservação foi aplicado o teste Tukey e para presença e ausência de desidratação foi aplicado o teste *F*. Foi também calculado o teste *t* de Dunnett para comparar o efeito do controle em relação aos tratamentos. Todos os testes foram realizados em nível de 1% de probabilidade utilizando-se o programa SAS (2004).

Ultraestrutura polínica

Morfologia e ultraestrutura polínica foram avaliadas nos períodos de 24 horas, 30 dias e 1 ano, utilizando-se três suportes metálicos para MEV, ou telinhas para MET, cada um subdividido em quatro quadrantes, totalizando 12. Para porcentagem de grãos de pólen íntegros foram utilizadas 12 repetições e para as mensurações de tamanho dos grãos e camadas da exina foram mensurados aleatoriamente 25 grãos.

Para caracterização morfológica e ultraestrutural foram utilizados grãos de pólen dos sete tratamentos em três períodos de avaliação (24 horas, 30 dias e 1 ano). Os grãos de pólen foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), $CaCl_2$ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, em seguida desidratados em série etílica (35-100%), 10 minutos cada. As amostras foram secas em HMDS (hexametildisilazano) e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os grãos de pólen foram fixados na mesma solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada, por 24 horas. Posteriormente, foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) e imediatamente pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%), por 1 hora, seguido de lavagens em solução salina (0,9%) e pré coloração em acetato de uranila (2,5%). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série de acetona (35-100%), por 20 minutos. A infiltração foi gradual em resina Spurr e o emblocamento em resina pura, por 48 horas, a 70°C. Os blocos seccionados em ultramicrótomo (Sorval Porter Blum MT2, Norwalk, EUA).

Para a microscopia de luz (ML) as secções semifinas (5 µm) foram montadas sobre lâminas de vidro, coradas com azul de toluidina (0,05%) e recobertas com Entelan® e

lamínula, sendo posteriormente fotografadas ao microscópio de luz Zeiss Axioscop 2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

As secções ultrafinas (60 nm) obtidas foram depositadas sobre grades de cobre previamente recobertas com formvar, contrastadas em acetato de uranila (2,5%) e citrato de chumbo, segundo Reynolds (1963). As imagens foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Teste de viabilidade* in vivo *com grãos de pólen

Para o teste de viabilidade *in vivo* utilizou-se como parental feminino flores de diferentes plantas da mesma espécie para cada tratamento. Foram utilizadas pelo menos 12 flores por tratamento. Na etapa de floração das plantas receptoras, foram retiradas as anteras antes da antese, evitando-se desta forma, a autofecundação. As flores foram ensacadas evitando-se contaminação por grãos de pólen de outras espécies. Após a emasculação, os grãos de pólen conservados nos diferentes tratamentos foram depositados sobre o estigma das flores e estas novamente ensacadas. As flores polinizadas foram etiquetadas, contendo o número do tratamento e a data da polinização. Após amadurecimento dos frutos avaliou-se a formação de frutos e número de sementes por fruto. As sementes foram germinadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) de acordo com Souza et al. (2009c).

6.3. Resultados

Ae. bicolor apresenta inflorescência indeterminada, com flores disposta em espiga (Figura 3.1 A). As flores são tubulares com três sépalas de coloração amarelo-alaranjado e três pétalas brancas (Figura 3.1 B-C). O androceu possui seis anteras dorsifixas, rimosas com filetes adnatos às pétalas. O gineceu é composto por um único pistilo, ovário ínfero, tricarpelar com numerosos óvulos, placentação axilar e nectário septal interlocular. Os óvulos são anátropos com micrópila bem visível e atenuada e ausentes de apêndice na região da calaza. O estigma é conduplicado-espiral com papilas pouco proeminentes. O fruto é tipo baga de formato elipsóide. Os dados morfométricos da inflorescência, estruturas florais e grãos de pólen podem ser observados na Tabela 3.1.

Os grãos de pólen de *Ae. bicolor* são de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, 2-porados, com um lado mais convexo e o outro mais plano, exina tectada, psilada (Figura 3.1 D-E). A estimativa da produção de grãos de pólen por flor foi de 32.916 grãos com uma média por antera de 5.486 grãos.

A germinação dos grãos de pólen variou de acordo com os meios de cultura. Não houve germinação no meio de cultura BM (Figura 3.1 F e 3.2 A). A maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen foi observada em meio de cultura SM e MSM (Figura 3.1 I-J e 3.2 A) e o maior comprimento do tubo polínico foi observado em meio de cultura MSM (Figura 3.1 J e 3.2 B). Em vista destes resultados, o meio MSM foi selecionado para os posteriores ensaios de conservação.

Em relação aos testes histoquímicos, todos os três corantes usados foram eficientes na determinação da viabilidade dos grãos de pólen para esta espécie, com uma fácil identificação de grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 3.1 K-M). A viabilidade dos grãos de pólen foi acima de 94% (Figura 3.2 C), resultados semelhantes aos obtidos com a germinação *in vitro* nos meios SM e MSM. Não houve diferença significativa na porcentagem de viabilidade entre os corantes utilizados (Figura 3.2 C).

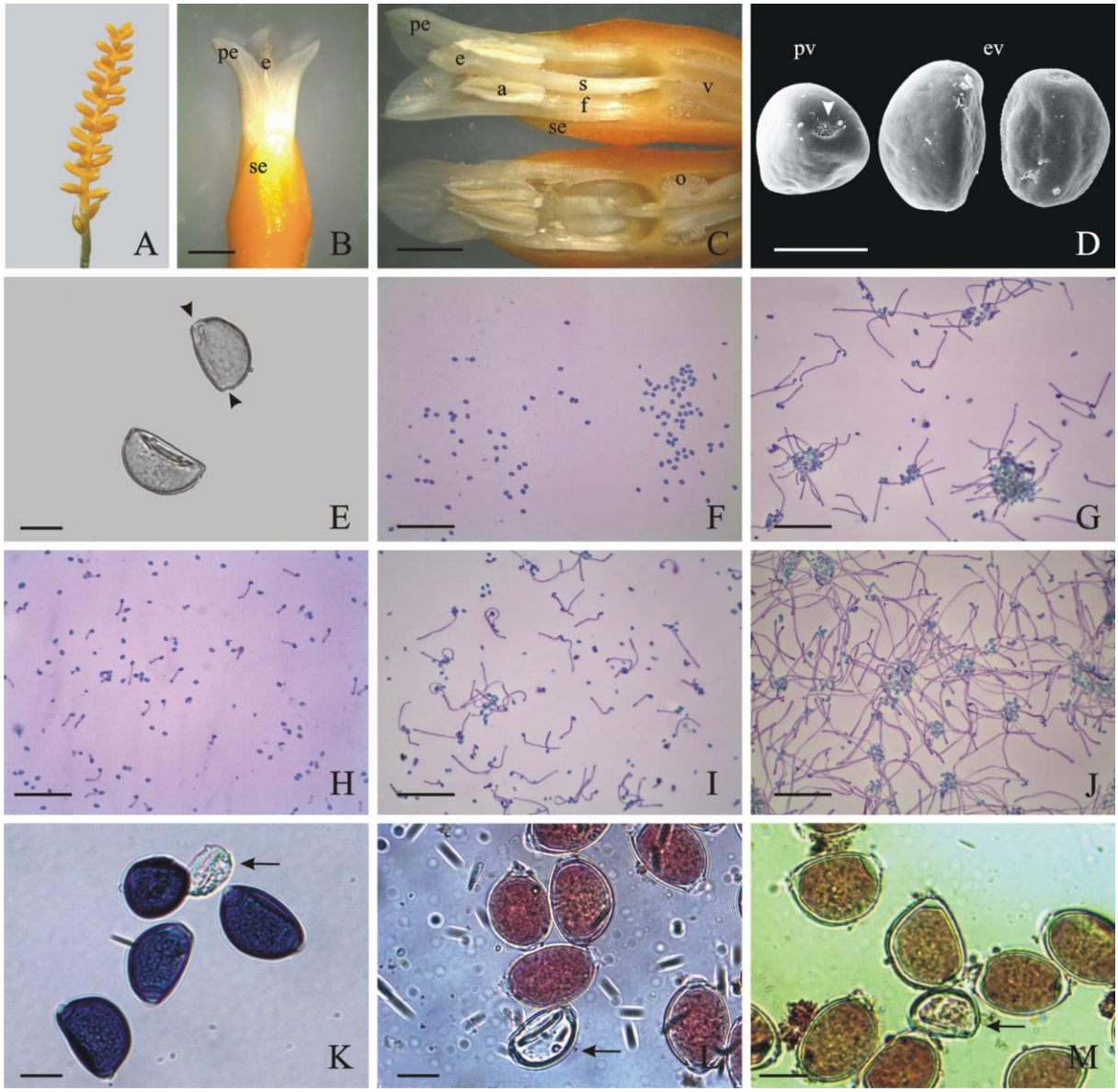


Figura 3.1 - Flor, grãos de pólen e viabilidade de grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. A) Inflorescência de *Ae. bicolor*. B) Aspecto geral da flor. C) Vista interna da flor evidenciando os verticílos florais. D) Grãos de pólen em vista polar (pv) e vista equatorial (ev) em MEV. E) Grãos de pólen acetolisados em vista equatorial, evidenciando os poros (ponta de seta). F-J) Germinação *in vitro* em diferentes meios de cultura: BM (F), BK (G), MBK (H), SM (I), MSM (J). K-M) Testes histoquímicos evidenciando grãos de pólen viáveis e inviáveis (seta). Alexander (K), Carmim acético (L), Sudan IV (M). a = antera , f = filete, v = ovário, o= óvulo, pe = pétala, se = sépala, e = estigma, s = estilete. Barras: B-C) 2 mm. D, K-M) 20 µm. F-J) 0,5 mm

Tabela 3.1 - Características morfométricas dos verticílos florais e grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm.

	Flor	
Comprimento da pétala (mm)		9,42 ± 0,29
Largura da pétala (mm)		3,32 ± 0,16
Comprimento da sépala (mm)		6,36 ± 0,35
Largura da sépala (mm)		3,28 ± 0,07
Número de flores por inflorescência		46,90 ± 4,04
	Androceu	
Grão de Pólen	Diâmetro polar em vista equatorial (µm)	21.95 ± 1.56
	Diâmetro equatorial em vista equatorial (µm)	31.63 ± 1.34
	Teto (µm)	0,64 ± 0,06
	Columela (µm)	0,23 ± 0,03
	Sexina (µm)	0,87 ± 0,07
	Nexina (µm)	0,54 ± 0,08
	Exina (µm)	1,41 ± 0,09
Antera	Comprimento (mm)	4,01 ± 0,07
	Diâmetro (mm)	0,97 ± 0,02
	Número	6
Filete	Comprimento (mm)	6,68 ± 0,70
	Diâmetro (mm)	0,49 ± 0,02
	Gineceu	
Ovário	Comprimento (mm)	4,29 ± 0,16
	Diâmetro (mm)	4,44 ± 0,33
Óvulo	Comprimento (µm)	356,61 ± 13,42
	Diâmetro (µm)	170,39 ± 10,34
	Número por lóculo	71,00 ± 5,29
	Largura da micrópila (µm)	43,63 ± 3,60
Estigma	Comprimento (mm)	1,07 ± 0,12
	Diâmetro (mm)	0,70 ± 0,06
Estilete	Comprimento (mm)	5,01 ± 0,06
	Diâmetro (mm)	0,72 ± 0,02

Os resultados correspondem a média de dez flores de três plantas ± desvio padrão

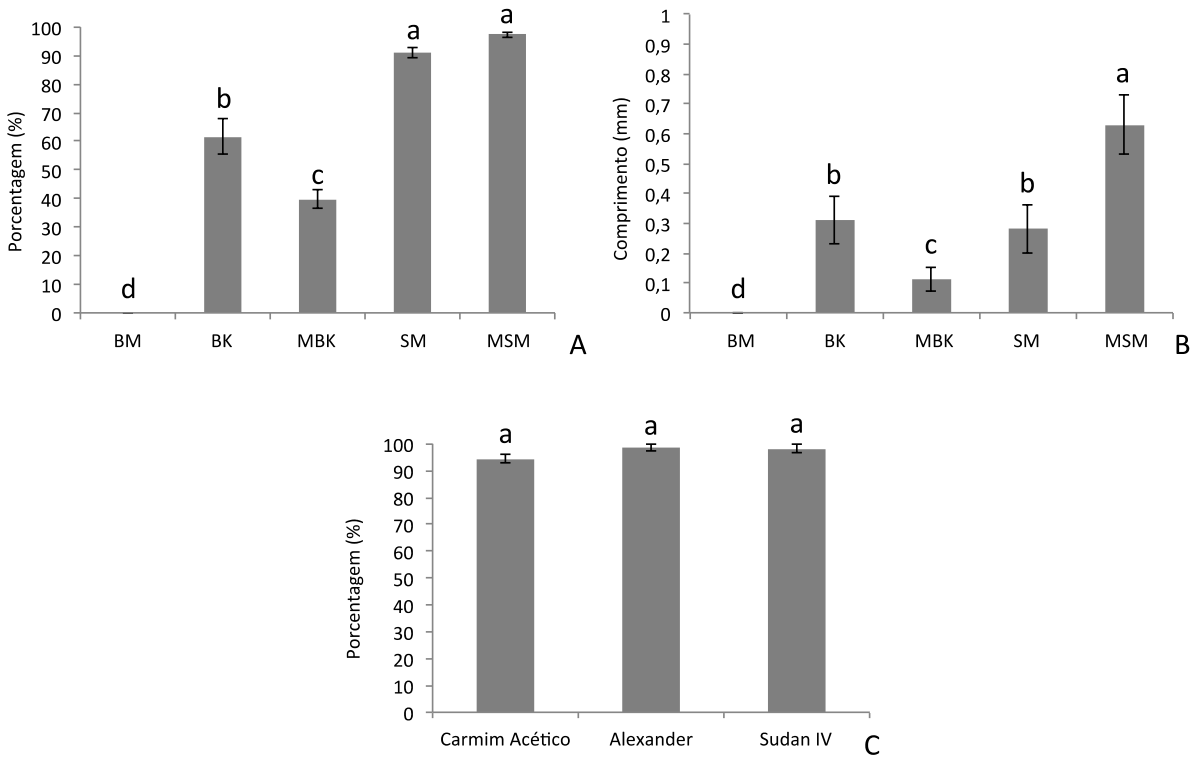


Figura 3.2 - Viabilidade e comprimento do tubo polínico em *Aechmea bicolor* L. B. Sm. A) Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen em diferentes meios de cultura. B) Comprimento do tubo polínico (mm) após 24 horas em diferentes meios de cultura. C) Porcentagem de viabilidade de grãos de pólen em testes histoquímicos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem ao teste Tukey ($p \leq 0,01$)

Nos ensaios preliminares para desidratação dos grãos de pólen, a sílica gel em dessecador durante três horas apresentou os melhores resultados, com 95% de germinação *in vitro* dos grãos de pólen e 0,6 mm de comprimento do tubo polínico após 24 horas em meio de cultura (Tabela 3.2). Nessas condições, a umidade dos grãos de pólen foi de aproximadamente 40%, o que é considerada uma condição segura e adequada para a conservação. Longos períodos de desidratação reduz a germinação dos grãos de pólen e umidade de forma gradual, com taxas de germinação dos grãos de pólen inferior a 15% depois de três dias. Desta forma, utilizou-se para os ensaios subsequentes a desidratação dos grãos de pólen em sílica gel em dessecador por três horas.

Tabela 3.2 - Comportamento dos grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. nos diferentes ambientes e períodos de avaliação

Períodos	Incubadora a 27 ± 1 °C	Câmara de fluxo laminar	Dessecador com sílica gel	Estufa a 37 ± 1 °C
		Umidade da antera inteira (%)		
1 hora	84,74 aA	83,55 aA	70,92 aB	47,26 aC
3 horas	62,78 bA	39,96 bB	38,93 bB	39,65 bB
6 horas	49,78 cA	30,64 cB	24,73 cC	35,23 bB
12 horas	40,95 dA	30,92 cB	24,30 cC	34,19 bB
24 horas	38,73 dA	30,86 cB	23,09 cC	39,90 bA
48 horas	38,73 dA	30,69 cB	22,15 cC	38,31 bA
72 horas	38,64 dA	30,43 cB	21,51 cC	37,95 bA
8 dias	38,00 dA	29,88 cB	20,79 cC	29,79 bB
CV (%)		12,44		
		Germinação dos grãos de pólen (%)		
1 hora	98,08 aA	97,16 aA	98,08 aA	91,83 aB
3 horas	97,58 aA	91,66 bB	95,16 aA	69,00 bC
6 horas	84,91 bA	72,00 cB	67,66 bC	56,58 dD
12 horas	85,33 bA	69,83 cB	68,41 bB	61,25 cC
24 horas	73,50 cA	69,41 cA	71,41 bA	40,00 eB
48 horas	42,91 dB	63,41 dA	37,50 cC	23,66 fD
72 horas	11,50 eA	12,08 eA	13,33 dA	3,08 gB
8 dias	3,25 fA	0,66 fB	4,91 eA	0,00 hB
CV (%)		8,10		
		Comprimento do tubo polínico (mm)		
1 hora	0,63 ± 0,11 aA	0,58 ± 0,10 aB	0,59 ± 0,10 aB	0,52 ± 0,10 aC
3 horas	0,58 ± 0,09 bA	0,51 ± 0,08 bB	0,60 ± 0,08 aA	0,41 ± 0,10 bC
6 horas	0,53 ± 0,12 cA	0,41 ± 0,10 cC	0,44 ± 0,11 bB	0,38 ± 0,10 bC
12 horas	0,52 ± 0,10 cA	0,42 ± 0,11 cB	0,41 ± 0,11 bB	0,38 ± 0,11 bB
24 horas	0,52 ± 0,07 cA	0,41 ± 0,11 cB	0,40 ± 0,10 bB	0,28 ± 0,09 cC
48 horas	0,27 ± 0,08 dB	0,40 ± 0,09 cA	0,27 ± 0,08 cB	0,19 ± 0,08 dC
72 horas	0,20 ± 0,10 eA	0,19 ± 0,11 dA	0,20 ± 0,10 dA	0,16 ± 0,08 dA
8 dias	0,14 ± 0,10 fA	0,14 ± 0,14 eA	0,16 ± 0,13 eA	0,00 eB
CV (%)		26,70		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de um mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$)

Para o ensaio de conservação registrou-se uma interação significativa entre a desidratação, ambientes de conservação e os períodos de avaliação para todas as variáveis estudadas, com exceção da espessura das camadas da exina (Tabelas 3.3 e 3.5). O tratamento controle T01 (temperatura ambiente, 27 ± 1 ^{o}C) mostra uma viabilidade do pólen até 24 horas, com uma drástica redução aos 8 dias e a perda total de viabilidade aos 30 dias, tanto para a germinação *in vitro* quanto para o comprimento do tubo polínico. Este resultado foi semelhante ao registrado quando os grãos de pólen foram conservados em freezer (-5 ^{o}C) independente dos procedimentos de desidratação, ainda que, o tratamento com desidratação apresentou valores um pouco superiores (Tabelas 3.3 e 3.5).

A conservação em ultrafreezer (-80 ^{o}C) resultou nos valores mais drásticos para todas as variáveis, logo após a primeira hora de conservação, ainda que, diferentemente do controle manteve valores aproximados até um ano de conservação (Tabela 3.3).

O melhor resultado foi obtido com o tratamento advindo da desidratação e conservação em nitrogênio líquido (-196 ^{o}C), tanto para a germinação *in vitro*, quanto para o comprimento do tubo polínico, além das outras variáveis estudadas, como a integridade morfológica e ultraestrutural do conteúdo citoplasmático (Tabelas 3.3 e 3.5).

A microscopia eletrônica de varredura mostrou valores acima de 65,75% de grãos de pólen íntegros em todos os tratamentos nas primeiras 24 horas. Entretanto à medida que aumentou o tempo de conservação houve uma redução para a maioria dos tratamentos. Os tratamentos advindos da desidratação e nas temperaturas de -80 ^{o}C e -196 ^{o}C, não revelaram diferença entre estes períodos de avaliação para a integridade e tamanho dos grãos de pólen (Tabela 3.4). O tratamento controle aos 30 dias apresentou 100% de grãos destruídos e uma redução no volume, comprovando a necessidade do uso de métodos de conservação para grãos de pólen desta espécie (Tabela 3.3 e 3.4 e Figura 3.3 F, M).

Uma característica observada nos tratamentos advindos do freezer (-5 ^{o}C) foi o desprendimento do material citoplasmático da exina (Figura 3.3 G, P, R, W), além da redução do tamanho dos grãos de pólen, o que pode ser verificado nos três métodos microscópicos. Já o congelamento dos grãos de pólen diretamente em nitrogênio líquido (-196 ^{o}C), sem o procedimento de desidratação, causou o rompimento de aproximadamente 20% dos grãos (Figura 3.2 I, O, S, Y).

Por outro lado, ao submeter o grão de pólen à desidratação antes da imersão no nitrogênio líquido registrou-se 96,25% de grãos de pólen íntegros, evidenciando-se a necessidade do procedimento de desidratação (Tabela 3.4 e Figura 3.3 L, T, A, AB e AC).

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou uma degradação do conteúdo citoplasmático nos tratamentos sem processo de desidratação tanto às 24 horas quanto aos 30 dias de avaliação (Figura 3.3 V, W, X), com exceção do freezer (-5 ^{o}C) que mesmo tendo sido desidratado, apresentou conteúdo citoplasmático degradado. Não se observou diferença significativa para todas as camadas da exina e intina em ambas as avaliações (Tabela 3.5).

Tabela 3.3 - Germinação e comprimento do tubo polínico de *Aechmea bicolor* L. B. Sm nos diferentes tratamentos de conservação e períodos de avaliação

Tratamentos	1 hora		24 horas		8 dias		30 dias		6 meses		12 meses	
	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD
	Germinação de Pólen (%)											
FR (-5 °C)	75,17bB**	85,58bA**	43,00bB**	67,42bA**	3,75cB**	8,75cA**	0,00cB**	4,25cA**	0,00cB**	4,42cA**	0,00cB**	4,83cA**
UF (-80 °C)	28,58cB**	77,67cA**	28,58cB**	77,67bA**	25,42bB**	59,25bA**	22,50bB**	56,42bA**	21,75bB**	55,83bA**	22,25bB**	54,91bA**
NL (-196 °C)	86,17aB**	94,00aA^{ns}	80,42aB**	89,25aA^{ns}	65,42aB**	87,17aA^{ns}	61,50aB**	86,50aA^{ns}	61,58aB**	86,92aA^{ns}	60,08aB**	87,58aA^{ns}
CV (%)	12,19											
	Comprimento do tubo polínico (mm)											
FR (-5 °C)	0,38cA**	0,34bA**	0,34cA**	0,35bA**	0,17cA**	0,19cA**	0,00cB**	0,15cA**	0,00cB**	0,15cA**	0,00cB**	0,15cA**
UF (-80 °C)	0,52aA*	0,36bB**	0,56aA*	0,32bB**	0,49aA*	0,32bB**	0,51aA*	0,35bB**	0,52aA*	0,36bB**	0,51aA*	0,35bB**
NL (-196 °C)	0,45bB**	0,59aA^{ns}	0,44bB**	0,58aA^{ns}	0,39bB**	0,60aA^{ns}	0,42bB**	0,58aA^{ns}	0,42bB**	0,60aA^{ns}	0,43bB**	0,61aA^{ns}
CV (%)	30,92											

SD = sem desidratação; CD = com desidratação (~ 39% de umidade); FR = -5 °C freezer; UF = -80 °C ultrafreezer; NL = -196 °C nitrogênio líquido

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de um mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,01)

Comparação significativa pelo teste de *t* de Dunnett (p≤0,05). ns = não significativo; * (p≤0,05); ** (p≤0,01)

Tabela 3.4 - Características dos grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. observados em microscopia eletrônica de varredura após diferentes tratamentos de conservação e períodos de avaliação

Tratamentos	24 horas		30 dias		1 ano	
	SD	CD	SD	CD	SD	CD
Grãos de pólen íntegros (%)						
FR (-5 °C)	78,25bA**	65,75cB**	20,58cB**	39,50cA**	21,08cB**	40,08cA**
UF (-80 °C)	68,08cB**	89,42bA**	66,83bB**	89,17bA**	65,00bB**	89,08bA**
NL (-196 °C)	91,25aB**	96,66aA^{ns}	84,33aB**	96,25aA^{ns}	83,50aB**	96,08aA^{ns}
CV (%)	8,32					
Diâmetro polar (µm)						
FR (-5 °C)	19,86 ± 1,71aA		19,28 ± 1,55bB		19,66 ± 1,47bB	
UF (-80 °C)	20,58 ± 1,62aA		20,83 ± 1,61aA		21,02 ± 1,32aA	
NL (-196 °C)	21,88 ± 1,71aA		21,50 ± 1,94aA		21,26 ± 1,44aA	
CV (%)	6,06					
Diâmetro equatorial (µm)						
FR (-5 °C)	28,53 ± 2,64aC		27,67 ± 1,84bC		28,13 ± 1,84bC	
UF (-80 °C)	29,61 ± 2,11aB		29,73 ± 1,99aB		29,63 ± 1,88aB	
NL (-196 °C)	31,65 ± 1,78aA		31,92 ± 1,77aA		32,08 ± 1,56aA	
CV (%)	3,69					
Sem desidratação	20,74 ± 1,77aA		20,24 ± 2,03bB		20,55 ± 1,89bB	
Com desidratação	20,80 ± 1,97aA		20,83 ± 1,81aA		20,31 ± 1,62aA	
CV (%)	6,06					

SD = sem desidratação; CD = com desidratação (~ 39% de umidade); FR = -5 °C freezer; UF = -80 °C ultrafreezer; NL = -196 °C nitrogênio líquido.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, dentro de um mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,01)

Comparação significativa pelo teste de *t* de Dunnett (p≤0,05). ns = não significativo; * (p≤0,05); ** (p≤0,01)

Tabela 3.5 - Dados morfométricos da espessura das camadas da exina dos grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm através da microscopia eletrônica de transmissão nos diferentes tratamentos de conservação e períodos de avaliação

Tratamentos	Teto	Columela	Sexine	Nexine	Exine
	---------- µm ----------				
	24 horas				
Controle	0,64 ± 0,06	0,23 ± 0,03	0,87 ± 0,07	0,54 ± 0,09	1,41 ± 0,09
SD + FR (-5 °C)	0,66 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,89 ± 0,07	0,53 ± 0,08	1,42 ± 0,10
SD + UF (-80 °C)	0,64 ± 0,07	0,23 ± 0,05	0,87 ± 0,09	0,58 ± 0,09	1,44 ± 0,16
SD + NL (-196 °C)	0,64 ± 0,06	0,24 ± 0,06	0,88 ± 0,10	0,53 ± 0,07	1,41 ± 0,13
CD + FR (-5 °C)	0,63 ± 0,10	0,25 ± 0,04	0,89 ± 0,09	0,55 ± 0,08	1,44 ± 0,13
CD + UF (-80 °C)	0,65 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,90 ± 0,08	0,57 ± 0,06	1,47 ± 0,09
CD + NL (-196 °C)	0,63 ± 0,09	0,25 ± 0,04	0,88 ± 0,11	0,52 ± 0,08	1,40 ± 0,14
	30 dias				
Controle	0,62 ± 0,08	0,24 ± 0,05	0,86 ± 0,10	0,55 ± 0,09	1,41 ± 0,10
SD + FR (-5 °C)	0,64 ± 0,06	0,24 ± 0,05	0,87 ± 0,09	0,53 ± 0,08	1,41 ± 0,11
SD + UF (-80 °C)	0,61 ± 0,08	0,25 ± 0,06	0,85 ± 0,12	0,57 ± 0,13	1,42 ± 0,24
SD + NL (-196 °C)	0,61 ± 0,07	0,26 ± 0,06	0,86 ± 0,11	0,53 ± 0,07	1,40 ± 0,14
CD + FR (-5 °C)	0,63 ± 0,10	0,25 ± 0,04	0,89 ± 0,09	0,55 ± 0,09	1,44 ± 0,15
CD + UF (-80 °C)	0,65 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,90 ± 0,08	0,59 ± 0,07	1,49 ± 0,11
CD + NL (-196 °C)	0,61 ± 0,10	0,24 ± 0,04	0,86 ± 0,11	0,59 ± 0,16	1,45 ± 0,21
	1 ano				
Controle	0,61 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,85 ± 0,09	0,53 ± 0,20	1,42 ± 0,10
SD + FR (-5 °C)	0,62 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,86 ± 0,09	0,52 ± 0,11	1,38 ± 0,09
SD + UF (-80 °C)	0,61 ± 0,09	0,25 ± 0,06	0,86 ± 0,09	0,55 ± 0,08	1,41 ± 0,11
SD + NL (-196 °C)	0,61 ± 0,07	0,24 ± 0,07	0,85 ± 0,07	0,55 ± 0,09	1,40 ± 0,10
CD +FR (-5 °C)	0,62 ± 0,09	0,24 ± 0,06	0,86 ± 0,09	0,56 ± 0,10	1,42 ± 0,15
CD + UF (-80 °C)	0,61 ± 0,07	0,24 ± 0,06	0,85 ± 0,06	0,58 ± 0,09	1,43 ± 0,11
CD + NL (-196 °C)	0,63 ± 0,07	0,25 ± 0,04	0,88 ± 0,08	0,55 ± 0,11	1,43 ± 0,10
CV (%)	12,58	20,12	11,11	16,88	10,34

SD = sem desidratação; CD = com desidratação (~ 39% de umidade); FR = -5 °C freezer; UF = -80 °C ultrafreezer; NL = -196 °C nitrogênio líquido

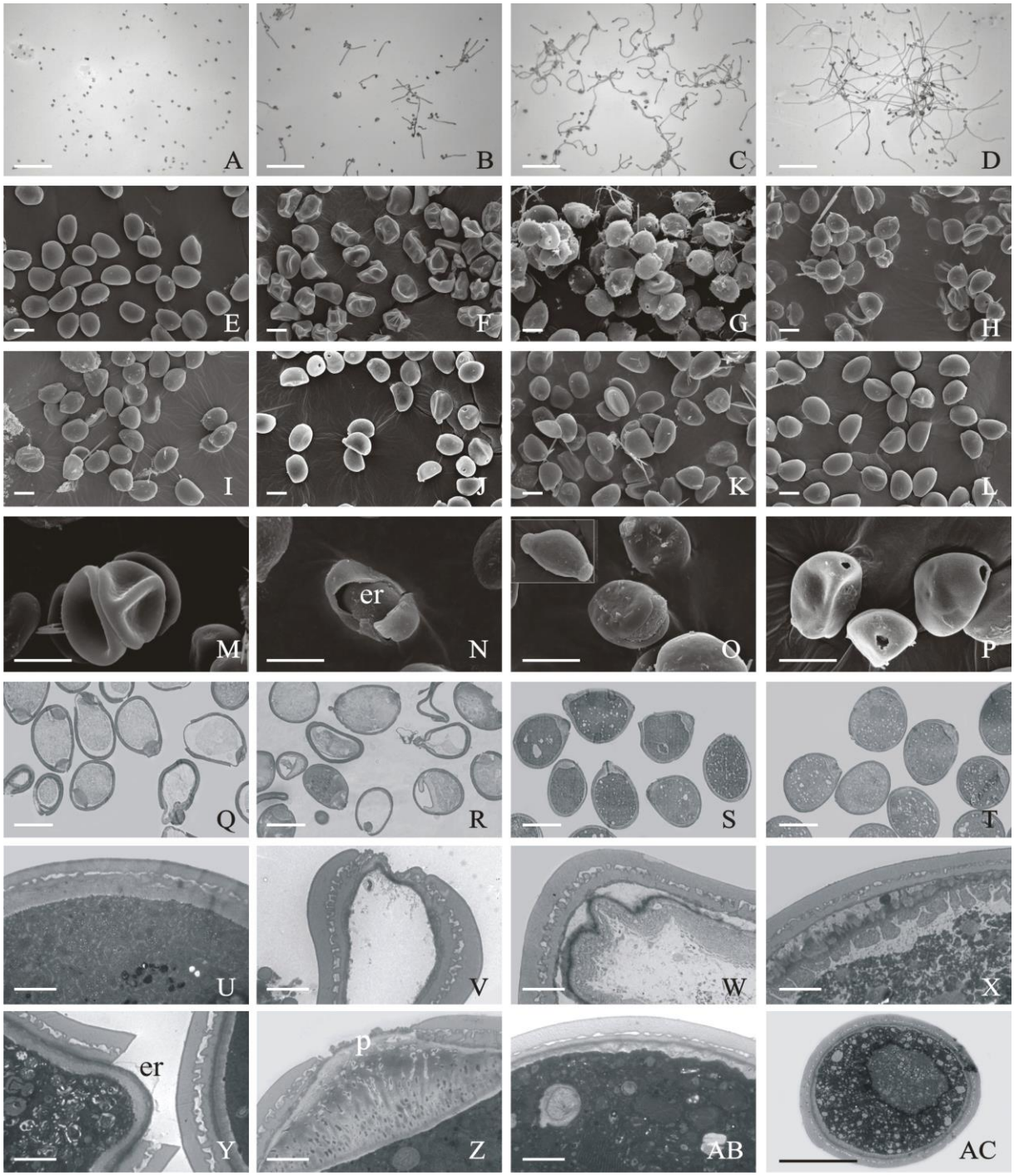


Figura 3.3 - Grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L. B. Sm. nos diferentes tratamentos de conservação. A-D) Germinação *in vitro* de grãos de pólen em meio de cultura MSM: controle aos 6 meses (A), ultrafreezer (-80 ^{o}C) (B), N_2 (-196 ^{o}C) (C), desidratação + N_2 (-196 ^{o}C) (D); E-P) Grãos de pólen em MEV nos diferentes tratamentos: controle com 1 hora (E), controle aos 30 dias (F), freezer (-5 ^{o}C) aos 30 dias (G), ultrafreezer (-80 ^{o}C) aos 30 dias (H), N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias (I), desidratação + freezer (-5 ^{o}C) aos 30 dias (J), desidratação + ultrafreezer (-80 ^{o}C) aos 30 dias (K), desidratação + N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias (L). M-P) detalhes dos danos causados nos grãos de pólen: retração da exina no tratamento controle aos 30 dias (M), ruptura da exina ultrafreezer (-80 ^{o}C) aos 30 dias (N), ruptura da exina e exposição do material citoplasmático sem a prévia desidratação em N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias (O), descolamento do citoplasma a exina em freezer (-5 ^{o}C) aos 30 dias (P); Q-AC) Grãos de pólen

observados em ML (Q-T) e microscopia eletrônica de transmissão (U-AC) nos diferentes tratamentos evidenciando a integridade do conteúdo citoplasmático e exina: controle aos 30 dias (Q), freezer (-5 ^{o}C) aos 30 dias (R), N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias (S), desidratação + N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias (T), controle com 1h (U), controle aos 30 dias (V), freezer (-5 ^{o}C) aos 30 dias (W), ultrafreezer (-80 ^{o}C) aos 30 dias (X), N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias evidenciando a exina rompida (er) (Y), desidratação + N_2 (-196 ^{o}C) aos 30 dias (p) poro (Z, AB, AC). Barras: A-D) 0,5mm. E-T) 20 µm. U-Z, AB) 2µm. AC) 10 µm

Os resultados referentes aos cruzamentos controlados com grãos de pólen armazenados por um ano, nos diferentes tratamentos podem ser observados na Tabela 3.6. Foram avaliados o número de frutos produzidos e o número de sementes produzidas por fruto, bem como a viabilidade das mesmas. Aproximadamente 88% das sementes germinaram, nos diferentes tratamentos.

A maior porcentagem de formação de frutos bem como o número de sementes produzidas foram obtidas no cruzamento com grãos de pólen desidratados e conservados em nitrogênio líquido (-196 ^{o}C), esses valores não diferem aos obtidos quando se realizou a polinização com grãos de pólen fresco (controle). O número de sementes geradas, mesmo com grãos de pólen fresco (controle) foi inferior ao número médio de óvulos presentes do ovário (210 óvulos/ flor).

O tratamento controle e o os grãos de pólen conservados em freezer (-5 ^{o}C) sem desidratação não formaram frutos. Todos os outros tratamentos produziram frutos com sementes viáveis acima de 92% em meio de cultura aos 8 dias.

Os tratamentos em ultrafreezer (-80 ^{o}C) sem e com desidratação formaram 67% e 83% de frutos respectivamente, mas a porcentagem de sementes geradas foi apenas de 5,44% e 30,15% quando comparados com o controle e com o tratamento de grãos de pólen desidratados e conservados em nitrogênio líquido (-196 ^{o}C).

Tabela 3.6 - Frutos e sementes produzidas após polinização cruzada com *Aechmea bicolor* L. B. Sm. com grãos de pólen conservados por um ano sob diferentes condições de conservação

Tratamentos	Número flores polinizadas	Frutos gerados (%)	Sementes geradas por fruto ($\bar{x} \pm S$)
Controle (grãos de pólen fresco)	25	100	133,33 ± 22,55
Controle (conservado)	18	0	0
SD + FR (-5 ^{o}C)	12	0	0
SD + UF (-80 ^{o}C)	12	67	7,25 ± 2,55
SD + NL (-196 ^{o}C)	12	58	9,14 ± 1,95
CD + FR (-5 ^{o}C)	12	25	12,00 ± 5,29
CD + UF (-80 ^{o}C)	12	83	40,20 ± 8,18
CD + NL (-196 ^{o}C)	18	100	129,33 ± 23,23

SD = sem desidratação; CD = com desidratação; FR = -5 ^{o}C freezer; UF = -80 ^{o}C ultrafreezer; NL = -196 ^{o}C nitrogênio líquido

6.4. Discussão

Os dados morfométricos, morfológicos e ultraestruturais obtidos são importantes na delimitação da espécie. O emprego de caracteres morfopolínicos para estudos taxonômicos é uma alternativa ao uso de outras características, como cor de folhas e flores e tamanho de estruturas, que podem estar mais sujeitas a alterações quando comparadas às características dos grãos de pólen, consideradas mais conservadas (BENZING, 2000).

Os grãos de pólen são responsáveis pela reprodução e conservação das espécies. A disponibilidade dos grãos de pólen em hibridações interespecíficas e intergenéricas é altamente dependente da possibilidade de conservação a longo prazo, e o desenvolvimento de um método eficiente para testar a viabilidade e os diferentes procedimentos de conservação são necessários. Neste trabalho avaliou-se uma gama de métodos, desde a germinação *in vitro*, testes histoquímicos até a fertilização *in vivo.* A germinação *in vitro*, embora forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo* e sua capacidade de fertilizar o óvulo.

Os melhores resultados de germinação *in vitro* dos grãos de pólen e comprimento do tubo polínico, em meio MSM, provavelmente deveu-se à constituição química, mais rica, em termos de nutrientes. Por outro lado, os menores valores registrados para o meio BM, não estão de acordo com os resultados de Parton et al. (2002), que obtiveram resultados satisfatórios utilizando este meio em sete espécies de bromélias diferentes da analisada neste trabalho. Os testes histoquímicos apresentaram resultados semelhantes aos da germinação *in vitro*, com valores acima de 94,33% de viabilidade, o que demonstra que ambos os métodos são confiáveis para a determinação da viabilidade polínica.

Segundo Galletta (1983), para haver a integridade dos grãos de pólen é necessário que haja manutenção do equilíbrio osmótico entre o seu conteúdo e meio de cultura. Este equilíbrio é determinado pelas concentrações de sacarose e de outras substâncias no meio de cultura, como ácido bórico e nitrato de cálcio. Assim, o excesso ou a deficiência de qualquer desses componentes pode promover o rompimento dos grãos de pólen, comprometendo o resultado do teste. A sacarose, além do importante papel para o equilíbrio osmótico entre os grãos de pólen e o meio de germinação, é fundamental como fonte de energia para o desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974).

Alguns autores consideram que o meio de cultura deve incluir, além de carboidratos, elementos como ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio (BERBAKER; KWACK, 1963; KEARNS; INOUYE, 1993; TAYLOR; HEPLER, 1997). Outros fatores ambientais podem interferir na viabilidade polínica. Quando a abertura da antera coincide com elevada umidade do ar, a alta pressão osmótica do conteúdo celular dos grãos de pólen, aliada à baixa resistência de sua parede, diminui a viabilidade polínica (KEARNS; INOUYE, 1993).

Os resultados de viabilidade obtidos com os diferentes corantes corresponderam de forma positiva com a germinação *in vitro*, com valores bem próximos. Relatos de outros trabalhos, entretanto, destacam a baixa confiabilidade neste tipo de teste, com resultados superestimados (PARFITT; GANESHAN, 1989; SOARES et al., 2008). Parfitt e Ganeshan (1989) inviabilizaram os grãos de pólen por meio de altas temperaturas e, ainda assim, o teste com este corante detectou alto nível de viabilidade polínica. A superestimação com coloração foi observada também por Parton et al. (2002) com grãos de pólen de bromélias antes da antese e após o armazenamento a 21 ^{o}C. Para Einhardt, Correa e Raseira (2006) a coloração, embora seja um procedimento simples e barato, poderá superestimar os valores de viabilidade.

As polinizações com grãos de pólen desidratados e conservados em nitrogênio líquido por um ano produziram frutos e sementes em quantidades satisfatórias quando comparados com polinizações realizadas com grãos de pólen recém coletados. Esses resultados demonstram que este método de armazenamento manteve a viabilidade e integridade dos grãos de pólen. Ganeshan (1986b) obteve resultados semelhantes na cultura da cebola com 81,05% de frutos formados quando utilizou grãos de pólen conservados em nitrogênio líquido por um ano. Vendrame et al. (2008) realizou cruzamentos em orquídea do gênero *Dendrobium* com grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido com e sem vitrificação e obtiveram sucessos nas hibridações.

Stanley e Linskens (1974) observaram alta correlação entre a germinação *in vitro* e a fertilização no campo. Porém, abordaram que até mesmo na polinização *in vivo* não se estima a viabilidade com segurança, já que a fertilização e números de sementes na espiga de milho não dependem somente da viabilidade e da fertilidade dos grãos de pólen, mas também do estado nutricional da planta-mãe, receptividade do estilete-estigma e das condições ambientais nas quais a polinização foi realizada.

É interessante salientar que os grãos de pólen foram coletados de inflorescências na mesma fase fisiológica, ou seja, na antese, e no mesmo horário. Para Franzon e Raseira (2006) é fundamental utilizar em programas de melhoramento, grãos de pólen em estágio adequado de maturação, para que o mesmo mantenha a viabilidade e capacidade de germinação quando for realizada a hibridação.

No que se refere aos resultados da conservação, a avaliação de diferentes métodos de desidratação foi fundamental para estabelecer qual deveria ser usado no experimento seguinte. Dentre os diferentes métodos avaliados de desidratação, a sílica foi o mais promissor com a vantagem de ser, de todos os métodos avaliados, o de maior repetibilidade, resultado esses, semelhantes aos encontrados para várias espécies de bromélias (PARTON et al., 2002). De acordo com Engelmann et al. (2008) o uso de métodos de desidratação em câmara de fluxo laminar produzem taxas variáveis e dependem de vários fatores não sendo portanto recomendados. A escolha do tratamento em sílica por três horas foi, não apenas pelos bons resultados na germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico após a desidratação, mas principalmente pela associação destes resultados com o menor índice de umidade, quando comparado com os demais. O significado disto está na maior possibilidade de se manter os grãos de pólen íntegros após o congelamento pela não formação de cristais de gelo e consequente rompimento de estruturas celulares. Quanto menos água dentro da célula, menor a possibilidade de danos estruturais. Comparando-se os tratamentos com e sem desidratação, verificou-se que este procedimento foi determinante para promover maiores valores na germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico, assim como manteve uma maior integridade da ultraestrutura dos grãos de pólen.

Ao se observar os resultados referentes aos diferentes tratamentos para o congelamento dos grãos de pólen, o efeito da retirada de água da célula fica bastante evidente quando os grãos de pólen foram congelados a -80 °C, de forma mais marcante do que com o congelamento em nitrogênio. Isso ocorreu, possivelmente, como resultado das propriedades físicas da água em temperaturas ultrabaixas e pela menor velocidade de congelamento a -80 ^{o}C, permitindo a nucleação de gelo. A formação destes cristais de gelo afeta a integridade estrutural, osmótica e coligativa das células causando rupturas físicas e injúrias mecânicas (BENSON, 2008).

Essas injúrias, nos tratamentos sem desidratação foram confirmadas pelos estudos de microscopia. As alterações no conteúdo citoplasmático estão visíveis na figura 3.3 Q, R, V,

W e X. Foi observado também o rompimento nas camadas da exina o que explica a queda da viabilidade dos grãos de pólen sob estes tratamentos (Figura 3.3 S, Y).

Quanto ao melhor método de conservação dos grãos de pólen para esta espécie de bromélia, dentro das condições ensaiadas neste trabalho, o congelamento em nitrogênio com desidratação prévia em sílica por três horas apresentou os melhores resultados para todas as variáveis analisadas, como pode ser visto em todas as análises deste trabalho e com base no que foi discutido acima. Finalmente o teste *t* de Dunnett, que permite o contraste das médias com o controle, mostra que apenas os tratamentos em nitrogênio líquido não foram diferentemente significativos. Esses resultados são similares ao que encontrou Parton et al. (2002) para outras espécies de Bromeliaceae como *Ae. fasciata, Ae. chantinii*, *Vriesea* 'Leen', *Vriesea* 'Christiane', *Tillandsia cyanea*, *Pitcairnia herdee*, quando avaliou a conservação de grãos de pólen destas espécies em nitrogênio liquido.

A parada total do metabolismo celular pode ser confirmada a partir de 24 horas de congelamento, quando os valores para a germinabilidade ou para o comprimento do tubo polínico já não se alteram mais. Essa característica do ultracongelamento, com os prévios cuidados para manter a integridade celular é a premissa básica para a conservação em longo prazo (WITHERS, 1991).

Mudanças morfológicas e ultraestruturais com a desidratação e conservação foram observadas para grãos de pólen de pecan (YATES; SPARKS, 1989). Esses autores observaram um murchamento dos grãos de pólen, com o desprendimento da intina (conteúdo citoplasmático), característica igualmente observada neste trabalho. Observaram outros tipos de deformações, como na região do poro quando os grãos foram submetidos a uma temperatura de -196 ^{o}C sem nenhum processo de desidratação, observando-se fissuras e eclosão do conteúdo citoplasmático. Observações semelhantes foram observadas para *Ae. bicolor*, onde o conteúdo citoplasmático foi expelido, causando também rupturas nas camadas da exina (Figura 3.3 O, S, Y).

Observou-se diferença ultraestrutural no conteúdo citoplasmático nos diferentes tratamentos. Nos tratamentos advindos do ultrafreezer com temperaturas acima de -80 ^{o}C, o conteúdo citoplasmático apresentou uma distribuição irregular, característica esta não observada no tratamento com desidratação em nitrogênio líquido (-196 ^{o}C), mantendo-se igual ao tratamento controle por 1 hora. Yates e Sparks (1989), estudando grãos de pólen de pecan observaram, em microscopia de luz, diferenças no conteúdo citoplasmático de pólen

conservado a -10 ^{o}C, ao contrário dos grãos de pólen desidratados e conservados em nitrogênio líquido.

Para as camadas da exina as deformações só foram observadas pela sua ruptura, não havendo diferença significativa na espessura das camadas para nenhum dos tratamentos. Isso pode ser justificado pelo fato da exina ser uma camada resistente e rígida e formada por esporopolenina (polímeros oxidados e ésteres de carotenoides). A intina, por sua vez, é formada por celulose e pectina, menos resistente e com aparência homogênea (HESSE et al. 2009), não sofrendo desta forma uma redução na sua espessura. Nenhum trabalho de conservação de grãos de pólen descrevendo essas estruturas é relatado na literatura, nem mesmo utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Desta forma, essa técnica empregada é uma inovação para comprovar os efeitos da conservação em grãos de pólen.

Os resultados do presente trabalho comprovam a possibilidade de se conservar grãos de pólen de *Ae. bicolor* e fornecem aos melhoristas uma alternativa para a realização de hibridações com materiais de florescimento assincrônico. Adicionalmente, a possibilidade de conservação dos grãos de pólen por longo prazo pode permitir a realização de vários estudos de fisiologia, dentre outros.

6.5. Conclusões

A conservação de grãos de pólen de *Ae. bicolor* foi realizada com sucesso, por período de um ano, com elevada taxa de viabilidade no tratamento advindo da desidratação e conservação em nitrogênio líquido (-196 °C); a desidratação prévia dos grãos de pólen ao congelamento é um fator determinante na conservação.

Todos os frutos produzidos com grãos de pólen conservados por um ano apresentaram sementes viáveis, e as sementes produzidas apresentaram alta taxa de germinação em meio de cultura.

O protocolo de conservação dos grãos de pólen desenvolvido neste trabalho possibilitará a realização de hibridações com materiais de florescimento assincrônico, permitindo a geração de novos materiais para inovações no segmento de flores, que não poderiam ser gerados sem essa ferramenta auxiliar. Adicionalmente, permite a formação de um banco de pólen de espécies silvestres e cultivadas que pode ter aplicações variadas. Além disso, os estudos da morfologia e ultraestrutura para observar os efeitos da

conservação são inovadores e permitiu entender os danos causados por tratamentos inadequados na conservação de grãos de pólen.

Referências

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agricultural Research**, Peradeniya, Sri Lanka, v. 13, p. 238-241, 1979.

ALBA, V.; BISIGNANO, V.; ALBA, E.; STRADIS, A.; POLIGNANO, G. B. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 58, p. 977-982, 2011.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55. n. 1, p. 13-18, 1980.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Cryopreservation of plant germplasm I. New York: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 3-18.

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

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation**. A Practical Guide. New York: Springer, 2008. p. 15-32.

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

BETTIOL NETO, J. M.; NERO, M. D.; KAVATI, R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 68, p. 825-837, 2009.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal Botany**, New York, v. 50, p. 859-865, 1963.

CONNOR, K. F.; TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/ dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica,** Wageningen, v. 68, p. 77-84, 1993.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ceres**, Viçosa, v. 55, p. 433-438, 2008.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, p. 5-7, 2006.

ENGELMANN, F.; ARNAO, M. T. G.; WU, Y.; ESCOBAR, R. Development of encapsulation dehydration. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation:** a practical guide. New York: Springer, 2008. p. 59-76.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, p. 18-20, 2006.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANINICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette, IN: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.

GANESHAN, S. Cryogenic preservation of papaya pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 28, p. 65-70, 1986a.

GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196°C). **Tropical Agriculture**, London, v. 63, p. 46-48, 1986b.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of Pollen. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation**: a practical guide. New York: Springer, 2008. p. 281-332.

GROUT, B. W. W.; ROBERTS, A. V. Storage of free pollen, pollen embryos and the zygotic embryos of seed by cryopreservation and freeze drying. In: GROUT, B. W. W. (Ed.). **Genetic preservation of plant cells *in vitro***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 63-74.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCH-RADIVO, A.; ULRICH, S. **Pollen terminology:** An illustrated handbook. Wien: Springer, 2009. 259 p.

HONDA, K.; WATANABE, H.; TSUTSUI, K. Cryopreservation of *Delphinium* pollen at -30 ^{o}C. **Euphytica**, Wageningen, v. 126, p. 315-320, 2002.

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

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

LORA, M. A. J.; OTEYZA, P.; FUENTETAJA, P.; HORMAZA, J. I. Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 1, p. 91-94, 2006.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

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

PARTON, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Cryostorage of *Aechmea fasciata* pollen. **CryoLetters**, Lewes, UK, v. 19, p. 355-360, 1998.

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

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

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

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia**, Paris, v. 2, n. 11, p. 77-79, 1979.

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.

SACKS, E. J.; ST'CLAIR, D. A. Cryogenic storage of tomato pollen: Effect on fecundity. **HortScience**, St. Joseph, v. 31, p. 447-448, 1996.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/ Stat user´s guide:** statistics. Version 9.1. 3. ed. Cary, NC, 2004.

SCORZA, R.; SGERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK, J.; MORRE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John & Sons, 1995. p. 325-440.

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

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; FERREIRA, F. R.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, p. 79-84, 2009a.

SOUZA, E. H.; ROSA, S. S.; SOUZA, F. V. D.; MELO, V. C. Indução floral em *Neoregelia carolinae* (Beer) L. B. Sm e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, (Bromeliaceae). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 21, p. 305-310, 2009b.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHAS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: JUNGHAS, T. G.; SOUZA, A. S. (Org.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 1. ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009c. p. 177-205.

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

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. *In vivo* viability assay of sugarcane pollen stored at ultra low temperature following preservation treatments. **Sugar Cane International**, Kent, UK, v. 22, p. 135-136, 2002.

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.

TOWILL, L. E. Low temperature and freeze-vacuum-drying preservation of pollen. In: KARTHA, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 171-198.

VENDRAME, W. A.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendrobium* Hybrids using Cryopreserved Pollen. **HortScience**, St. Joseph, v. 43, p. 264-267, 2008.

WITHERS, L. A. Biotechnology and plant genetic resources conservation. In: PARODA, R. S.; ARORA, R. K. **Plant genetic resources conservation and management**. Concepts and Approaches. New Dehli, India: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. chap. 11.

YATES, I. E.; SPARKS, D. Hydration and temperature influence *in vitro* germination of pecan pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 114, p. 599-605, 1989.

ZHANG, F.; GE, Y. Y.; WANG, W. Y.; SHEN, X. L.; YU, X. Y. Assessing genetic divergence in interspecific hybrids of *Aechmea gamosepala* and *A. recurvata* var. *recurvata* using inflorescence characteristics and sequence-related amplified polymorphism markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, p. 4169-4178, 2012.

Capítulo 4

Perfil de compostos voláteis em flores de Bromeliaceae por HS-SPME/GC–MS

Aechmea fasciata Baker - Inflorescência

7. PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM FLORES DE BROMELIACEAE POR HS-SPME/ GC-MS

RESUMO

Os compostos voláteis desempenham papel vital no ciclo de vida das plantas, principalmente na polinização das plantas. Os voláteis possuem atividade biológica antimicrobiana e anti-herbivoria, além de grande importância na indústria de alimentos, cosméticos, perfumaria, química e farmacêutica. O presente trabalho teve como objetivo identificar os compostos voláteis de flores de treze espécies, pertencentes a quatro gêneros de Bromeliaceae utilizando microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa hifenada a espectrometria de massas (GC-MS). Foram identificados setenta e um diferentes compostos voláteis pertencentes a oito grupos: álcoois (11), terpenóides (48), aldeídos (5), éster (2), cetona (1), éter (1), furans (1), óxidos (1) e outros (1), sendo que 67,60% dos compostos identificados foram terpenóides. Os compostos identificados representaram mais de 97% dos componentes majoritários em *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Vriesea friburgensis* e as três variedades de *Ananas* foram identificados acima de 99% dos compostos e em *V. simplex* 90%. *V. friburgensis* apresentou a maior diversidade de voláteis com 31 compostos, enquanto que em *Al. nahoumii* foram encontrados apenas 14 compostos. As três variedades de *Ananas* apresentaram os mesmos 28 compostos em abundância relativamente próximas, o que também foi verificado pela análise de componentes principais.

Palavras-chave: *Aechmea. Alcantarea. Ananas.* Análise de componentes principais. Compostos voláteis. Cromatografia gasosa. Espectrometria de massa. Headspace. *Vriesea.*

VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF BROMELIACEAE FLOWERS BY HS-SPME/ GC-MS

ABSTRACT

Volatile compounds play a vital role in the life cycle of plants, being particularly relevant for pollination of plant species. Volatiles possess antimicrobial and anti-herbivore biological activities and have a significant importance in the food, cosmetic, chemical, fragrance, and pharmaceutical industry. The objective of this study was to identify the volatile compounds of thirteen species of flowers belonging to four genus of Bromeliaceae, using headspace solid-phase micro-extraction with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). We identified seventy-one volatile compounds belonging to eight chemical groups: alcohols (11), terpenoids (48), aldehydes (5), esters (2), ketone (1), ethers (1), furans (1), oxides (1) and others (1), with 67.60% being terpenoids. The compounds identified represent more than 97% of the major components in *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Vriesea friburgensis.* In the *Ananas* varieties studied, over 99% of the components were identified, and around 90% in *V. simplex*. *V. friburgensis* presented the largest diversity of volatiles with 31 compounds while *Alcantarea nahoumii* presented only 14. All three *Ananas* varieties presented the same 28 compounds in relatively similar abundance, confirmed by principal components analysis.

Keywords: *Aechmea. Alcantarea. Ananas.* Gas chromatography. Headspace. Mass spectrometry. Principal components analysis. Volatile compounds. *Vriesea.*

7.1. Introdução

A família Bromeliaceae Juss, pertence à ordem Poales (APG III, 2009), com cerca de 58 gêneros e 3.352 espécies (LUTHER, 2012). Bromeliaceae apresenta grande diversidade genética, sendo encontradas em praticamente todos os ecossistemas neotropicais, desde o nível do mar, em praias, mangues e restingas, até altitudes de 5.000 metros nos Andes (BENZING, 2000).

A maioria das espécies de bromélias é polinizada por beija-flores, pela atração das brácteas vistosas e coloridas e pela presença de néctar abundante. Morcegos também são importantes agentes polinizadores, pela presença de odor forte em muitas flores de antese noturna. Além da ornitofilia e quiropterofilia, polinização por borboletas, abelhas e besouros também são relatadas. A maioria das Bromeliaceae possui flores inodoras, exceto em alguns poucos casos, como relatados por Siqueira (1998), Siqueira Filho e Machado (2001) e Canela e Sazima (2005). Nestas espécies o odor é geralmente doce e suave e está associado à polinização por abelhas. Por sua vez, *Encholirium glaziovii* Mez e algumas espécies de *Vriesea*, possuem odor desagradável e copiosa quantidade de néctar, sendo visitadas por morcegos (SAZIMA; VOGEL; SAZIMA, 1989; SAZIMA; BUZATO; SAZIMA, 1995). As flores de *Bromelia antiacantha* Bertol. apresentam odor forte e adocicado, que diminui ao longo do dia (CANELA; SAZIMA, 2005).

Compostos voláteis desempenham papel vital no ciclo de vida das plantas, principalmente na visitação de polinizadores e disseminadores de sementes, garantindo assim a reprodução das plantas e o sucesso evolutivo (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002; SUINYUY; DONALDSON; JOHNSOS, 2013). Possuem atividade biológica antimicrobiana e anti-herbivoria, podendo também repelir microrganismos e animais ou atrair predadores naturais, protegendo indiretamente a planta através de interações tritróficas (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; ARAB; BENTO, 2006; LUCAS-BARBOSA; LOON; DICKE, 2011), sugerindo seu envolvimento na proteção das partes reprodutivas das plantas durante a floração.

Esses compostos voláteis apresentam também grande importância na indústria de alimentos, cosméticos, perfumaria, química e farmacêutica (CHENG, 2010; DARJAZI, 2011; PAIBON et al., 2011), pelo aumento na preferência por aditivos alimentares naturais e outros compostos de origem biológica (HUANG; LEE; CHOU, 2001). Os compostos voláteis são constituídos principalmente por terpenóides, fenilpropanóides, hidrocarbonetos, álcoois,

aldeídos, cetonas, éteres e ésteres e derivados de ácidos graxos, e representam cerca de 1% dos metabólitos secundários conhecidos em plantas (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004).

Compostos voláteis em Bromeliaceae foram estudados apenas no gênero *Ananas,* concentrando-se na análise dos frutos. Mais de 280 compostos foram identificados, sendo os mais abundantes os ésteres, terpenos, cetonas e aldeídos (TOKITOMO et al., 2005; TOKITOMO, 2007; LIU et al., 2008; WEI et al., 2011).

O presente trabalho tem como objetivo identificar os compostos voláteis de flores de treze espécies, pertencentes a quatro gêneros de Bromeliaceae utilizando microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa hifenada a espectrometria de massas. Além disso, o trabalho traz uma nova contribuição revelando o potencial que estas plantas possuem tanto na indústria, na síntese de produtos naturais, quanto aos futuros estudos de processos ecológicos envolvendo a interação planta-animal.

7.2. Material e Métodos

Material Vegetal

Flores inteiras de treze espécies, pertencentes a quatro gêneros de Bromeliaceae, sendo que um exemplar de cada foi depositado no herbário ESA (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- Esalq/ USP): *Aechmea bicolor* L. B. Sm. (voucher ESA 120990), *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f. (ESA 121275), *Ae. distichantha* Lem. (ESA 121275), *Ae. fasciata* Baker (ESA 120987), *Ae. nudicaulis* Griseb. (ESA 120991), *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal (ESA 121284), *An. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L.B.Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121285), *Ananas macrodontes* E. Morren (ESA 121286), *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (ESA 120986), *Vriesea friburgensis* Mez (ESA 121282), *V. michaelii* W. Weber (ESA 121280), *V. paraibica* Wawra (ESA 121276) *e V. simplex* Beer (ESA 120989), mantidas em casa de vegetação, foram coletadas na antese nos meses de agosto de 2011 a fevereiro de 2012.

Microextração em fase sólida

As flores foram introduzidos em frascos de 20 mL e deixados para equilibrar durante 20 min a 37 °C. Os voláteis de cada amostra foram obtidos por meio da técnica de SPME, utilizando fibras Supelco SPME recobertas com divinilbenzeno/ polidimetilsiloxano (DVB/ PDMS, 65µm). Após o tempo de equilíbrio, a fibra foi exposta ao headspace durante 20 min a 37 °C. Uma vez que a amostragem foi terminada, a fibra foi recolhida para dentro da agulha e então transferida para injeção no sistema de GC-MS, utilizando o modo de injeção splitless, com temperatura do injetor a 240 °C. Foram utilizadas médias de três replicatas biológicas, considerando cada replicata, uma flor de plantas diferentes.

Cromatografia gasosa e espectrometria de massa

As análises de GC-MS dos extratos vegetais foram realizadas em um cromatógrafo gasoso GC-2010 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa QP 2010 Plus (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). As amostras foram separadas utilizando uma coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições analíticas foram: temperatura do forno programada para 40 °C durante 2 minutos, aumentando para 130 °C durante 1 minuto, taxa de 4 °C min^{-1}; 130-230°C taxa de 7 °C min^{-1} e 130 °C durante 4 min; vazão do gás de arraste hélio a 2 µL min^{-1} e split 1:20. A interface foi mantida a 280 °C e o detector operou no modo varredura (m/z 45 - 450). A integração dos dados foi realizada por meio do programa computacional Lab Soluction GC-MS.

Processo de identificação e semiquantificação

Os compostos voláteis foram identificados por comparação com dados da literatura e os perfis das bibliotecas Wiley8 e FFNSC1.3. Com base nos resultados dos espectros de massa, foram calculados a abundância relativa dos compostos.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise multivariada de componentes principais utilizando-se o programa Statistica (STATSOFT Inc., 2004). Foi também calculada a contribuição dos constituintes voláteis para diversidade entre os acessos pelo método de Singh (1981) utilizando-se o programa Genes (CRUZ, 2001).

7.3. Resultados e Discussão

Foram identificados 71 dos 80 diferentes compostos voláteis pertencentes a oito grupos: álcoois, terpenóides, aldeídos, éster, cetona, éter, furans e óxidos, sendo que 67,60% dos compostos identificados foram terpenóides nas 13 espécies de bromélias analisadas, pertencentes a quatro gêneros (Tabelas 4.1, 4.2 e Figura 4.1). Os compostos identificados representam mais de 97% dos componentes majoritários da presente fração, em *Ae. bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *V. friburgensis* e as três variedades de *Ananas* foram identificados acima de 99,45% dos compostos e em *V. simplex* 90,69% (Tabela 4.2).

Pelo método de Singh (1981), observou-se que os compostos, gaultheric acid, β-myrcene e n-hexanol são os de maior importância com 26,87%, 13,44% e 11,76%, respectivamente (Tabela 4.3). O método de Singh (1981) identifica a contribuição relativa de cada uma das variáveis quantitativas com base na distância de Mahalanobis.

V. friburgensis apresentou maior diversidade de voláteis com 31 compostos, enquanto que *Al. nahoumii* apresentou apenas 14 compostos, sendo apenas 10 identificados. As três variedades de *Ananas* apresentaram os mesmos 28 compostos em abundância relativamente próximas, como verificado pela análise de componentes principais (Figura 4.2).

O grupo dos terpenos apresentou o maior número de compostos, bem como a maior porcentagem na fração analisada para a maioria das espécies estudadas, a exemplo de *Ae. bicolor* (74,92%), *Ae. distichantha* (77,54%) e *V. friburgensis* (71,27%). Entre as variedades de *Ananas* os terpenos correspondem a 82% e representam 66,21% da sua composição total. A presença de terpenóides em plantas está associada à defesa contra herbivoria, patogenicidade, alelopatia e atração de polinizadores (LANGENHEM, 1994). Os terpenos estão associados a muitas fragrâncias, fato que os torna muito utilizados na indústria de perfumaria e aromas (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001).

O composto β-myrcene foi observado em todas as espécies com exceção de *Al. nahoumii*, com abundância relativa variando entre 0,31% e 39,26% em *V. michaelii* e *Ae. distichantha,* respectivamente. Esse composto já foi descrito em mais de 200 espécies vegetais como sendo responsável pelo odor verde, erva, pinos, limão, toranja, bolor e picante (MAHATTANATAWEE et al., 2003; QUIAO et al., 2008). É muito utilizado na indústria

cosmética e farmacêutica. Uma síntese sobre este composto pode ser obtido em Zeiger (1997) e Behr e Johnen (2009).

Um composto de destaque foi o linalool, presente apenas em *Al. nahoumii* com 12,94% em relação ao total dos compostos (Tabela 4.1 e Figura 4.1 B). Esse composto volátil foi encontrado em tangerinas e é responsável pelo sabor e o aroma que esta espécie emite (SAWAMURA et al., 2004).

Outros dois compostos que apresentaram grande abundância na maioria das espécies são o γ-terpinene que possui um odor cítrico adocicado, de gasolina e terebintina (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001; ACREE; ARN, 2004; QIAO et al., 2008) e α-humulene, que possui um odor fresco de madeira (ACREE; ARN, 2004; CUEVAS-GLORY et al., 2013) com propriedades anti-inflamatórias e é encontrado em óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) (FERNANDES et al., 2007).

Foram identificados 11 compostos pertencentes à classe dos álcoois, com uma abundância total que variou de 6,12% a 59,69% em *V. michaelii* e *Ae. bromeliifolia,* respectivamente. Dentre eles, os mais abundantes foram o n-hexanol, (*Z*)-3-hexenol, (*E*)-sabinene hydratate e o 1-terpinenol (Tabela 4.1).

O n-hexanol foi identificado na maioria das espécies estudadas, em elevada abundância em *Al. nahoumii* (31,54%), *Ae. bromeliifolia* (29,68%) e *V. paraibica* (21,21%). Grande abundância desse composto foi também observada em frutos de ameixeira (Rosaceae) (GOMEZ; LEDBETTER; HARTSELL, 1993; PINO; QUIJANO, 2012), flores de *Caralluma europaea* (Guss.) N.E.Br. (Apocynaceae) (FORMISANO et al., 2009) e *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (HAN et al., 2006). Jabalpurwala, Smoot e Rouseff (2009) estudando compostos voláteis em flores de diferentes espécies de *Citrus* também observaram altos índices de n-hexanol em *Citrus grandis* (L.) Osbeck (Rutaceae), o que foi correlacionado com os tipos de polinização já que esta espécie apresenta autoincompatibilidade e que a polinização cruzada por abelhas é crucial para a perpetuação desta espécie.

Entre os aldeídos foram identificados cinco compostos, n-hexanal, phenylacetaldehyde, n-nonanal, (*E*)-2-nonenal e decanal, sendo os três últimos encontrados em todas as espécies de *Aechmea*. Esses aldeídos emitem odores fortes que remetem aos frutos cítricos, rosas e grama cortada e são muito utilizados em perfumaria (BAUER; GARBE; SURBURG, 2001). O phenylacetaldehyde foi encontrado apenas em *Ae. bromeliifolia* (8,17%)

sendo um composto aromático encontrado em *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae) (JANES et al., 2009) e diversas espécies de flores (ROBERT; MEAGHER JUNIOR, 2002). Este composto é usado para atrair diversas espécies de mariposas em armadilhas para controle biológico (SMITH; ALLEN; NELSON, 1943; CARLELO; JACOBSON, 1979; ROBERT; MEAGHER JUNIOR, 2002) e possui um aroma adocicado de flores e mel (WHETSTINE; CADWALLADER; DRAKE, 2005).

O gaultheric acid foi encontrado em maior abundância em *V. michaelii* (63,13%), *V. paraibica* (10,02%) além de outras espécies com valores abaixo de 2% (Tabela 4.1). Este composto pertence a classe das cetonas e pode ser encontrado em vinhos e em algumas espécies de plantas como a *Gaultheria itoana* Hayata (Ericaceae) (CHEN et al., 2009). Esse composto foi também encontrado em grande quantidade em cascas de raízes de *Securidaca longepedunculata* Fresen (Polygalaceae), exercendo um efeito biocida contra insetos em grãos armazenados (LOGNAY et al., 2000). A emissão de compostos voláteis com efeito biocida pode estar relacionada aos polinizadores, exercendo um efeito antagonista em algumas espécies (KNAAK; FIUZA, 2010).

O eucalyptol é um composto pertencente à classe dos éteres e está presente nas três variedades do gênero *Ananas* (Figura 4.1 C), em *V. friburgensis* (Figura 4.1 D) e *V. simplex,* apresentando uma abundância relativa variando de 5,16% a 6,08% (Tabela 4.1). Este composto foi identificado em maior abundância entre todos os compostos voláteis nas flores de cica africana (*Encephalartos*) (Zamiaceae) (SUINYUY; DONALDSON; JOHNSON, 2013).

Os furans e óxidos estão presentes em um pequeno número das poucas espécies estudadas e em pequenas quantidades.

Padrões especiais de odor de uma flor, assim como as diferenças na intensidade nos tipos de compostos voláteis emitidos, servem como guias para insetos e ajudam na busca de recompensa por alimentos. Uma combinação das análises químicas dos aromas florais com as observações de campo do comportamento dos visitantes florais são uma forma importante de comprovar o efeito dos voláteis na atração dos polinizadores (DOBSON, 1994).

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/ GC-MS

N	Compostos	t_R (min)[a]	Amostras das espécies (% de área)													
			BIC	BRO	DIS	FAS	NUD	BRA	ERE	MAC	ALC	FRI	MIC	PAR	SIM	Descrição do aroma
	Álcoois															
1	(*E*)-3-Hexenol	7,75	9,28		6,80		15,57				6,11			18,68		musgo[1], fresco[1]
2	(*Z*)-3-Hexenol	7,80		24,49									2,86			grama[1], verde[2], frutas[2]
3	n-Hexanol	8,22	6,16	29,68	5,97	2,76	7,97				31,54		2,72	21,21		resina[1], flores[1], verde[1,2,3], verde[2], mofo[2], nozes[2], grama[4]
4	(*E*)-Sabinene hydrate	15,57						14,66	0,86	7,10		12,29	0,54	0,72	13,82	bálsamo[1], flores[4], frutas[4]
5	Phenethyl alcohol	17,29		5,52												doce[8], flores[8]
6	*p*-Menth-2-en-1-ol	17,64						0,38	0,23	0,66		0,33			0,59	erva[1]
7	(*Z*)-Non-3-en-1-ol	18,74				9,35	2,68									-
8	Octanol	19,36				2,89								0,75		musgo[1], nozes[1], cogumelo[1]
9	1-Terpinenol	19,73						10,29	18,09	15,06		6,16			1,57	limão[7], pinho[7], menta[7]
10	(-)-α-Trepineol	20,23						1,83	2,01	1,69		1,44			1,55	doce[2], frutas[2], óleo[6,9], flores[6], anis[9]
11	Cedrol	32,42	0,93				0,51									cedro[12], madeira[12]
	Terpenos															
12	α-Thujene[A]	10,29						4,57	1,17	2,91		3,38			4,42	madeira[1], verde[1], erva[1]
13	1,3,8-p-Menthatriene[A]	10,44			4,13		2,33									terebintina[1]
14	α-Pinene[A]	10,49			1,26	6,34		1,22	2,03	1,35		3,00	0,89	9,95		pinho[1,5,7], terebintina[1,5], madeira[5,6], frutas[5], doce[5], verde[5], citros[5], lima[5], cânfora[5], resina[6]
15	Camphene[A]	11,07			1,28		0,50									cânfora[1,5,7], doce[5], frutas[5], pinho[5], óleo[5], erva[5], baunilha[5]
16	β-Pinene[A]	12,13	1,00		3,07		1,54									pinho[1,5,7], terebintina[1,5], madeira[5,6], frutas[5], doce[5], verde[5], citros[5], lima[5], cânfora[5], resina[6]

BIC = *Aechmea bicolor*; BRO = *Ae. bromeliifolia*; DIS = *Ae. distichantha*; FAS = *Ae. fasciata*; NUD = *Ae. nudicaulis*; BRA = *Ananas comosus* var. *bracteatus*; ERE = *An. comosus* var. *erectifolius*; MAC = *An. macrodontes*; ALC = *Alcantarea nahoumii*; FRI = *Vriesea friburgensis*; MIC = *V. michaelii*; PAR = *V. paraibica*; SIM = *V. simplex;* A = monoterpeno; 1 = Acree e Arn (2004); 2 = Mahattanatawee et al. (2005); 3 = Fan e Qian (2006); 4 = Phi et al. (2006); 5 = Formisano et al. (2009); 6 = Cuevas-Glory et al. (2013); 7 = Qiao et al (2008); 8 = Zheng et al. (2004); 9 = Bordiga et al. (2013); 12 = Brechbill (2007)

(continua...)

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/ GC-MS

(continuação...)

N	Compostos	t_R (min)[a]	Amostras das espécies (% de área)													Descrição do aroma
			BIC	BRO	DIS	FAS	NUD	BRA	ERE	MAC	ALC	FRI	MIC	PAR	SIM	
								Terpenos								
17	o-Cymene[A]	12,52					1,31									cânfora[1,5,7], doce[5], frutas[5], pinho[5], óleo[5], erva[5], baunilha[5]
18	β-Myrcene[A]	12,67	17,81	0,72	39,26	2,57	24,43	0,47	1,94	1,78		2,07	0,31	0,46	1,58	verde[2], erva[2], pinho[2], limao[2], pomelo[7], bolor[5], verde[5], doce[5], madeira[5], fresco[6]
19	Sabinene[A]	12,97				4,33		5,32	0,58	4,95		8,59			5,53	pimenta[1,12], terebintina[1,12], madeira[1,12], citros[12], pinho[12]
20	α-Phellandrene[A]	13,16						1,11	0,98	1,19					0,91	pimenta[1,5], terebintina[1], hortelã[1,5], frutas[5], erva[5], citos[5], lima[5]
21	δ-3-Carene[A]	13,33				6,30										limao[1], resina[1]
22	α-Terpinene[A]	13,70						5,73	11,25	7,55		6,75			5,56	limao[1], verde[2], citros[2]
23	p-Cymene[A]	13,95						1,39	6,32	5,07		3,83			3,74	solvente[1,5], gasolina[1,5], citros[1,5], limao[5], frutas[5], doce[5], picante[5]
24	Sylvestrene[A]	14,03			2,07											-
25	(*E*)- β-Ocimene[A]	14,04	0,53	3,02	0,56	5,98						0,20	10,23	1,24	0,14	doce[1,2], erva[1,2]
26	Limonene[A]	14,11					1,25									limao[1], laranja[1], citros[1,6,7], verde[6], menta[7]
27	γ-Terpinene[A]	15,35						8,06	18,43	12,44		10,47			7,85	gasolina[1], terebintina[1], doce[7], citros[7]
28	Terpinolene[A]	16,37						2,88	4,69	6,08		3,52			3,40	flores[2], limao[2], frutas[2,5], madeira[5], doce[5], pinho[5], anis[5], plástico[5], verde[7]
29	Linalool[A]	16,85									12,94					flores[1,2,5,6], lavanda[1,5,13], doce[1,5,6], erva[4], picante[4], frutas[5,7], citros[5,13], anis[5], muscat[5,9], salsa[5]
30	4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene[B]	17,40					4,46				30,69		1,41	2,73		-
31	Bicycloelemene[C]	25,32						2,34	1,05	1,68		2,80			3,74	-

BIC = *Aechmea bicolor*; BRO = *Ae. bromeliifolia*; DIS = *Ae. distichantha*; FAS = *Ae. fasciata*; NUD = *Ae. nudicaulis*; BRA = *Ananas comosus* var. *bracteatus*; ERE = *An. comosus* var. *erectifolius*; MAC = *An. macrodontes*; ALC = *Alcantarea nahoumii*; FRI = *Vriesea friburgensis*; MIC = *V. michaelii*; PAR = *V. paraibica*; SIM = *V. simplex;* A = monoterpeno; B = homoterpeno; C = sesquiterpeno; 1 = Acree e Arn (2004); 2 = Mahattanatawee et al. (2005); 4 = Phi et al. (2006); 5 = Formisano et al. (2009); 6 = Cuevas-Glory et al. (2013); 7 = Qiao et al (2008); 9 = Bordiga et al. (2013); 12 = Brechbill (2007); 13 = Lee et al. (2013)

(continua...)

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/ GC-MS

(continuação...)

N	Compostos	t_R (min)[a]	Amostras das espécies (% de área)													
			BIC	BRO	DIS	FAS	NUD	BRA	ERE	MAC	ALC	FRI	MIC	PAR	SIM	Descrição do aroma
								Terpenos								
32	α-Cubebene[C]	25,76						1,30	0,49	0,79		1,01			1,32	erva[1], cera[1]
33	Isoledene[C]	26,59				2,69										-
34	α-Copaene[C]	26,62				1,41		0,77	0,69	0,86		0,62			1,57	madeira[1,5], pimenta[1,5], terra[5]
35	β-Elemene[C]	27,18	0,40					0,92	0,23	0,58		0,77			1,05	erva[1], cera[1], fresco[1]
36	β-Maaliene[C]	27,74						1,97	2,05	2,70		0,12				-
37	α-Gurjunene[C]	27,80										2,13			2,53	madeira[1], bálsamo[1]
38	(*E*)-Caryophyllene[C]	28,06				2,46	8,05	1,77	1,33	1,66						-
39	Caryophyllene[C]	28,08	18,18		10,19			2,69	2,12	2,23		1,85		0,55	2,27	bolor[5], verde[5], picante[5], madeira[5], frutas[5], doce[5], terebintina[5]
40	γ-Maaliene[C]	28,29						0,78	0,57	0,73		0,68				-
41	(*E*)-α-Bergamotene[C]	28,39	4,52		2,20		1,85									madeira[1], quente[1], chá[1]
42	α-Maaliene[C]	28,51										1,12			1,42	-
43	Alloaromadendren[C]	28,63						5,04	3,99	3,90		4,82			5,46	madeira[1]
44	3,5-Cadinadiene[C]	28,87				4,86		1,00	0,66	0,86		0,90	1,26			-
45	α-Humulene[C]	28,99	21,19		8,91		9,63									madeira[1], fresco[6]
46	α-Selinene[C]	29,14	2,69	1,54	1,74											-
47	Muurola-4(14),5-diene[C]	29,17				8,96										-

BIC = *Aechmea bicolor*; BRO = *Ae. bromeliifolia*; DIS = *Ae. distichantha*; FAS = *Ae. fasciata*; NUD = *Ae. nudicaulis*; BRA = *Ananas comosus* var. *bracteatus*; ERE = *An. comosus* var. *erectifolius*; MAC = *An. macrodontes*; ALC = *Alcantarea nahoumii*; FRI = *Vriesea friburgensis*; MIC = *V. michaelii*; PAR = *V. paraibica*; SIM = *V. simplex;* C = sesquiterpeno; 1 = Acree e Arn (2004); 5 = Formisano et al. (2009); 6 = Cuevas-Glory et al. (2013)

(continua...)

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/ GC-MS

(continuação...)

N	Compostos	t_R (min)[a]	Amostras das espécies (% de área)													
			BIC	BRO	DIS	FAS	NUD	BRA	ERE	MAC	ALC	FRI	MIC	PAR	SIM	Descrição do aroma
									Terpenos							
48	Neo-allo-ocimene[C]	29,23			0,60							1,87	0,17	4,43	2,15	-
49	1(6),4-Cadinadiene[C]	29,48						2,39	1,45	1,93		1,83			1,83	-
50	β-Selinene[C]	29,79	2,30		0,59		0,78									erva[1]
51	δ-Elemene[C]	30,01	3,17		0,98											madeira[1]
52	3,7(11)-selinadiene[C]	30,04					1,50									-
53	Viridiflorene[C]	30,06						8,50	5,35	5,52						-
54	γ-Elemene[C]	30,19										4,98			6,36	verde[1], madeira[1], óleo[1]
55	β-Bisabolene[C]	30,23	2,38		0,70		1,49									bálsamo[1]
56	β-Curcumene[C]	30,30	0,75			2,55										-
57	δ-Cadinene[C]	30,71				5,00		4,37	2,79	2,33		3,08			4,05	tomilho[1], madeira[1]
58	α-Cubenene[C]	30,91						1,62	0,81	0,76		0,88			1,02	erva[7]
59	Squalene[D]	31,79									1,28			0,93		-
									Aldeídos							
60	n-Hexanal	6,09		3,41							4,22			10,77		maça[3], verde[3], grama[3]
61	Phenylacetaldehyde	14,66		8,17									1,32			maçã[5], damasco[5], cereja[5], chocolate[5], uva[5], mel[5], jacinto[5], limao[5], melão[5], laranja[5], verde[5], noz[5], frutas[5], pêssego[5], castanha[5], vegetais[5], doce[5], flores[5], margarida[5]

BIC = *Aechmea bicolor*; BRO = *Ae. bromeliifolia*; DIS = *Ae. distichantha*; FAS = *Ae. fasciata*; NUD = *Ae. nudicaulis*; BRA = *Ananas comosus* var. *bracteatus*; ERE = *An. comosus* var. *erectifolius*; MAC = *An. macrodontes*; ALC = *Alcantarea nahoumii*; FRI = *Vriesea friburgensis*; MIC = *V. michaelii*; PAR = *V. paraibica*; SIM = *V. simplex;* C = sesquiterpeno; D = triterpeno; 1 = Acree e Arn (2004); 3 = Fan e Qian (2006); 5 = Formisano et al. (2009); 7 = Qiao et al (2008)

(continua...)

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/GC-MS

(continuação...)

N	Compostos	t_R (min)[a]	Amostras das espécies (% de área)													Descrição do aroma
			BIC	BRO	DIS	FAS	NUD	BRA	ERE	MAC	ALC	FRI	MIC	PAR	SIM	
									Aldeídos							
62	n-Nonanal	16,91	1,00	0,61	0,42	5,01	1,18				0,15		0,4			gordura[1], citros[1], verde[1]
63	(*E*)-2-Nonenal	18,94	1,68	0,98	2,77	2,48	0,84						0,93	0,82		pepino[1], gordura[1, 10], verde[1], metálico[2], erva[1], sabão[10], cloro[11]
64	Decanal	20,61	1,62	0,20	0,23	1,19	0,56						0,35	0,51		sabão[1], citros[1], sebo[1], frutas[7], bálsamo[7], geranium[10]
									Éster							
65	Lyrantion	32,11				0,83	0,52									doce[12], botões de laranja[12]
66	Diisobutyl phthalate	36,85	0,55			1,96							0,51			-
									Cetona							
67	Gaultheric acid	20,29	0,53	1,01			1,03				2,09	1,52	63,13	10,02		-
									Éter							
68	Eucalyptol	14,02						6,08	5,37	5,16		5,58			5,26	fresco[12], cânfora[12]
									Furano							
69	2-pentyl-Furan	12,66	0,70	0,92							0,54		0,77	0,93		feijão[1,8], manteiga[1], verde[1,8], frutas[8], vegetais[8], solo[7], incenso de raízes[8]
									Óxido							
70	cis-Linalool oxide	16,42									0,99					flores[1], resina[4], citros[4]
									Outros							
71	Styrene	8,94				4,45										bálsamo[1,13], gasolina[1,13]

BIC = *Aechmea bicolor*; BRO = *Ae. bromeliifolia*; DIS = *Ae. distichantha*; FAS = *Ae. fasciata*; NUD = *Ae. nudicaulis*; BRA = *Ananas comosus* var. *bracteatus*; ERE = *An. comosus* var. *erectifolius*; MAC = *An. macrodontes*; ALC = *Alcantarea nahoumii*; FRI = *Vriesea friburgensis*; MIC = *V. michaelii*; PAR = *V. paraibica*; SIM = *V. simplex;* 1 = Acree e Arn (2004); 2 = Mahattanatawee et al. (2005); 4 = Phi et al. (2006); 7 = Qiao et al (2008); 8 = Zheng et al. (2004); 10 = Wang et al. (2012); 11 = Culleré et al. (2013); 12 = Brechbill (2007); 13 = Lee et al. (2013)

(continua...)

Tabela 4.1 - Constituintes voláteis, tempos de retenção, porcentagem de área presentes no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae por HS-SPME/ GC-MS

(continuação...)

N	Compostos	t_R (min)[a]	Amostras das espécies (% de área)													
			BIC	BRO	DIS	FAS	NUD	BRA	ERE	MAC	ALC	FRI	MIC	PAR	SIM	Descrição do aroma
									Não identificados							
72	Não identificado 1	6,82		1,32							0,23		0,22	2,20		-
73	Não identificado 2	12,92				4,07	1,43				1,16		2,05			-
74	Não identificado 3	12,95		1,32										1,84		-
75	Não identificado 4	15,58		1,24	0,42											-
76	Não identificado 5	18,83	2,00	13,24	5,00						1,12		2,35	2,89		-
77	Não identificado 6	21,94	0,17	0,85	0,44											-
78	Não identificado 7	24,76	0,23	0,38	0,12	1,42	0,30				0,27		0,61	0,62		-
79	Não identificado 8	28,92				1,26										-
80	Não identificado 9	29,87				5,66								0,37		-

BIC = *Aechmea bicolor*; BRO = *Ae. bromeliifolia*; DIS = *Ae. distichantha*; FAS = *Ae. fasciata*; NUD = *Ae. nudicaulis*; BRA = *Ananas comosus* var. *bracteatus*; ERE = *An. comosus* var. *erectifolius*; MAC = *An. macrodontes*; ALC = *Alcantarea nahoumii*; FRI = *Vriesea friburgensis*; MIC = *V. michaelii*; PAR = *V. paraibica*; SIM = *V. simplex*

Tabela 4.2 - Categorias aromáticas de componentes voláteis identificados no espectro de massa em treze espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill, *Alcantarea* (Leme) J. R. Grant e *Vriesea* Lindl. por HS-SPME/GC-MS

Espécies	Compostos	Álcoois	Terpenos	Aldeídos	Éster	Cetona	Éter	Furan	Óxido	Outros	Não identificados	Total de voláteis
	Nº	----------	----------	----------	----------	----------	----------	%	----------	----------	----------	----------
Aechmea bicolor	24	16,37	74,92	4,30	0,55	0,53	--	0,70	--	--	2,40	99,77
Ae. bromeliifolia	19	59,69	5,28	13,37	--	1,01	--	0,92	--	--	18,35	98,62
Ae. distichantha	24	12,77	77,54	3,42	--	--	--	--	--	--	5,98	99,71
Ae. fasciata	25	15,00	53,45	8,68	2,79	--	--	--	--	4,45	12,41	96,78
Ae. nudicaulis	24	26,73	59,12	2,58	0,52	1,03	--	--	--	--	1,73	91,71
Ananas comosus var. *bracteatus*	28	27,16	66,21	--	--		6,08	--	--	--	--	99,45
An. comosus var. *erectifolius*	28	21,19	70,97	--	--	--	5,37	--	--	--	--	97,53
An. macrodontes	28	24,51	69,85	--	--	--	5,16	--	--	--	--	99,52
Alcantarea nahoumii	14	37,65	44,91	4,37	--	2,09	--	0,54	0,99	--	2,78	93,33
Vriesea friburgensis	31	20,22	71,27	--	--	1,52	5,58	--	--	--	---	98,59
V. michaelii	20	6,12	14,27	3,00	0,51	63,13	--	0,77	--	--	5,23	93,03
V. paraibica	21	41,36	20,29	12,10	--	10,02	--	0,93	--	--	7,92	92,62
V. simplex	27	17,53	67,90	--	--		5,26	--	--	--	--	90,69
Totais de voláteis	80	11	48	5	2	1	1	1	1	1	9	97,53

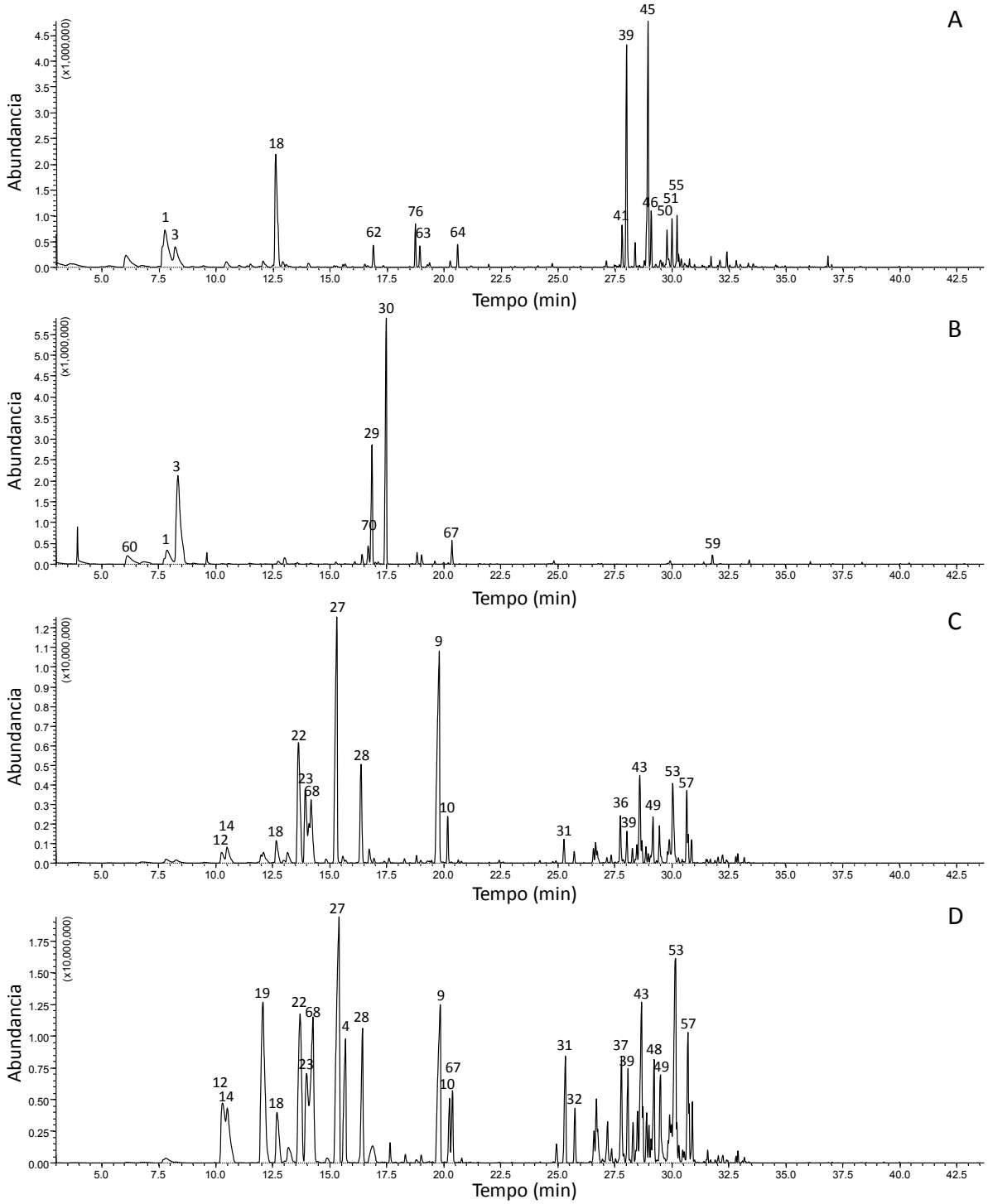


Figura 4.1 - Perfil cromatográfico obtido por HS-SPME/ GC-MS de compostos voláteis em flores de Bromeliaceae, indicando os compostos majoritários identificados. A) *Aechmea bicolor* L. B. Sm, B) *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant, C) *Ananas comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal, D) *Vriesea friburgensis* Mez

Tabela 4.3 - Contribuição dos principais compostos voláteis para a diversidade seguindo o método de Singh (1981) obtidos por HS-SPME/GC-MS de compostos voláteis em flores de 13 espécies de Bromeliaceae

Compostos	*S.j*	*S.j* (%)
Gaultheric acid	46939,64	26,87
β-Myrcene[1]	23473,98	13,44
n-Hexanol	20543,44	11,76
4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene	11082,01	6,35
(*Z*)-3-Hexenol	7155,19	4,10
α-Humulene[2]	6496,36	3,72
1-Terpinenol	6486,13	3,74
γ-Terpinene[1]	6220,57	3,56
(*E*)-Sabinene hydrate	5416,85	3,10
Demais compostos	22966,02	23,36

S.j = contribuição da variável *x* para o valor da distância de Mahalanobis entre os genótipos *i* e *i*

A análise de componentes principais com base nos compostos voláteis de flores de Bromeliaceae evidenciou que os três primeiros componentes retém 62,81% da informação inicial (Tabela 4.4). A variância total observada foi considerada alta, devido à grande heterogeneidade da composição química das amostras.

A correlação de cada componente com as variáveis permitiu avaliar seu poder discriminatório nesta análise. No CP1 (30,78%) as variáveis que mais influenciaram na discriminação dos acessos baseados nos compostos voláteis foram eucalyptol, alloaromadendren e 1(6),4-cadinadiene, com valores de correlação de 0,99, 0,98 e 0,98, respectivamente. Para CP2 (19,17%) as variáveis que mais influenciaram foram 3,5-cadinadiene, não identificado 7, e muurola-4(14),5-diene, com valores de correlação de 0,96, 0,93 e 0,93, respectivamente. Em CP3 (12,85%), as variáveis mais importantes foram α-humulene, (*E*)-α-bergamotene e β-bisabolene, com correlações de 0,76, 0,75 e 0,75, respectivamente.

Tabela 4.4 - Autovalores, porcentagem de variância total, autovalor acumulado e porcentagem acumulada dos cinco primeiros componentes principais obtidos por HS-SPME/GC-MS de compostos voláteis em flores de 13 espécies de Bromeliaceae

Componentes principais	Autovalor	Porcentagem de variância total	Autovalor acumulado	Porcentagem acumulada
CP 1	25,2458	30,7876	25,2458	30,7876
CP 2	15,7234	19,1749	40,9693	49,9625
CP 3	10,5336	12,8459	51,5029	62,8084
CP 4	6,3267	7,7155	57,8296	70,5239
Cp 5	5,1625	6,2958	62,9922	76,8198

O diagrama de dispersão dos escores dos três primeiros componentes principais (Figura 4.2) evidenciou a formação de três grupos e duas espécies isoladas, o que demonstra a grande variabilidade de compostos voláteis dentro dessas espécies.

V. michaelii, *V. paraibica* e *Al. nahoumii* formaram um grupo (Figura 4.2), estas espécies são filogeneticamente muito próximas, consideradas irmãs, todas pertencendo à subfamília Tillandsioideae. O gênero *Alcantarea* emergiu de um clado a partir do gênero *Vriesea,* entretanto, ainda existe controvérsia quanto à aceitação de sua classificação como gênero (BARFUSS et al., 2005; VERSIEUX et al., 2012). A composição dos compostos voláteis produzidos por estas espécies pode ser um fator que demonstra a proximidade dessas espécies.

Três espécies de *Aechmea* formaram outro grupo, dentre elas *Ae. bicolor*, *Ae. distichantha* e *Ae. nudicaulis* pertencentes à subfamília Bromelioideae com flores morfologicamente semelhantes (Figura 4.2). Faria, Wendt e Brown (2004), estudando as relações cladísticas deste gênero demonstraram que *Ae. distichantha* e *Ae. nudicaulis* são muito próximas no clado de distribuição. Além disso, há relatos de polinizadores comuns entre essas duas espécies (SCHMID et al., 2010; SCROK; VARASSIN, 2011). Há poucos estudos para *Ae. bicolor* não sendo possível relacionar essas características, ressaltando-se a semelhança morfológica da inflorescência à da *Ae. nudicaulis.*

Ae. fasciata e *Ae. bromeliifolia* apresentaram-se isolados na análise de componentes principais (Figura 4.2), o que demonstra a grande variabilidade de compostos neste gênero.

O terceiro grupo é formado por *An. macrodontes, An. comosus* var. *erectifolius* e *An. comosus* var. *bracteatus* e duas espécies de *Vriesea* (*V. simplex* e *V. friburgensis*). Este grupo corrobora a aproximação morfológica e taxonômica entre plantas do gênero *Ananas,* uma vez que apresentaram os mesmos 28 compostos e valores próximos entre eles. Considerando-se que os compostos voláteis de flores podem ser uma estratégia de plantas para atrair polinizadores, as duas espécies de *Vriesea* podem apresentar polinizadores semelhantes com o gênero *Ananas*, sendo assim, agrupadas na análise de componentes principais. No entanto, considerando o grande número de espécies da família Bromeliaceae, há poucos relatos sobre os polinizadores, tornando-se difícil associar os mesmos aos compostos voláteis de flores produzidas por uma determinada espécie.

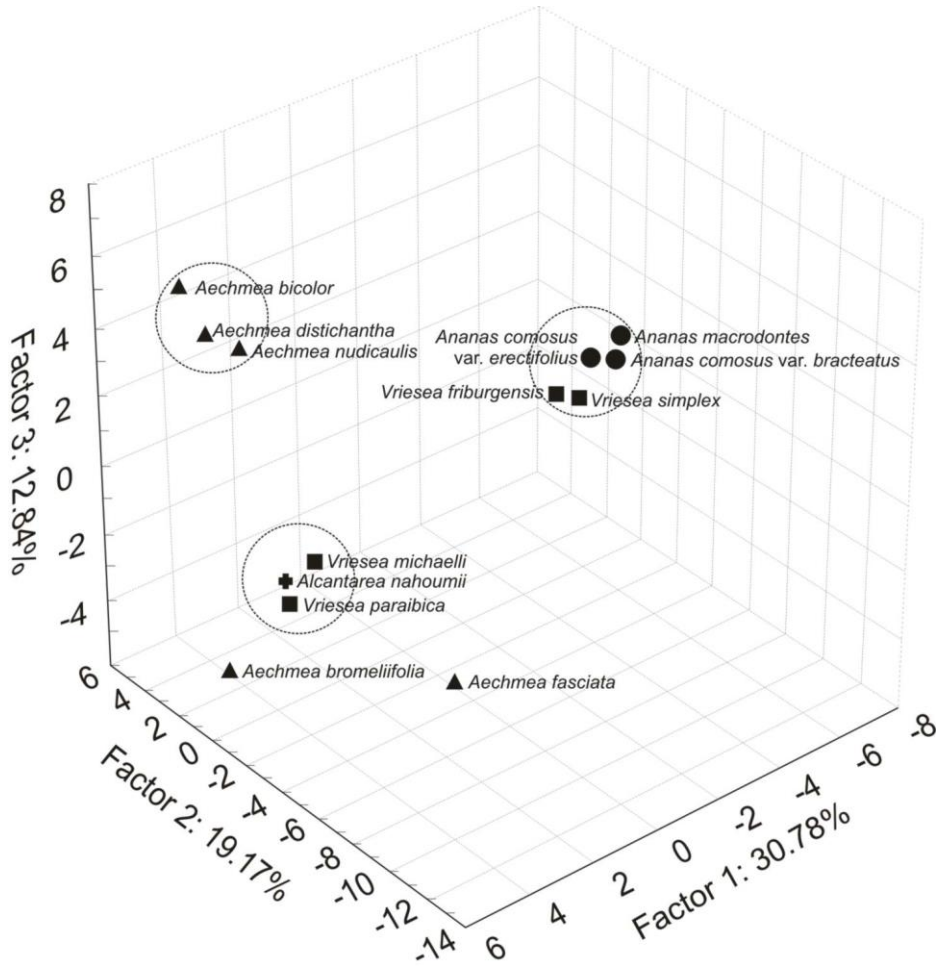


Figura 4.2 - Diagrama de dispersão dos escores associados aos três primeiros componentes principais obtidos por HS-SPME/GC-MS de compostos voláteis em flores de 13 espécies de Bromeliaceae. Os símbolos representam os gêneros das espécies estudadas

7.4. Conclusões

Foram identificados 71 diferentes compostos voláteis e alguns deles com importância na indústria de alimentos, cosméticos, perfumes, indústria química e farmacêutica. A variação no perfil de odor das flores de Bromeliaceae mostra uma grande variabilidade. Estudos futuros utilizando um maior número de espécies de diferentes gêneros, informações morfológicas e a composição dos voláteis associados com os seus polinizadores, podem esclarecer a atração dos mesmos com compostos de odores específicos.

Referências

ACREE, T.; ARN, H. **Flavornet and human odor space**. 2004. Disponível em: <http://www.flavornet.org/> Acessado em: 18 Jul 2013.

APG - Angiosperm Phylogeny Group. 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.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 151-158, 2006.

BARFUSS, M. H. J.; SAMUEL, R.; TILL, W.; STUESSY, T. F. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. **American Journal of Botany**, New York, v. 92, p. 337-351, 2005.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials**. Weinheim Wiley-VCH, 2001. 44 p.

BEHR, A.; JOHNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. **ChemSusChem**, Weinheim, v. 2 p. 1072-1095, 2009.

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

BORDIGA, M.; RINALDI, M.; LOCATELLI, M.; PIANA, G.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J.D.; ARLORIO, M. Characterization of Muscat wines aroma evolution using comprehensive gas chromatography followed by a post-analytic approach to 2D contour plots comparison. **Food Chemistry**, Barking, v. 140, p. 57-67, 2013.

BRECHBILL, G. O. **Classifing aroma chemicals**. Freagrance Book Inc: New Jersey. 2007. 229 p.

CANELA, M. B. F.; SAZIMA, M. The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil: *Ornithophilous* versus *Melittophilous* features. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 411-416, 2005.

CARLELO, W. W.; JACOBSON, M. Phenylacetaldehyde attracts moths to bladder flower and to blacklight traps. **Environmental Entomology**, College Park, v. 8, p. 444-447, 1979.

CHEN, C. Y.; LIN, R. J.; HUANG, J. C.; WU, Y. H.; CHENG, M. J.; HUNG, H. C.; LO, W.L. Chemical constituents from the whole plant of *Gaultheria itoana* Hayata. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 6, p. 1737-1743, 2009.

CHENG, H. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 50, p. 938-950, 2010.

CRUZ, C. D. **Programa genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648 p.

CUEVAS-GLORY, L.; ORTIZ-VAZQUEZ, SAURI-DUCH, E.; PINO, J. A. Characterization of aroma-active compounds in sugar apple (*Annona squamosa* L.). **Acta Alimentaria**, Budaoest, v. 42, p. 102-108, 2013.

CULLERÉ, L.; SIMÓN, B. F.; CADAHÍA, E.; FERREIRA, V.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J. Characterization by gas chromatography-olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. **Food Science and Technology**, London, v. 53, p. 240-248, 2013.

DARJAZI, B. B. A comparison of volatile components of flower of page mandarin obtained by ultrasound-assisted extraction and hydrodistillation. **Journal of Medicinal Plants Research**, Victoria Island, Lagos, v. 5, p. 2839-2847, 2011.

DOBSON, H. E. H. Floral volatile in insect biology**.** In: BERNAYS, E. A. (Ed.). **Insect-plant interations**. CRC Press, Boca raton, 1994.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

FAN, W.; QUIAN, M. C. Characterization of Aroma Compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” Liquors by Aroma Extract Dilution Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 2695-2704, 2006.

FARIA, A. P. G.; WENDT, T.; BROWN, G. K. Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae: Bromelioideae) and allied genera. **Annals of the Missouri Botanical Garden,** St. Louis, v. 91, p. 303-319, 2004.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. S.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (−)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, p. 228-236. 2007.

FORMISANO, C.; SENATORE, F.; PORTA, G. D.; SCOGNAMIGLIO, M.; BRUNO, M.; MAGGIO, A.; ROSSELLI, S.; ZITO, P.; SAJEVA, M. Headspace volatile composition of the flowers of *Caralluma europaea* N.E.Br. (Apocynaceae). **Molecules**, Basel, v. 14, p. 4597-4613, 2009.

GOMEZ, E.; LEDBETTER, C. A.; HARTSELL, P. L. Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, p. 1669-1676, 1993.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 853-860, 2003.

HAN, B.; ZHOU, P.; CUI, L.; FU, J. Characterization of the key aromatic constituents in tea flowers of elite chinese tea cultivar. **International Journal of Tea Science**, New Delhi, India, v. 6, p. 31-36, 2006.

HUANG, C. J.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production of 2-phenylethanol, flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Research International**, Essex, v. 34, p. 277-282, 2001.

JABALPURWALA, F. A.; SMOOT, J. M.; ROUSEFF, R. L. A comparison of citrus blossom volatiles. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, p. 1428-1434, 2009.

JANES, D.; KANTAR, D.; KREFT, S.; PROSEN, H. Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) aroma compounds with GC-MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 120-124, 2009.

KANAAK, N.; FIUZA, L. M. Potential of essential plant oils to control insects and microorganisms. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, p. 120-132, 2010.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 1223-1280, 1994.

LEE, J.; CHAMBERS, D. H.; CHAMBERS, E.; ADHIKARI, K.; YOON, Y. Volatile aroma compounds in various brewed green teas. **Molecules**, Switzerland, v. 18, p. 10024-10041, 2013.

LIU, S. H.; WEI, C. B.; SUN, G. M.; ZANG, X. P. Analysis of aroma components of three ripe pineapple cultivars. **Food Science**, Beijing, China, v. 29, p. 614-617, 2008.

LOGNAY, G.; MARLIER, M.; SECK, D.; HAUBRUGE, E. The occurrence of 2-hydroxy-6-methoxybenzoic acid methyl ester in *Securidaca longepedunculata* Fresen root bark. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Gembloux, v. 4, p. 107-110, 2000.

LUCAS-BARBOSA, D.; LOON, J. J. A.; DICKE, M. The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 72, p. 1647-1654, 2011.

LUTHER. H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.

MAHATTANATAWEE, K.; ROUSEFF, R.; VALIM, M. F.; NAIM, M. Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 393-397, 2005.

PAIBON, W.; YIMNOI, C. A.; TEMBAB, N.; BOONLUE, W.; JAMPACHAISRI, K.; NUENGCHAMNONG, N.; WARANUCH, N.; INGKANINAN, K. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 33, p. 150-156, 2011.

PHI, N. T. L.; NISHIYAMA, C.; CHOI, H. S.; SAWAMURA, M. Evaluation of characteristic aroma compounds of *Citrus natsudaidai* Hayata (Natsudaidai) cold-pressed pell oil. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, p. 1832-1838, 2006.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 237-243, 2002.

PINO, J. A.; QUIJANO, C. E. Study of the volatile compounds from plum (*Prunus domestica* L. cv. Horvin) and estimation of their contribution to the fruit aroma. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, São Paulo, v. 32, p. 76-83, 2012.

QIAO, Y.; XIE, B. J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; FAN, G.; YAO, X. L.; PAN, S. Y. Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of Jinchen sweet orange fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. **Molecules**, Switzerland, v. 13, 1333-1344, 2008.

ROBERT, L.; MEAGHER JUNIOR, R. Trapping noctuid moths with synthetic floral volatile lures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 103, p. 219-226, 2002.

SAWAMURA, M.; MINH TU, N. T.; ONISHI, Y.; OGAWA, E.; CHOI, H. S. Characteristic odor components of *Citrus reticulata* Blanco (Ponkan) cold pressed oil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, p. 1690-1697, 2004.

SAZIMA, I.; VOGEL, S.; SAZIMA, M. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. **Plant Systematics and Evolution,** Vienna, v. 168, p. 167-179, 1989.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat pollination of *Vriesea* in Southeastern Brazil. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 29-37, 1995.

SCHMID, S.; SCHMID, V. S.; ZILLIKENS, A.; HARTER-MARQUES, B.; STEINER, J. Bimodal pollination system of the bromeliad *Aechmea nudicaulis* including hummingbirds and bees. **Plant Biology,** Stuttgart, v. 13, p. 41-50, 2010.

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

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, India, v. 41, p. 237-245, 1981.

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. S. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 15, p. 427-443, 2001.

SIQUEIRA, J. A. F. Biologia floral of *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. **Bromelia**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 3-13, 1998.

SMITH, C. E.; ALLEN, N.; NELSON, O. A. Some chemotropic studies with *Autographa* spp. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 36, p. 619-621, 1943.

STATSOFT INC. **Statistica 7.0. Statsoft®**, Tulsa, OK, 2004.

SUINYUY, T. N.; DONALDSON, J. S.; JOHNSON, S. D. Variation in the chemical composition of cone volatiles within the African cycad genus *Encephalartos*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 85, p. 82-91, 2013.

TOKITOMO, Y. Aroma of pineapple. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, Osaka, Japan, v. 212, p. 949-956, 2007.

TOKITOMO, Y.; STEINHAUS, M.; BUTTNER, A.; SCHIEBERLE, P. Odor-active constituents in fresh pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] by quantitative and sensory evaluation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, p. 1323-1330, 2005.

VERSIEUX, L. M.; BARBARÁ, T.; WANDERLEY, M. G. L.; CALVENTE, A.; FAY, M. F.; LEXER, C. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 64, p. 177-189, 2012.

WANG, Y.; HOSSAIN, D.; PERRY, P. L.; ADAMS, B.; LIN, J. Characterization of volatile and aroma-impact compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L., var. Triumph) fruit by GC-MS and GC-O analyses. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 27, 141-148, 2012.

WEI, C. B.; LIU, S. H.; LIU, Y. G.; LV, L. L.; YANG, W. X.; SUN, G. M. Characteristic aroma compounds from different pineapple parts. **Molecules**, Basel, v. 16, p. 5104-5112, 2011.

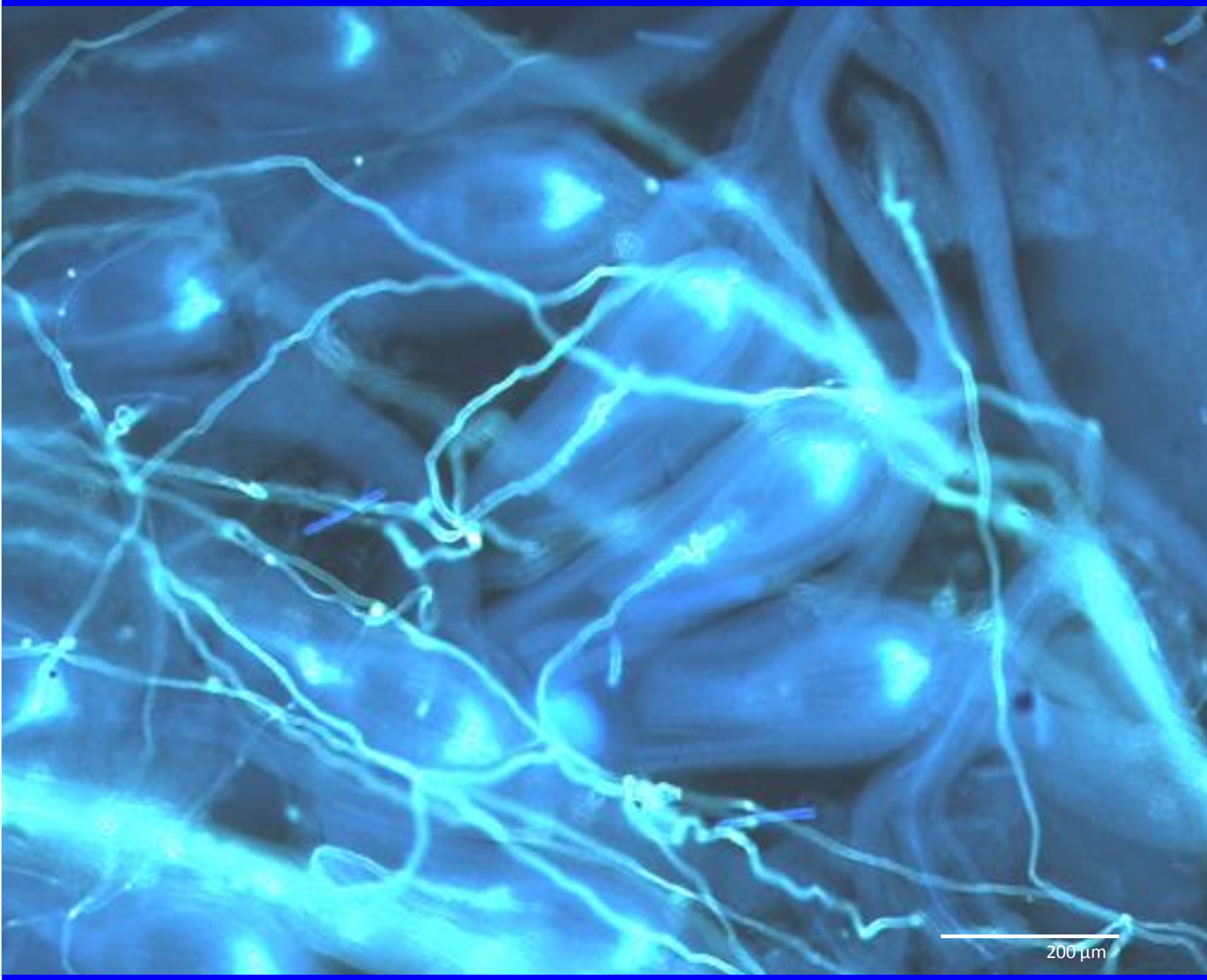
WHETSTINE, M. E. C.; CADWALLADER, K. R.; DRAKE, M. Characterization of Aroma Compounds Responsible for the Rosy/Floral Flavor in Cheddar Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 3126-3132, 2005.

ZEIGER, E. **β-Myrcene**: review of toxicological literature. Research Triangle Park: National Institute of Environmental Health Science, 1997. 50 p.

ZHENG, C. H.; KIM, T. H.; KIM, K. H.; LEEM, Y. H.; LEE, H. J. Characterization of potent aroma compounds in *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland) using aroma extract dilution analysis. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 19, p. 401-405, 2004.

Capítulo 5

Sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas e intergenéricas em Bromeliaceae com potencial ornamental



Vriesea michaelii W. Weber – Fertilização observada em microscopia de fluorescência

8. SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÕES INTERESPECÍFICAS E INTERGENÉRICAS EM BROMELIACEAE COM POTENCIAL ORNAMENTAL

RESUMO

O conhecimento dos sistemas reprodutivos de plantas é de fundamental importância para o melhorista, pois define os métodos que serão utilizados para o melhoramento de determinada espécie. Hibridações permitem criar genótipos com novas combinações de formas e cores, entre outras características, exercendo papel estratégico no desenvolvimento de novas variedades. O presente trabalho teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos de dezessete espécies de bromélias, assim como avaliar a ocorrência de barreiras reprodutivas por meio da avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo, através da fluorescência com azul de anilina. Foram estudadas as espécies: *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas macrodontes*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *Alcantarea nahoumii*, *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. michaelii*, *V. paraibica* e *V. simplex*. Os sistemas reprodutivos foram determinados através de dois índices: Índice de autogamia (IA = polinização espontânea/ polinização cruzada) e Índice de autoincompatibilidade (IAI = autopolinização manual/ polinização cruzada). Mais de 50% das espécies estudadas apresentaram autoincompatibilidade (IAI<0,30): *Ae. bicolor*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *V. carinata* e *V. paraibica*. Entre as espécies autocompatíveis (IAI>0,30), *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha* e *An. macrodontes* apresentaram autogamia (AI>0,30), o que demonstra que essas espécies não necessitam de polinizadores para a fertilização. *Al. nahoumii*, *V. friburgensis*, *V. michaelii* e *V. simplex* não apresentaram autogamia (AI <0,30), necessitando de polinizadores, mesmo para a autopolinização. Agamospermia foi observada em apenas duas espécies, *Ae. bromeliifolia* e *Ae. distichantha*. Cruzamentos controlados foram realizados para avaliar as hibridações interespecíficas e intergenéricas. Noventa e cinco combinações entre 17 espécies de *Aechmea* e *Ananas* (Bromelioideae) e *Alcantarea* e *Vriesea* (Tillandsioideae) foram realizadas. O sucesso nas hibridações corresponde a 33,74%, sendo que 24,96% envolveram as variedades botânicas do gênero *Ananas*. Entre as hibridações intergenéricas, apenas duas combinações foram obtidas com sucesso: *V. michaelii* x *Al. nahoumii* e *V. simplex* x *Al. nahoumii*. As possíveis causas da autoincompatibilidade e incongruência nesses cruzamentos estão relacionadas a diferentes eventos no tubo polínico, como: deposição reticulada de calose no tubo polínico; enovelamento dos tubos polínicos no estilete; paralisação do crescimento do tubo polínico no estilete, entre outros. Sugere-se que a autoincompatibilidade seja gametofítica, evitando a autofertilização. Estudos mais aprofundados contribuirão para caracterizar as causas e as potenciais medidas para superá-la a autoincompatibilidade, visando à eficiência reprodutiva em Bromeliaceae.

Palavras-chave: *Aechmea.* Agamospermia. *Alcantarea.* *Ananas.* Autogamia. Autoincompatibilidade. Barreiras reprodutivas. *Vriesea.*

BREEDING SYSTEM AND INTERSPECIFIC AND INTERGENERIC HYBRIDIZATION IN BROMELIACEAE WITH ORNAMENTAL POTENTIAL

ABSTRACT

Detailed knowledge of the plant reproductive systems is of fundamental importance to the breeder, since it defines the adequate methods for breeding. New genotypes with different colors and forms among other characteristics, can be obtained from hybridizations, with a strategic role in the development of new varieties. This study aimed to identify the reproductive system of seventeen species of bromeliads, and to describe the occurrence of reproductive barriers, through pollen grain germination, and pollen tube growth in the pistil, through aniline blue staining. The following species were studied *Aechmea bicolor*, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas macrodontes*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *Alcantarea nahoumii*, *Vriesea carinata*, *V. friburgensis*, *V. michaelii*, *V. paraibica* and *V. simplex*. The reproductive strategy was described using two indexes: autogamy index (AI = autonomous selfing/cross pollination) and self-incompatibility index (ISI = selfing/cross pollination). More than 50% of the species showed self-incompatibility (ISI<0.30): *Ae. bicolor*, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis*, *Ananas* sp., *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius*, *An. comosus* var. *parguazensis*, *V. carinata* and *V. paraibica*. Among the self-compatible species (ISI>0.30), *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha* and *An. macrodontes* presented autogamy (AI>0.30), demonstrating that these species do not require pollinators for fertilization. *Al. nahoumii*, *V. friburgensis*, *V. michaelii* and *V. simplex* did not need pollinators including for self-pollination, since they do not present autogamy (AI<0.30). Agamospermy was observed only in two species *Ae. bromeliifolia* and *Ae. distichantha*. Controlled crosses were made to evaluate interspecific and intergeneric hybridization. Ninety five combinations among 17 species of *Aechmea* and *Ananas* (Bromelioideae) and *Alcantarea* and *Vriesea* (Tillandsioideae) were tried. The results show 33.74% of success, with 24,96% when botanical varieties of *Ananas* were used. Among the intergeneric crosses, only two combinations were successfull: *V. michaelii* x *Al. nahoumii* e *V. simplex* x *Al. nahoumii.* Possible causes of self-incompatibility and incongruence in these crosses are related to the pollen tube growth, such as reticulate callose deposition; pollen tube growth is halted at a certain region of the style; pollen tubes lose directional growth at a certain region of the style and tube grow in random directions in the style, among others. We suggest that the self-incompatibility is gametophytic, preventing self-fertilization. More detailed studies will contribute to characterize the causes and potential solutions to overcome self-incompatibility, aiming at higher reproductive effecting in Bromeliaceae.

Keywords: *Aechmea.* Agamospermy*. Alcantarea. Ananas.* Autogamy. Reproductive barriers. Self-incompatibility. *Vriesea.*

8.1. Introdução

A família Bromeliaceae Juss, pertence à ordem Poales (APG III, 2009), possui cerca de 58 gêneros e mais de 3.352 espécies com grande diversidade de cores, formas, tamanhos e sistemas reprodutivos (BENZING, 2000; LUTHER, 2012). O conhecimento dos sistemas reprodutivos das espécies é de fundamental importância para o melhoramento genético, estudos de evolução e biologia da conservação (PAGGI et al., 2012).

As bromélias desempenham um importante papel ecológico nos ecossistemas naturais (BENZING, 2000), além de apresentar diferentes potenciais de uso como: plantas ornamentais (STEENS, 2003; SOUZA et al., 2009a; NEGRELLE; MITCHELL; ANACLETO, 2012; SOUZA et al., 2012); na alimentação, como é o caso do abacaxizeiro (CRESTANI et al., 2010; FAO, 2013); produção de fibras para fabricação de cordas e tecidos; na indústria automotiva e para a fabricação de papel (TICKTIN; NANTEL, 2004; ZAH et al., 2007; LEÃO et al., 2009; FERREIRA et al., 2010), bem como para a produção de enzimas de ação proteolítica e metabólitos secundários com atividades biológicas antioxidantes e de grande valor para a indústria farmacêutica e cosmética (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE JUNIOR, 2009; FERREIRA et al., 2011).

A busca por novas espécies de plantas ornamentais tem crescido muito nos últimos anos, principalmente, aquelas marcadas pela originalidade, durabilidade e beleza. A inovação na floricultura pode ocorrer pela identificação de novos materiais genéticos com potencial ornamental, ou pela geração de novos híbridos a partir de programas de melhoramento genético de espécies já descritas.

A hibridação é uma importante fonte de variação genotípica (VERVAEKE et al., 2002; 2003; 2004; VERVAEKE, DEROOSE; DE PROFT, 2003). Hibridações interespecíficas e intergenéricas permitem criar genótipos com novas combinações de formas e cores (VERVAEKE et al., 2001; 2004) exercendo papel estratégico no desenvolvimento de novas variedades ornamentais. O sucesso na hibridação interespecífica e intergenérica depende da viabilidade dos cruzamentos, e obtenção de sementes viáveis.

A ausência de espinhos em bromélias é uma característica desejável para consumidores e produtores, facilitando o manejo e a comercialização das plantas (VERVAEKE; DEROOSE; DE PROFT, 2003). As espécies pertencentes a subfamília

Tillandsioideae não possuem espinhos, enquanto nas demais subfamílias, estas estruturas são altamente frequentes (BENZING, 2000). Os gêneros com maior apelo comercial são *Guzmania*, *Neoregelia, Tillandsia*, *Vriesea*, (Tillandsioideae), *Aechmea* e *Ananas* (Bromelioideae) (ANDRADE; DEMATTÊ, 1999; SANTOS; BITTENCOURT; NOGUEIRA, 2005), onde a grande maioria não apresenta espinhos. As plantas com espinhos normalmente são comercializadas para uso em paisagismo.

Hibridações em Bromeliaceae têm sido relatadas desde 1879, com o relato da primeira hibridação utilizando espécies do gênero *Vriesea* (SAMYN, 1995). Outros relatos de hibridações interespecíficas e intergenéricas foram apresentados por Smith e Downs (1974), Wendt et al. (2000; 2001; 2002), Vervaeke, Deroose e De Proft (2003), Rôcas, Klein e Mattos (2004), Vervaeke et al. (2004), Gonçalves e Azevedo-Gonçalves (2009), Souza et al. (2009a), Souza (2010), envolvendo os gêneros *Aechmea, Ananas, Bilbergia, Canistrum, Guzmania, Neoregelia, Nidularium, Pitcairnia, Quesnelia*, e *Tillandsia*. No entanto, apesar de registros já existentes, apenas uma pequena porcentagem entre as numerosas combinações possíveis em Bromeliaceae já foi testada, e dentre elas, nem todas têm apresentado sucesso devido às barreiras reprodutivas.

As barreiras reprodutivas resultam na incapacidade total ou parcial de espécies se cruzarem ou autofertilizarem e resultam de incompatibilidade ou incongruência. A incompatibilidade é o mecanismo em que a atividade do alelo-S resulta em uma barreira no estigma (incompatibilidade esporofítica) ou no estilete (incompatibilidade gametofítica). A incongruência ocorre em cruzamentos interespecíficos como resultado da falta de informação genética de uma das espécies necessárias para completar a fertilização (HOGENBOOM, 1973; PARTON et al., 2001). Dentre as informações genéticas necessárias para obtenção de sucesso na fertilização estão os estudos de incompatibilidade alélica (alelo-S) (TAKAYAMA; ISOGAI, 2005), estrutura citogenética, posição taxonômica e relações filogenéticas (TECHIO et al., 2008), entre outras. Essas informações são fundamentais para um planejamento estratégico no melhoramento genético de plantas.

Dentre as barreiras reprodutivas, existem ainda as barreiras associadas ao polimorfismo floral, como no caso das espécies que apresentam pistilo mais longo e estames mais curtos, dificultando assim a reprodução (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

A autoincompatibilidade é um mecanismo reprodutivo presente na maioria das angiospermas para evitar a autogamia e promover a alogamia, desta forma contribuindo para a manutenção e aumento da diversidade genética (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002; ZHANG; ZHAO; XUE, 2009; BANDEIRA et al., 2011). Esse mecanismo é uma das principais barreiras reprodutivas para programas de melhoramento genético que buscam a obtenção de novos cultivares (BANDEIRA et al., 2011). Na autoincompatibilidade gametofítica, os tubos polínicos incompatíveis têm o seu crescimento cessado no estilete e a especificidade do grão de pólen é gerada pelo alelo-S do genoma haploide do gametófito, já na autoincompatibilidade esporofítica a inibição da germinação do grão de pólen ocorre na superfície do estigma e a especificidade dos grãos de pólen é determinada pelo genótipo diploide do esporófito (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Em Bromeliaceae existem diferentes sistemas reprodutivos e a autoincompatibilidade é frequente e relatada em diversos trabalhos (HIETZ et al., 2006, VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006; RAMÍREZ-MORTILLO et al., 2009; MATALLANA et al., 2010; WOLOWSKI et al., 2013). Alguns autores citam essa incompatibilidade, como sendo gametofítica (BREWBAKER; GORREZ, 1967; VERVAEKE et al., 2001; COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 2011; WOLOWSKI et al., 2013), devido à inibição observada dos tubos polínicos no estilete. Uma síntese sobre o assunto pode ser obtida em Matallana et al. (2010). Muitas espécies apresentam alogamia como sistema reprodutivo preferencial, além de serem dependentes de agentes polinizadores para a polinização (SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001; CASCANTE-MARIN et al., 2005; LENZI; MATTOS; ORTH, 2006; MATALLANA et al., 2010).

Técnicas de microscopia de fluorescência com anilina azul permitem analisar características associadas à germinação dos grãos de pólen e suas taxas de crescimento do tubo polínico, servindo também para analisar hibridações em programas de melhoramento genético e, assim, elucidar algumas formas de incompatibilidade ou incongruência (BANDEIRA et al., 2011).

Diversas técnicas para superar as barreiras reprodutivas foram descritas por Van Tuyl e De Jeu, (1997) e Vervaeke et al. (2002), destacando-se a polinização a partir de cortes no estilete, enxertia no estilete e polinização placentária. Desta forma, é importante conhecer o

local exato das barreiras e o que ocorre em casa espécie, para posterior utilização de técnicas a fim de superar essas barreiras.

A falta de sincronia no período de florescimento em bromélias é outro entrave na realização de hibridações, já que algumas espécies florescem de forma regular e espontânea, enquanto outras necessitam o emprego de indutores florais (SOUZA et al., 2009b). A indução e sincronização do florescimento em bromélias utilizando etileno já vem sendo realizada, principalmente para as espécies dos gêneros *Ananas*, *Aechmea*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Tillandsia* e *Vriesea* (MEKERS; PROFT; JACOBS, 1983, ALMEIDA et al., 2003, DUKOVSKI; BERNATZKY; HAN, 2006; SOUZA et al., 2009b).

O presente trabalho teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos de dezessete espécies de bromélias, assim como, avaliar as possíveis barreiras reprodutivas a partir de hibridações interespecíficas e intergenéricas por meio da observação e avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo visando a produção de híbridos de Bromeliaceae.

8.2. Material e Métodos

Foram estudadas 17 espécies e/ou variedades botânicas de Bromeliaceae, sendo que um exemplar de cada foi depositado no herbário ESA (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo - Esalq/ USP): *Ae. bicolor* L. B. Sm. (voucher ESA 120990), *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f. (ESA 121275), *Ae. distichantha* Lem. (ESA 121281), *Ae*. *fasciata* Baker (ESA 120987), *Ae*. *nudicaulis* Griseb. (ESA 120991), *Ananas macrodontes* E. Morren (ESA 121286), *Ananas* sp. (L.) Merr. (ESA 120988), *An. comosus* (L.) Merr. var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (ESA 121274), *An. comosus* (L.) Merr. var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & F. Leal (ESA 121284), *An. comosus* (L.) Merr. var. *erectifolius* (L. B. Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121285), *An. comosus* (L.) Merr. var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Sm.) Coppens & F. Leal (ESA 121405), *Alcantarea nahoumii* (Leme) J. R. Grant (ESA 120986), *Vriesea carinata* Wawra (ESA 121404), *V. friburgensis* Mez (ESA 121282), *Vriesea michaelii* W. Weber (ESA 121280), *V. paraibica* Wawra (ESA 121276) e *V. simplex* Beer (ESA 120989). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos plásticos (13 cm de

altura por 10 cm de diâmetro) com substrato Basaplant®, sob temperatura ambiente e umidade relativa de 70%, no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

O florescimento foi induzido através da pulverização de 30 mL de solução de Ethrel® (etefon) a 240 mg mL^{-1}, na roseta de cada planta, conforme metodologia empregada por Souza et al. (2009b). O início do florescimento foi considerado com a emergência do botão da inflorescência. Avaliou-se no decorrer dos dias os seguintes estádios de desenvolvimento após o tratamento com indutor floral. Estádio 1: emissão da inflorescência (botão); Estádio 2: abertura da primeira flor; Estádio 3: abertura da última flor. Diferentes quantidades de plantas foram usadas para os ensaios de indução, variando de cinco a vinte, como consta na Tabela 5.1.

Sistemas reprodutivos

Polinizações controladas foram realizadas para determinar o sistema reprodutivo: polinização espontânea (flores protegidas sem emascular); autopolinização manual (flores polinizadas manualmente com grãos de pólen da mesma flor); polinização cruzada (flores anteriormente emasculadas e posterior polinização com grãos de pólen de outro indivíduo da mesma espécie) e agamospermia (emasculação das flores, sem deposição de grãos de pólen). As polinizações controladas foram realizadas sempre às 8:00 h (antese) e para cada tratamento foram utilizados quantidades de flores diferentes, como consta na Tabela 5.2. As flores foram etiquetadas, contendo as informações de cada tratamento.

O índice de autogamia (IA) foi calculado para cada espécie, dividindo-se o percentual de frutos formados em flores a partir da polinização espontânea pelo percentual de frutos formados em flores de polinizações cruzadas. Espécies são consideradas autógamas ou parcialmente autógamas, quando o índice de autogamia é superior a 0,30, e para espécies não-autógamas o valor de IA deve ser inferior a 0,30 (RAMIREZ; BRITO, 1990).

O índice de autoincompatibilidade (IAI) foi calculado dividindo-se o percentual de frutos formados em flores a partir da autopolinização manual, pelo percentual de frutos formados em flores de polinização cruzada. Espécies compatíveis e parcialmente compatíveis o IAI deve ser superior a 0,30, e para espécies autoincompatíveis o valor de IAI deve ser inferior a 0,30 (RAMIREZ; BRITO, 1990).

Hibridações interespecíficas e intergenéricas

Foram realizadas 1.206 hibridações interespecíficas e intergenéricas em 95 diferentes combinações envolvendo 17 espécies pertencentes a quatro gêneros *Aechmea* e *Ananas* (Bromelioideae) e *Alcantarea* e *Vriesea* (Tillandsioideae) (Tabela 5.3). Nas plantas receptoras de grãos de pólen, as anteras foram removidas e as flores ensacadas na pré-antese, evitando-se a autopolinização e a contaminação por grãos de pólen de outras espécies. Grãos de pólen das espécies doadoras foram depositados no estigma das flores emasculadas. Após este processo, as flores foram etiquetadas e novamente protegidas com sacos de pano para evitar contaminação por outras espécies. Foram avaliados o número de frutos e sementes por fruto produzidos em cada cruzamento.

Desenvolvimento do tubo polínico no estigma

Dez pistilos de plantas de cada tratamento (autopolinização manual, polinização cruzada entre indivíduos da mesma espécie e hibridações envolvendo diferentes parentais) foram coletados 24 horas após as polinizações, fixados em solução Carnoy [3 partes de etanol (95%) : 1 parte de ácido acético glacial], por 48 horas, clarificados em solução de sulfito de sódio (10%) onde o mesmo foi autoclavado por 20 minutos, a 120 ^{o}C, com o intuito de clarificar e amolecer os tecidos. A coloração foi feita com solução de azul de anilina (0,01%) em tampão de fosfato tribásico, overnight. Para se verificar a germinação dos grãos de pólen no estigma e o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do pistilo utilizou-se microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta (MARTIN, 1959; YI et al., 2006). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Axioskop2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para avaliar o crescimento do tubo polínico no pistilo, foram consideradas regiões pré-determinadas segundo o trabalho de Bandeira et al. (2011): tubo polínico no estigma, sem crescimento no estilete; tubo polínico no primeiro terço do estilete; tubo polínico no segundo terço do estilete; tubo polínico no terceiro terço do estilete; tubo polínico no interior do ovário; tubo polínico próximo ao óvulo; tubo polínico penetrando na micrópila.

Germinação das sementes

As sementes geradas nas hibridações envolvendo os gêneros *Aechmea*, *Alcantarea* e *Vriesea* e o genótipo *Ananas* sp. foram estabelecidas em placa de Petri contendo meio de cultura com metade das concentrações de sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) de

acordo com metodologia descrita por Souza et al. (2009c). Enquanto que, as demais sementes do gênero *Ananas* foram semeadas em bandejas de 96 células com substrato Basaplant®.

8.3. Resultados e Discussão

A dose de 240 mg mL^{-1} de etefon foi adequada para todas as espécies estudadas, respondendo à indução floral acima de 80%, sendo que 14 espécies responderam 100% ao florescimento (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Características do florescimento de diferentes espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl após a indução ao florescimento com 30 mL de solução de ethrel® (etefon) a 240 mg mL^{-1}

Espécies/ Variedades	Número de plantas	Florescimento (%)	Fase de botão (dias)	Abertura 1ª Flor (dias)	Abertura última flor (dias)
Aechmea bicolor	15	100	56 ± 3	76 ± 4	92 ± 4
Ae. bromeliifolia	15	100	55 ± 2	62 ± 2	78 ± 4
Ae. distichantha	15	80	60 ± 3	70 ± 3	91 ± 3
Ae. fasciata	15	100	42 ± 2	56 ± 3	76 ± 4
Ae. nudicaulis	20	100	40 ± 1	52 ± 1	59 ± 2
Ananas macrodontes	10	100	50 ± 2	65 ± 3	90 ± 5
Ananas sp.	20	100	44 ± 1	60 ± 2	71 ± 2
An. comosus var. *ananassoides*	15	100	43 ± 2	63 ± 3	75 ± 3
An. comosus var. *bracteatus*	10	100	48 ± 2	72 ± 2	81 ± 3
An. comosus var. *erectifolius*	10	100	45 ± 2	65 ± 2	74 ± 4
An. comosus var. *parguazensis*	5	100	44 ± 2	63 ± 2	72 ± 4
Alcantarea nahoumii	15	90	70 ± 6	142 ± 8	172 ± 9
Vriesea carinata	15	100	58 ± 2	109 ± 4	135 ± 4
V. friburgensis	15	80	75 ± 4	133 ± 3	165 ± 2
V. michaelii	15	100	60 ± 3	125 ± 5	142 ± 3
V. paraibica	15	100	60 ± 4	118 ± 3	143 ± 4
V. simplex	15	100	45 ± 3	120 ± 2	133 ± 4

As plantas que não foram tratadas com etefon, não floresceram durante todo o período de avaliação do experimento, confirmando a importância deste procedimento no planejamento das hibridações e principalmente para fins comerciais dessas espécies.

O florescimento mais precoce e o mais rápido desenvolvimento da flor foi observado nas espécies do gênero *Aechmea* e variedades de *Ananas* tanto na fase de botão quanto no florescimento completo. A espécie mais precoce foi a *Ae. nudicaulis* que aos 40 ± 1 dias já apresentava a emergência do botão e aos 59 ± 2 dias o florescimento completo.

As espécies mais tardias são as do gênero *Vriesea* e *Al. nahoumii*, como no caso da *V. friburgensis,* que a emergência do botão se deu aos 75 ± 4 dias, 133 ± 3 dias para a abertura da primeira flor e 165 ± 2 dias para a abertura da última flor. Neste gênero a *V. carinata* apresentou uma maior precocidade, mesmo sendo superior às espécies dos gêneros *Aechmea* a *Ananas*, com 58 ± 2 dias para a formação de botão; 109 ± 4 dias para a abertura da primeira flor e 135 ± 4 dias para a abertura da última flor.

Black e Dehgan (1994), afirmam que o florescimento de bromélias ocorre entre 6 e 16 semanas após a aplicação do indutor e que esta variação depende do gênero, produto aplicado e concentração, condições ambientais e idade da planta. Mekers, Proft e Jacobs (1983), usando 1000 ppm de etefon em plantas de *Ae. fasciata* obtiveram 100% de florescimento após 90 dias. Eccher e Mignani (1977), por sua vez, observaram a necessidade de maior concentração, 2000 ppm de etefon para obter elevadas taxas de florescimento em plantas da mesma espécie, em um período de 50 dias. As variações observadas entre as espécies evidenciam a necessidade de desenvolvimento de protocolos específicos em cada situação.

As diferentes respostas estão relacionadas aos fatores envolvidos nos mecanismos de florescimento, como a idade da planta, as condições ambientais, principalmente luz e temperatura, necessitando de diferentes tempos de exposição ao etileno para que a indução ao florescimento ocorra (ECCHER; MIGNANI, 1977; DUKOVSKI; BERNATZKY; HAN, 2006).

O estádio fisiológico da planta é um dos fatores mais importantes a serem considerados para os procedimentos de indução floral, sendo conveniente respeitar a maturação fisiológica de cada espécie, evitando anormalidades e diminuição no tamanho e qualidade das inflorescências (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992).

No presente trabalho as inflorescências produzidas em todas as espécies foram morfologicamente normais, com cores pronunciadas e dentro dos padrões esperados para as espécies em estudo.

Os resultados obtidos permitem, portanto, planejar o florescimento de forma sincrônica entre as espécies e possibilitando a realização de hibridações entre as mesmas, o que não seria possível no sistema natural, devido a assincronia de florescimento existente.

Sistemas reprodutivos

Mais de 50% das espécies estudadas apresentaram autoincompatibilidade (IAI < 0,30). Dentre essas, *Ae. bicolor*, *Ae. nudicaulis* e *Ananas* sp. não apresentaram frutos e sementes (Tabela 5.2).

As variedades botânicas de abacaxi*, An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius* e *An. comosus* var. *parguazensis* produziram poucas sementes. Em contra partida, *An. macrodontes* apresentou 100% de formação de frutos e número de sementes superior às demais variedades do *Ananas comosus* em todos os sistemas reprodutivos (Tabela 5.2). Coppens d'Eeckenbrugge et al. (2011) descrevem o sistema de reprodução do gênero *Ananas* como pseudo autoincompatível do tipo gametofítico, com inibição de crescimento do tubo polínico no terço superior do estilete. Esses autores relataram que as cultivares de *An. comosus* var. *comosus* são fortemente autoincompatíveis, no entanto, outras variedades de *Ananas* apresentam reduzida autoincompatibilidade, produzindo poucas sementes.

Entre as espécies autocompatíveis, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha* e *An. macrodontes* apresentaram autogamia (autopolinização espontânea) (IA > 0,30), o que demonstra que essas espécies não necessitam de agentes polinizadores para a fertilização. Por outro lado, *Al. nahoumii*, *V. friburgensis*, *V. michaelii* e *V. simplex* necessitam de polinizadores para a fertilização mesmo para a autopolinização.

As espécies autocompatíveis que não realizam autopolinização espontânea apresentaram o pistilo mais longo do que os estames, dificultando a deposição dos grãos de pólen no estigma. Nas espécies que apresentaram autopolinização espontânea, as anteras estão posicionadas ao redor do estigma.

Na incompatibilidade gametofítica, os grãos de pólen germinam no estigma, mas o crescimento do tubo polínico é paralisado no estilete e/ou ovário (NEWBIGIN; ANDERSON; CLARKE, 1993) ao contrário da incompatibilidade esporofítica, no qual o desenvolvimento dos grãos de pólen é paralisado no estigma sem a penetração no estilete (NASRALLAH; NASRALLAH, 1993). No entanto, estudos fisiológicos e moleculares mais aprofundados para o conhecimento da autoincompatibilidade em Bromeliaceae são necessários.

Tabela 5.2 - Produção de frutos e sementes em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl., sob diferentes tratamentos de polinização

	Frutos produzidos *				Sementes produzidas **				Índices		
Espécies/ Variedades	Polinização espontânea	Autopolinização manual	Polinização cruzada	Agamospermia	Polinização espontânea	Autopolinização manual	Polinização cruzada	Agamospermia	IA	IAI	Sistema de Reprodução
Aechmea bicolor	0 (0/162)	0 (0/96)	95,34(82/86)	0 (0/25)	0	0	133,33 (25)	0	0,00	0,00	AI
Ae. bromeliifolia	100 (100/100)	100 (100/100)	100 (75/75)	16,66(5/30)	18,23 (25)	20,12 (25)	21,15 (25)	6 (5)	1,00	1,00	AC(A)
Ae. distichantha	21,95 (18/82)	33,33 (32/96)	70,83 (51/72)	8 (2/25)	28,73 (10)	46,54 (10)	74,12 (25)	8 (2)	0,31	0,47	AC(A)
Ae. fasciata	0 (0/75)	5,62 (5/89)	59,55 (53/89)	0 (0/25)	0	47,68 (5)	173,22 (25)	0	0,00	0,09	AI
Ae. nudicaulis	0 (0/145)	0 (0/105)	96,66 (87/93)	0 (0/25)	0	0	145,15 (25)	0	0,00	0,00	AI
Ananas macrodontes	100 (23/23)	100 (28/28)	100 (45/45)	0 (0/45)	6,74 (23)	8,23 (28)	9,18 (42)	0	1,00	1,00	AC(A)
Ananas sp.	0 (0/45)	0 (0/37)	0 (0/41)	0 (0/31)	0	0	0	0	0,00	0,00	AI
var. *ananassoides*	0 (0/46)	9,52 (4/42)	93,33 (42/45)	0 (0/33)	0	1,10 (4)	8,23 (42)	0	0,00	0,10	AI
var. *bracteatus*	0 (0/57)	2,90 (2/69)	100 (62/62)	0 (0/62)	0	1,50 (2)	11,24 (62)	0	0,00	0,03	AI
var. *erectifolius*	0 (0/31)	2,63 (1/38)	100 (38/38)	0 (0/29)	0	1,00 (1)	6,21 (38)	0	0,00	0,03	AI
var. *parguazensis*	0 (0/23)	9,52 (2/21)	69,56 (16/23)	0 (0/21)	0	1,00 (2)	9,43 (16)	0	0,00	0,14	AI
Alcantarea nahoumii	0 (0/22)	53,33 (8/15)	87,50 (14/16)	0 (0/12)	0	228,76 (8)	328,18 (10)	0	0,00	0,61	AC
Vriesea carinata	0 (0/15)	6,66 (1/15)	81,25 (13/15)	0 (0/8)	0	106,23 (1)	302,48 (10)	0	0,00	0,08	AI
V. friburgensis	13,04 (3/23)	72,72 (16/22)	88,46 (23/26)	0 (0/15)	43,46 (3)	223,72 (10)	318,42 (10)	0	0,15	0,82	AC
V. michaelii	0,04 (1/25)	86,66 (13/15)	100 (15/15)	0 (0/8)	53,12 (1)	228, 34 (10)	285,13 (10)	0	0,00	0,87	AC
V. paraibica	0 (0/12)	13,33 (2/15)	57,14 (8/14)	0 (0/5)	0	103,41 (2)	387,18 (10)	0	0,00	0,23	AI
V. simplex	14,28 (4/21)	38,88 (7/18)	60,00 (18/30)	0 (0/11)	104,18 (4)	204,76 (10)	672,18 (10)	0	0,23	0,65	AC

* Porcentagem de frutos obtidos. ** Média de sementes obtidas por flor. O número de frutos produzidos/ número de flores utilizadas são apresentados entre parêntesis.
Os sistemas reprodutivos são determinados através de dois índices: Índice de autogamia (IA = polinização espontânea/ polinização cruzada) e Índice de autoincompatibilidade (IAI = autopolinização manual/ polinização cruzada). IAI é determinado como autoincompatível quando o IAI é inferior a 0,30, e autocompatíveis ou parcialmente autocompatível (AC) quando os índices do IAI foram superior a 0,30. A letra (A) entre parênteses indica um índice autogamia superior a 0,30

Como resultado da polinização cruzada registrou-se que 94,11% das espécies formaram frutos e que o número de sementes produzido foi superior em relação aos demais sistemas de reprodução avaliados (Tabela 5.2). A polinização cruzada é considerada importante para a manutenção das espécies, pois promove o fluxo gênico entre os indivíduos, aumentando a variabilidade genética (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006).

Agamospermia foi observada em apenas duas espécies, *Ae. bromeliifolia* e *Ae. distichantha,* com pequena porcentagem de frutos formados e número reduzido de sementes (Tabela 5.2). A formação de frutos nos tratamentos de agamospermia indica que a reprodução assexuada pode ocorrer nessas espécies. As poucas sementes obtidas apresentaram tamanho inferior e germinação mais lenta, quando comparadas às sementes oriundas dos demais mecanismos de polinização. Na literatura, baixa produção de frutos e sementes por agamospermia foram relatados, como no gênero *Pitcairnia* com média de 17,95% de frutos produzidos (WENDT et al., 2001) e na espécie *Ae. distichantha* com 10% de frutos formados (SCROK; VARASSIN, 2011).

Embora agamospermia tenha sido relatada em algumas espécies de Bromeliaceae (WENDT et al., 2001; 2002; LENZI; MATOS; ORTZ, 2006; ROGALSKI et al., 2009; SCROK; VARASSIN, 2011), a possibilidade de contaminação por grão de pólen na superfície do estigma antes da abertura da flor não pode ser descartada, devido à proximidade das anteras e o estigma e a dificuldade de emasculação, pelo tamanho reduzido das flores. A descrição da ontogênese embrionária é necessária para confirmar a ocorrência de agamospermia.

Diferentes eventos no desenvolvimento do tubo polínico no pistilo caracterizaram a autoincompatibilidade nas diferentes espécies estudadas (Figura 5.1).

Todas as espécies apresentaram boa germinação dos grãos de pólen e início do desenvolvimento do tubo polínico no estilete, com exceção de *Ananas* sp. onde a maioria dos grãos de pólen não germinaram no estigma (Figura 5.1 E). Baixa germinação e viabilidade de grãos de pólen foi observada em *Ananas* sp. (SOUZA et al., 2011), sugerindo a baixa potencialidade deste genótipo para hibridações. Os poucos grãos que germinaram cessaram o crescimento no início do primeiro terço do estilete.

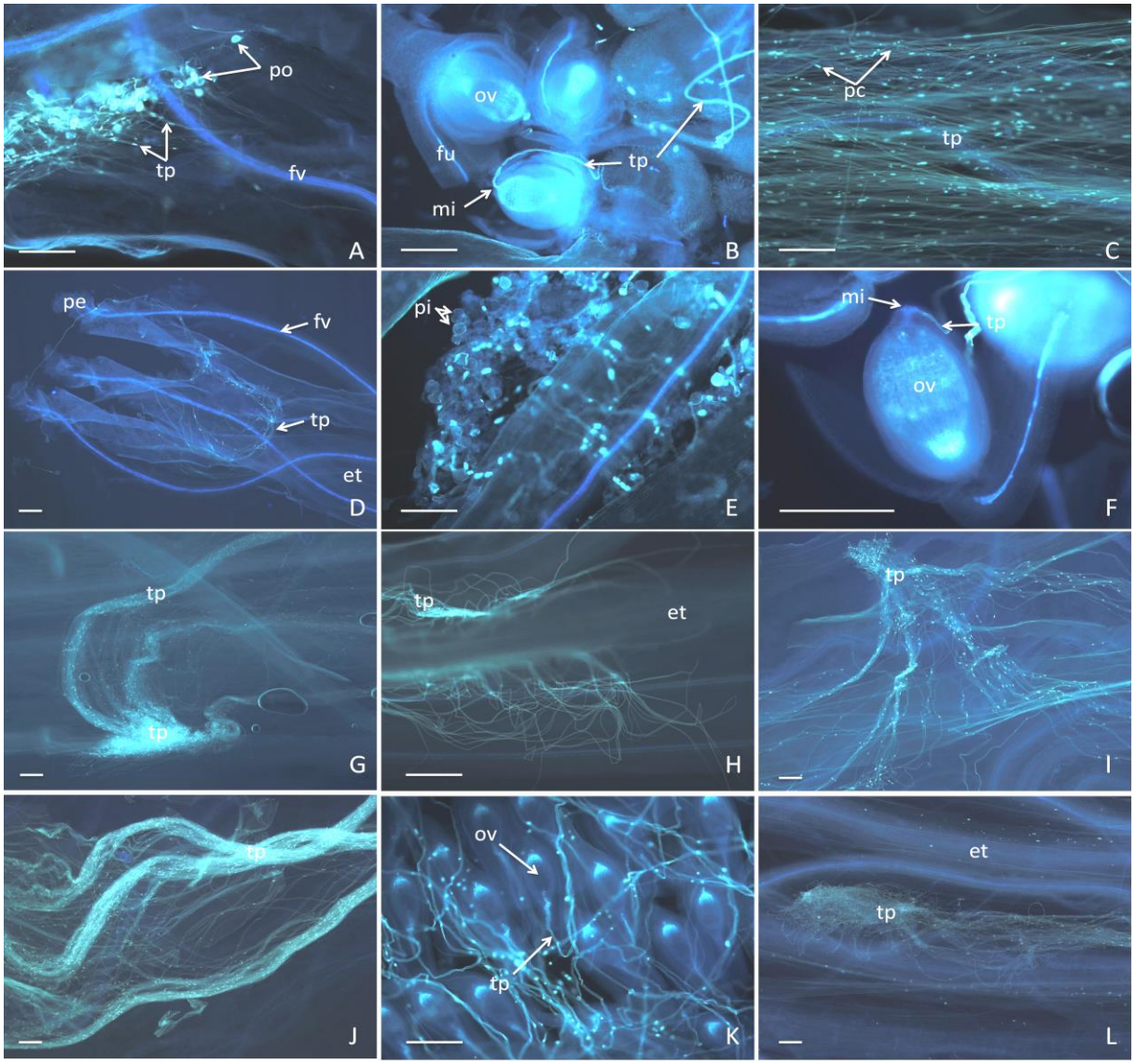


Figura 5.1 - Crescimento do tubo polínico após autopolinização manual no estigma observado através de microscopia de fluorescência em pistilos tratados com solução de azul de anilina em Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl. A) *Ae. bicolor* L. B. Sm, evidenciando a paralisação do tubo polínico no início do primeiro terço do estilete. B) *Ae. bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hook. f., evidenciando a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização. C) *Ae. distichantha* Lem., evidenciando feixes de tubos polínicos com distribuição regular de calose. D) *Ae. nudicaulis* Griseb., evidenciando tubos polínicos crescendo e enovelando no primeiro terço do estilete. E) *Ananas* sp. (L.) Merr., evidenciando grãos de pólen inviáveis e grãos de pólen germinando e cessando seu crescimento no estigma com deposição de calose na base do tubo polínico. F) *An. macrodontes* E. Morren, evidenciando a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização. G) *Al. Nahoumii* (Leme) J. R. Grant, evidenciando o enovelamento dos tubos polínicos no final do primeiro terço do estilete. H) *V. carinata* Wawra, evidenciando a paralisação do crescimento dos tubos polínicos no final do primeiro terço do estilete. I) *V. friburgensis* Mez, evidenciando parte dos tubos polínicos enovelados e parte seguindo o crescimento no estigma. J) *V. michaelii* W. Weber, evidenciando os feixes de tubos polínicos. K) *V. michaelii* W. Weber, evidenciando a

penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização. L) *V. simplex* Beer, evidenciando o enovelamento dos tubos polínicos no final do primeiro terço do estilete. fu = funículo, fv = feixe vascular, mi = micrópila, ov = óvulo, pc = placas de calose, pe = papilas estigmáticas, pi = grãos de pólen inviáveis, po = grãos de pólen, et = estilete, tp = tubo polínico. Barras = 200 μm

Ae. bicolor, *Ae. fasciata*, *Ae. nudicaulis* e *Al. nahoumii* apresentaram germinação dos grãos de pólen no estigma e posterior enovelamento do tubo polínico no primeiro terço do estilete. Em *V. paraibica* este enovelamento ocorreu no final do segundo terço do estilete. Para *An. comosus* var. *ananassoides*, *An. comosus* var. *bracteatus*, *An. comosus* var. *erectifolius* e *V. carinata*, observou-se que os grãos de pólen germinaram e o crescimento do tubo polínico cessou de forma desorientada no final do primeiro terço do estilete (Figura 5.1).

Nas espécies *V. friburgensis* e *V. simplex* observaram-se que o crescimento do tubo polínico cessou de forma desorientada no final do segundo terço do estilete, em 70% dos pistilos estudados, enquanto 30% conseguiram chegar ao ovário sem a penetração do tubo polínico na micrópila (Figura 5.1). Esses resultados estão de acordo com os estudos dos sistemas reprodutivos (Tabela 5.2), mostrando que essas espécies são autocompatíveis e apresentam alguma taxa de incompatibilidade, além de um número reduzido de sementes pela autopolinização.

Para as espécies autoincompatíveis foram observadas deposição de calose de forma reticulada nos tubos polínicos (Figura 5.1 D), enquanto nas espécies autocompatíveis essa deposição foi regular (Figura 5.1 C). Em todas as variedades botânicas do gênero *Ananas* foi observado um tampão de calose no final do tubo polínico.

Diferentes deposições de calose foram descritas em cruzamentos interespecíficos e intergenéricos em Bromeliaceae (VERVAEKE et al., 2001), mas não se sabe exatamente se a deposição de calose é a causa da inibição do crescimento do tubo polínico (Figura 5.1 E).

É de conhecimento que a deposição de calose participa na manutenção da pressão de turgescência, tensões mecânicas e manutenção do equilíbrio osmótico no tubo polínico e ajuda na penetração do mesmo no estigma, uma síntese sobre o assunto pode ser obtida em Ünal, Vardar e Artürk (2013).

Hibridações interespecíficas e intergenéricas

O sucesso obtido nas hibridações corresponde a 33,74%, sendo que 24,96% envolveram as variedades botânicas do gênero *Ananas*. Falhas na obtenção de híbridos podem ser resultado de barreiras pré-zigóticas, as quais ocorrem pela incapacidade de germinação do grão de pólen no estigma, ou pela inibição do crescimento do tubo polínico no estilete (VERVAEKE et al., 2002) ou pela existência de barreiras pós-zigóticas, que resultam na não fertilização ou aborto do embrião em diferentes fases de desenvolvimento, desde as primeiras divisões embrionárias até a maturidade (VERVAEKE et al., 2001).

Foram registradas quatro hibridações interespecíficas no gênero *Aechmea*: *Ae. bicolor* x *Ae. nudicaulis* com 3% de sucesso; *Ae. nudicaulis* x *Ae. bicolor* com 70% de sucesso; *Ae. bicolor* x *Ae. fasciata* com 25% de sucesso e *Ae. nudicaulis* x *Ae. fasciata* com 38% de sucesso.

As demais combinações interespecíficas dentro deste gênero foram incongruentes, sendo confirmadas por microscopia de fluorescência, evidenciando anormalidades no crescimento do tubo polínico: *Ae. distichantha* x *Ae. bicolor, Ae. fasciata* x *Ae. bromeliifolia* e *Ae. fasciata* x *Ae. nudicaulis*, apresentaram enovelamento dos tubos polínicos no terço superior do estilete (Figura 5.2 A); *Ae. bicolor* x *Ae. bromeliifolia* e *Ae. bicolor* x *Ae. distichantha* apresentaram germinação dos grãos de pólen e paralisação do crescimento do tubo polínico no próprio estigma (Figura 5.2 B); *Ae. fasciata* x *Ae. distichantha* os tubos polínicos cresceram até a região do ovário, mas não foi verificada penetração do tubo polínico na micrópila. As anormalidades detectadas se constituíram, portanto, nas barreiras pré-zigóticas existentes entre as espécies a serem hibridizadas.

Tabela 5.3 - Hibridações interespecíficas e intergenéricas em espécies de Bromeliaceae dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl.

♀ \ ♂	*Ae. bicolor*	*Ae. bromeliifolia*	*Ae. distichantha*	*Ae. fasciata*	*Ae. nudicaulis*	*An. macrodontes*	*Ananas* sp.	*An. comosus* var. *ananassoides*	*An. comosus* var. *bracteatus*	*An. comosus* var. *erectifolius*	*An. comosus* var. *parguazensis*	*Al. nahoumii*	*V. carinata*	*V. friburgensis*	*V. michaelii*	*V. paraibica*	*V. simplex*
Aechmea bicolor	*	0/8	0/4	2/8	2/65	-	0/5	0/5	-	-	-	0/4	0/8	-	0/8	-	0/2
Ae. bromeliifolia	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/4	0/2	-	0/5	-	-
Ae. distichantha	0/16	-	*	-	-	0/4	0/6	0/12	0/8	-	-	0/5	-	0/7	0/5	-	-
Ae. fasciata	-	0/28	0/23	*	0/4	-	-	-	-	-	-	-	0/12	0/14	0/23	-	0/7
Ae. nudicaulis	14/20	-	-	7/18	*	-	-	-	-	-	-	0/5	-	0/6	0/3	0/2	0/10
Ananas macrodontes	-	-	0/3	-	-	*	0/23	-	-	-	-	-	0/5	-	0/3	-	0/2
Ananas sp.	-	-	-	-	0/5	0/24	*	1/51	1/20	0/30	0/12	-	-	-	-	-	-
An. comosus var. *ananassoides*	0/8	-	0/5	-	0/8	-	0/18	*	-	24/24	-	-	-	-	-	-	0/4
An. comosus var. *bracteatus*	-	-	-	-	-	-	0/38	99/99	*	52/52	-	-	-	-	-	-	-
An. comosus var. *erectifolius*	-	-	-	-	-	-	0/29	35/35	27/27	*	-	-	-	-	-	-	-
An. comosus var. *parguazensis*	-	-	-	-	-	-	-	23/23	-	39/39	*	-	-	-	-	-	-
Alcantarea nahoumii	-	-	-	0/8	-	-	-	-	-	-	-	*	-	0/5	0/3	-	0/5
Vriesea carinata	0/10	-	-	0/5	0/4	-	-	-	-	-	-	-	*	0/3	-	15/15	-
V. friburgensis	0/5	-	0/4	0/8	-	0/4	0/4	0/6	-	-	-	0/11	-	*	16/16	-	14/16
V. michaelii	0/6	-	-	0/15	0/4	-	0/5	0/3	-	-	-	2/6	-	8/10	*	-	3/6
V. paraibica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14/14	-	-	*	-
V. simplex	0/8	-	-	0/7	0/8	-	0/5	0/5	-	-	-	3/7	-	4/6	2/6	-	*

Número de fruto colhidos/número de polinizações realizadas
Hibridação que obtiveram sucesso estão marcadas em preto

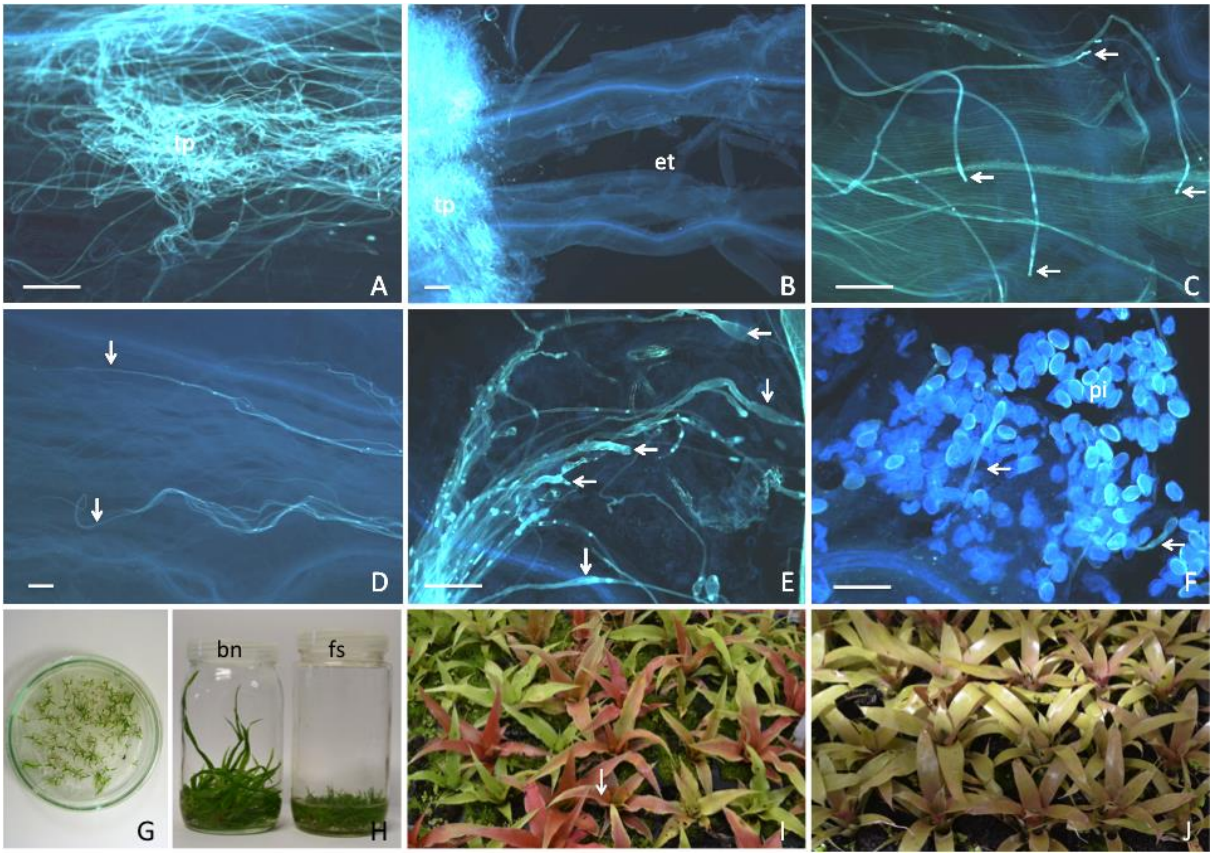


Figura 5.2 - Crescimento do tubo polínico no estigma observado através de microscopia de fluorescência em pistilos tratados com solução de azul de anilina em Bromeliaceae evidenciando diferentes barreiras reprodutivas em hibridações interespecíficas e intergenéricas (A-F). A) *Ae. fasciata* x *Ae. nudicaulis,* evidenciando enovelamento dos tubos polínicos no terço superior do estilete. B) *Ae. bicolor* x *Ae. bromeliifolia,* evidenciando a germinação dos grãos de pólen e a paralisação do crescimento no próprio estigma. C) *V. carinata* x *V. friburgensis,* evidenciando o crescimento do tubo polínico e a paralisação no início do terceiro terço do estilete com deposição de calose na ponta do tubo polínico (setas). D) *V. michaelii* x *Ae. fasciata*, evidenciando a paralisação do crescimento do tubo polínico no terço superior do estigma (setas). E) *Al. nahoumii* x *Ae. fasciata*, evidenciando a deposição reticulada de calose no tubo polínico (setas). F) *Ae. fasciata* x *V. carinata*, evidenciando a baixa porcentagem de germinação dos grãos de pólen no estigma. G) Germinação de sementes híbridas de *Ae. bicolor* x *Ae. nudicaulis* em placa de Petri contendo meio de cultura ½ MS. H) Desenvolvimento de híbridos de *Ae. bicolor* X *Ae. nudicaulis* (bn) e *V. friburgensis* x *V. simples* (fs) em meio de cultura MS. I) Progênie de *An. comosus* var. *erectifolius* x *An. comosus* var. *bracteatus,* evidenciando a segregação de cor e espinhos (seta). J) Progênie de *V. carinata* x *V. paraibica* aos 12 meses de cultivo em substrato. tp = tubo polínico, et = estilete, pi = grãos de pólen inviáveis. Barras = 200 μm

Entre as nove combinações do gênero *Vriesea,* oito foram congruentes, produzindo grande número de sementes em todas as hibridações. Entre *V. carinata* e *V. paraibica* registrou-se 100% de sucesso nas hibridações unilaterais, com uma média de 298 sementes. Outras hibridações unilaterais foram registradas com: *V. friburgensis* e *V. michaelii*, sucesso acima de 80% e média de 277 sementes, *V. friburgensis* e *V. simplex* com sucesso de 66,6% a 87,5% e *V. michaelii* e *V. simplex* com sucesso abaixo de 50% em ambas polinizações reciprocas. O número obtido de sementes foi similar aos resultados da polinização cruzada. Hibridações interespecíficas no gênero *Vriesea* são comuns e os primeiros registros datam de 1879 por Eduard Morren na Europa onde diversas combinações foram testadas incluindo espécies utilizadas neste trabalho como *V. carinata* e *V. simplex* (SAMYN, 1995).

A única incongruência observada nas hibridações interespecíficas envolvendo o gênero *Vriesea* foi em *V. carinata* x *V. friburgensis*. Neste cruzamento foi observado crescimento do tubo polínico e paralisação no início do terceiro terço do estilete com deposição de calose na ponta do tubo polínico (Figura 5.2 C), o que confirma a incongruência observada.

Em 299 flores polinizadas em sete combinações entre as variedades do gênero *Ananas,* observou-se 100% de sucesso, com uma média de 5,11 sementes/ flor em *An. comosus* var. *erectifolius* com *An. comosus* var. *bracteatus* e 18,63 sementes/ flor na combinação reciproca. Todas as sementes geradas nas hibridações envolvendo o gênero *Ananas* foram semeadas e a taxa de germinação foi acima de 93%. As plântulas geradas estão sendo cultivadas em casa de vegetação, observando-se a segregação de cor e presença de espinhos nas progênies produzidas (Figura 5.2 I).

Entre as variedades botânicas do gênero *Ananas*, o *An. comosus* var. *erectifolius* é a fonte de genes relacionados a ausência de espinhos, o que explica o uso desta variedade na maioria dos cruzamentos envolvendo abacaxi ornamental. Diversos híbridos envolvendo este gênero foram descritos por Souza et al. (2009a) e Souza (2010), que citam uma alta segregação desta característica, além de observar segregações na coloração de folhas e hábito de crescimento. Essas características foram observadas também em progênies obtidas nas diversas hibridações.

Foram realizadas 275 polinizações recíprocas envolvendo o parental *Ananas* sp. com as duas espécies do mesmo gênero e algumas intergenéricas. Houve a formação de apenas

quatro sementes a partir de todos os cruzamentos realizados, sendo duas em *An. comosus* var. *ananassoides* e duas em *An. comosus* var. *bracteatus*. Vale destacar que as sementes geradas apresentaram tamanhos reduzidos, inviáveis e com aspecto murcho. Aos 120 dias de cultivo não foram verificadas sinais de germinação.

A infertilidade observada em *Ananas* sp. pode estar relacionada à baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis conforme descrito por Souza et al. (2011). Esses resultados evidenciam que este genótipo pode ser um híbrido natural ou uma espécie ainda não descrita.

Vervaeke et al. (2004), caracterizando híbridos de *Vriesea*, *Guzmania* e *Tillandsia*, observaram que os grãos de pólen eram completamente estéreis, apresentando morfologia colapsada e as polinizações realizadas utilizando esses híbridos como progenitor feminino não geraram sementes. Na grande maioria, os híbridos são estéreis ou apresentam algum nível de esterilidade, pois os cromossomos homólogos não se pareiam o que impede a correta divisão meiótica (APARICIO; ALBALADEJO, 2003; LARROSA et al., 2012).

Entre as hibridações intergenéricas, apenas cinco polinizações apresentaram sucesso em duas combinações: *V. michaelii* x *Al. nahoumii* e *V. simplex* x *Al. nahoumii*, com 33,3% e 42,8% de sucesso, produzindo uma média de 168 sementes e 418 sementes, respectivamente. Essas duas combinações apresentaram incongruência unilateral, o que pode ter sido devido a diversos fatores, destacando, dentre eles, a diferença entre o comprimento do estilete dos dois progenitores, que pode ocasionar barreira no estilete. Em *Al. nahoumii* o comprimento do estilete é de 89,99 ± 0,71 mm e nas duas espécies de *Vriesea,* uma média de 20,56 ± 0,15 mm na *V. michaelii* e 31,90 ± 0,38 mm na *V. simplex* (Capítulo 2). Com a metodologia de azul de anilina, foi possível observar que em *Al. nahoumii* ocorreu uma paralisação do crescimento dos tubos polínicos no início do segundo terço do estilete (comprimento correspondente das espécies de *Vriesea*) o que pode comprovar a presença desta barreira estilar. Esses resultados estão de acordo com Parton et al. (2001) e Vervaeke et al. (2001) que relataram barreiras no estilete devido à diferença no comprimento entre espécies de *Aechmea* (estiletes curtos), *Vriesea* e *Guzmania* (estiletes compridos). Esse tipo de barreira é classificada como pré-zigótica de isolamento mecânico.

As duas combinações intergenéricas obtidas podem ser justificadas, pois os gêneros apresentam parentesco em comum. O gênero *Alcantarea* pertencia a um subgênero de *Vriesea,* sendo que a partir de estudos moleculares e filogenéticos emergiu como um clado

dentro de *Vriesea*, desde que o gênero *Vriesea* é parafilético e *Alcantarea* é monofilético (VERSIEUX et al., 2012).

Foi possível observar diferentes anormalidades no tubo polínico entre as hibridações intergenéricas, como a deposição reticulada de calose no tubo polínico; enovelamento dos tubos polínicos no estilete; paralisação de crescimento em uma determinada região do estilete (Figura 5.2 D-E); além da baixa germinação de grãos de pólen em hibridações envolvendo parentais de *Aechmea* com *Vriesea* (Figura 5.2 F). Parton et al. (2001) relataram que em hibridações intergenéricas os tubos polínicos apresentam mais anormalidades do que em hibridações interespecíficas. Essa observação não foi confirmada neste trabalho, pois as mesmas anormalidades presentes em ensaios de autoincompatibilidade e hibridações interespecíficas foram encontradas nas hibridações intergenéricas.

Hibridações intergenéricas são relatadas na literatura envolvendo gêneros muito próximos dentro de um clado de distribuição desta família, como no caso de *Guzmania*, *Tillandsia* e *Vriesea* (Tillandsioideae) (SMITH; DOWNS, 1974; VERVAEKE et al., 2004) e entre *Aechmea*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Quesnelia* (Bromelioideae) (SMITH; DOWNS, 1974). Não há registro de hibridações entre subfamílias, nem mesmo utilizando as técnicas para superar as barreiras reprodutivas.

Vervaeke et al. (2001; 2002) trabalhando com diferentes espécies de bromélias observaram barreiras pré e pós-zigóticas como algumas anomalias no estilete, principalmente na região basal: comprimento desigual do estilete e tubo polínico; morfologia e tamanho dos grãos de pólen; não germinação do grão de pólen sobre o estigma devido a hidratação insuficiente ou descontrolada, assim como a falta de nutrientes (principalmente cálcio e boro); ausência de fatores quimiotrópicos na região da micrópila; degeneração imatura do embrião e endosperma, além de outros fatores referentes à polinização, como horário de maior receptividade do estigma e polinizadores.

As sementes geradas nas hibridações germinaram de forma satisfatória, e aos 45 dias, as plântulas foram transferidas para frascos contendo meio de cultura MS permanecendo até atingir um tamanho ideal (Figura 5.2 G) para posterior transplantio em substrato (Firura 2 J). A caracterização das progênies será necessária para a identificação de híbridos superiores e compreensão dos mecanismos de segregação.

8.4. Conclusões

Mais de 50% das espécies estudadas apresentaram autoincompatibilidade; entre as espécies autocompatíveis, *Ae. bromeliifolia*, *Ae. distichantha* e *An. macrodontes* apresentaram autogamia; agamospermia foi observada em apenas duas espécies, *Ae. bromeliifolia* e *Ae. distichantha*.

O sucesso nas hibridações corresponde a 33,74%, sendo que 24,96% envolveram as variedades botânicas do gênero *Ananas*; entre as hibridações intergenéricas, apenas duas combinações foram obtidas com sucesso: *V. michaelii* x *Al. nahoumii* e *V. simplex* x *Al. nahoumii*.

As possíveis causas da autoincompatibilidade e incongruência nos cruzamentos estão relacionadas a diferentes eventos no tubo polínico, como: deposição reticulada de calose no tubo polínico; enovelamento dos tubos polínicos no estilete; paralisação do crescimento do tubo polínico no estilete, entre outros.

Dentre as espécies estudadas foram observados diferentes sistemas reprodutivos como autogamia, alogamia e agamospermia. Esses dados são fundamentais na orientação de hibridações de interesse. Hibridações interespecíficas e intergenéricas foram obtidas, deixando evidente a possibilidade de geração de novos híbridos, que entretanto, necessitam de outras avaliações morfológicas, citogenéticas, moleculares e de mercado para comprovar o potencial ornamental dos mesmos.

Referências

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT JUNIOR, M. E. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992. 414 p.

ALMEIDA, E. F. A.; RODRIGUES, M. G. V.; SILVA, F. C.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, I. A.; CARVALHO, M. M.; ARAÚJO, R. A.; PARRELA, R. A. C. Indução floral em bromélia *Guzmania* 'Grand Prix'. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 9, p. 129-134, 2003.

ANDRADE, F. S. A.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudo sobre produção e comercialização de bromélias nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 5, p. 97-110, 1999.

APARICIO, A.; ALBALADEJO, R. G. Microsporogenesis and meiotic abnormalities in the hybrid complex of *Phlomis composita* (Lamiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society,** London, v. 143, p. 79-85, 2003.

APG - Angiosperm Phylogeny Group. 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.

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

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

BLACK, R. J.; DEHGAN, B. **Bromeliads**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Cooperative Extension Service, 1994.

BREWBAKER, J. L.; GORREZ, D. D. Genetics of self-incompatibility in the monocot genera *Ananas* (pineapple) and *Gasteria.* **American Journal of Botany**, New York, v. 54, p. 611-616, 1967.

CASCANTE-MARÍN, A.; OOSTERMEIJER, J. G. B.; WOLF, J. H. D.; DEN NIJS, J. C. M. Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a Premontane Tropical Forest. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 203-209, 2005.

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

CRESTANI, M. B.; HAWERROTH, R. L.; CARVALHO, F. J.; FÉLIX, F. I.; OLIVEIRA, A. C. Das Américas para o Mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 40, p. 1473-1483, 2010.

DUKOVSKI, D.; BERNATZKY, R.; HAN, S. Flowering induction of *Guzmania* by ethylene. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 104-108. 2006.

ECCHER, T.; MIGNANI, I. L. Trials on chemical control of flowering in ornamental bromeliads. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.1, p. 145-150, 1977.

FAO. **FAOSTAT.** Agricultural statistics database. Rome, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor.> Acesso em: 22 ago 2013.

FERREIRA, A. S.; LOPES, F. P. D.; MONTEIRO, S. N.; SATYANARAYANA, K. G. Charpy impact resistance of alkali treated curaua reinforced polyester composites. **Matéria**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 131-137, 2010.

FERREIRA, J. F.; SBRUZZI, D.; BARROS, K. V. G.; MACHADO, I. S.; TAMBOURGI, E. B. Purificação da enzima bromelina presente no curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) variedade roxa, por sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato de potássio. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, p. 189-194, 2011.

GONÇALVES, C. N.; AZEVÊDO-GONÇALVES, C. F. A new hybrid bromeliad from southernmost Brazil, *Tillandsia* × *baptistana*. **Novon**, St. Louis, v. 19, p. 353-356, 2009.

HIETZ, P.; WINKLER, M.; CRUZ-PAREDES, L.; JIMÉNEZ-AGUILAR, A. Breeding systems, fruit set, and flowering phenology of epiphytic bromeliads and orchids in a Mexican humid mountain forest. **Selbyana**, Sarasota, v. 27, p. 156-164, 2006.

HOGENBOOM, N. G. A model for incongruity in intimate partner relationships. **Euphytica**, Wageningen, v. 22, p. 219-233, 1973.

LARROSA, F. H.; MAUNE, J. F.; ERAZZÚ, L. E.; CAMADRO, E. L. Meiotic abnormalities underlying pollen sterility in wild potato hybrids and spontaneous populations. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, p. 223-233, 2012.

LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, p. 227-238, 2009.

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, p. 487-500, 2006.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 13. ed. Sarasota, FL: The Marie Selby Botanical Gardens; The Bromeliad Society International, 2012.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H. LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. Química Nova, São Paulo, v. 32, p. 1885-1897, 2009.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, Baltimore, v. 37, p. 125-128, 1959.

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

MEKERS, O.; PROFT, M.; JACOBS, L. Prevention of unwanted flowering of ornamental Bromeliaceae by growth regulating chemicals. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, p. 217-224, 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 15, p. 473-479, 1962.

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

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

NEWBIGIN, E.; ANDERSON, M. A.; CLARKE, A. E. Gametophytic self-incompatibility systems. **The Plant Cell,** Baltimore, v. 5, p. 1315-1324, 1993.

PAGGI, G. M.; SILVEIRA, L. C. T.; ZANELLA, C. M.; BRUXEL, M.; BERED, F.; KALTCHUCK-SANTOS, E.; PALMA-SILVA, C. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. **Plant Species Biology**, New York, 2012.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Interspecific and intergeneric fertilization barriers in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 552, p. 43-54, 2001.

RAMÍREZ-MORILLO, I. M.; MAY, F. C.; CARNEVALI, G.; PAT, F. M. It takes two to tango: self incompatibility in the bromeliad *Tillandsia streptophylla* (Bromeliaceae) in Mexico. **Revista de Biologia Tropical,** San Jose, v. 57, p. 761-70, 2009.

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

RÔCAS, G.; KLEIN, D. E.; MATTOS, E. A. Artificial hybridization between *Pitcairnia flammea* and *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae): analysis of the performance of parentes and hybrids. **Plant Species Biology**, New York, v. 19, p. 47-53, 2004.

ROGALSKI, J. M.; REIS, A.; REIS, M. S.; HMELJEVSKI, K. V. Biologia reprodutiva da reófita *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, p. 691-702, 2009.

SAMYN, G. *Vriesea* hybrids of today and yesteryear. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 45, p. 99-109, 1995.

SANTOS, A. J.; BITTENCOURT, A. M.; NOGUEIRA, A. S. Aspectos econômicos da cadeia produtiva das bromélias na região metropolitana de Curitiba e Litoral Paranaense. **Floresta**, Curitiba, v. 35, p. 409-417, 2005.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 1083-1090, 2002.

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

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. S. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica,** Porto Alegre, v. 15, p. 427-443, 2001.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae. Part 1). **Flora Neotropica Monograph,** New York, v. 14, p. 1-658, 1974.

SOUZA, E. H. **Pré-melhoramento e avaliação de híbridos de abacaxi e banana para fins ornamentais**. 2010. 158 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

SOUZA, E. H.; ROSA, S. S.; SOUZA, F. V. D.; MELO, V. C. Indução floral em *Neoregelia carolinae* (Beer) L. B. Sm e *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker, (Bromeliaceae). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 21, p. 305-310, 2009b.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA JUNIOR, D. S.; ROSSI, M. L.; SOARES, T. L.; MARTINELLI, A. P. Morfoanatomia polínica e fertilidade de *Ananas* sp. (BAG 197) com potencial ornamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Armação dos Búzios, RJ. **Panorama atual e perspectivas do melhoramento de plantas no brasil**. Armação dos Búzios: SBMP, 2011. v. 6. p. 4030.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, p. 1357-1376, 2012.

SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H.; FERREIRA, F. R.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 822, p. 79-84, 2009a.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: JUNGHAS, T. G.; SOUZA, A. S. (Org.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009c. v. 1, p. 177-205.

STEENS, A. **Bromeliads for the contemporary gardens**. Portland: Timber, 2003.

TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. Self-incompatibility in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p.467-489, 2005.

TICKTIN, T.; NANTEL, P. Dynamics of harvested populations of the tropical understory herb *Aechmea magdalenae* in old-growth versus secondary forests. **Biological Conservation**, Barking, v. 120, p. 461-470, 2004.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; SOUZA, T. M.; PEREIRA, A. V. Número cromossômico em acessos de *Pennisetum* spp. (Poaceae, Poales). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 30, p. 291-294, 2008.

ÜNAL, M.; VARDAR, F.; ARTÜRK, O. Callose in Plant Sexual Reproduction. In: SILVA-OPPS, M. (Ed.) **Current Progress in Biological Research**. Croatia: InTech, 2013. p. 319-343.

VAN TUYL, J. M.; DE JEU, M. J. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: SHIVANNA, K. R.; SAWHNEY, V. K. (Ed.). **Pollen biotechnology for crop production and improvement**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 273-293.

VERSIEUX, L. M.; BARBARÁ, T.; WANDERLEY, M. G. L.; CALVENTE, A.; FAY, M. F.; LEXER, C. Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): implications for morphological evolution and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 64, p. 177-189, 2012.

VERVAEKE, I.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Interespecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 624, p. 77-83, 2003.

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

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

VERVAEKE, I.; LONDERS, E.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. *In vitro* pollination and fertilization in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 612, p. 23-25. 2003.

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

VOSGUERITCHIAN, S. B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, p. 433-442, 2006.

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

WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; KLEIN, D. E.; RIOS, R. I. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 232, p. 201-212, 2002.

WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; MORREY-JONES, J. E.; HENRIQUES, A. B.; RIOS, R. I. Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 25, p. 389-398, 2000.

WOLOWSKI, M.; SAAD, C. F.; ASHMAN, T. L.; FREITAS, L. Predominance of self-compatibility in hummingbird-pollinated plants in the Neotropics. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 100, p. 69-79, 2013.

YI, W.; LAW, E.; MCCOY, D.; WETZSTEIN, H. Y. Stigma development and receptivity in Almond (*Prunus dulcis*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, p. 57-63, 2006.

ZAH, R.; HISCHIER, R.; LEÃO, A.L.; BRAUN, I. Curaua fibers in the automobile industry - A sustainability assessment. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 15, p. 1032-1040, 2007.

ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; XUE, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 21-42, 2009.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese buscou estudar aspectos da biologia floral e reprodutiva, assim como desenvolver estudos do comportamento de grãos de pólen e sua conservação com ações voltadas à hibridação interespecífica e intergenérica em Bromeliaceae com potencial ornamental. Adicionalmente trouxe informações acerca de compostos voláteis em flores, suas potencialidades e possíveis interações com polinizadores.

Os estudos referentes à morfologia dos grãos de pólen e do estigma ofereceram uma caracterização detalhada das espécies que podem ser importantes para a taxonomia, auxiliando na melhor definição da delimitação genérica e de espécies muito semelhantes. Por outro lado, e em adição aos estudos de morfologia, os conhecimentos sobre a viabilidade e longevidade dos grãos de pólen foram cruciais para subsidiar os trabalhos de conservação, que por sua vez poderão nortear melhor o melhoramento genético das espécies. Já os estudos referentes à receptividade do estigma complementam essa gama de informações que possibilitam maior eficiência nas hibridações pretendidas.

O protocolo de conservação de pólen desenvolvido neste trabalho possibilitará a realização de hibridações com materiais de florescimento assincrônico, permitindo a geração de novos materiais para inovações no segmento de flores, que não poderiam ser gerados sem essa ferramenta auxiliar. Adicionalmente, permite a formação de um banco de pólen de espécies silvestres e cultivadas que pode ter aplicações variadas.

Os compostos voláteis desempenham papel vital no ciclo de vida das plantas, principalmente na polinização. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram uma grande variabilidade no perfil de odor das flores de Bromeliaceae permitindo realizar algumas inferências e correlações com a taxonomia e a síndrome de polinizadores. O trabalho realizado trouxe uma contribuição para o entendimento do potencial que estas plantas possuem tanto na indústria como na síntese de produtos naturais, além de sinalizar estudos futuros de processos ecológicos envolvendo a interação planta-animal.

Finalmente, foram realizados estudos visando o conhecimento do sistema reprodutivo de plantas a fim de se definir os métodos a serem utilizados para o melhoramento de determinada espécie. Dentre as espécies estudadas foram observados diferentes sistemas reprodutivos como autogamia, alogamia e agamospermia. Esses dados são fundamentais na

orientação de hibridações de interesse. Hibridações interespecíficas e intergenéricas foram obtidas, deixando evidente a possibilidade de geração de novos híbridos, que entretanto, necessitam de outras avaliações morfológicas, citogenéticas, moleculares e de mercado para comprovar o potencial ornamental dos mesmos.