

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

**ASPECTOS REPRODUTIVOS DE *Lymania* (BROMELIACEAE)  
ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE  
EXTINÇÃO**

**Simplício dos Santos Mota**

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2023**

**ASPECTOS REPRODUTIVOS DE *Lymania* (BROMELIACEAE)  
ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE  
EXTINÇÃO**

**Simplicio dos Santos Mota**  
Licenciado em Ciências Biológicas  
Universidade Estadual do Piauí, 2017

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

**Orientador:** Dr. Everton Hilo de Souza.  
**Coorientadora:** Dr. Fernanda Vidigal Duarte Souza.  
**Coorientadora:** Dr. Lidyanne Yuriko Saleme Aona.

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M917a

Mota, Simplício dos Santos.

Aspectos reprodutivos de *Lymania* (Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção / Simplício dos Santos Mota. – Cruz das Almas, BA, 2023.  
101f.; il.

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

Orientador: Prof. Dr. Everton Hilo de Souza.

Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Coorientadora: Dra. Lidyane Yuriko Saleme Aona.

1.Bromeliaceae – Plantas – Botânica. 2.Bromeliaceae – Reprodução – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 581.9

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

**ASPECTOS REPRODUTIVOS DE *Lymania* (BROMELIACEAE)  
ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE  
EXTINÇÃO**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Simplicio dos Santos Mota

Aprovada em 24 de fevereiro de 2023



Prof. Dr. Everton Hilo de Souza

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB  
(Orientador)



Dr. João Paulo Rodrigues Martins

Polish Academy of Sciences (Polskiej Akademii Nauk) – Polônia  
(Examinador Externo)



Dra. Kayna Agostini

Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR  
(Examinador Externo)

## **Dedicatória**

À minha família, em especial minha mãe  
Perpetua, por seu amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) por me conceder a oportunidade de estudo e formação de mestre em Recursos Genéticos Vegetais;

A Embrapa - Mandioca e Fruticultura por conceder o acesso as estruturas físicas e recursos materiais para a realização dessa pesquisa;

A CAPES pelo auxílio financeiro durante os anos em que estive na Pós-Graduação por meio da bolsa de estudo, residindo em Cruz das Almas, BA;

Agradeço à FAPESB pelo projeto aprovado "Avaliação socioambiental integrada da FIOL" (PPF0014/2021) e auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho;

Agradeço à Reserva Biológica Michelin pelo convênio "Levantamento florístico de epífitas e aspectos fenológicos e reprodutivos em Bromeliaceae na Reserva da Michelin, Bahia, Brasil" e auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho;

Ao meu orientador Dr. Everton Hilo de Souza agradeço imensamente por oportunizar minha inserção à pesquisa e por todo conhecimento e dedicação oferecido a mim durante esse período de formação. Pelo exemplo de excelente profissional e ser humano. Minha eterna gratidão!

Às minhas coorientadoras Dra. Lidyanne Yuriko Saleme Aona e Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza pela contribuição neste trabalho;

Agradeço em especial minhas grandes amigas que conheci durante o curso Mônica Ribeiro Peixoto do Nascimento e Ila Adriane Marciel de Faro. Pelo apoio, amizade, incentivo nos momentos difíceis, escuta e trocas de conhecimento;

À Mônica Lanzoni Rossi pelo auxílio e colaboração nas etapas da análise da microscopia eletrônica de varredura e aos Laboratórios de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária da ESALQ/USP e Laboratório de Hispatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA/USP pela disponibilidade da estrutura física para realização deste trabalho;

À Dra. Taliane Leila Soares pelo apoio e colaboração durante as análises dos dados;

Ao meu ex aluno da U. E. Helena Maria da Cruz e hoje grande amigo Vinicius de Souza Cruz, pelo apoio e auxílio ao longo do curso;

À Glícia Mayara Dias Ferreira, pela amizade, companheirismo, sou grato por cada momento que passamos juntos desde a graduação;

Aos professores da UFRB e pesquisadores da EMBRAPA que me proporcionaram todo o conhecimento adquirido em cada disciplina oferecida ao longo desta formação.

## ASPECTOS REPRODUTIVOS DE *Lymania* (BROMELIACEAE) ENDEMICAS NO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO

**RESUMO:** O gênero *Lymania* Read pertence à família Bromeliaceae e apresenta como caracteres diagnósticos, a presença de pétalas livres, ovário ínfero, sulcado ou alado. Atualmente, o gênero possui dez espécies, todas endêmicas do Nordeste do Brasil e restritas ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica. A maioria das espécies está ameaçada de extinção ou não foram avaliadas quanto ao seu status de ameaça. Estudos sobre morfologia, viabilidade polínica e sistemas reprodutivos fornecem informações importantes para estudos taxonômicos, reprodutivos e para a conservação das espécies. Este trabalho teve como objetivo estudar aspectos reprodutivos, como a morfologia, produção e viabilidade polínica por meio da germinação *in vitro* e testes histoquímicos de nove espécies de *Lymania*. Visa também, identificar os sistemas reprodutivos e as potenciais hibridações interespecíficas, por meio da avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo através de microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Todas as espécies apresentam grãos de pólen monades, exceto *L. languida* Leme que apresenta grãos arranjados em tétrades, tamanho médio, formatos oblato a suboblato, simetria bilateral, abertura triporado para a maioria das espécies, exina semitectada a eutectada, ornamentação variando de reticulada-heterobrocada, psilada a perforada. Os grãos de pólen apresentaram altas porcentagens de viabilidade, principalmente na antese, independente da metodologia utilizada. Todas as espécies são alógamas e autoincompatíveis, exceto *L. smithii* Read que apresentou autogamia. Agamospermia não foi observada em nenhuma das espécies estudadas. O sucesso das hibridações correspondeu a 53,9% (228 sucessos de 423 polinizações) em 41 combinações. Apenas 12 combinações apresentaram incongruências. As possíveis causas da autoincompatibilidade e incongruência entre as espécies estão relacionadas a inibição do crescimento do tubo polínico ao longo do estilete; enovelamento dos tubos polínicos ao longo do estilete; tubos polínicos no interior do ovário, mas sem penetração na micrópila; deposição reticulada de calose no tubo polínico, baixa germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma, entre outros eventos. Sugere-se que a autoincompatibilidade nas espécies avaliadas seja gametofítica, evitando a autofertilização. As sementes geradas nos diferentes sistemas reprodutivos, bem como nas hibridações germinaram acima de 94%. Conhecer a morfologia dos grãos de pólen e a viabilidade conferem dados importantes para a taxonomia bem como para os cruzamentos controlados e obtenção de sementes ou até mesmo para ensaios de conservação a médio e longo prazo. Os resultados apresentados trazem contribuições importantes para a taxonomia, morfologia, conservação das espécies, geração de sementes e hibridação em Bromeliaceae, principalmente, as endêmicas e ameaçadas de extinção.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bromelioideae, biologia floral e reprodutiva; conservação; sistema reprodutivo, taxonomia; teste histoquímico; viabilidade polínica.

## REPRODUCTIVE ASPECTS OF *Lymania* (BROMELIACEAE), ENDEMIC TO NORTHEAST BRAZIL AND ENDANGERED

**ABSTRACT:** The genus *Lymania* Read belongs to the Bromeliaceae family. Among its diagnostic traits are the presence of free petals and an inferior grooved or winged ovary. At present, the genus has ten species, all of them endemic to Northeast Brazil and restricted to the Atlantic Forest phytogeographic domain. Most of these species are classified as endangered or have not yet been evaluated in this regard. Studies of the pollen morphology and viability and reproductive systems provide important information for taxonomic and reproductive investigations and efforts to preserve these species. The objective of this work was to investigate the reproductive aspects, such as the morphology, production and viability of pollen, by means of *in vitro* germination and histochemical testing of nine *Lymania* species, as well as to identify the reproductive systems and potential for interspecific hybridization through evaluation of the germination of pollen grains and growth of pollen tubes in the pistil via fluorescence microscopy with ultraviolet filtering. All the species had monad pollen except for *L. languida* Leme, which had grains arranged in tetrads. The grains of the majority of species had medium size, oblate to suboblate shape, bilateral symmetry, triporate opening, semitectate or eutectate exine, and ornamentation varying from reticulated-heterobrocade, psilate or perforate. The grains presented high viability percentages, mainly during anthesis, independent of the method used. All the species are allogamous and self-incompatible except for *L. smithii* Read, which is autogamous. Agamospermy was not observed in any of the species. The hybridization success rate was 53.9% (228 successes from 423 pollinations), in 41 combinations. Only 12 combinations presented incongruence. The possible causes of self-incompatibility and incongruence among the species were related to inhibition of growth and/or folding of the pollen tube in the style; failure of the pollen tube to penetrate the micropyle; reticulated deposition of callose in the pollen tube; and low germination of the pollen grains on the surface of the stigma, among other problems. We suggest that the self-incompatibility of the species is gametophytic, to prevent self-fertilization. The germination rate of the seeds generated in the different reproductive systems, as well as in the hybridizations, was 94%. Knowledge of the morphology of pollen grains and their viability is important for controlled crosses to obtain seeds for conservation of the species in the medium to long term. The results make contributions to the taxonomy, morphology, conservation of species, generation of seeds and hybridization of Bromeliaceae, mainly endemic species that are at risk of extinction.

**KEYWORDS:** Bromelioideae, floral and reproductive biology; conservation; reproductive system, taxonomy; histochemical testing; pollen viability.



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....                    | 10 |
| <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....           | 13 |
| Bromeliaceae .....                         | 13 |
| Gênero <i>Lymania</i> .....                | 15 |
| Morfologia polínica em Bromeliaceae .....  | 17 |
| Viabilidade polínica em Bromeliaceae ..... | 19 |
| Sistema reprodutivo em Bromeliaceae .....  | 21 |
| Hibridações em Bromeliaceae .....          | 24 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                   | 26 |

### CAPÍTULO I

|  |    |
|--|----|
| <b>MORFOLOGIA E VIABILIDADE POLÍNICA DE ESPÉCIES DE <i>Lymania</i> (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO<sup>1</sup></b> ..... | 40 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....                             | 43 |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                    | 44 |
| Morfologia dos grãos de pólen .....                 | 46 |
| Produção e tamanho dos grãos de pólen .....         | 46 |
| Testes histoquímicos dos grãos de pólen .....       | 46 |
| Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen ..... | 47 |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                 | 48 |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....                              | 62 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                            | 63 |

### CAPÍTULO II

|  |    |
|--|----|
| <b>SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÕES EM <i>Lymania</i> (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO<sup>2</sup></b> ..... | 69 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....                                      | 70 |
| ABSTRACT .....                                    | 71 |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                   | 73 |
| Material Vegetal .....                            | 73 |
| Sistemas reprodutivos .....                       | 75 |
| Hibridações interespecíficas .....                | 76 |
| Desenvolvimento do tubo polínico no pistilo ..... | 76 |

|   |    |
|---|----|
| Germinação <i>in vitro</i> das sementes ..... | 77 |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....           | 77 |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....                        | 94 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                      | 95 |

## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae possui um grande número de espécies e gêneros e está presente em diversos ecossistemas distribuído em todo território nacional, principalmente na Mata Atlântica. O gênero *Lymania* Read possui dez espécies (GOUDA et al., 2023) que se caracterizam por possuir ovário ínfero sulcado ou alado e as pétalas livres (READ, 1984; SOUSA; WENTD, 2008). São espécies endêmicas do Sul da Bahia, exceto *L. smithii* R. W. Read que ocorre nos estados de Pernambuco e Alagoas (SOUSA et al., 2007). A maioria das espécies do gênero está na lista de espécies ameaçadas de extinção conforme o Livro Vermelho da Flora do Brasil (FORZZA et al., 2013; SOUZA et al., 2021) e *International Union for Conservation of Nature* (União Internacional para Conservação da Natureza) (IUCN, 2023) ou ainda não foram avaliadas quanto ao seu grau de ameaça.

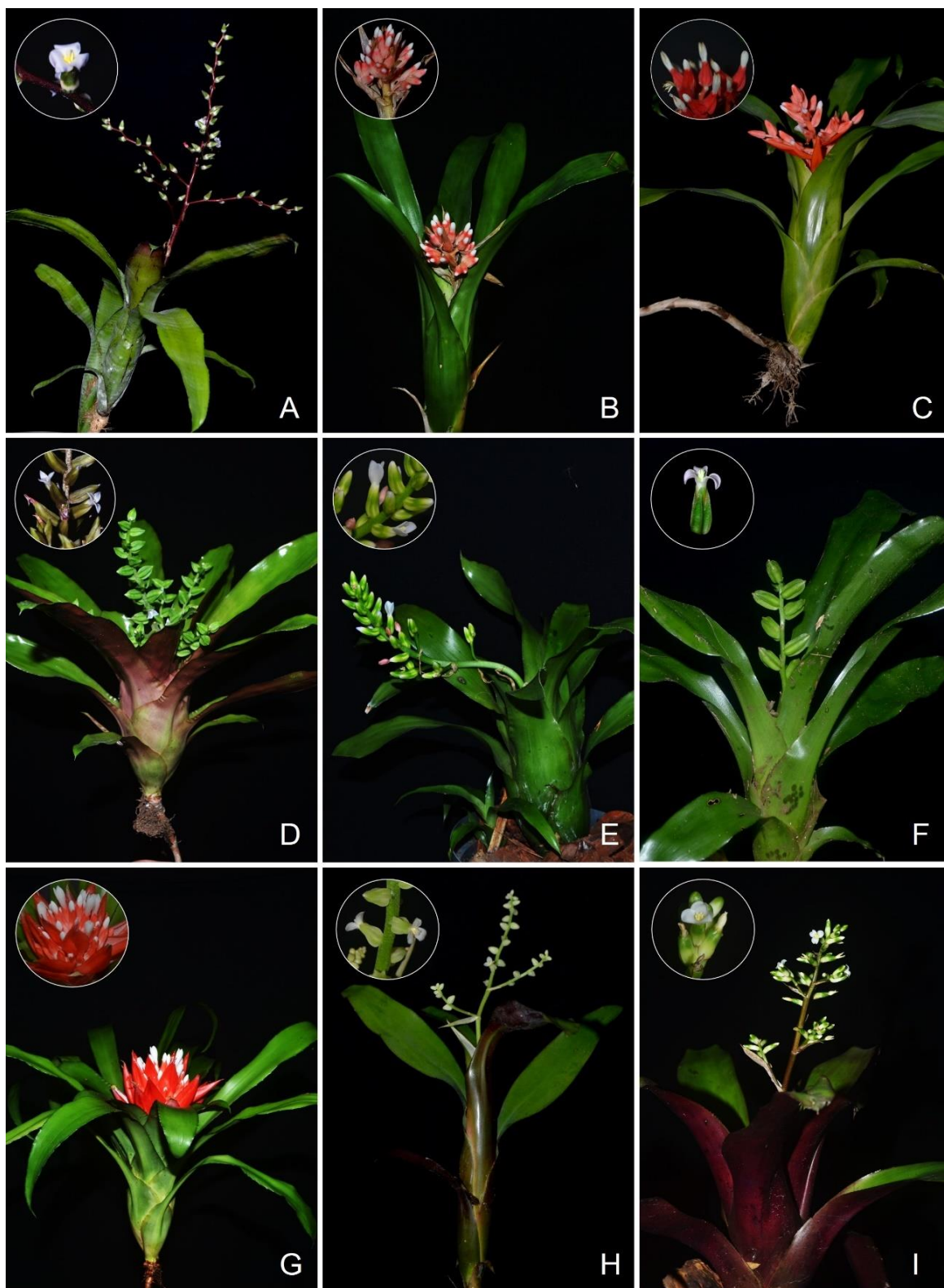
O conhecimento da biologia floral e reprodutiva é imprescindível para elaboração de estratégias de conservação e manejo das espécies, fornecendo informações sobre a morfologia e viabilidade polínica, mecanismo reprodutivo e barreiras reprodutivas indispensáveis para a reprodução de espécies nativas (NEGRELLE; MURATO, 2006).

Neste trabalho, foram estudadas nove espécies do gênero *Lymania* (Figura 1). São elas: *Lymania azurea* Leme (Figura 1A), *L. brachycaulis* (E.Morren ex Baker) L. F. Sousa (Figura 1B), *L. corallina* (Brong. ex Beer) R. W. Read (Figura 1C), *L. globosa* Leme (Figura 1D), *L. languida* Leme (Figura 1E), *L. marantoides* (L. B. Sm.) R.W. Read (Figura 1F), *L. involucrata* Leme & E.H. Souza (Figura 1G), *L. smithii* R. W. Read (Figura 1H) e *L. spiculata* Leme & Forzza (Figura 1I).

Esta dissertação está dividida em dois capítulos que abrangem estudos sobre a viabilidade e morfologia e dos grãos de pólen (Capítulo 1) e sistemas reprodutivo e hibridações interespecíficas de *Lymania* (Capítulo 2).

O capítulo I é intitulado “Morfologia e viabilidade polínica de espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção”. O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfologia e a viabilidade de grãos de pólen de nove espécies de *Lymania* endêmicas do Nordeste e ameaçadas de extinção. Foram utilizadas metodologias como microscopia eletrônica de varredura (MEV) e acetólise láctica para avaliar a morfologia polínica, germinação *in vitro* dos grãos de pólen em meio BM e SM, teste histoquímicos com solução de Alexander e diacetato de fluoresceína em três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese) para avaliar a viabilidade polínica.

O capítulo II intitulado “Sistema reprodutivo e hibridações em *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção” aborda resultados dos estudos do sistema reprodutivo de *Lymania* e hibridações interespecíficas. Este capítulo teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos e as possíveis hibridações interespecíficas, bem como avaliar as possíveis barreiras reprodutivas de nove espécies de *Lymania*, através da avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo com o uso da microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Vale destacar que todos os resultados aqui apresentados são inéditos.



**Figura 1.** Espécies de *Lymania* Read (Bromelioideae, Bromeliaceae). A) *L. azurea* Leme, B) *L. brachycaulis* (E.Morren ex Baker) L. F. Sousa, C) *L. corallina* (Brong. ex Beer) R. W. Read, D) *L. globosa* Leme, E) *L. languida* Leme, F) *L. marantoides* (L. B. Sm.) R.W. Read, G) *L. involucrata* Leme & E.H. Souza, H) *L. smithii* R. W. Read e I) *L. spiculata* Leme & Forzza. Fotos: E.H.Souza.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### **Bromeliaceae**

A família Bromeliaceae Juss. pertence a Ordem Poales (APG IV, 2016) e, atualmente, possui 82 gêneros e 3.735 espécies (GOUDA et al., 2023), com distribuição por toda América, exceto *Pitcairnia feliciana* (Aug. Chev) Harms & Mildbr que é nativa do oeste da África (GIVNISH et al., 2007; 2011). No Brasil, são encontrados aproximadamente 56 gêneros e 1.779 espécies (GOUDA et al., 2023), sendo 85% endêmicas e 202 espécies ameaçadas de extinção (FORZZA et al., 2013), podendo ser encontradas em todos os biomas do Brasil (GOMES; SILVA., 2013).

Tradicionalmente, Bromeliaceae está dividida em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcairnioideae e Tillandsioideae (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979). Porém, estudos filogenéticos realizados com marcadores plastidiais subdividiram em oito subfamílias: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (GIVNISH et al., 2011).

As bromélias caracterizam-se por serem plantas herbáceas, perenes, a maioria epífitas, raramente arborescentes ou arbustivas, caule pouco desenvolvido e geralmente com entrenós curtos, apresentam folhas alternas, espiraladas em forma de rosetas distribuídas ao longo do caule, a margem foliar variando de inteira a serrilhada (BENZING, 2000; VASCONCELLOS; OLIVEIRA, 2019). A superfície da folha possui tricomas especializados em absorver umidade e nutrientes, quando estes estão disponíveis na atmosfera, característica típica da família (VASCONCELLOS; OLIVEIRA, 2019).

As inflorescências apresentam variações nas cores, podendo ser racemosas, simples ou compostas, com posição terminal, raramente axilar, comumente escapo e brácteas são coloridas e vistosas. As flores podem ser poucas ou numerosas, bissexuais ou raramente unissexuais, simetria actimorfa ou levemente zigomorfa, trímeras, hipóginas a epíginas, subtendidas por uma bráctea normalmente vistosa, tendo função de atrair uma diversidade de polinizadores (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; WANDERLEY; MARTINS, 2007; GIVNISH et al., 2014).

As pétalas e sépalas são soldadas ou livres entre si, com cores variando de vermelhas, brancas, amarelas ou verdes, apresentando ou não apêndices petalíneos. Os estames (3+3) diplostêmone, podendo ser livres ou adnatos às pétalas, podendo formar um tubo pelo concrecimento dos filetes. As anteras são tetrasporangiadas, bitecas, com deiscência rimosa (BENZING, 2000; WANDERLEY; MARTINS, 2007; OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020).

Os grãos de pólen são bastante variáveis quanto ao padrão de abertura, podendo ser porado (duas a muitas aberturas), monocarpado ou inaperturado (SMITH; DOWNS, 1974; WANDERLEY; MELHEM, 1991; FARIA et al., 2004; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2017a). O gineceu possui três carpelos unidos entre si, ovário súpero, ínfero ou semi-ínfero, tricarpelar, trilocular, com estilete terminal trifido (NOGUEIRA et al., 2015; KUHN et al., 2016). O estigma apresenta variações podendo ser classificado em dezenove tipos, incluindo: conduplicado-espiral, conduplicado-ereto, conduplicado-patente, conduplicado-pinatisecto, simples-ereto, simples-truncado, simples-pinatisecto, simples-patente, simples-dilatado, simples-imbricado, cilíndricodistante, convoluto-lâmina I, convoluto-lâmina II, coraliforme, convoluto-obcônico, convoluto-guarda-chuva, cupulado, urceolado e tubo-laciniado (BARFUSS et al., 2016; LEME et al., 2022; SIQUEIRA et al., 2023).

Os óvulos podem ser escassos ou numerosos com placentação axilar. Os frutos variam de cápsulas septicidas, raramente loculicidas, bagas, ou composto, como no gênero *Ananas* Mill. As sementes são pequenas, contendo apêndices ou não, que podem ser aladas, plumosas ou apresentando mucilagem (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; WANDERLEY; MARTINS, 2007; FAGUNDES et al., 2014; KUHN et al., 2016).

As bromélias desempenham função muito importante nos ecossistemas, suas folhas largas dispostas em rosetas ao longo do caule acumulam água e nutrientes, formando um habitat para diversos organismos, como algas, bactérias, anfíbios, répteis e insetos, sendo utilizado para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (TSUDA et al., 2016; ROMERO et al., 2020; SRIVASTAVA et al., 2020; LOPES FILHO et al., 2023).

Na economia, as bromélias possuem um papel importante em atividades comerciais, seja na ornamentação ou na alimentação. Seu uso como planta ornamental inclui algumas espécies dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Bromelia* L., *Guzmania* Ruiz & Pav., *Puya* Molina, *Sincoraea* Ule, *Tillandsia* L.,

*Vriesea* Lindl. (VANHOUTTE et al., 2016; VIEHMANNNOVA et al., 2016; ANACLETO et al., 2019; LIMA et al., 2020; ZUCCHI et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021; LIDUEÑA-PERÉZ et al., 2022). Na alimentação se destaca o gênero *Ananas* como o maior representante econômico pelo consumo do fruto *in natura* ou industrializados, sucos concentrados, geleias, frutas cristalizadas, lanches desidratados, produção de metabólitos secundários e na suplementação de ração animal (PRADO; SPINACÉ, 2019; ALI et al., 2020; CAMPOS et al., 2020; CHEN et al., 2020; HIKAL et al., 2021). Como potencial medicinal, a enzima bromelina se destaca devido as suas propriedades anti-inflamatórias, de suporte articular e de ajuda digestiva e fins terapêuticos (CAMPOS et al., 2020).

### **Gênero *Lymania***

O gênero *Lymania* Read foi estabelecido por Robert W. Read (1984) e pertence a subfamília Bromelioideae (GOUDA et al., 2023). Nesse gênero, foram acomodadas as espécies que continham a combinação de pétalas livres e ovário ínfero sulcado ou alado (READ, 1984), que, anteriormente, pertenciam ao gênero *Aechmea*, dentro dos subgêneros *Lamprococcus* (Beer) Baker, *Araeococcus* Brongniart e *Ronnbergia* Morren & André. Este gênero é composto por dez espécies sendo elas, *Lymania alvimii* (L. B. Sm. & R. W. Read) R.W.Read, *L. azurea* Leme, *L. brachycaulis* (E.Morren ex Baker) L. F. Sousa, *L. corallina* (Brong. Ex Beer) R. W. Read, *L. globosa* Leme, *L. languida* Leme, *L. marantoides* (L. B. Sm.) R.W. Read, *L. smithii* R. W. Read e *L. spiculata* Leme & Forzza e, recentemente, *L. involucrata* Leme & E. H. Souza publicada em 2021 (SOUZA et al., 2021; GOUDA et al., 2023).

De acordo com a Flora e Funga do Brasil (2020), as plantas desse táxon são caracterizadas pela presença de rosetas em forma de tanque, com 5 a 10 folhas lageniforme à infundibuliforme, coloração verde ou arroxeada; bainhas foliares elípticas e inteiras; lâminas foliares do tipo linear ou lanceolada; escapo ereto, bem pronunciado ou incluso no tanque; inflorescência é frequentemente ramificada ou simples (*L. marantoides*); brácteas primárias são semelhantes às brácteas escapais e as florais são ausentes ou inconspícuas; sépalas podem ser de agudas a arredondadas, inteiras, assimétricas com a presença de uma asa lateral membranácea; pétalas são espatuladas, livres ou unidas; flores são hermafroditas



inodoras (perfumadas apenas em *L. languida*), sésseis; estames contêm filetes adnatos as pétalas e antissépalos livres, ou todos aderidos ao tubo da corola; estigma do tipo conduplicado-espiral, raramente com lobos não contorcidos (*L. smithii*) de coloração branca, verde claro a azulado; ovário ínfero, profundamente sulcado ou alado, com tubo epigínico curto, placentação do tipo axial e apical e óvulos caudados; frutos do tipo baga, profundamente sulcado ou alado e, dificilmente propagadas vegetativamente por estolões.

As plantas desse gênero são epífitas ou raramente terrestres (*L. smithii* e *L. marantoides*), típicas de ambientes de floresta tropical úmida (KERSTEN; KUNIYOSHI, 2009). As espécies de *Lymania* são endêmicas do Nordeste brasileiro. Das dez espécies conhecidas, incluindo as raramente terrestres (*L. smithii* e *L. marantoides*), todas são encontradas na Mata Atlântica do sul da Bahia, principalmente, nos municípios de Arataca, Buerarema, Cravolândia, Ilhéus, Jussari, Una e Uruçuca, centro sul da Bahia (MARINHO et al., 2007; SOUZA et al., 2021; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2020). Apenas *L. smithii*, também pode ser encontrada no município de Jaqueira, em Pernambuco, e Murici, em Alagoas (MARTINELLI et al., 2008; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2020).

O crescente interesse comercial em bromélias tem se intensificado com o decorrer dos anos e tem sido baseado nas potencialidades de uso das plantas de bromélia como ornamentais. Esse interesse agravou o extrativismo predatório, culminado com o desmatamento e destruição dos habitats, perda de biodiversidade e, por consequência, muitas espécies da família acabaram entrando na lista das ameaçadas de extinção (FORZZA et al., 2013). As espécies de *Lymania*, por serem epífitas de sub-bosque, necessitam obrigatoriamente de sombra para sua sobrevivência e acabam sendo bastante afetadas pelas intervenções antrópicas (SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2000).

Desse grupo de dez espécies presentes no gênero, 60% estão na Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção, presentes na última portaria publicada pelo Ministério do Meio ambiente, Nº 148 em 7 de julho de 2022, sendo elas a *L. alvimii*, *L. azurea*, *L. brachycaulis*, *L. corallina* e *L. globosa* classificadas como em perigo, e *L. spiculata*, em criticamente em perigo (BRASIL, 2022). *Lymania involucrata* está classificada como criticamente ameaçada conforme Souza et al. (2021). Vale ressaltar, que as outras espécies, como *L. marantoides*, *L. languida* e *L. smithii* não foram avaliadas quanto ao risco de ameaça e quando

avaliadas, provavelmente entrarão em novas listas devido ao número de indivíduos encontrados no habitat verificado ao longo desse estudo.

### **Morfologia polínica em Bromeliaceae**

De modo geral, a morfologia do grão de pólen é caracterizada pela presença de camadas interna (intina) e externa (exina) e uma região de abertura denominada de colpo ou poro, porção formada pelo estreitamento e aprofundamento da exina junto ao espessamento da intina (HESSE et al., 2009). As somas dessas características morfológicas e estruturais distintas servem de referência para determinação da classificação taxonômica das espécies, bem como podem subsidiar estudos de conservação e reprodução (NACATA et al., 2019).

Entre as Bromeliáceas, há uma ampla variabilidade na diversidade da morfologia polínica inseridas nos grupos da família. Por conta disto, Mez (1891-1894; 1986) utilizou essas características para a classificação sistemática da família. Também foi responsável por distinguir dentro da família três subfamílias, Pitcairnoideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, baseado no padrão de abertura dos grãos de pólen. Nas subfamílias pertencentes a Pitcairnoideae e Tillandsioideae são classificadas como estenopolínica, ou seja, com baixa diversificação, geralmente monocoplados. Já nas Bromelioideae, há uma gama de tipos de abertura da exina, porados (tribo Poratae), monocoplados (tribo Sulcatae) e inaperturados (tribo Integrae) (MOREIRA et al., 2005).

Quanto à disposição polínica, pode-se encontrar na família, grãos de pólen mônades ou mais dificilmente tétrades. Além disso, a exina, pode ser classificada como do tipo psilada, escabrada, foveolada, heterobrocada, microreticulada, perforada ou reticulada (ERDTMAN, 1952; ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974; HALBRITTER, 1992; HALBRITTER; TILL 1998; FURNESS; RUDALL, 2001; JUDD et al., 2002; MOREIRA et al., 2005; PUNT et al., 2007; SILVA et al., 2016; SCHROEDER et al., 2019a; 2019b; SOUZA et al., 2021; LEME et al., 2022).

A partir da década de 70, diversos estudos foram realizados envolvendo a morfologia polínica em Bromeliaceae. Entre eles, há destaque para Ehler e Schill (1973), que analisaram os grãos de pólen de 217 espécies inseridas em 39 gêneros por meio da utilização de microscopia óptica e eletrônica de varredura. Os mesmos autores confirmaram que a subfamília Bromelioideae apresentava caráter

euripolínico e Pticairnioideae e Tillandsioideae, caráter estenopolínico, além de classificar os grãos de pólen em três tipificações, sendo elas: monossulcados com padrão irregular dos colpos, monossulcados com o comprimento dos sulcos próximos ao tamanho dos grãos de pólen e os bi a poliporados.

Erdtman e Praglowski (1974) foram mais um dos pesquisadores responsáveis por analisar os grãos de pólen de 125 espécies pertencentes a 40 gêneros de Bromeliaceae. Estes autores definiram dois agrupamentos baseados no número de aberturas polínicas, sendo eles, o grupo com grãos monocolpados e outro com grãos porados.

Halbritter (1992) estudou 31 gêneros e 338 espécies de bromélias, dando uma visão geral dos grãos de pólen das espécies sobre microscopia eletrônica de varredura, focando principalmente na morfologia da abertura dos grãos sem, entretanto, apresentar medidas e descrições das espécies.

Além disso, vários outros estudos foram desenvolvidos visando enriquecer o conhecimento voltado para à família abrangendo a morfologia e ultraestrutura dos grãos de pólen. A partir deles, utilizando diferentes técnicas microscópicas para a caracterização polínica, servindo de subsídios à taxonomia da família e delimitação entre os táxons inseridos (ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974; WANDERLEY; MELHEM, 1991; HALBRITTER, 1992; HALBRITTER; TILL, 1998; TARDIVO; RODRIGUES, 1998; VERVAEKE et al., 2003; SOUZA et al., 2004; 2015; 2021; MOREIRA et al., 2005; SILVA et al., 2016; SCHROEDER et al., 2019a; 2019b).

A utilização de técnicas, como a microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, é fundamental para as análises da caracterização morfológica dos grãos de pólen que, junto às análises multivariadas, possibilitam o mapeamento dos caracteres para estudos dos grupos taxonômicos (JAMES; MCCULLOCH, 1990; TULER et al., 2017).

Durante os estudos envolvendo a palinologia, se faz necessário a aplicação de tratamentos sobre os grãos para promover a limpeza e assim possibilitar uma melhor visualização da morfologia, ornamentação e alguns detalhes intrínsecos ao táxon (HESSE et al., 2009). A acetólise, é uma metodologia que se utiliza de substâncias ácidas, como o anidrido acético, para retirar todo o conteúdo interno polínico e conservar a morfologia da exina para visualização (ERDTMAN; SORSA, 1952).

Durante o processo, a esporopolenina, substância que compõe a membrana externa, reage com a solução de acetólise que a torna transparente e degrada todo o conteúdo celular e a membrana interna (LABOURIAU, 1973). No entanto, esse tipo de técnica merece atenção quando submetida aos grãos de pólen de Bromeliaceae. Wanderley e Melhem (1991), em seu estudo sobre o material polínico de 30 espécies distribuídas em nove gêneros da família, ressaltaram a necessidade de cuidados na escolha do tratamento para efetuar a limpeza dos grãos de pólen, por conta da possibilidade de deformação provocada durante a acetólise utilizando a acetólise láctica (ACLAC) de Raynald e Raynald (1971). Nesse contexto, precisam ser realizadas adaptações para permitir a observação no microscópio, antes que os grãos de pólen deformem.

### **Viabilidade polínica em Bromeliaceae**

Para o entendimento do sucesso, ou eventuais barreiras da fecundação e geração de sementes que assegure perpetuação das espécies, são necessários estudos associados a biologia reprodutiva dos indivíduos, como o tamanho das inflorescências, a produção de flores, o padrão e distribuição floral e de frutos, a produção e a viabilidade de sementes e, principalmente, os estudos relacionados a produção e viabilidade dos grãos de pólen (MCINTOSH, 2002; BURNE et al., 2003; KÉRY; MATTHIES, 2004; SOUZA et al., 2015; 2017a; 2021; ALVES et al., 2015; SAMPAIO et al., 2012; PAGGI et al., 2015; SILVA et al., 2016; NEVES et al., 2020).

A viabilidade polínica é um dos indicadores mais importantes para o êxito da fertilização. Deste modo, o entendimento e conhecimento desse parâmetro são imprescindíveis em programas de conservação, melhoramento genético e na produção agrícola (SANTOS et al., 2015). Teoricamente, o meio de testar essa viabilidade, normalmente, é através da realização de polinizações e, por consequência, observar os resultados na formação de frutos e sementes. No entanto, por conta do tempo requisitado são aplicadas outras metodologias que possibilitam a estimativa do potencial em intervalos mais curtos (KARAKAYA, 2011). Esses meios podem ser métodos diretos, como a indução germinação polínica *in vitro* (DUTRA et al., 2000; PARTON et al., 2002; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007; SOUZA et al., 2015) e *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2001) ou ainda indiretos, baseados em características citológicas como a coloração dos grãos

(SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; KEARNS; INOUE, 1993), para verificar atividade enzimática ou a presença de substâncias químicas (SOUZA et al., 2015).

A metodologia baseada em testes histoquímicos, são mais simples, baratos e rápidos que os demais. No entanto, não são tão conclusivos sobre a real viabilidade do grão de pólen e sua efetividade para uso na polinização. Entre os corantes mais utilizados estão o carmim acético, solução de Alexander, sudan IV, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (STANLEY; LINSKENS, 1974), 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (DERIN; ETI, 1999) e diacetato de fluoresceína (MARTINELLI, 2012). Essas substâncias em contato com os grãos de pólen, promovem variações na coloração e reações enzimáticas que indicam a viabilidade ou não. Os testes histoquímicos, não permitem a inferência sobre a capacidade germinativa polínica (SOARES et al., 2008). Deste modo, os resultados não conferem confiabilidade por serem superestimados, devido a interação e pigmentação de substâncias como enzimas, amidos ou outras substâncias que também estão presentes em grãos de pólen inviáveis (PARTON et al., 2002; SOARES et al., 2008; SOUZA et al., 2015; 2017a). Esse é o caso do corante carmim acético, que superestima a viabilidade por reagir com a integridade cromossômica, como relatado por Kearns e Inouye (1993), tanto que é pouco recomendada nesse tipo de estudo (PARFIT; GANESHAN, 1989).

A coloração citológica polínica atua como na ilustração da integridade celular seja ela cromossômica (KEARNS; INOUE, 1993) protoplasmática, de parede celular (ALEXANDER, 1969) ou sobre as atividades enzimáticas desidrogenases, como no caso do 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; DERIN; ETI, 1999). Einhardt et al. (2006) relatam que por mais que a coloração seja um método simples e barato, ainda assim, não permite maiores informações quanto a viabilidade polínica, o que já é observado no procedimento da germinação *in vitro*.

Os processos diretos, envolvendo a germinação de pólen *in vitro* e *in vivo*, conferem maior robustez, os quais permitem analisar a emissão do tubo polínico e assim correlacionar com a viabilidade (MARCELLÁN; CAMADRO, 1996; JAYAPRAKASH; SARLA, 2001).

A metodologia mais utilizada na determinação da viabilidade polínica é a germinação *in vitro*, pois possibilita a observação do desenvolvimento do tubo polínico (SOUZA et al., 2015; 2017a). É caracterizada como uma técnica de fácil

aplicação e com a possibilidade de resultados em curto prazo (PIO et al., 2007; SOARES et al., 2008). Esse procedimento não garante a efetivação da fertilização, porém serve de indicativo de confiabilidade (EINHARDT et al., 2006). Entretanto, o método *in vivo*, é o mais eficiente porque através dele é possível assegurar que o processo da fecundação foi concluído (SOUZA et al., 2015). Fatores como a nutrição da planta, o horário e o método utilizado para coleta dos grãos de pólen, o fotoperíodo, temperatura, período de incubação aplicados e, principalmente, a composição do meio de cultura são determinantes para o eventual sucesso na germinação *in vitro* (SOARES et al., 2008), sendo eles, ajustados de acordo com cada espécie a ser trabalhada (DAFNI, 1992; SOUZA et al., 2017a).

Para obtenção de resultados confiáveis quanto à germinação *in vitro* dos grãos de pólen, é imprescindível a utilização de meios de cultura que permitam a expressão do potencial fisiológico e o desenvolvimento do tubo polínico (TAYLOR; HEPLER, 1997; SOARES et al., 2008). O meio de cultura mais adequado deve ser parte de um protocolo específico considerando diversos fatores como sua composição, pH, condições de incubação, assim como aspectos relacionados à fisiologia do grão de pólen (SOARES et al., 2008).

Para um meio de cultura eficiente na germinação *in vitro* dos grãos de pólen, diferentes substâncias são adicionadas, a exemplo de carboidratos que atuam no fornecimento de energia e equilíbrio osmótico do grão de pólen e promoção do desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). O ácido bórico promove o crescimento do tubo polínico e reduz as chances de rompimento (FRANZON; RASEIRA, 2006); nitrato de cálcio favorece a formação dos atribuídos relacionados a fisiologia e na redução da sensibilidade dos grãos de pólen ao meio inserido, com a promoção da rigidez e crescimento do tubo polínico em formato linear (STANLEY; LINSKENS, 1974), além de micronutrientes e hormônios que são associados como principais componentes do meio de cultura (BREWBAKER; KWACK, 1963; PIO et al., 2007; SOARES et al., 2008).

### **Sistema reprodutivo em Bromeliaceae**

As bromélias podem se reproduzir tanto de forma sexuada, por autofecundação ou fecundação cruzada, e assexuada por meio de órgãos especializados como estolões ou rizomas (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006; HMELJEVSKI et al., 2007; RIBEIRO; MATALLANA, 2013; ROGALSKI et al., 2017;

PINANGÉ et al., 2020). Essa combinação é vantajosa a curto e longo prazo, pois possibilita a manutenção e permanência das espécies em seus habitats e na colonização em novos ambientes, favorecendo a conservação e evolução dessas plantas no espaço e no tempo (KARASAWA, 2009; LIU et al., 2010). A reprodução via estolões é comum em Bromeliaceae, principalmente nas espécies do gênero *Aechmea* (SAMPAIO et al., 2002) e *Lymania*. No entanto, para alguns táxons a propagação ocorre exclusivamente por um único método, como em *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006; ROGALSKI et al., 2009; ROGALSKI et al., 2017).

As espécies de Bromeliaceae podem apresentar autocompatibilidade autoincompatibilidade, agamospermia a cleistogâmia (CULLEY; KLOOSTER, 2007; MATAALLANA et al., 2010; SOUZA et al., 2017b), além de diferentes barreiras reprodutivas como a dicogamia e a heterostilia, ambos funcionando como um entrave para a autopolinização e assim promover a alogamia (BENZING, 2000). Assim como a protoginia, que se refere ao amadurecimento do gineceu, antes que o pólen esteja maduro, e é característica no gênero *Tillandsia* (GARDNER, 1986). Já a protandria, com o amadurecimento do androceu antes que o órgão feminino esteja receptivo, foi observada em algumas espécies do gênero *Vriesea* (MARTINELLI, 1997).

A autoincompatibilidade obriga a ocorrência de fecundação cruzada (xenogamia), como já observado em *Ananas comosus* (L. Merril), *A. ananassoides* (Bak.) L.B. Smith e *A. bracteatus* (Lindl.) Schult. & Schult (PAGGI et al., 2007). Acredita-se que alogamia seja o sistema reprodutivo basal em Bromeliaceae (BENZING, 2000; GIVNISH et al., 2007) e é comum em várias espécies já descritas na literatura de diferentes gêneros (VERVAEKE et al., 2001; WENDT et al., 2002; MATAALLANA et al., 2010; PAGGI et al., 2015; MATAALLANA et al., 2016; SOUZA et al., 2017b).

Diversos autores estudaram as barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas presentes em Bromeliaceae e relataram autoincompatibilidade gametofítica; diferença de comprimento entre o estilete e o comprimento do tubo polínico; morfologia e tamanho dos grão de pólen; inviabilidade dos grãos de pólen; ausência de germinação dos grãos de pólen por conta de ausência e insuficiência de nutrientes e hidratação no estigma; ausência de fatores associados ao quimiotropismo na área da micrópila para estimular o crescimento do tubo polínico;

degeneração precoce dos tecidos de reserva e do embrião; relação entre o tempo de receptividade do estigma e a ação dos agentes polinizadores, entre outros (VAN TUYL; DE JEU, 1997; VERVAEKE et al., 2001; 2002; MATAALLANA et al., 2016; SOUZA et al., 2017b). Para a superação dessas barreiras, já foram descritas algumas técnicas como a polinização com o estilete cortado, polinização no eixo placentário, enxertia de estilete, afins de garantir o sucesso na fertilização (VAN TUYL; DE JEU, 1997; VERVAEKE et al., 2001; 2002).

A utilização da microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta utilizando azul de anilina é uma técnica que permite a presença de calose nos tubos polínicos e conseqüentemente o sucesso e o insucesso da fertilização. Em estudos desenvolvidos por Souza et al. (2017b) em espécies de Bromeliaceae, foi possível observar o crescimento do tubo polínico nos diferentes sistemas reprodutivos e em hibridações interespecíficas e intergenéricas. O sucesso da fertilização pode ser evidenciado com o crescimento e deposição regular de calose e a penetração dos tubos polínicos na micrópila (SOUZA et al. 2017b). Já a deposição irregular de calose no tubo polínico, enovelamento dos tubos polínicos no estilete, paralização de crescimento em uma determinada região do estilete, evidencia as possíveis barreiras gametofíticas presentes nas espécies ou incongruências nos casos das hibridações (SOUZA et al. 2017b).

No entanto, apesar de tantos estudos, ainda há uma demanda grande de conhecimento, considerando a diversidade presente das espécies de Bromeliaceae. Neste contexto, o conhecimento da biologia reprodutiva dessas plantas, é importante para assegurar a sobrevivência e o estabelecimento dos indivíduos com a finalidade de subsidiar planos de manejo e conservação dessas espécies, muitas, já ameaçadas (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008).

As plantas direcionam uma boa parte da sua energia para reprodução, iniciada pela produção de flores em quantidades, diferentes colorações, formatos e dimensões, visando exclusivamente, a atração de polinizadores (HOWE; WETTLEY, 1997). Essas flores são direcionadas para tipos específicos de agentes polinizadores, garantindo o maior número de visitas, visto que esse é um dos fatores que influenciam no sucesso da fertilização e no número de sementes (PAGGI et al., 2007). Os fatores, como a biologia floral, estrutura espacial em que estão distribuídas as populações e as interações da planta com polinizador, são



cruciais nos processos envolvidos no sistema de cruzamento e a garantia do sucesso reprodutivo (GAUDEUL; TILL-BOTTRAUD, 2004).

A síndrome de polinização em Bromeliaceae é bem diversificada e, majoritariamente, há o predomínio da ornitofilia, principalmente envolvendo os beija-flores (KRAEMER et al., 1993; KESSLER; KRÖMER, 2000; KESSLER, 2002; TAGLIATI et al., 2018). Há também, a quiropterofilia (VOGEL, 1969; DOBAT; PEIKERT-HOLLE, 1985; HELVERSEN, 1993; SAZIMA et al., 1999), além de espécies de pequenos roedores (COCUCCI; SÉRSIC, 1998). É uma das poucas famílias em que a polinização por seres vertebrados se sobrepõe a realizada por insetos (ARAÚJO et al., 1994). Entre os invertebrados, estão os himenópteros e lepidópteros, como principais agentes polinizadores, realizada em menor frequência (SAZIMA et al., 1995; KAEHLER et al., 2005).

### **Hibridações em Bromeliaceae**

A hibridação atua como uma importante fonte de variação genotípica, formando indivíduos a partir de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos (VERVAEKE et al., 2002; 2003; 2004) que permitem a criação de cultivares ou variedades com novas combinações de formas e cores (VERVAEKE et al., 2001; 2004).

Na literatura, os primeiros registros envolvendo híbridos entre bromeliáceas foram relatados por Morren, em 1879, em plantas do gênero *Vriesea* (SAMYN, 1995). Nesse gênero, há uma grande compatibilidade reprodutiva entre espécies o que tem permitido a produção de híbridos controlados para fins artificiais (MCWILLIAMS, 1974; VERVAEKE et al., 2004) ou híbridos naturais (LUTHER, 1984; READ, 1984; WENDT et al., 2000; PALMA-SILVA et al., 2011; ZANELLA et al., 2015; COSTA et al., 2022).

Poucos são os registros científicos envolvendo hibridações em Bromeliaceae (VERVAEKE et al., 2002; 2003; SOUZA et al., 2017b; COSTA et al., 2021) mas inúmeros híbridos são registrados e estão no mercado suprindo a grande demanda das plantas ornamentais. No trabalho de Souza et al. (2017b), foram estudados os sistemas reprodutivos e as possíveis barreiras reprodutivas em hibridações interespecíficas e intergenéricas de dezesseis espécies de bromélias a partir de cruzamentos controlados. Realizou-se posterior germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo com microscopia de fluorescência.

Entre as hibridações de sucesso, a grande maioria foi associada ao gênero *Ananas* (24,96%). Entre as hibridações intergenéricas foi possível apenas nas combinações entre *Vriesea michaelii* W.Weber x *A. nahoumii* Leme e *V. simplex* (Vell.) Beer x *A. nahoumii* (SOUZA et al., 2017b). O insucesso observado por Souza et al. (2017b) foi semelhante ao observado em Vervaeke et al. (2002) com a incapacidade germinativa do grão de pólen na superfície do estigma, inibição do crescimento do tubo polínico no estilete, enovelamento ou paralisação dos tubos polínicos ou estilete como barreiras pré-zigóticas. Já os casos relacionados às barreiras pós-zigóticas, há ocorrência da fertilização e posterior aborto do embrião nas mais diversas fases de desenvolvimento (VERVAEKE et al., 2001).

Na Sociedade Internacional de Bromélias “*Bromeliad Society International*” (BSI, 2023) e no “*Journal of the Bromeliad Society*” estão registrados mais de 600 híbridos envolvendo inúmeras espécies de mais de 35 gêneros da família, sendo eles tanto de origem natural, como híbridos controlados. Na literatura, até o presente momento, não existe registros de híbridos envolvendo espécies de *Lymania*.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, p. 117-122, 1969.
- ALI, M.M.; HASHIM, N.; AZIZ, A.S.; LASEKAN, O. Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. **Food Research International**, Essex, v. 137, p. 109675, 2020.
- ALVES, M.; TROVÓ, M.; FORZZA, R. C.; VIANA, P. Overview of the systematics and diversity of Poales in the Neotropics with emphasis on the Brazilian flora. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, p. 305-328, 2015.
- ANACLETO, A.; ROVEDA, L.F.; RAMOS, R.A.S. Germination and survival of *Aechmea gamosepala* on different substrates. **Ornamental Horticulture**, Petrolina, v. 25, n. 3, p. 225-230, 2019.
- APG - Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 181, p. 1-20, 2016.
- ARAÚJO, A. C.; FISCHER, E. A.; SAZIMA, M. Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região de Juréia, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, Brasília, v. 17, p. 113-118, 1994.
- BAKER, J.G. **Handbook of the Bromeliaceae**. London: George Bell & Sons. 1889. 243 p.
- BARFUSS, M. H. J.; TILL, W.; LEME, E. M. C.; PINZÓN, J. P.; MANZANARES, J. M.; HALBRITTER, H.; SAMUEL, R.; BROWN, G. K. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**, Auckland, v. 279, n. 1, p. 1–97, 2016.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: Profile of an adaptative radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. **ICMBIO**. Disponível em: <[https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P\\_mma\\_148\\_2022\\_altera\\_anexos\\_P\\_mma\\_443\\_444\\_445\\_2014\\_atualiza\\_especies\\_ame\\_acadas\\_extincao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ame_acadas_extincao.pdf)> Acesso: 30 Novembro de 2022.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal Botany**, Columbus, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.
- BSI (BROMELIAD SOCIETY INTERNATIONAL). Bromeliad Cultivar Register: Lista de nomes. **Bromeliad Society International**, (Continuamente atualizado). Disponível em: <https://registry.bsi.org/>. Acesso em: 19 Janeiro de 2023.

BURNE, H. E.; YATES, C.J.; LADD, P.G. Comparative population structure and reproductive biology of the critically endangered shrub *Grevillea althoferorum* and two closely related more common congeners. **Biological Conservation**, Essex, v. 114, p. 53–65, 2003.

CAMPOS, D. A.; RIBEIRO, T. B.; TEIXEIRA, J. A.; PASTRANA, L.; PINTADO, M. M. Integral valorization of pineapple (*Ananas comosus* L.) By-products through a green chemistry approach towards Added Value Ingredients. **Foods**, West Lafayette, v. 9, n. 1, p. 60, 2020.

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

CHEN, A.; GUAN, Y. J.; BUSTAMANTE, M.; URIBE, L.; URIBE-LORÍO, L.; ROOS, M. M.; LIU, Y. Production of renewable fuel and value-added bioproducts using pineapple leaves in Costa Rica. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 141, p. 105675, 2020.

COCUCCI, A.; SÉRSIC, A. Evidence of rodent pollination in subtropical South America. In: OWENS, S. J.; RUDALL, P. J. (Eds.) **Reproductive biology**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1998. p. 113-121.

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

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

CULLEY, T. M.; KLOOSTER, M. R. The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. **The Botanical Review**, New York, v. 73, n. 1, p. 1–30, 2007.

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

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

DERIN, K.; ETI, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 25, p. 169-173, 1999.

DOBAT, K.; PEIKERT-HOLLE, T. **Blüten und Fledermäuse. Bestäubung durch Fledermäuse und Flughunde (Chiropterophilie)**. Waldermar Kramer: Frankfurt am Main, 1985.

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.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. do C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 5-7, 2006.

ERDTMAN, G. **Pollen Morphology and Plant Taxonomy**. Angiosperms. Stockholm: Almqvist and Wiksell, 1952.

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

ERDTMAN, G.; SORSA, P. **Pollen morphology and plant taxonomy: An introduction to palynology**. Sweden: Almqvist & Wiksell, 1952.

FAGUNDES, N. F.; ARAUJO MARIATH, J. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 300, n. 6, p. 1323-1336, 2014.

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, p. 303-319, 2004.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Lymania* R.W.Read. **REFLORA**. 2020. (continuamente atualizado). Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 28 Out. 2022.

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

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

FURNESS, C.A.; RUDALL, P.J. Pollen and anther characters in monocot systematics. **Grana**, Viena, v. 40, p. 17-25, 2001.

GARDNER, C. S. Preliminary classification of *Tillandsia* based on floral characters. **Selbyana**, Sarasota, n. 9, p.130-146, 1986.

GAUDEUL, M.; TILL-BOTTRAUD, I. Reproductive ecology of the endangered

alpine species *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Phenology, gene dispersal and reproductive success. **Annals of Botany**, Oxford, v. 93, p. 711-721, 2004.

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

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

GOMES, J. M. L.; SILVA, N. N. F. Bromeliaceae das restingas do estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza online**, Santa Teresa, v. 11, p. 79-89, 2013.

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**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 14-17, 2003.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. Encyclopaedia of Bromeliads, Version 4. **Utrecht University Botanic Gardens**. (continuamente atualizado). Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso em: 10 Jan. 2023.

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

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

HELVERSEN, V. O. Adaptations of flowers to the pollination by Glossophagine bats. In: BARTHLOTT, W.; NAUMANN, C. M.; SCHMIDT-LOSKE, K.; SCHUCHMANN, K. L. (Eds.). **Animal-plant interactions in tropical environments**. Bonn: Zoologisches Forschungsinstitut & Museum Alexander Koenig, 1993, pp. 41-59.

HESSE, M.; HALBRITTER, H.; ZETTER, R.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCHE-RADIVO, A.; ULRICH, S. **Pollen Terminology**: an illustrated handbook. New York: Springer Wien, 2009. 266p.

HIKAL, W. M.; MAHMOUD, A. A.; SAID-AL AHL, H. A.; BRATOVCIC, A.;

TKACHENKO, K.G.; KAČÁNIOVÁ, M.; RODRIGUEZ, R. M. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.), waste streams, characterisation and valorisation: An Overview. **Open Journal of Ecology**, Sharjah, v. 11, n. 9, p. 610-634, 2021.

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.

HOWE, H. F.; WESTLEY, L. C. Ecology of pollination and seed dispersal. In: CRAWLEY, M. J (Ed.). **Plant Ecology**. Oxford: Blackwell science, 1997.

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

JAMES, F. C.; MCCULLOCH, C. E. Multivariate Analysis in Ecology and Systematics: Panacea or Pandora's Box? **Annual Review of Ecology and Systematics**, Gothenburg, v. 21, p. 129-66, 1990.

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

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer Associates. 2 ed. 2002.

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

KARAKAYA, D. Effects of inflorescence on pollen viability and morphology of Strawberry (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Science and Technology**, Johor, v. 1, p. 43-47, 2011.

KARASAWA, M. M. G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira. 2009, 113p.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado, 1993, 579p

KERSTEN, R. A.; KUNIYOSHI, Y. S. Conservação das florestas na bacia do alto Iguaçu, Paraná - Avaliação da comunidade de epífitas vasculares em diferentes estágios serais. **Floresta**, Curitiba, v. 39, n. 1, p. 51-66, 2009.

KÉRY, M.; MATTHIES, D. Reduced Fecundity in Small Populations of the Rare Plant *Gentianopsis ciliate* (Gentianaceae). **Plant Biology**, New York, v. 6, p. 683-688, 2004.

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

KESSLER, M.; KRÖMER, T. Patterns and ecological correlates of pollination modes among bromeliad communities of Andean forests in Bolivia. **Plant Biology**. New York, v. 2, p. 659-669, 2000.

KRAEMER, M.; SCHMITT, U. E.; SCHUCHMANN, K. L. Notes on the organization of a Neotropical high-altitude hummingbird-flower community. *In*: BARTHLOTT, W.; NAUMANN, C.M.; SCHMIDT-LOSKE, K.; SCHUCHMANN K.-L. (Eds.). **Animal-plant interactions in tropical environments**. Germany: Bonn. pp. 61-65, 1993.

KUHN, S. A.; NOGUEIRA, F. M.; FAGUNDES, N. F.; MARIATH, J. E. Morphoanatomy of the ovary and ovule in Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae and its systematic relevance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 181, n. 3, p. 343-361, 2016.

LABOURIAU, M. L. S. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Rio de Janeiro: Academia brasileira de ciências, 1973, 291p.

LEME, E. M. C.; COUTO, D. R.; KOLLMANN, L. J.; FRAGA, C. N. Novelties in Stigmatodon (Bromeliaceae, Tillandsioideae), a genus endemic to Brazil: three new species, one new combination, and two new stigma types. **Phytotaxa**, Auckland, v. 576, n. 3, p. 233-249, 2022.

LIDUEÑA-PERÉZ, K. I.; MARTELO-SOLÓRZANO, A. M.; PAYARES-DÍAZ, I. R.; SANTOS-AMAYA, O. F.; CORREDOR-PRADO, J. P. *Ananas ananassoides* (Baker) LB Sm. a bromeliad from the savanna: seed morpho-anatomy and histochemistry. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 84, 2022.

LIMA, A. P. P. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 50, 2020.

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

LOPES FILHO, D. R. MANTOVANO, T.; NEVES, G. P.; SILVA, N. J.; MIRANDA, V. B. dos S.; LANSAC-TÔHA, F. A. Bromeliad phytotelmata: the first scientometric study. **Limnetica**, Bilbao, v. 42, n. 1, p. 143-154, 2023.

LUTHER, H. E. A hybrid *Pitcairnia* from western Ecuador [*Pitcairnia* X *daiseyana*, a new hybrid of *Pitcairnia heterophylla* and *Pitcairnia pungens*]. **Journal of Bromeliad Society**, Orlando, v. 34, p. 272-274. 1984.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 67, p. 101-104, 1996.



- MARINHO, F. J. E.; CUNHA, M. S.; FONTOURA, T. Fenologia da espécie *Lymania azurea* leme (Bromeliaceae) na reserva biológica de Una, BA. *In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL*, 8., 2007, Caxambu. **Anais** [...] São Paulo: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007.
- MARTINELLI, A. P. Morfologia e Conservação de Grãos de Pólen. *In: WORKSHOP DE MANEJO DE POMARES DE POLINIZAÇÃO CONTROLADA*, 16., 2012, São Paulo. **Anais** [...] São Paulo: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2012.
- MARTINELLI, G. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva ecológica de Macaé de Cima. *In: LIMA, H.C.; GUEDES-BRUNI, R. R. (Eds.). Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 213-250, 1997.
- MARTINELLI, G.; VIEIRA, C. M.; GONZALEZ, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A. F. D.; 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**, Viena, v. 289, p. 57-65, 2010.
- MATALLANA, G.; OLIVEIRA, P. E.; SILVA, P. R. R.; WENDT, T. Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south - eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 181, p. 521-531, 2016.
- MCINTOSH, M. E. Plant size, breeding system, and limits to reproductive success in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae). **Plant Ecology**, New York, v. 162, p. 273-288, 2002.
- MCWILLIAMS, E. Evolutionary Ecology. *In: SMITH, L.B.; DOWNS, J. (Eds.). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph*. New York: Hafner Press. 14 ed., v. 1, p. 33-39, 1974.
- MEZ, C. Bromeliaceae. *In: ENGLER, H. G. A. Monographiae Phanerogamarum prodromi nunc continuation*. Paris: Sumptibus Masson & C., Parisiis, v. 9, p. 1-990. 1896.
- MEZ, C. Bromeliaceae. *In: VON MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.W.; URBAIN, I. (Eds.) Flora Brasiliensis*. Leipzig: München, v. 3, p. 173-674, 1891-1994.
- 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**. Brasília, v. 19, p. 61-70, 2005.

- NACATA, G.; BELONSI, T. K.; GASPARINO, E. C.; ANDRADE, R. A. D. Pollen morphology and availability of pollen and stigma in *Syzygium* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, 2019.
- NEGRELLE, R. R. B.; MURARO, D. Aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 21, p. 95-102, 2006.
- NEVES, B.; KESSOUS, I. M.; MOURA, R. L.; COUTO, D. R.; ZANELLA, C. M.; ANTONELLI, A.; BACON, C. D.; SALGUEIRO, F.; COSTA, A. F. Pollinators drive floral evolution in an Atlantic Forest genus. **Plantas AoB**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 046, 2020.
- NOGUEIRA, F. M.; NATIVIDADE, F.F.; KUHN, S. A.; FREGONEZI, J. N.; MARIATH, J. N. Ovary and ovule anatomy in the nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 177, n. 1, p. 66-77, 2015.
- OLIVEIRA, R. S.; SOUZA, F. V. D.; SANTOS, I. L.; SOUZA, S. D. O.; AONA, L. Y. S.; SOUZA, E. H. Criopreservação e armazenamento em baixa temperatura de sementes de espécies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) com potencial ornamental. **3 Biotech**, Porto Alegre, v. 11, n. 4, p. 186, 2021.
- OLIVEIRA, F. M. C.; RODRIGUES, A. C.; LUSA, M. G.; ALBUQUERQUE-MELO, G. F.; Androecium and gynoeceum anatomy of Bromeliaceae species. **Flora**, Jena, v. 263, p. 151538, 2020.
- OLIVEIRA, F. M. C.; SOUZA, A. M. D.; CORRÊA, B. B. R.; MAEDA, T. M.; MELO-DE-PINNA, G. F. Anatomia floral de *Aechmea distichantha* Lem. e *Canistropsis billbergioides* (Schult. & Schult. f) Leme (Bromeliaceae). **Hoehnea**, São Paulo, v. 43, p. 183-193, 2016.
- OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açazeiro. **Acta Botânica Brasilica**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 63-67, 2001.
- PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; LEXER, C.; BERED, F. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic Forest bromeliad. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Jena, v. 211, p. 1-10, 2015.
- PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; SILVEIRA, L. C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; BERED, F. Fertilidade de *Vriesea gigantea* Gaud.(Bromeliaceae) no sul do Brasil. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 94, n. 4, p. 683-689, 2007.
- PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M. F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive

isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, United Kingdom, v. 20, n. 15, p. 3185-3201, 2011.

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

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

PINANGÉ, D. S. B.; LOUZADA, R. B.; WÖHRMANN, T.; KRAPP, F.; WEISING, K.; ZIZKA, G.; POLO, E. M.; WANDERLEY, M. G. L.; BENKO-ISEPPON, A. M. Population genetics shed light on species delimitation and life history of the *Dyckia pernambucana* complex (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 20, p. 1-20, 2020.

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, n. 1, p. 147-153, 2007.

PRADO, K. S.; SPINACÉ, M. A. S.; Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from pineapple crown waste and their potential uses. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 122, p. 410-416, 2019.

PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of paleobotany and palynology**, Stockholm, v. 143, n. 1-2, pg. 1-81, 2007.

RAYNALD, J.; RAYNALD, A. Une technique de preparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia**, Paris, v. 11, p. 77-79, 1971.

READ, R.W. The 'Evolution' of a new genus, *Lymania* gen. nov. **Journal of the Bromeliad Society**, Florida, v. 34, p. 199-216, 1984.

RIBEIRO, I. F.; MATALLANA, G. Biologia reprodutiva de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 64., 2013, Belo Horizonte. **Anais [...]** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2013.

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

ROGALSKI, J.M.; REIS A.; ROGALSKI, M.; MONTAGNA, M.; REIS, M. S. Mating System and Genetic Structure Across All Known Populations of *Dyckia brevifolia*: A Clonal, Endemic, and Endangered Rheophyte Bromeliad. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 108, n. 3, p. 299-307, 2017.

ROMERO, G. Q.; MARINO, N. A. C.; MACDONALD, A. A. M.; CÉRÉGNINO, R.; TRZCINSK, M. K.; MERCADO, D. A.; LEROY, C.; CORBARA, B.; FARJALLA, V. F.; BARBERIS, I. M.; DÉZERALD, O.; HAMMILL, E.; ATWOOD, T. B.; PICCOLI, G. C. O.; BAUTISTA, F. O.; CARRIS, J-F.; LEAL, J. S.; MONTERO, G.; ANTIQUEIRA, P. A. P.; FREIRE, R.; REALPE, E.; AMUNDRUD, S. L.; OMENA, P. M.; CAMPOS, A. B. A.; KRATINA, P.; O'GORMAN, F. J.; SRIVASTAVA, D. S. Extreme rainfall events alter the trophic structure in bromeliad tanks across the Neotropics. **Nature communications**, London, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2020.

SAMPAIO, J. A. T.; PAGGI, G. M.; ZANELLA, C. M.; BRUXEL, M.; PALMA-SILVA, C.; GOETZE, M.; BÜTTOW, M. V.; BERED, E. F. Inbreeding depression in *Vriesea gigantea*, a perennial bromeliad from Southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 169, p. 312-319, 2012.

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

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

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

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

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Polinização de *Vriesea* por morcegos no Sudeste brasileiro. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 29-37, 1995.

SCHROEDER, G. R.; VIEIRA JÚNIOR, N. P.; DEC, E.; MOUGA, D. M. S. Caracterização palinológica de Bromeliaceae (A. Juss.) de São Francisco do Sul, Santa Catarina. **Acta Biológica Catarinense**, Joenville, v. 6, n. 1, p. 46-57, 2019a.

SCHROEDER, G. R.; VIEIRA JÚNIOR, N. P.; DEC, E.; MOUGA, D. M. S. Morfologia pólinica de espécies do gênero *Aechmea* (Bromeliaceae) do Parque Estadual do Acaraí, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, Joenville, v. 6, n. 1, p. 38-47, 2019b.

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

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

SIQUEIRA FILHO, J. A.; MACHADO, I. C. Fenologia e Biologia floral em *Araeococcus parviflorus* (Mart. ex Schultes f.) Lindl. e *Lymania smithii* R.W. Read, espécies ameaçadas da Floresta Atlântica Nordeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 51., 2000, Brasília. **Anais [...]** Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2000.

SIQUEIRA, S. F. H.; COSTA, A. F.; TONI, K. L. G. Beyond SEM: Stigmatic margins in Bromeliaceae. **Flora**, Jena, v. 298, p. 152195, 2023.

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**, Viçosa, v. 8, p. 111-118, 2008.

SOUZA, L. O. F.; WENDT, T.; BROWN, G. K.; TUTHILL, D. E.; EVANS, T. M. Monophyly and phylogenetic relationships in *Lymania* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on morphology and chloroplast DNA sequences. **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 32, n. 2, p. 264-270, 2007.

SOUZA, L. O. F.; WENDT, T. Taxonomy and conservation of the genus *Lymania* (Bromeliaceae) in the southern Bahian Atlantic Forest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 157, n. 1, p. 47-66, 2008.

SOUZA, E. H.; AONA, L.Y. S.; SOUZA, F. V. D.; LEME, E. M. C. *Lymania involucrata* (Bromeliaceae: Bromelioideae), a new ornamental species from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 489, n. 2, p. 209-215, 2021.

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

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

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

- SOUZA, F. C.; MENDONÇA, C. B. F.; GONÇALVES-ESTEVEES, 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.
- SRIVASTAVA, D. S. Extreme rainfall events alter the trophic structure in bromeliad tanks across the Neotropics. **Nature communications**, London, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2020.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1974. 307p.
- TAGLIATI, M. C.; OLIVEIRA, H. C.; FARIA, A. P. G. Fenologia reprodutiva, recursos florais e polinização de espécies de bromeliaceae em um remanescente urbano de Floresta Atlântica do sudeste brasileiro. **Diversidade e Gestão**, Niterói, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2018.
- TARDIVO, R.C.; RODRIGUES, W. A. Pólen e estigma das espécies de *Nidularium* Lem. e *Canistrum* 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.
- TSUDA, É. T.; CASTELLANI, T. T.; *Vriesea friburgensis*: A natural trap or a nurse plant in coastal sand dunes?. **Austral Ecology**, New South Wales, v. 41, n. 3, p. 273-281, 2016.
- TULER, A. C.; SILVA, T.; CARRIJO, T. T.; GARBIN, M. L.; MENDONÇA, C. B. F.; PEIXOTO, A. L.; GONÇALVES-ESTEVEES, V. Taxonomic significance of pollen morphology for species delimitation in *Psidium* (Myrtaceae). **Plant Systematic Evolution**, Viena, v. 303, p. 317-327, 2017.
- VAN TUYL, J. M.; DE JEU, M. J. **Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Pollen biotechnology for crop production and improvement**. New York: Cambridge University Press. pp. 273-292, 1997.
- VANHOUTTE, B.; CEUSTERS, J.; DE PROFT, M. P. The tubing phenomenon in commercial cultivation of *Guzmania*: Morphology, physiology and anatomy. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 205, p. 112-118, 2016.
- VASCONCELLOS, V. C.; OLIVEIRA, J. M. S. Descrição morfológica e anatômica da estrutura floral em *Dyckia ibicuiensis* Strehl (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetinga, v. 6, n. 6, p. 58-69, 2019.
- VERVAEKE, I.; LONDERS, E.; DERROOSE, R.; DE PROFT, M. P. In vitro pollination and fertilization in Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 612, p. 23-25. 2003.

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

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.

VIEHMANNOVA, I.; CEPKOVA, P. H.; VITAMVAS, J.; STREBLOVA, P.; KISILOVA, J. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Boston, v. 125, p. 293-302, 2016.

VOGEL, S. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. **Neue Mitteil Flora**. V. 158, p. 289-323, 1969.

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

WANDERLEY, M. G. L.; MARTINS, S. E., COORDS. Bromeliaceae. *In*: WANDERLEY, M. G. L., SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S., GIULIETTI, A. M., (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 5, p. 39-161, 2007.

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.

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.

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**, Viena, v. 232, n. 3-4, p. 201-212, 2002.

ZANELLA, C. M.; PALMA-SILVA, C.; GOETZE, M.; BERED, F. Natural hybridization between two sympatric species of bromeliads from Atlantic Forest: evolutionary implications. *In*: World Congress on Bromeliaceae Evolution, 1., 2015, Porto de Galinhas. **Anais [...]** Porto de Galinhas: Bromeliad Society International, 2015.

ZUCCHI, M. R.; SILVA, M. W. D.; SIBOV, S. T.; PIRES, L. L. Ornamental and landscape potential of a bromeliad native to the Cerrado. **Ornamental Horticulture**, Petrolina, v. 25, p. 425-433, 2020.



## CAPÍTULO 1

### **MORFOLOGIA E VIABILIDADE POLÍNICA DE ESPÉCIES DE *Lymania* (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Manuscrito a ser ajustado e submetido ao periódico científico *Microscopy Research and Techniques*,

**MORFOLOGIA E VIABILIDADE POLÍNICA DE ESPÉCIES DE *Lymania*  
(BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO NORDESTE DO  
BRASIL E AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO<sup>1</sup>**

**RESUMO:** O gênero *Lymania* pertence à família Bromeliaceae e atualmente possui dez espécies endêmicas no Nordeste do Brasil restritas ao domínio da Mata Atlântica e, a grande maioria ameaçada de extinção. Estudos sobre morfologia e viabilidade polínica fornecem informações importantes para estudos taxonômicos, reprodutivos e para conservação das espécies. Este trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia polínica e a viabilidade de grãos de pólen de nove espécies de *Lymania* que ocorrem no estado da Bahia, Brasil. Para a caracterização morfológica, os grãos de pólen foram coletados e processados para microscopia de luz (ACLAC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para os testes histoquímicos, foram utilizadas duas soluções: Alexander e diacetato de fluoresceína em três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese). A germinação dos grãos de pólen foi determinada pela germinação *in vitro* utilizando dois meios de cultura (BM e SM) nos mesmos estádios. Todas as espécies apresentam grãos de pólen monades com exceção de *L. languida* com grãos arranjados em tétrades, tamanho médio, com formatos oblato a suboblato, simetria bilateral, abertura triporado para a maioria das espécies, exina semitectada a eutectada, ornamentação variando de reticulada-heterobrocada, psilada a perforada. Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentaram altas porcentagens de viabilidade na antese, independentemente do método utilizado, histoquímico ou germinação *in vitro*. O meio de cultura SM e a coleta dos grãos de pólen no estágio de antese floral foram os mais adequados para as espécies de *Lymania*. Conhecer a estrutura dos grãos de pólen e viabilidade polínica dessas espécies confere dados importantes para a taxonomia bem como para os cruzamentos controlados e obtenção de sementes ou para os ensaios de conservação, especialmente das espécies ameaçadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bromélia, Biologia floral e reprodutiva; Conservação, Germinação *in vitro*; Viabilidade polínica; Teste histoquímico; Taxonomia.

**POLLEN MORPHOLOGY AND VIABILITY OF *Lymania* (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) SPECIES ENDEMIC TO NORTHEAST BRAZIL AND ENDANGERED**

**ABSTRACT:** The genus *Lymania* Read belongs to the Bromeliaceae family and currently contains ten species, all endemic to Northeast Brazil, restricted to the Atlantic Forest domain. Most of these species are classified as endangered or have not yet been evaluated in this regard. Studies of the pollen morphology and viability and reproductive systems provide important information for taxonomic and reproductive investigations and efforts to preserve these species. The objective of this work was to evaluate the pollen morphology and viability of nine *Lymania* species that occur in the state of Bahia, Brazil. For morphological characterization, the pollen grains were collected and processed for light microscopy (ACLAC method) and scanning electron microscopy (SEM). In the histochemical tests, two stains were used, Alexander's solution and fluorescein diacetate, in three floral development stages (pre-anthesis, anthesis and post-anthesis). The pollen grains were germinated *in vitro* using two culture media (BM and SM) in the same stages. All the species had monad pollen grains, except for *L. languida*, which had grains arranged in tetrads. The grains of the majority of species had medium size, oblate to suboblate shape, bilateral symmetry, triporate opening, semitected or eutectate exine, and ornamentation varying from reticulated-heterobrocade, psilate or perforate. The grains presented high viability percentages, mainly during anthesis, independent of the method used (histochemistry or *in vitro* germination). The SM culture medium and collection of the pollen grains at the floral anthesis stage were the best strategy for the *Lymania* species. This study presents the first report of the palynological characterization of the *Lymania* species, contributing to their taxonomy and species characterization. Knowledge of the morphology of pollen grains and their viability is important for controlled crosses to obtain seeds for conservation of species, especially endangered species.

**KEYWORDS:** Bromeliad, floral and reproductive biology, *in vitro* germination; pollen viability; histochemical testing; taxonomy.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Lymania* Read pertence à família Bromeliaceae e atualmente possui dez espécies (GOUDA et al., 2023). Todas as espécies do gênero são endêmicas do Nordeste, mais especificamente do sul da Bahia, exceto a *L. smithii* Read que ocorre em Alagoas e Pernambuco, com todas as espécies restritas ao domínio da Mata Atlântica (SOUSA; WENDT, 2008). São plantas que se caracterizam por serem epífitas ou raramente terrestres, com flores completas e ovário profundamente sulcado ou alado (SOUSA; WENDT, 2008).

A Mata Atlântica possui alta biodiversidade, um grande número de espécies endêmicas e está entre os 35 *hotspots* do planeta (MITTERMEIER et al., 2011). A maioria das espécies do gênero *Lymania* estão ameaçadas de extinção conforme o Livro Vermelho da Flora do Brasil (FORZZA et al., 2013) e União Internacional para Conservação da Natureza, devido as atividades antrópicas provocadas no bioma que alteram seu habitat natural, além do constante aumento na demanda comercial de plantas ornamentais representante em Bromeliaceae (NEGRELLE et al. 2012).

Investigações da morfologia polínica fornecem informações importantes para estudos taxonômicos auxiliando na melhor delimitação de espécies muito semelhantes (MAJEED et al., 2020). Alguns estudos foram publicados sobre a morfologia de grãos de pólen em Bromeliaceae de diferentes gêneros, como podem ser evidenciado nos trabalhos de Halbritter (1992), Moreira et al. (2005), Soares et al. (2011), Silva et al. (2016), Souza et al. (2017; 2021), Santos et al. (2018), Schroeder et al. (2019), Santos-Teixeira et al. (2020), Santos et al. (2021) e Leme et al. (2022) mas para as espécies do gênero *Lymania*, esse é o primeiro registro, com exceção de *L. smithii* e *L. spiculata* que já tinha sido descrita por Halbritter (1992; 2016). Apesar dos trabalhos já realizados, o conhecimento dos caracteres polínicos ainda é limitado considerando o grande número de espécies dentro de família.

Os grãos de pólen possuem características morfológicas únicas, sendo responsável pela transferência do material genético masculino e por isso, tem sido foco de vários estudos reprodutivos para várias espécies (HESSE et al., 2009). Além disso, o conhecimento sobre a abertura dos grãos de pólen e ornamentação da exina são importantes na identificação de espécies dentro da família (EHLER;

SCHILL, 1973; ERDTMAN; PRAGLOWSKI, 1974; SOUZA et al., 2021; SANTOS et al., 2021).

Além da morfologia, a viabilidade polínica é importante para estudos reprodutivos, conservacionistas e de melhoramento genético de diversas espécies (SOUZA et al., 2017; 2021). Além disso, os grãos de pólen podem ser criopreservados, de modo a garantir a conservação e possibilitar cruzamentos controlados em diferentes espécies especialmente em casos de assíncrona de florescimento (SOARES et al., 2011; SOUZA et al., 2015). A determinação da viabilidade polínica pode ser realizada de diferentes formas, através de métodos de indução a germinação *in vitro* ou testes histoquímicos (SOARES et al., 2008; SOUZA et al., 2017; 2021; SANTOS et al., 2021).

A germinação *in vitro* é o teste mais utilizado para determinar a fertilidade dos grãos de pólen, pois simula a interação dos grãos de pólen com o estigma induzindo o crescimento do tubo polínico (SOARES et al., 2013). Para o sucesso da germinação *in vitro*, alguns fatores como, estado nutricional da planta, horário e técnica utilizada para a coleta dos grãos de pólen, temperatura, fotoperíodo, período de incubação e composição do meio de cultura, são fundamentais (TAYLOR; HEPLER, 1997; SOARES et al., 2008). Para cada espécie, são necessários ajustes no meio de cultura para obter estimativas confiáveis de viabilidade. O meio básico utilizado em germinação consiste em sacarose, ácido bórico, nitrato de cálcio e outras substâncias (BREWBAKER; KWACK, 1963).

Esse estudo pretende gerar informações que possam subsidiar futuros estudos taxonômicos da família Bromeliaceae, trabalhos de conservação do gênero e ações de melhoramento genético a partir de cruzamentos controlados. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de grãos de pólen e a morfologia polínica de nove espécies de *Lymania* endêmicas do Nordeste, mais especificamente no sul do estado da Bahia, Brasil, onde cada espécie aqui estudada apresenta algum grau de ameaça de extinção.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram estudadas nove espécies de *Lymania* endêmicas do Nordeste do Brasil (Tabela 1). Todas as espécies foram coletadas em populações naturais, o voucher incorporado no Herbário do Recôncavo da Bahia (HURB) e amostras vivas

depositadas no Banco de Germoplasma de Bromélias (BGB Bromélia) do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPG-RGV) da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As coletas foram realizadas conforme autorização do SISBIO n. 69870-1 e as atividades realizadas estão devidamente cadastradas no SISGEN, sob a autorização A9E9F8D.

**Tabela 1.** Espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) ocorrentes na Bahia, Brasil, incluindo o município de coleta e voucher do Herbário HURB, endemismo e status de ameaça.

| Espécie  | Município de Coleta                           | HURB (voucher)                      | Endemismo    | Status de Ameaça* |
|--|---|-------------------------------------|--------------|-------------------|
| <i>L. azurea</i> Leme                                | Una   | 18873                               | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. brachycaulis</i> (E.Morren ex Baker) L.F.Sousa | Camamu  | 25954                               | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. corallina</i> (Brongn. ex Beer) Read           | Ilhéus,<br>Itacaré,<br>Uruçuca,               | 23965,<br>27852,<br>25953           | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. globosa</i> Leme                               | Igrapiúna,<br>Ilhéus,<br>Ituberá,<br>Uruçuca, | 25392,<br>30427,<br>30457,<br>27803 | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. involucrata</i> Leme & E.H.Souza               | Igrapiúna                                     | 25815                               | Sul da Bahia | CR                |
| <i>L. languida</i> Leme                              | Uruçuca                                       | 27855                               | Sul da Bahia | NE                |
| <i>L. marantoides</i> (L.B.Sm.) Read                 | Ibicaraí                                      | 30616                               | Sul da Bahia | NE                |
| <i>L. smithii</i> Read                               | Igrapiúna,<br>Una, Uruçuca                    | 30435,<br>30416,18872               | Nordeste     | NE                |
| <i>L. spiculata</i> Leme & Forzza                    | Jussari                                       | 30618                               | Sul da Bahia | CR                |

\* Conforme IUCN (2023), Forzza et al. (2013) e Souza et al. (2021). EN = Em Perigo; CR = Criticamente Ameaçada; NE = Não avaliada.

### *Morfologia dos grãos de pólen*

Os grãos de pólen foram desidratados em série etílica crescente por 20 minutos cada. As amostras foram secas em HMDS (Hexamethyldisilazane, Sigma® Life Science) e montadas sobre suportes metálicos recobertos com fita adesiva carbonada e metalizadas com ouro por 180 segundos (Leica EM ACE 600 Wetzlar, Alemanha). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de pressão variável JEOL JSMIT300LV (Tokyo, Japão) operando a 20 kV sendo as imagens digitalizadas. A classificação dos grãos de pólen foi de acordo com a nomenclatura descrita por Punt et al. (2007) e Halbritter et al. (2018).

### *Produção e tamanho dos grãos de pólen*

Para a quantificação dos grãos de pólen, foi realizada a contagem dos grãos produzidos por flor que possui seis anteras. Foram coletadas cinco flores em estágio de pré-antese de diferentes plantas e armazenadas individualmente em tubos de Eppendorf®, seguindo a metodologia descrita por Kearns e Inouye (1993).

Para mensurar o tamanho dos grãos de pólen foi realizada a acetólise láctica fraca (ACLAC 40), que consiste na retirada do conteúdo citoplasmático dos grãos facilitando a visualização da parede polínica e medição, conforme metodologia de Raynal e Raynal (1971). As lâminas foram examinadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tóquio, Japão). Foram medidos o diâmetro polar, diâmetro equatorial menor, diâmetro equatorial maior e espessura da exina de 25 grãos de pólen escolhidos aleatoriamente com um auxílio do software ImageJ 1.46r (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) (RASBAND 1997-2012). As medidas do lumem foram realizadas tomando como referência a maior distância entre elas. Foram analisados estatisticamente quanto à média das medidas e desvio padrão.

### *Testes histoquímicos dos grãos de pólen*

Para os testes histoquímicos para avaliação da viabilidade polínica, foram utilizadas duas soluções: Alexander (ALEXANDER, 1969) e diacetato de fluoresceína (FDA) (HESLOP-HARRISON; HESLOP-HERRISON, 1970). A porcentagem de viabilidade foi avaliada utilizando cinco flores de plantas diferentes em cada estágio de desenvolvimento floral (pré-antese – 18h, flor em botão; antese – 7h, flor recém-aberta; e pós-antese – 7h, flores recém fechadas).

Os grãos de pólen foram distribuídos em lâminas de vidro com uma gota do respectivo corante e cobertos com uma lamínula. As lâminas foram examinadas com auxílio de microscópio de fluorescência Olympus BX51 acoplado à uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tóquio, Japão). Para a viabilidade dos grãos de pólen com solução de Alexander as imagens foram obtidas em campo claro e para o FDA as imagens foram obtidas em microscopia de fluorescência com filtro UV. A fim de se obter uma boa amostragem, foi utilizado o método de varredura, sendo contabilizados, para ambos os corantes, 100 grãos de pólen por lâmina com três repetição por tratamentos, perfazendo um total de 300 grãos de pólen.

O delineamento experimental para os testes histoquímicos dos grãos de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 x 9 (testes histoquímicos x estágio de desenvolvimento floral x espécie) com cinco repetições. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ ) para os estádios de abertura da flor, F ( $p < 0,01$ ) para os dois testes histoquímicos e Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) para a espécie, por meio do software R Core Team (2018).

#### *Germinação in vitro dos grãos de pólen*

Foram coletadas três flores nos mesmos cinco estádios de desenvolvimento floral, como descrito acima. A germinação dos grãos de pólen foi determinada pela germinação *in vitro* utilizando dois meios de cultura: BM: (PARTON et al., 2002):  $H_3BO_3$  (0,01%); sacarose (20%); ágar (0,5%); pH ajustado para 6,5; e SM: (SOARES et al., 2008):  $H_3BO_3$  (0,01%);  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (0,03%);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,02%);  $KNO_3$  (0,01%); sacarose (15%); ágar (0,8%); pH 6,5.

Os grãos de pólen foram depositados em placas de Petri contendo 35 mL dos diferentes meios de cultura, espalhados com auxílio de um pincel e mantidos por 24 horas à temperatura  $27 \pm 1^\circ C$  em câmara incubadora B.O.D. no escuro. As imagens dos grãos de pólen germinados foram capturadas com um estereomicroscópio Leica EZ4 D (Leica Wetzlar, Alemanha). Após o período de inoculação a germinação foi estimada (em porcentagem) a partir da contagem dos grãos de pólen germinados sobre o total.

Para mensurar o comprimento do tubo polínico foi utilizado o programa ImageJ 1.46r. Cinco tubos foram medidos aleatoriamente em cada quadrante,



totalizando 60 tubos polínicos em cada tratamento. Os grãos de pólen com tubos de comprimento maior ou igual ao diâmetro do grão de pólen foram considerados germinados conforme metodologia descrita por Soares et al. (2008).

O delineamento experimental para germinação de grãos de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 x 9 (meio de cultura x estágio de desenvolvimento floral x espécie) com 12 repetições, sendo cada repetição, representada por três placas de Petri subdividida em quatro quadrantes.

Os dados de percentagem 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 as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ ) para os estádios de abertura da flor, F ( $p < 0,01$ ) para os dois meios de cultura e Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) para a espécie, por meio do software R Core Team (2018).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Morfologia dos grãos de pólen*

Foi observada variabilidade morfológica entre as nove espécies de *Lymania*, principalmente em relação ao formato dos grãos de pólen, abertura, tipo e ornamentação da exina (Tabelas 1, 2 e Figura 1). O gênero *Lymania* não possui uma característica palinológica padrão, já que existe uma variação desde a grãos de pólen monades a tétrades com formato que variam de oblato a suboblato, aberturas dos grãos biporados a triporados além da sua ornamentação variar de reticulada-heterobrocada, psilada à perforada (Tabela 3 e Figura 1). Já dentro das espécies, essa característica é consistente, pois foram avaliadas mais de um espécime coletado em diferentes localidades.

**Tabela 2.** Características morfométricas dos grãos de pólen de nove espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas no Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção.

| Espécie                | Vista equatorial <sup>1</sup> |                              | Vista polar <sup>1</sup> |                       | P/E <sup>2</sup> |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------|
|                        | Diâmetro polar (P) (µm)       | Diâmetro equatorial (E) (µm) | Equatorial maior (µm)    | Equatorial menor (µm) |                  |
| <i>L. azurea</i>       | 32,45 ± 1,20                  | 45,42 ± 2,95                 | 41,08 ± 2,04             | 35,07 ± 5,82          | 0.71             |
| <i>L. brachycaulis</i> | 34,72 ± 2,14                  | 44,37 ± 2,81                 | 42,38 ± 2,35             | 37,20 ± 2,06          | 0.78             |
| <i>L. corallina</i>    | 36,15 ± 1,61                  | 48,91 ± 3,36                 | 43,01 ± 2,70             | 37,70 ± 2,48          | 0.74             |
| <i>L. globosa</i>      | 28,73 ± 2,75                  | 43,89 ± 2,80                 | 38,24 ± 3,46             | 32,54 ± 4,64          | 0.65             |
| <i>L. involucrata</i>  | 30,02 ± 3,89                  | 43,14 ± 5,03                 | 39,73 ± 3,59             | 34,48 ± 4,37          | 0.70             |
| <i>L. languida</i>     | 31,68 ± 2,81                  | 47,75 ± 4,37                 | 36,95 ± 3,20             | 31,00 ± 1,63          | 0.66             |
| <i>L. marantoides</i>  | 27,33 ± 2,21                  | 42,28 ± 1,98                 | 37,18 ± 2,58             | 31,26 ± 2,28          | 0.65             |
| <i>L. smithii</i>      | 24,56 ± 1,35                  | 32,75 ± 3,03                 | 30,85 ± 2,23             | 26,94 ± 2,29          | 0.75             |
| <i>L. spiculata</i>    | 28,58 ± 2,48                  | 36,46 ± 4,22                 | 32,28 ± 2,11             | 30,56 ± 2,98          | 0.78             |

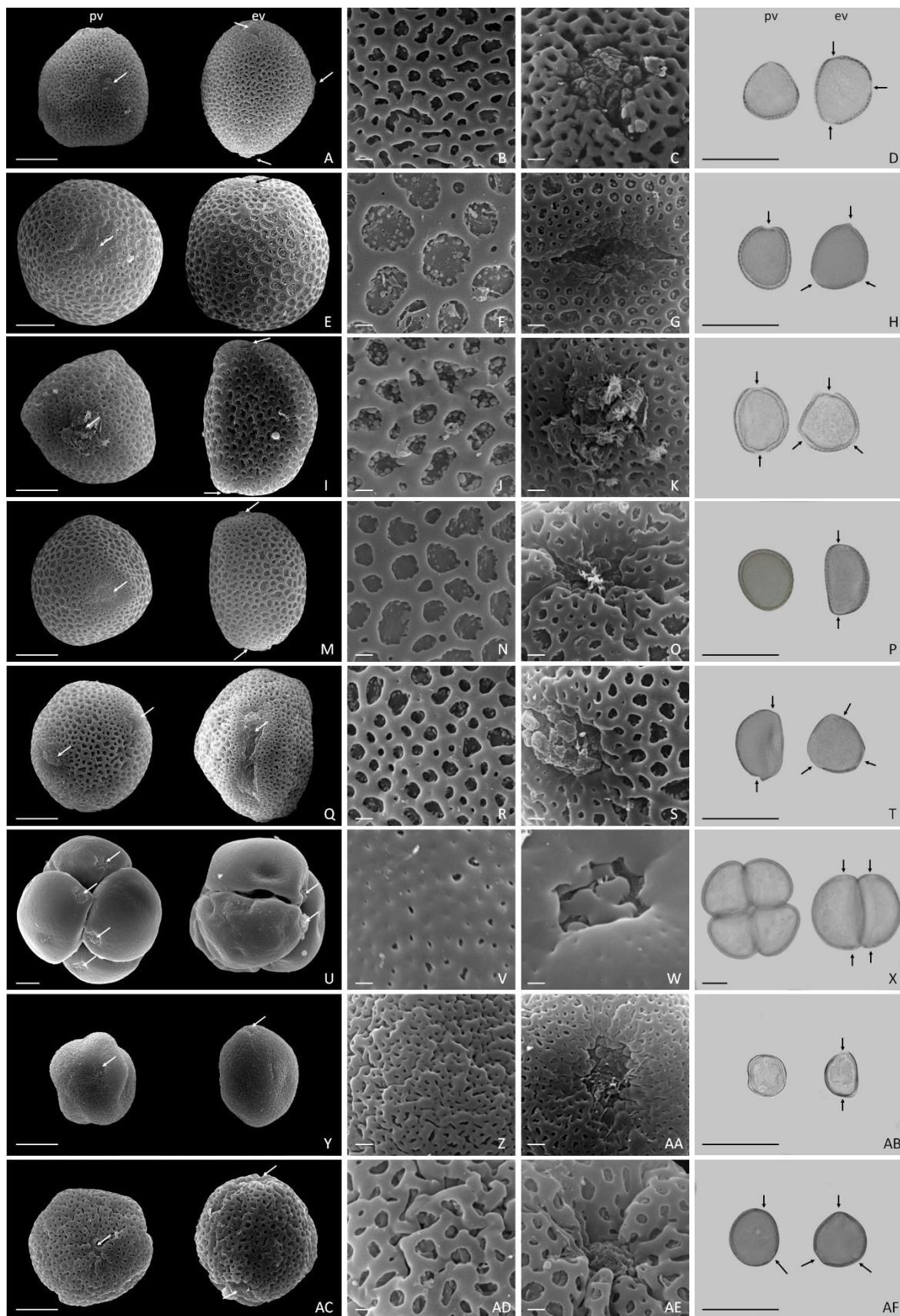
| Espécie                | Espessura <sup>1</sup> |             | Diâmetro <sup>1</sup> | Número de grãos de pólen <sup>3</sup> |
|------------------------|------------------------|-------------|-----------------------|---------------------------------------|
|                        | Exina (µm)             | Teto (µm)   | Lumem (µm)            |                                       |
| <i>L. azurea</i>       | 2,05 ± 0,25            | 0,55 ± 0,14 | 1,03 ± 0,18           | 16.393 f                              |
| <i>L. brachycaulis</i> | 2,07 ± 0,32            | 0,33 ± 0,09 | 1,52 ± 0,11           | 112.500 b                             |
| <i>L. corallina</i>    | 3,24 ± 0,41            | 0,35 ± 0,07 | 1,34 ± 0,10           | 130.000 a                             |
| <i>L. globosa</i>      | 2,39 ± 0,33            | 0,31 ± 0,07 | 1,46 ± 0,06           | 40.000 c                              |
| <i>L. involucrata</i>  | 2,43 ± 0,35            | 0,66 ± 0,18 | 1,29 ± 0,11           | 126.622 a                             |
| <i>L. languida</i>     | 2,67 ± 0,40            | 1,03 ± 0,24 | 0,26 ± 0,04           | 76.666 c                              |
| <i>L. marantoides</i>  | 2,35 ± 0,28            | 0,28 ± 0,15 | 1,33 ± 0,10           | 51.555 d                              |
| <i>L. smithii</i>      | 1,58 ± 0,27            | 0,34 ± 0,07 | 0,21 ± 0,06           | 32.083 e                              |
| <i>L. spiculata</i>    | 1,76 ± 0,24            | 0,76 ± 0,14 | 1,23 ± 0,16           | 28.333 e                              |

<sup>1</sup>Os grãos de pólen foram acetolizados com ACLAC conforme Raynal e Raynal (1979). Os resultados correspondem à média de 25 repetições ± desvio padrão; <sup>2</sup>De acordo com o método descrito por Punt et al. (2007) e Halbritter et al. (2018). <sup>3</sup>Conforme metodologia de Kearns e Inouye (1993). Letras iguais na coluna do número de grãos de pólen não diferem pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Características morfológicas de grãos de pólen de diferentes espécies de *Lymania* (Bromeliaceae) endêmica do Nordeste do Brasil e ameaçada de extinção.

| Espécie                | Formato <sup>1</sup> | Polaridade <sup>1</sup>   | Simetria <sup>1</sup> | Abertura <sup>1</sup> |
|------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>L. azurea</i>       | Oblato               | Heteropolar               | Bilateral             | Triporado             |
| <i>L. brachycaulis</i> | Suboblato            | Heteropolar               | Bilateral             | Triporado             |
| <i>L. corallina</i>    | Oblato               | Heteropolar               | Bilateral             | Triporado             |
| <i>L. globosa</i>      | Oblato               | Subisopolar               | Bilateral             | Biporado              |
| <i>L. involucrata</i>  | Oblato               | Heteropolar               | Bilateral             | Triporado             |
| <i>L. languida</i>     | Oblato               | Subisopolar               | Bilateral             | Biporado              |
| <i>L. marantoides</i>  | *                    | *                         | *                     | *                     |
| <i>L. smithii</i>      | Oblato               | Subisopolar               | Bilateral             | Biporado              |
| <i>L. spiculata</i>    | Suboblato            | Heteropolar               | Bilateral             | Triporado             |
| Espécie                | Exina <sup>1</sup>   | Ornamentação <sup>1</sup> | Lumem <sup>1</sup>    |                       |
| <i>L. azurea</i>       | Semitectada          | Reticulada-heterobrocada  | p.b.                  |                       |
| <i>L. brachycaulis</i> | Semitectada          | Reticulada-heterobrocada  | m.b.                  |                       |
| <i>L. corallina</i>    | Semitectada          | Reticulada-heterobrocada  | m.b.                  |                       |
| <i>L. globosa</i>      | Semitectada          | Reticulada-heterobrocada  | p.b.                  |                       |
| <i>L. involucrata</i>  | Semitectada          | Reticulada-heterobrocada  | p.b.                  |                       |
| <i>L. languida</i>     | Eutectado            | Psilada                   | -                     |                       |
| <i>L. marantoides</i>  | *                    | *                         | *                     |                       |
| <i>L. smithii</i>      | Eutectado            | Perforata                 | -                     |                       |
| <i>L. spiculata</i>    | Semitectada          | Reticulada-heterobrocada  | p.b.                  |                       |

<sup>1</sup> De acordo com Punt et al. (2007) e Halbritter et al. (2018). p.b. = poucas báculas; m.b. = muitas báculas.



**Figura 1.** Morfologia dos grãos de pólen do gênero *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas no Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção. A-D) *L. azurea*; E-H) *L. brachycaulis*; I-L) *L. corallina*; M-P) *L. globosa*; Q-T) *L. involucrata*; U-X) *L. languida*; Y-AB) *L. smithii*; AC-AF) *L. spiculata*; A, E, I, M, Q, U, Y, AC) vista polar (pv) e

vista equatorial (ev); B, F, J, N, R, V, Z, AD) detalhe da ornamentação da exina; C, G, K, O, S, W, AA, AF) detalhe da abertura; D, H, L, P, T, X, AB, AF) grão de pólen após acetólise lática. Barras: A, E, I, M, Q, U, Y, AC) 10  $\mu\text{M}$ ; B-C, F-G, J-K, N-O, R-S, V-W, Z, AA, AD, AE) 1  $\mu\text{M}$ ; D, H, L, P, T, AB, AF) 50  $\mu\text{M}$ ; X) 20  $\mu\text{M}$ .

A partir dos dados morfométricos realizados nos grãos submetidos à ACLAC, todas as espécies apresentam grãos de pólen com tamanho médio, sendo *L. smithii* o de menor diâmetro e *L. corallina* o de maior diâmetro, independente da vista observada. Quanto à espessura da exina o menor valor observado foi em *L. smithii* com  $1,58 \pm 0,27 \mu\text{m}$  e a maior espessura em *L. corallina* com  $3,24 \pm 0,41 \mu\text{m}$ . Para a espessura do teto a variação foi de  $0,31 \pm 0,07 \mu\text{m}$  para *L. globosa* e  $1,03 \pm 0,21 \mu\text{m}$  para *L. languida*. Para o diâmetro do lumem, a variação foi de  $0,21 \pm 0,06 \mu\text{m}$  para *L. smithii* e  $1,52 \pm 0,11 \mu\text{m}$  para *L. brachycaulis* (Tabela 2). A espessura da exina, teto e lumem está diretamente relacionada com a ornamentação dos grãos de pólen e tem a função de proteção quanto à desidratação e incidência dos raios ultravioletas (SOUZA et al., 2021). Conseqüentemente, tem influência nos estudos reprodutivos, na polinização nas espécies (PHILBRICK; OSBORN, 1994) e na conservação, como no caso da criopreservação que pode influenciar na dissecação, assim como na ruptura dos grãos de pólen (SOUZA et al., 2015).

Em relação ao formato dos grãos de pólen, as espécies *L. brachycaulis*, *L. spiculata* e *L. corallina* apresentam formato suboblato, enquanto as demais espécies possuem formato oblato (Tabela 3). Observou-se variações na abertura podendo classificá-las como triporada para maioria das espécies, com exceção *L. globosa*, *L. languida* e *L. smithii* que apresentam grãos de pólen biporado. Vale destacar que nas espécies *L. languida* e *L. smithii*, o lumem foi bem reduzido por possuir grãos de pólen com ornamentação psilada e perforada (Tabela 3).

Todas as espécies avaliadas possuem grãos de pólen com a unidade de dispersão sendo em monades com exceção de *L. languida* que apresentou grãos de pólen arranjados em tétrades. Esta diferença que se dá devido à permanência dos micrósporos unidos após a meiose na célula-mãe dos grãos de pólen (DUTRA et al., 2014). Segundo Caccavari (2002), em áreas tropicais pode ser encontrada a alta diversidade das características morfopolínicas, podendo estar relacionada ao endemismo das espécies. As tétrades polínicas podem se desenvolver independentemente em muitos grupos não relacionados taxonomicamente (SKVARLA et al., 1975; GRAHAM et al., 1980; GUINET; FERGUSON, 1989;

FERGUSON; BANKS, 1994) e podem ser consideradas como uma estratégia para melhoria na eficiência da polinização (PRAGLOWSKI et al., 1987; FERGUSON; BANKS, 1994).

As características dos grãos de pólen tétrades são as mais comuns em espécies de *Mimosa* L. (Fabaceae) (MEDINA-ACOSTA et al., 2019), como também em outras espécies de diferentes famílias, como em *Gaylussacia brasiliensis* (Spr.) Meiss e *Agarista oleifolia* (Cham.) G. Don (Ericaceae) (CORRÊA et al., 2011), Thurniaceae (SILVA et al., 2020), Juncaceae (ORIANI et al. 2012), Annonaceae (TSOU; FU, 2002; LORA et al., 2009). Em Bromeliaceae, até o presente momento, só existe registro de grãos arranjados em tétrades em *Androlepis skinneri* Brongniart ex Houlet (HALBRITTER., 2012) e *Alcantarea nahoumii* (SANTOS et al., 2018). Vale destacar que em *A. nahoumii* os autores só encontraram essa conformação em uma amostra com inflorescência imatura, o que é totalmente justificável, pois na microsporogênese os microsporócitos sofrem meiose e são divididas em quatro com redução da carga genética (RUDALL, 2007).

As características morfo-palinológicas desempenham uma função muito importante para a taxonomia na identificação de espécies pertencente a uma família e em nível de gênero e espécie (BUTT et al., 2018).

O gênero *Lymania* foi descrito por Read (1984) para agrupar as espécies com ovários sulcados ou alados que foram segregados dos gêneros *Aechmea* (subgênero *Lamprococcus*), *Araeococcus* Brongn. e *Ronnbergia* E.Morren & André. Estudos apontam o monofiletismos do gênero (SOUSA et al., 2007; SOUSA; WENDT, 2008). As primeiras espécies descritas foram baseadas em pinturas de E. Morren feita em 1883 como no caso de *Aechmea brachycaulis* Baker, descrita como *Lamprococcus brachycaulis* É.Morren in Baker. A descrição incompleta e a ausência de material *typus* evidenciam o pouco conhecimento deste táxon desde a sua descoberta e descrição das espécies. Isso resultou em várias interpretações diferentes e sinonimizações errôneas, como descrito em Gouda et al. (2023). Ao descrever o gênero, Read (1984) tratou *A. brachycaulis* como sinônimo de *L. corallina*, esta última espécie também descrita a partir de outra pintura de Morren. A partir disso, Sousa et al. (2007) e Sousa e Wendt (2008) baseados em estudos morfológico e filogenético restabeleceram a espécie, propondo uma nova combinação (*L. brachycaulis*) a partir de plantas floridas de ambas as espécies em cultivo.

Nossos resultados palinológicos demonstram que realmente são espécies distintas (Tabela 3 e Figura 1) principalmente pelo formato dos grãos de pólen, sendo *Lymania brachycaulis* com grãos de pólen de formato suboblato e *Lymania corallina* com grãos de pólen de formato oblato. Além disso, os grãos de *L. brachycaulis* são menores que o de *L. corallina* (Tabela 2), confirmando o posicionamento taxonômico estabelecido por Sousa e Wendt (2008).

Até o presente momento não se tinha conhecimento acerca dos caracteres morfopolínicos do gênero *Lymania*. Desta forma, uma descrição pormenorizada está apresentada a seguir.

#### *Lymania azurea*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $45,42 \pm 2,95 \mu\text{m} \times 32,45 \pm 1,20 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $41,08 \pm 2,04 \mu\text{m} \times 35,07 \pm 5,82 \mu\text{m}$  em vista polar), formato oblato, heteropolar, simetria bilateral, ornamentação triporada, semitectada, reticulada-heterobrocada e lúmen com poucas baculas (Figura 1 A-D).

#### *Lymania brachycaulis*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $44,37 \pm 2,81 \mu\text{m} \times 34,72 \pm 2,14 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $42,38 \pm 2,35 \mu\text{m} \times 37,20 \pm 2,06 \mu\text{m}$  em vista polar), formato suboblato, heteropolar, simetria bilateral, ornamentação triporada, semitectada, reticulada-heterobrocada e lúmen com muitas baculas (Figura 1 E-H).

#### *Lymania corallina*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $48,91 \pm 3,36 \mu\text{m} \times 36,15 \pm 1,61 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $43,01 \pm 2,70 \mu\text{m} \times 37,70 \pm 2,48 \mu\text{m}$  em vista polar), formato oblato, heteropolar, simetria bilateral, abertura triporada, semitectada, ornamentação reticulada-heterobrocada, e lúmen com muitas baculas (Figura 1 I-L).

#### *Lymania globosa*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $43,89 \pm 2,80 \mu\text{m} \times 28,73 \pm 2,75 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $38,24 \pm 3,46 \mu\text{m} \times 32,54 \pm 4,64 \mu\text{m}$  em vista polar), formato oblato, subisopolar, simetria bilateral, ornamentação biporada,

semitectada, reticulada-heterobrocada e lúmen com poucas baculas (Figura 1 M-P).

#### *Lymania involucrata*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $43,14 \pm 5,03 \mu\text{m} \times 30,02 \pm 3,89 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $39,73 \pm 3,59 \mu\text{m} \times 34,48 \pm 4,37 \mu\text{m}$  em vista polar), formato oblato, heteropolar, simetria bilateral, ornamentação triporada, semitectada, reticulada-heterobrocada e lúmen com poucas baculas (Figura 1 Q-T).

#### *Lymania languida*

Possui grãos de pólen em tetrade, de tamanho médio ( $47,75 \pm 4,37 \mu\text{m} \times 31,68 \pm 2,81 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $36,95 \pm 3,20 \mu\text{m} \times 31,00 \pm 1,63 \mu\text{m}$  em vista polar), formato oblato, subisopolar, simetria bilateral, ornamentação biporada, eutectada e psilada (Figura 1 U-X).

#### *Lymania smithii*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $32,75 \pm 3,03 \mu\text{m} \times 24,56 \pm 1,35 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $30,85 \pm 2,23 \mu\text{m} \times 26,94 \pm 2,29 \mu\text{m}$  em vista polar), forma oblata, subisopolar, simetria bilateral, ornamentação biporada, eutectado e perfurada (Figura 1 Y-AB).

#### *Lymania spiculata*

Possui grãos de pólen monade, de tamanho médio ( $36,46 \pm 4,22 \mu\text{m} \times 28,58 \pm 2,48 \mu\text{m}$  em vista equatorial e  $32,28 \pm 2,11 \mu\text{m} \times 30,56 \pm 2,98 \mu\text{m}$  em vista polar), forma suboblata, heteropolar, simetria bilateral, ornamentação triporada, semitectada, reticulada-heterobrocada e lúmen com poucas baculas (Figura 1 AC-AF).

#### *Produção de grãos de pólen*

A estimativa do número de grãos de pólen produzidos por flor apresentou diferenças significativas entre as espécies (Tabela 2). As espécies *L. corallina*, *L. involucrata* e *L. brachycaulis* apresentam as maiores quantidades de grãos de pólen com valores acima de 112.500 grãos. *Lymania azurea* foi a espécie que apresentou



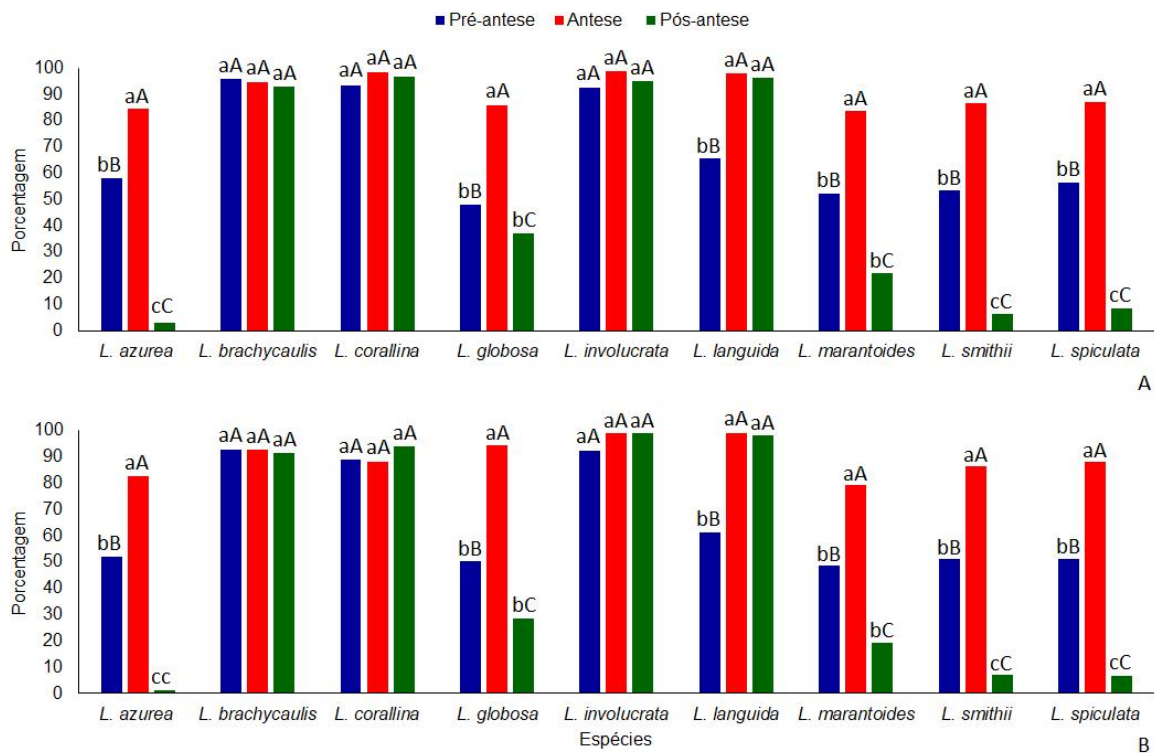
a menor quantidade de grãos de pólen nas anteras com 16.393 (Tabela 2). A variação na produção de grãos de pólen por flor foi também verificada em outros trabalhos com espécies da família Bromeliaceae. A variação observada por Souza et al. (2017), em estudo com 18 espécies pertencentes a cinco gêneros distintos, a exemplo de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker ex Benth. & Hook.f. com aproximadamente 32.080 grãos por flor, enquanto *Aechmea distichantha* Lem., com média de 221.666 grãos. Souza et al. (2021) estudaram 24 espécies de *Tillandsia* L. e observaram uma variação do número de grãos entre as espécies do mesmo gênero, a exemplo do subgênero *Anoplophytum* (Beer) Baker que apresentou uma variação maior entre as espécies com 11.667 grãos de pólen para *T. tenuifolia* var. *vaginata* (Wawra) L.B.Sm. a 80.033 para *T. milagrensis* Leme, destacando uma variação significativa entre as espécies do mesmo gênero.

A quantidade de grãos de pólen por flor está relacionada a diversos fatores entre os quais a espécie, adaptação ao ambiente, condições climáticas, altitude, tamanho dos grãos de pólen, dentre outros (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2010; KHANDURI, 2011). Espécies que possuem elevado número de grãos de pólen, por antera e por flor, têm maior potencial de dispersão por agentes polinizadores (CLARK; FINN., 2011). A produção de grãos de pólen produzidos por flor pode variar entre espécies do mesmo gênero ou até mesmo genótipos da mesma espécie, como verificado em trabalhos de Nogueira et al. (2015) e Figueiredo et al. (2013). Espécies que possuem elevada quantidade de grãos de pólen podem ter maior sucesso na fertilização.

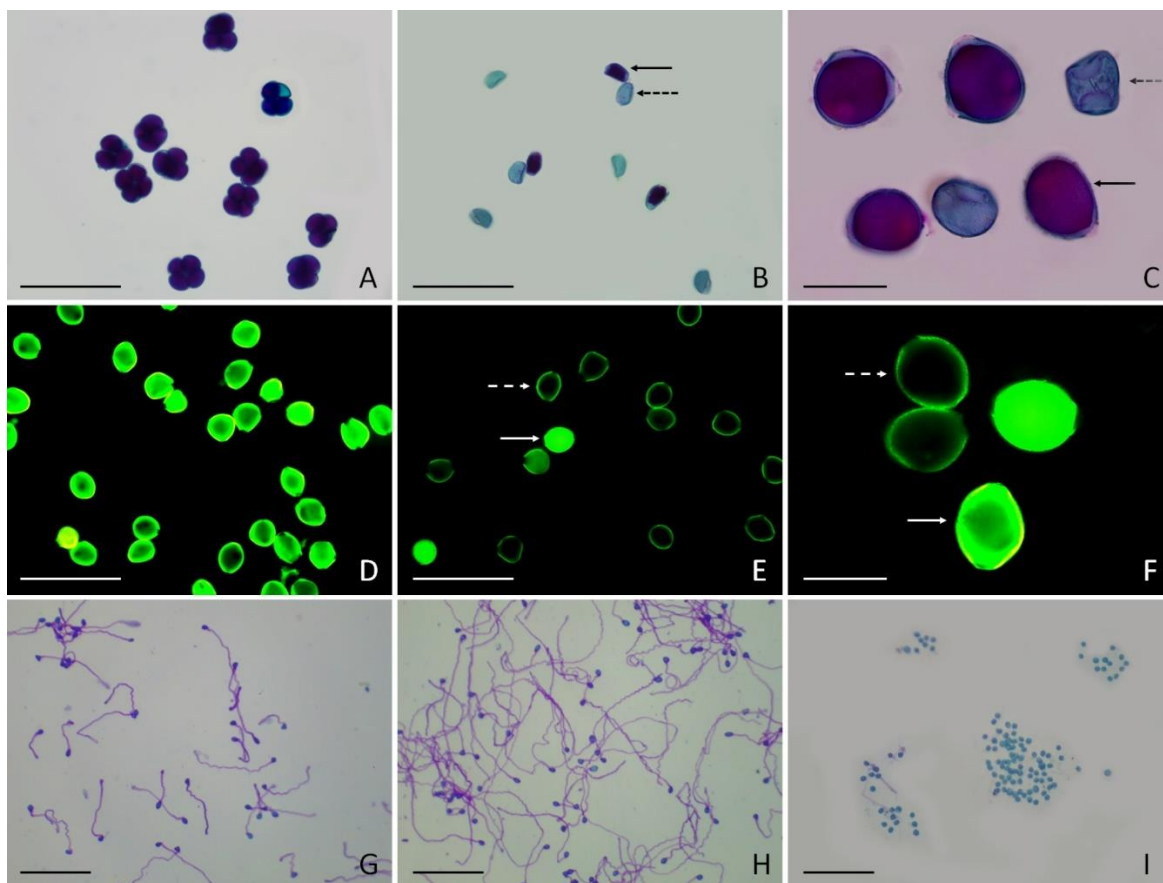
#### *Testes histoquímicos dos grãos de pólen*

Foram observadas interações significativas apenas para os estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese) e as nove espécies de *Lymania*. Entre os dois testes histoquímicos utilizados (solução de Alexander e diacetato de fluoresceína) não foi possível observar diferenças significativas, evidenciando assim uma confiabilidade entre os dois métodos avaliados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Viabilidade dos grãos de pólen por dois testes histoquímicos [Solução de Alexander (A) e Diacetato de Fluoresceína (B)] e três estádios de desenvolvimento floral em nove espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas no Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção.



Médias seguidas pela mesma letra minúsculas comparam as espécies e maiúsculas os estádios de desenvolvimento floral não diferem entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott ( $p < 0,01$ ) e teste de média Tukey ( $p < 0,01$ ), respectivamente.



**Figura 3.** Viabilidade dos grãos de pólen de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas no Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção. a-f) Testes histoquímicos evidenciando grãos de pólen viáveis e inviáveis (seta). a-c) Solução de Alexander 2%. d-f) Diacetato de fluoresceína. g-i) Germinação de pólen *in vitro* em meios de cultura BM (PARTON et al., 2002) e SM (SOARES et al., 2008). a) *L. languida*, evidenciando altas taxas de viabilidade com solução de Alexander 2% na antese. b) *L. globosa*, apresentando baixa viabilidade na pós-antese. c) *L. azurea*, evidenciando grãos de pólen viáveis e inviáveis (seta) na antese. d) *L. coralina*, evidenciando altas taxas de viabilidade com diacetato de fluoresceína na antese. e) *L. coralina*, pós-antese com diacetato de fluoresceína. f) *L. coralina*, evidenciando grãos de pólen viáveis e inviáveis (seta) na antese. g) *L. involucrata*, evidenciando alta porcentagem de germinação dos grãos de pólen em meio de cultura BM na pré-antese. h) *L. involucrata*, evidenciando alta porcentagem de germinação o dos grãos de pólen em meio de cultura SM na antese. i) *L. azurea*, apresentando baixa porcentagem de germinação em meio de cultura BM na pós-antese. Barras: a, b, d, e) 200  $\mu$ m; c, f) 50  $\mu$ m; g, h, i) 0,50 mm.

*Lymania brachycaulis*, *L. corallina* e *L. involucrata* apresentaram as maiores porcentagens de viabilidade independente do estágio de desenvolvimento floral e do teste histoquímico utilizado, com valores superiores a 88,26%. *Lymania azurea*, *L. globosa*, *L. marantoides*, *L. smithii* e *L. spiculatta* apresentaram altas porcentagens de viabilidade polínica apenas na antese, com valores superiores a 79,15%. *Lymania languida* apresentou alta viabilidade na antese e pós antese com valores superiores a 96,23%. As menores porcentagens de viabilidade foram

observadas na pós-antese em *L. azurea*, *L. smithii* e *L. spiculatta* com valores inferiores a 8,65 % (Tabela 4).

Para Souza et al. (2017), a solução Alexander é um bom teste de histoquímico quando comparado a outros corantes, pois permite distinguir os grãos de pólen viáveis e inviáveis na maioria das espécies de angiospermas. O corante Alexander é uma solução tripla contendo fucsina ácida, que cora o citoplasma de vermelho, o verde malaquita, que tinga a parede dos grãos de pólen de verde e o Orange G, que intensifica a coloração (ALEXANDER, 1969). Grãos de pólen viáveis e íntegros coram de roxo ou azul escuro (Figura 3A-C).

O diacetato de fluoresceína (FDA) visa verificar integridade da membrana plasmática que está intimamente relacionada com a viabilidade polínica e atividade enzimática dos grãos de pólen (HESLOP-HARRISON; HESLOP HERRISON, 1970). O corante atravessa as membranas, esterases intercelulares hidrolisam FDA e a fluoresceína se acumula no citoplasma que mostra uma fluorescência verde brilhante. Quando o plasmalema é prejudicado, o corante deixa os grãos de pólen com uma coloração uniforme, indicando que os grãos de pólen não são viáveis, assim fornecendo uma metodologia eficaz para avaliar a qualidade do pólen (IMPE et al., 2020).

De acordo com Souza et al. (2002) e Hister e Tedesco (2016), são considerados como alta viabilidade polínicas, valores acima de 70% de germinação, de 31 % a 69% como média e abaixo de 30%, baixa viabilidade. Dessa forma, os resultados deste estudo se mostraram excelentes para cruzamentos controlados e conservação.

#### *Germinação in vitro dos grãos de pólen*

Foram observadas interações significativas entre os meios de cultura, estágio de desenvolvimento floral e espécie, tanto para porcentagem de germinação *in vitro* quanto para comprimento do tubo polínico (Tabela 5). Os valores da germinação *in vitro* dos grãos de pólen estão bem próximos aos resultados dos dois testes histoquímicos, o que confirma que os métodos utilizados são confiáveis e o fator de variação é apenas a espécie e o estágio de desenvolvimento floral.

**Tabela 5.** Porcentagem de germinação *in vitro* e crescimento do tubo polínico em nove espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas no Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção em dois meios de cultura (BM e SM) e em três estádios florais de desenvolvimento (pré-antese, antese e pós-antese).

| Espécie                | Meio de Cultura | Germinação <i>in vitro</i>        |          |            |
|------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------|------------|
|                        |                 | Pré-antese                        | Antese   | Pós-antese |
| <i>L. azurea</i>       | BM              | 44,09 aB                          | 77,55 aA | 1,59 aC    |
|                        | SM              | 46,07 aB                          | 79,95 aA | 2,13 aC    |
| <i>L. brachycaulis</i> | BM              | 91,56 aA                          | 97,58 aA | 93,30 aA   |
|                        | SM              | 93,53 aA                          | 91,88 aA | 93,94 aA   |
| <i>L. corallina</i>    | BM              | 80,39 aA                          | 91,35 aA | 95,33 aA   |
|                        | SM              | 85,74 aA                          | 87,85 aA | 93,30 aA   |
| <i>L. globosa</i>      | BM              | 35,41 bB                          | 94,49 aA | 0,00 bC    |
|                        | SM              | 73,52 aB                          | 96,42 aA | 19,60 aC   |
| <i>L. involucrata</i>  | BM              | 90,21 aA                          | 96,42 aA | 98,35 aA   |
|                        | SM              | 92,08 aA                          | 99,30 aA | 98,36 aA   |
| <i>L. languida</i>     | BM              | 54,87 aB                          | 97,79 aA | 94,16 aA   |
|                        | SM              | 58,31 aB                          | 98,21 aA | 98,22 aA   |
| <i>L. marantoides</i>  | BM              | 50,41 aA                          | 47,06 bA | 0,00 bB    |
|                        | SM              | 53,65 aB                          | 80,11 aA | 4,16 aC    |
| <i>L. smithii</i>      | BM              | 40,10 aB                          | 79,58 aA | 0,25 aC    |
|                        | SM              | 46,21 aB                          | 85,28 aA | 1,13 aC    |
| <i>L. spiculata</i>    | BM              | 44,23 aB                          | 86,16 aA | 2,15 bC    |
|                        | SM              | 48,40 aB                          | 86,50 aA | 7,50 aC    |
| CV (%)                 |                 | 23,11                             |          |            |
|                        |                 | Comprimento do tubo polínico (mm) |          |            |
| <i>L. azurea</i>       | BM              | 0,22 aB                           | 0,34 aA  | 0,11 aC    |
|                        | SM              | 0,25 aB                           | 0,33 aA  | 0,06 aC    |
| <i>L. brachycaulis</i> | BM              | 0,48 aA                           | 0,46 aA  | 0,48 aA    |
|                        | SM              | 0,49 aA                           | 0,49 aA  | 0,53 aA    |
| <i>L. corallina</i>    | BM              | 0,23 aA                           | 0,27 aA  | 0,28 aA    |
|                        | SM              | 0,23 aA                           | 0,21 aA  | 0,26 aA    |
| <i>L. globosa</i>      | BM              | 0,11 bB                           | 0,56 aA  | 0,00 bC    |
|                        | SM              | 0,34 aB                           | 0,58 aA  | 0,12 aC    |
| <i>L. involucrata</i>  | BM              | 0,47 aA                           | 0,48 bA  | 0,52 aA    |
|                        | SM              | 0,51 aB                           | 0,81 aA  | 0,42 aC    |
| <i>L. languida</i>     | BM              | 0,24 aB                           | 0,42 aA  | 0,40 aA    |
|                        | SM              | 0,26 aB                           | 0,45 aA  | 0,39 aA    |
| <i>L. marantoides</i>  | BM              | 0,32 aA                           | 0,30 bA  | 0,00 bB    |
|                        | SM              | 0,35 aB                           | 0,45 aA  | 0,18 aC    |
| <i>L. smithii</i>      | BM              | 0,16 aB                           | 0,31 aA  | 0,05 aC    |
|                        | SM              | 0,17 aB                           | 0,38 aA  | 0,05 aC    |
| <i>L. spiculata</i>    | BM              | 0,37 aB                           | 0,42 aA  | 0,16 aC    |
|                        | SM              | 0,35 aB                           | 0,45 aA  | 0,18 aC    |
| CV (%)                 |                 | 18,56                             |          |            |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna dentro do mesmo fator espécie e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste F e Tukey ( $p < 0,01$ ), respectivamente.

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

Após 24 horas de incubação, de forma geral, verificou-se que flores em estágio de antese apresentaram maiores taxas de germinação e comprimento do tubo polínico independente dos meios de cultura BM e SM, para todas as espécies estudadas (Tabela 5). *Lymania brachycaulis*, *L. corallina* e *L. involucrata* não apresentam diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento floral e meios de cultura tanto para a germinação dos grãos de pólen quanto para o comprimento do tubo polínico. Baixa viabilidade ou inviabilidade total foi observada na pós-antese em *L. azurea*, *L. globosa*, *L. marantoides*, *L. smithii* e *L. spiculata* independente do meio utilizado.

O meio de cultura BM apresentou menores porcentagens de germinação de grãos de pólen em *L. globosa* em flores na pré-antese e pós antese, as espécies *L. marantoides* e *L. spiculata* em pós antese, com taxas de germinação inferior a 2,15%, diferindo significativamente em relação ao meio SM. O meio de cultura SM é mais completo por possuir nitrato de cálcio, sulfato de magnésio e nitrato de potássio, possivelmente elementos que maximizem a germinação dos grãos para essa espécie.

Souza et al. (2017) relataram que o meio de cultura BM não foi eficiente para a germinação em espécies dos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl. Em contrapartida, Parton et al. (2002), obtiveram êxito para as espécies *Aechmea*, *Vriesea*, *Guzmania* e *Tillandsia*, esses resultados demonstram que o fator espécie é decisivo para escolha de um meio de cultura adequado.

Em relação aos valores médios de crescimento do tubo polínico, de maneira geral, verificou-se que a antese também apresentou as maiores médias, seguido da pré-antese (Tabela 5). *Lymania globosa* e *L. involucrata* apresentaram os maiores comprimentos do tubo polínico, principalmente no meio de cultura SM na antese, com médias superior 0,58 mm, enquanto os menores valores foram observados na antese para *L. corallina* e *L. azurea* independente do meio de cultura utilizado com valores inferiores a 0,34 mm.

Para que obtenha sucesso na fecundação, os grãos de pólen precisam germinar na superfície do estigma, desenvolver o tubo polínico e liberar os gametas masculinos nos óvulos para uma fertilização bem-sucedida, com

interações coordenadas entre os grãos de pólen e pistilo (JOHNSON et al., 2019; TANG et al., 2020).

## **CONCLUSÃO**

Todas as espécies estudadas possuem grãos de pólen mônadas, exceto *L. languida*, com grãos dispostos em tétrades, de tamanho médio, com formato oblato a suboblato, simetria bilateral, abertura triporada para a maioria das espécies, exina semitectada e eutectada, ornamentação incluindo reticulada-heterobrocada, psilada e perforata.

Os grãos de pólen das espécies estudadas apresentaram altas porcentagens de viabilidade na antese, independentemente do método utilizado, histoquímico ou germinação in vitro. O meio de cultura SM e a coleta dos grãos de pólen no estágio de antese floral foram os mais adequados para as espécies de *Lymania*.

Conhecer a estrutura dos grãos de pólen e viabilidade polínica dessas espécies confere dados importantes para a taxonomia do gênero, bem como para os cruzamentos controlados e obtenção de sementes ou para os ensaios de conservação.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L.; DANERDI, F.; DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, 2010.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, p. 117-122, 1969.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.
- BUTT, M. A.; ZAFAR, M.; AHMAD, M., SULTANA, S.; ULLAH, F.; JAN, G.; IRFAN, A., NAQVI, S. A. Z. Morpho-palynological study of Cyperaceae from wetlands of Azad Jammu and Kashmir using SEM and LM. **Microscopy Research and Technique**, New Jersey, v. 81, n. 5, p. 458-468, 2018.
- CACCAVARI, M. A. Pollen morphology and structure of Tropical and Subtropical American genera of the Piptadenia-group (Leguminosae: Mimosoideae). **Grana**, Oslo, v. 41, n. 3, p. 130-141, 2002.
- CLARK, J.R.; FINN, C.E. Blackberry breeding and genetics. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, New York, v. 5, p.27-43, 2011.
- CORRÊA, A. M. S.; BARROS, M. A. V. C. Flora Polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil): Famílias: 67-Ericaceae, 96-Olacaceae e 126-Trigoniaceae. **Hoehnea**, São Paulo, v. 38, p. 109-113, 2011.
- DUTRA, F. V.; DORETO, H. S.; RIBEIRO, P. C.; GASPARINO, E. C. Morfologia polínica em espécies ornamentais de Asteraceae, Ericaceae, Fabaceae, Malpighiaceae, Malvaceae e Rubiaceae. **Nucleus**, Jaboticaba, v. 11, n. 1, 2014.
- 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, n. 1, p. 28-33, 1974.
- FERGUSON, I. K.; BANKS, H. Tetrad pollen in the subfamily Caesalpinioideae (Leguminosae) and its significance. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 83, n. 1-3, p. 31-42, 1994.
- FIGUEIREDO, M. A.; PIO, R.; SILVA, T. C.; SILVA, K. N. Características florais e carpométricas e germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.7, p.731-740, 2013.



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

GOUDA, E.J., BUTCHER, D; GOUDA, C.S. (cont. Atualizado) **Encyclopaedia of Bromeliads**. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Utrecht University Botanic Gardens. Acesso em: 22 Jan. 2023.

GRAHAM, A.; BARKER, G.; SILVA, M. F. Unique pollen types in the *Caesalpinioideae* (Leguminosae). **Grana**, v. 19, n. 2, p. 79-84, 1980.

GUINET, P.; FERGUSON, I. K. Structure, evolution and biology of pollen in Leguminosae. **Advances in legume biology. Monographs in Systematic Botany**, v. 29, p. 77-103, 1989.

HALBRITTER, H. **Androlepis skinneri**. 2012. In: PalDat – A palynological database. Disponível em: <[https://www.palдат.org/pub/Androlepis\\_skinneri/207184;jsessionid=B3650ED2F2D1F03F3B11CF2509ECA3FD](https://www.palдат.org/pub/Androlepis_skinneri/207184;jsessionid=B3650ED2F2D1F03F3B11CF2509ECA3FD)>; Acessado em: 16 Janeiro 2023.

HALBRITTER, H. **Lymania spiculata**. 2016. In: PalDat – A palynological database. Disponível em: <[https://www.palдат.org/pub/Lymania\\_spiculata/300598;jsessionid=69B5F0994924F371AAA3A69718E845C](https://www.palдат.org/pub/Lymania_spiculata/300598;jsessionid=69B5F0994924F371AAA3A69718E845C)>; Acessado em: 16 Janeiro 2023.

HALBRITTER, H. Morphologie und systematische bedeutung des pollens der Bromeliaceae. **Grana**, Stockholm, v. 31, n. 3, p. 197-212, 1992.

HALBRITTER, H.; ULRICH, S.; GRÍMSSON, F.; WEBER, M.; ZETTER, R.; HESSE, M.; BUCHNER, R.; SVOJTKA, M.; FROSCH-RADIVO, A. **Illustrated pollen terminology**. 2 ed. Vienna: Springer, 2018. 487 p.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain technology**, Baltimore, v. 45, n. 3, p. 115-120, 1970.

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

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

IMPE, D.; REITZ, J.; KÖPNICK, C.; ROLLETSCHEK, H.; BÖRNER, A.; SENULA, A.; NAGEL, M. Assessment of pollen viability for wheat. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, p. 1588, 2020.

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

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

KHANDURI, V. P. Variation in anthesis and pollen production in plants. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 11, n. 6, p. 834-839, 2011.

LEME, E. M. C.; ZIZKA, G.; SOUZA, E. H.; PAULE, J.; CARVALHO, J. D. T.; MARIATH, J. E. A.; HALBRITTER, H.; RIBEIRO, O. B. C. New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny. **Phytotaxa**, Auckland, v. 544, n. 2, p.128-170, 2022.

LORA, J.; TESTILLANO, P. S.; RISUEÑO, M. C.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Implications for the evolution of aggregated pollen. **BMC Plant Biology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2009.

MAJEED, S.; ZAFAR, M.; AHMAD, M.; KILIC, O.; SULTANA, S.; RAZA, J.; YASEEN, G.; GUL, H.; MIR, S.; LUBNA.; JABEEN, M. Pollen morphological investigations of family Cactaceae and its taxonomic implication by light microscopy and scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, New Jersey, v. 83, n. 7, p. 767-777, 2020.

MEDINA-ACOSTA, Montserrath et al. Comparative study of pollen morphology and exine ultrastructure in tetrads, octads and polyads of the genus *Mimosa* (Leguminosae). **Palynology**, London, v. 43, n. 2, p. 188-212, 2019.

MITTERMEIER, R. A.; TURNER, W. R.; LARSEN, F. W.; BROOKS, T. M.; GASCON, C. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: **Biodiversity hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 3-22. 2011.

MOREIRA, B. A.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; WANDERLEY, M. G. L. Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* LB Sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 19, n. 1, 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, n. 1, p. 91-100, 2012.

- NOGUEIRA, P. V.; SILVA, D. F.; PIO, R.; SILVA, P. A. O.; BISI, R. B.; BALBI, R. V. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, Campinas, v. 74, p. 9-15, 2015.
- ORIANI, A.; STÜTZEL, T.; SCATENA, V. L. Contributions to the floral anatomy of Juncaceae (Poales–Monocotyledons). **Flora**, Amsterdam, v. 207, n. 5, p. 334-340, 2012.
- PARTON, E.; VERVEAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; PROFT, M. Viability and storage of bromelias pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 155-161, 2002.
- PHILBRICK, C. T.; OSBORN, J. M. Exine reduction in underwater flowering *Callitriche* (Callitrichaceae): implications for the evolution of hydrophily. **Rhodora**, Beltsville, v. 96, n. 888, p. 370-381, 1994.
- PRAGLOWSKI, J.; NOWICKE, J.W.; RAVEN, P.H.; SKVARLA, J.J.; WAGNER, W.L. Onagraceae Juss. Onagreae R. Raimann pro parte. Taxonomy Peter H. Raven and Warren L. Wagner. **World Pollen Spore Flora**, Stockholm, v. 15, p. 1–55, 1987.
- PUNT, W.; HOEN, P. P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 143, p. 1-81, 2007.
- R CORE TEAM (2018) **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollp.en fragiles. **Adansonia**, Paris, v. 2, p. 77-79, 1979.
- READ, R. W. The “evolution” of a new genus, *Lymania* gen. nov. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 34, n. 5, p. 199-201, 212-216, 1984.
- RUDALL, P.J. **Anatomy of Flowering Plants: An Introduction to Structure and Development**. 1 ed. Cambridge University Press: Cambridge, 2007, 109p.
- SANTOS, V. L.; NIEVOLA, C.C.; FIDALGO, A. O.; KANASHIRO, S.; WANDERLEY, M. G. L.; GOMES, E. P. C.; LUZ, C. F. P. Floral morphology and pollen viability of an endangered and endemic Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. **Grana**, Oslo, v. 60, n. 5, p. 327-346, 2021.
- SANTOS, V. L.; VERSIEUX, L. M. WANDERLEY, M. G. L.; LUZ, C. F. P. Pollen morphology of *Alcantarea* giant bromeliads (Bromeliaceae, Tillandsioideae). **Grana**, Oslo, v. 57, n. 1-2, p. 117-136, 2018.

SANTOS-TEIXEIRA, K. C. C.; ROMANINI, R. P.; WANDERLEY, M. G. L.; LUZ, C. F. P. Palynotaxonomy of *Aechmea* subgenus *Ortgiesia* (Regel) Mez (Bromeliaceae, Bromelioideae). **Grana**, Oslo, v. 59, n. 6, p. 399-427, 2020.

SCHROEDER, G. R.; JUNIOR, N. P. V.; DEC, E.; MOUGA, D. M. D. S. Caracterização palinológica de Bromeliaceae (A. Juss.) de São Francisco do Sul, Santa Catarina. **Acta Biológica Catarinense**, Joinville, v. 6, n. 1, p. 46-57, 2019.

SILVA, A. L.; ALVES, M. V. S.; COAN, A. I. Comparative floral morphology and anatomy of Thurniaceae, an early-diverging family in the cyperids (Poales, Monocotyledons). **Plant Systematics and Evolution**, Heidelberg, v. 306, n. 3, p. 1-14, 2020.

SILVA, V. J. D.; RIBEIRO, E. M.; LUIZI-PONZO, A. P.; FARIA, A. P. G. Ultrastructure and pollen morphology of Bromeliaceae species from the Atlantic Rainforest in Southeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.88, p. 439-449, 2016.

SKVARLA, J. J.; RAVEN, P. H.; PRAGLOWSKI, J. The evolution of pollen tetrads in Onagraceae. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 62, n. 1, p. 6-35, 1975.

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

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, n. 2, p. 111-118, 2008.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; ROSSI, M. L.; SOUZA, F. V. D. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1744-1749, 2011.

SOUSA, L. O. F.; WENDT, T.; Taxonomy and conservation of the genus *Lymania* (Bromeliaceae) in the southern Bahian Atlantic Forest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 157, n. 1, p. 47-66, 2008.

SOUSA, L. O. F.; WENDT, T.; BROWN, G. K.; TUTHILL, D. E.; EVANS, T. M. Monophyly and phylogenetic relationships in *Lymania* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on morphology and chloroplast DNA sequences. **Systematic Botany**, Notre Dame, v. 32, n. 2, p. 264-270, 2007.

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

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

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SOUZA, S. O; OLIVEIRA, R. S.; AONA, L. Y. S.; SOUZA, F. V. D.; SOARES, T. L.; ROSSI, M. L.; SOUZA, E. H. Pollen morphology and viability of *Tillandsia* (Bromeliaceae) species by light microscopy and scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 84, n. 3, p. 441-459, 2021.

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

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, n. 1, p. 461-491, 1997.

TSOU, C. H.; FU, Y. L. Tetrad pollen formation in *Annona* (Annonaceae): proexine formation and binding mechanism. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 89, n. 5, p. 734-747, 2002.

## CAPÍTULO 2

### **SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÕES EM *Lymania* (BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO NORDESTE DO BRASIL E AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Manuscrito a ser submetido ao periódico científico Scientia Horticulturae.

**SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÕES EM *Lymania*  
(BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO NORDESTE E  
AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO**

**RESUMO**

**RESUMO:** Os sistemas reprodutivos em Bromeliaceae são bem diversificados com espécies, que vão desde plantas alógamas, autógamas, cleistógamas, agamospérmicas ou mistas. A hibridação permite a criação de novos genótipos com diferentes combinações de formas e cores para atender às demandas do mercado de plantas ornamentais por novidades. Conhecer as estratégias reprodutivas das espécies viabiliza a obtenção desses novos materiais com potencial ornamental, além de ser fundamental para definir melhores estratégias de conservação. Pouco se conhece sobre a biologia reprodutiva das espécies de *Lymania*, além disso, pelo menos, 60% das espécies do gênero estão na Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. O trabalho teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos e as possíveis hibridações interespecíficas e as possíveis barreiras reprodutivas de oito espécies de *Lymania*, a partir da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo utilizando microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Foram realizadas polinizações naturais e controladas nas oito espécies estudadas. A estratégia reprodutiva foi determinada através do índice de autogamia (IA), índice de autoincompatibilidade (IAI) e eficiência reprodutiva (EF). Todas as espécies apresentaram autoincompatibilidade, exceto *L. smithii*, que apresentou autogamia. Agamospermia não foi observada em nenhuma espécie estudada. Foram realizadas 41 combinações de hibridação entre as espécies, resultando em 54% de sucesso, com registro de incongruência em apenas 12 combinações. Os principais fenômenos de incongruência identificados após cruzamentos interespecíficos foram: pouca germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma; inibição do crescimento do tubo polínico ao longo do estilete; enovelamento dos tubos polínicos ao longo do estilete; tubos polínicos no interior do ovário, mas sem penetração na micrópila; deposição reticulada de calose no tubo polínico, entre outros. Sugere-se que a autoincompatibilidade nas espécies avaliadas seja gametofítica, evitando a autofertilização. Os resultados demonstraram que é possível realizar hibridação com algumas espécies, porém, são necessários estudos morfológicos, genéticos e moleculares para comprovar o potencial dessas espécies. As sementes geradas nos diferentes sistemas reprodutivos, bem como nas hibridações germinaram acima de 94%. Os resultados apresentados trazem contribuições importantes para a conservação das espécies, geração de sementes e hibridação em Bromeliaceae.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bromélia; barreiras reprodutivas; conservação, cruzamentos intraespecíficos, microscopia de fluorescência.

**REPRODUCTIVE SYSTEMS AND HYBRIDIZATION OF *Lymania*  
(BROMELIOIDEAE, BROMELIACEAE) SPECIES ENDEMIC TO  
NORTHEAST BRAZIL AND ENDANGERED**

**ABSTRACT**

**ABSTRACT:** The reproductive systems of the Bromeliaceae are highly diversified, including species classified as allogamous, autogamous, cleistogamous, agamospermic and mixed. Hybridization allows the creation of new genotypes with different shapes and colors to meet the market demand for novel ornamental plants. Knowledge of the reproductive strategies of these species enables obtaining new genetic materials, and is fundamental to define conservation strategies. Little is known about the reproductive biology of the *Lymania* species, at least 60% of which are on the endangered list. The objective of this study was to identify the reproductive systems along with the possible interspecific hybridization and reproductive barriers of the eight *Lymania* species, based on germination of pollen grains and growth of the pollen tube in the pistil, using fluorescence microscopy with ultraviolet filtering. We carried out natural and controlled pollinations of the eight species. The reproductive strategy was classified according to the autogamy index (AI), self-incompatibility index (SII) and reproductive efficiency index (REI). All the species were self-incompatible except *L. smithii*, which was autogamous. Agamospermy was not observed in any of the species studied. All told, 41 hybridization combinations were carried out, resulting in a success rate of 54%, with finding of incongruence in only 12 combinations. The main incongruence phenomena identified after the interspecific crosses were low pollen grain germination on the stigma surface; inhibition of growth and folding of the pollen tube in the style; failure of the pollen tube to penetrate the micropyle; and reticulated deposition of callose in the pollen tube, among other problems. We suggest that the self-incompatibility of the species is gametophytic, to prevent self-fertilization. The results demonstrated the possibility of hybridization of some species, but morphological, genetic and molecular studies are necessary to prove the potential of these species. The germination rate of the seeds generated in the different reproductive systems, as well as in the hybridizations, was greater than 94%. The results make contributions to the taxonomy, morphology, conservation of species, generation of seeds and hybridization of Bromeliaceae.

**KEYWORDS:** Bromeliad; reproductive barriers; conservation, interspecific crosses, fluorescence microscopy.



## INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae Juss. pertencente à ordem Poales com 3.731 espécies e 83 gêneros (GOUDA et al., 2023) e estão distribuídas nas Américas, principalmente no território nacional, e em todos os ecossistemas, principalmente na região da Mata Atlântica (LEME; SIQUEIRA FILHO, 2006).

O gênero *Lymania* Read pertence à subfamília Bromelioideae e é caracterizado pela combinação de pétalas livres, ovário ínfero, sulcado ou alado (READ, 1984; SOUSA; WENDT, 2008; GOUDA et al., 2023). As espécies são tipicamente epífitas ou raramente terrestres que habitam principalmente ambientes de floresta tropical úmida e se propagam também de forma assexuada por meio de estolões (SOUSA; WENDT, 2008). Todas as espécies são endêmicas do Nordeste do Brasil, mais especificamente do Sul da Bahia e do domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, com exceção de *L. smithii* que é encontrada em Pernambuco e Alagoas (MARINHO et al., 2007; SOUZA et al., 2021; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2020).

Os sistemas reprodutivos em Bromeliaceae são bem diversificados, e vão desde espécies autógamas, alógamas, cleistógamas ou sistemas mistos (MATTALANA et al., 2010; SOUZA et al., 2017). Muitas espécies apresentam algum tipo de autocompatibilidade (SIQUEIRA FILHO; MACHADO, 2001; MATTALANA et al., 2010; SOUZA et al., 2017), ou possuem barreiras reprodutivas como a dicogamia, heterostilia (BENZING, 2000), protoginia (GARDNER, 1986) e protandria (MARTINELLI, 1997). Todas essas barreiras reprodutivas presentes favorecem a alogamia, obrigando a ocorrência da fecundação cruzada (BENZING, 2000; PAGGI et al., 2007). A biologia floral e reprodutiva de *Lymania* ainda é pouco conhecida e, além disso, pelo menos, 60% das espécies do gênero estão na Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (FORZZA et al., 2013; SOUZA et al., 2021; BRASIL, 2022). Desta forma, estudos sobre os sistemas reprodutivos dessas espécies são de suma importância para o manejo e conservação, principalmente das espécies ameaçadas (CESÁRIO; GAGLIANONE, 2008).

A polinização cruzada permite a troca de material genético entre as espécies favorecendo o processo de formação de híbridos, sendo uma importante fonte de variação que permite a criação de novos indivíduos com características próprias (VERVAEKE et al., 2002; 2003; 2004). Para a

comprovação do sucesso das hibridações, sejam interespecíficas ou intergenéricas, de forma controlada ou artificial, o método da microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta utilizando azul de anilina permite a visualização do crescimento do tubo polínico e assim a observação do sucesso ou fracasso do cruzamento a ser realizado (BANDEIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2017).

A hibridação permite a criação de novas cultivares/ variedades com diferentes combinações de formas e cores (VERVAEKE et al., 2001; 2004). Os primeiros registros de híbridos na família Bromeliaceae foram relatados por Morren, em 1879, em plantas do gênero *Vriesea* Lindl. (SAMYN, 1995). No entanto, até o momento, pouco se tem na literatura comparado ao número de espécies da família estudos científicos relacionados ao assunto envolvendo hibridações em Bromeliaceae (VERVAEKE et al., 2002; 2003; SOUZA et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2020; MATALLANA et al., 2016; LOISEAU et al., 2021; COSTA et al., 2021). Em contrapartida, há registro de mais de 600 híbridos abrangendo inúmeras espécies pertencentes a 35 gêneros da família (BSI, 2023), tanto de origem natural ou por meio de cruzamentos específicos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos e as possíveis hibridações interespecíficas, bem como avaliar as possíveis barreiras reprodutivas em oito espécies de *Lymania*, através da avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo a partir do uso da microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Os resultados aqui apresentados são inéditos, pois não existe registro de estudos dos sistemas reprodutivos nem híbridos envolvendo espécies do gênero *Lymania*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Material Vegetal*

Foram avaliadas oito espécies endêmicas no Nordeste do Brasil do gênero *Lymania*. As espécies estudadas são restrita ao domínio fitogeográfico da Mata Atlântica e muitas delas ameaçadas de extinção (Tabela 1). As análises foram realizadas partes em campo nas próprias populações naturais nos municípios de Camamu, Igrapiúna, Ilhéus, Itacaré, Una, Uruçuca e Jussari na

Bahia e em plantas coletadas e estabelecidas no Banco de Germoplasma de Bromélias (BGB Bromélia) do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPG-RGV) da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil, no período de julho de 2019 à dezembro de 2022.

**Tabela 1.** Espécies de *Lymania* endêmicas do Nordeste do Brasil, incluindo o município de coleta e voucher do Herbário HURB, endemismo e status de ameaça.

| Espécie  | Município de Coleta                  | HURB (voucher)             | Endemismo    | Status de Ameaça* |
|--|--------------------------------------|----------------------------|--------------|-------------------|
| <i>L. azurea</i> Leme                                | Una                                  | 18873                      | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. brachycaulis</i> (E.Morren ex Baker) L.F.Sousa | Camamu                               | 25954                      | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. corallina</i> (Brongn. ex Beer) Read           | Ilhéus, Itacaré, Uruçuca,            | 23965, 27852, 25953        | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. globosa</i> Leme                               | Igrapiúna, Ilhéus, Ituberá, Uruçuca, | 25392, 30427, 30457, 27803 | Sul da Bahia | EN                |
| <i>L. involucrata</i> Leme & E.H.Souza               | Igrapiúna                            | 25815                      | Sul da Bahia | CR                |
| <i>L. languida</i> Leme                              | Uruçuca                              | 27855                      | Sul da Bahia | NE                |
| <i>L. smithii</i> Read                               | Igrapiúna, Una, Uruçuca              | 30435, 30416, 18872        | Nordeste     | NE                |
| <i>L. spiculata</i> Leme & Forzza                    | Jussari                              | 30618                      | Sul da Bahia | CR                |

\* Conforme IUCN (2023), Forzza et al. (2013) e Souza et al. (2021). EN = Em Perigo; CR = Criticamente Ameaçada; NE = Não avaliada.

As espécies estabelecidas no BGB Bromélia foram cultivadas em ripado de madeira com 50% de sombreamento e vasos plásticos (13 cm de altura por 10 cm de diâmetro) com substrato Vivato® e Casca de Pinus (1:1), sob temperatura ambiente e umidade relativa de 70 %, no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

As coletas foram realizadas conforme autorização do SISBIO n. 69870-1 e as atividades realizadas estão devidamente cadastradas no SISGEN, sob a

autorização A9E9F8D. Exemplares de cada espécie coletada nas diferentes localidades foram incorporadas ao acervo do Herbário do Recôncavo da Bahia (HURB).

### *Sistemas reprodutivos*

Para determinar o mecanismo de reprodução das espécies foram realizadas polinizações controladas e acompanhadas as polinizações naturais: a) polinização natural (flores abertas em campo sem manipulação); b) autopolinização natural (flores protegidas sem emasculas); c) autopolinização artificial (flores polinizadas manualmente com grãos de pólen da mesma flor); d) 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 no estigma). Todas as polinizações foram realizadas na antese floral de 6h30 às 8h da manhã. Para cada tratamento, as flores foram marcadas com etiquetas contendo as informações das polinizações. O número de repetições em cada sistema reprodutivo variou de 10 a 25 flores, a depender da sua disponibilidade.

As plantas foram acompanhadas semanalmente até a formação dos frutos e sementes. Posteriormente, as flores foram coletadas antes da deiscência para a avaliação da porcentagem de frutificação e quantidade de sementes por fruto.

A estratégia reprodutiva foi determinada através de dois índices: Índice de autogamia ( $IA = \text{autopolinização natural} / \text{polinização cruzada}$ ) e Índice de autoincompatibilidade ( $IAI = \text{autopolinização artificial} / \text{polinização cruzada}$ ). IAI é determinada como autoincompatível (AI) quando o IAI é inferior a 0,30, e autocompatível ou parcialmente autocompatível (AC) quando os índices do IAI foram acima de 0,30, conforme Ramirez e Brito (1990).

A eficiência reprodutiva (EF) foi determinada pela porcentagem de frutos formados com sementes de polinização livre/ porcentagem de frutos formados com sementes por polinização cruzada, conforme Zapata e Arroyo (1978). O índice mais próximo de 1 evidencia alta eficiência reprodutiva, mais próxima de 0 baixa eficiência reprodutiva.

### *Hibridações interespecíficas*

Foram realizadas hibridações interespecíficas envolvendo as oito espécies, conforme disponibilidade das flores (Tabela 2). Nas plantas receptoras de grãos de pólen, as flores foram emasculadas e ensacadas em estágio de pré-antese, evitando-se a autopolinização ou 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 marcadas e novamente protegidas com sacos de voil para evitar contaminação de pólen por outras espécies. Foram avaliados o número de frutos e sementes por fruto produzidos em cada cruzamento, de acordo com Souza et al. (2017).

### *Desenvolvimento do tubo polínico no pistilo*

Para os estudos do desenvolvimento do tubo polínico no pistilo dos diferentes sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas, pistilos de cada tratamento e espécie foram coletados 24 horas após as polinizações e 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 °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 verificar a germinação dos grãos de pólen no estigma e o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do pistilo utilizou-se microscopia de epifluorescência com filtro ultravioleta (MARTIN, 1959; SOUZA et al., 2017). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio Olympus BX51 acoplado com câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tokyo, Japão).

Foram avaliadas quatro variáveis quanto à germinação de grãos de pólen e o crescimento de tubos polínicos no pistilo: *i*) grãos de pólen aderidos à superfície do estigma (GPSE); *ii*) grãos de pólen germinados na superfície do estigma (GPGE); *iii*) crescimento do tubo polínico no pistilo (CTPP); e *iv*) óvulos com tubo polínico penetrado na micrópila (OTPM).

Os grãos de pólen aderidos à superfície do estigma (GPSE) e os grãos de pólen germinados na superfície do estigma (GPGE) foram avaliados de acordo com a escala: 0) ausente; 1) 1 a 25 grãos de pólen; 2) 25 a 50 grãos de pólen; 3) > 50 grãos de pólen. Os óvulos fertilizados (OVFE) foram avaliados de acordo com a escala: 0) ausente; 1) 1 a 5 óvulos; 2) 5 a 10 óvulos; 3) > 10 óvulos.

O crescimento do tubo polínico no pistilo (CTPP) foi avaliado conforme adaptado de Souza et al. (2017): 0) grãos de pólen não germinados na superfície do estigma; 1) grãos de pólen germinados na superfície do estigma; 2) tubos polínicos paralisados no primeiro terço do estilete; 3) tubos polínicos paralisados no segundo terço do estilete; 4) tubos polínicos paralisados no terceiro terço do estilete; 5) tubos polínicos na região do ovário; 6) tubo polínico próximo ao óvulo; 7) tubo polínico penetrando na micrópila.

### *Germinação in vitro das sementes*

Sementes maduras dos diferentes sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas de *Lymania* foram desinfestadas em etanol 70% por 5', solução de cloro ativo 1% de por 30' e enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. As sementes foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura com a metade das concentrações de sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com adição de 3% de sacarose, 0,7% de ágar e pH 5,8. O número de sementes variou conforme a disponibilidade e foram depositadas duas sementes em cada tubo de ensaio. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, por 45 dias, sob condições de temperatura de  $27 \pm 1$  °C, densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram realizadas aos 30 dias com a contagem das sementes germinadas e não germinadas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Sistemas reprodutivos*

Foram observados diferentes sistemas reprodutivos nas oito espécies estudadas de *Lymania*, sendo a alogamia presente em 100%. Todas as espécies apresentaram autoincompatibilidade, exceto *L. smithii* que apresentou também autogamia com 80% de sucesso na autopolinização artificial. Agamospermia não foi observada (Tabela 2, Figura 1).

**Tabela 2.** Porcentagem de frutos com sementes e número de sementes produzidas nos diferentes sistemas reprodutivos, em oito espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção.

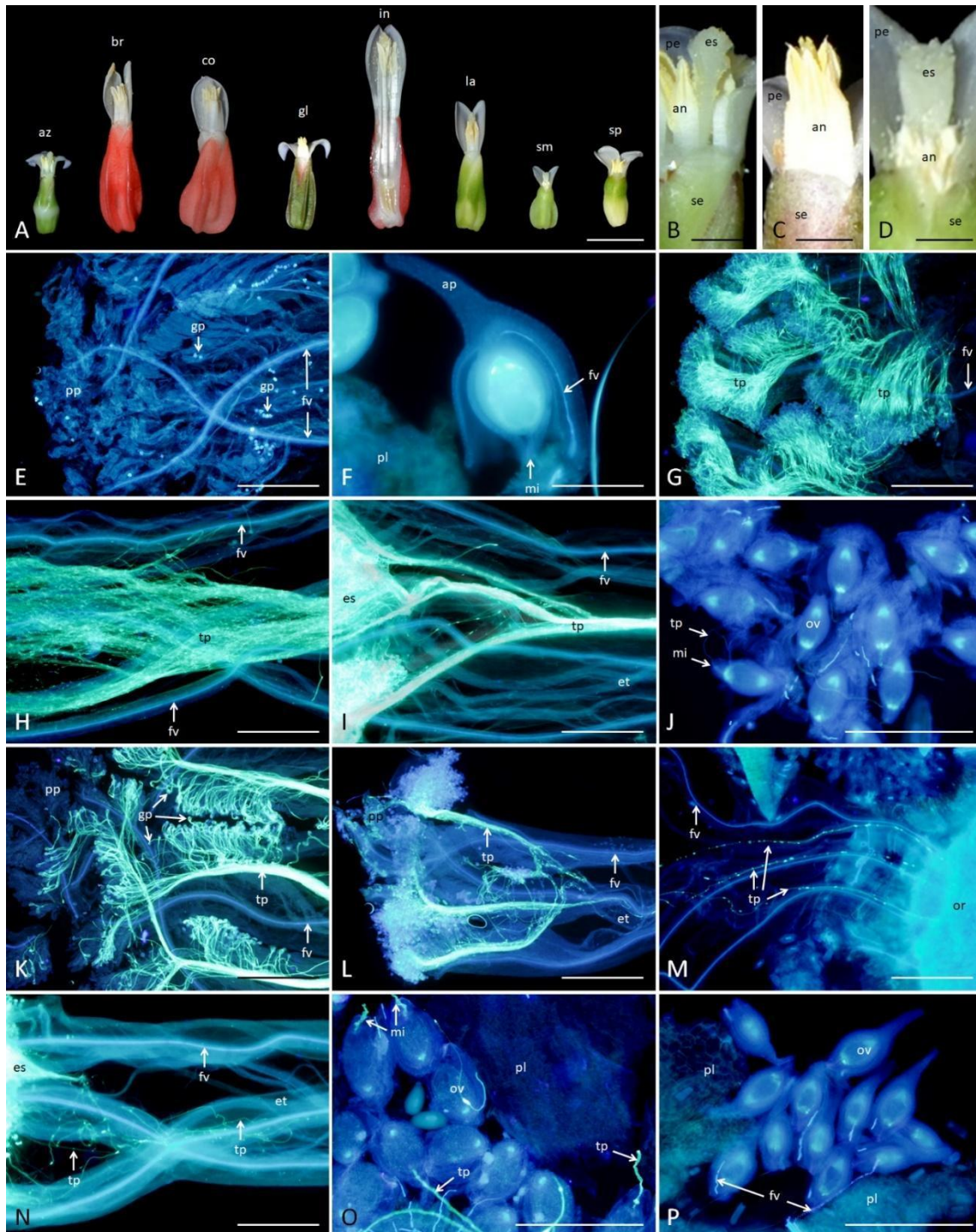
| Espécies               | Frutos com sementes*      |                         |                            |                           |          |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|----------|
|                        | Polinização Natural       | Autopolinização Natural | Autopolinização Artificial | Polinização Cruzada       | Agamosp. |
| <i>L. azurea</i>       | 80 (20/25)                | 0 (0/25)                | 0 (0/20)                   | 84 (21/25)                | 0 (0/25) |
| <i>L. brachycaulis</i> | 84 (21/25)                | 0 (0/25)                | 8 (2/25)                   | 100 (10/10)               | 0 (0/25) |
| <i>L. corallina</i>    | 100 (20/20)               | 0 (0/25)                | 12 (3/25)                  | 100 (20/20)               | 0 (0/25) |
| <i>L. globosa</i>      | 20 (5/25)***              | 16 (4/25)               | 16 (4/25)                  | 88 (22/25)                | 0 (0/20) |
| <i>L. involuocrata</i> | 92 (23/25)                | 0 (0/25)                | 4(1/25)                    | 100 (25/25)               | 0 (0/20) |
| <i>L. languida</i>     | 85 (17/20)                | 0 (0/25)                | 4(1/25)                    | 100 (20/20)               | 0 (0/20) |
| <i>L. smithii</i>      | 90 (18/20)                | 8 (2/25)                | 80 (20/25)                 | 100 (20/20)               | 0 (0/20) |
| <i>L. spiculata</i>    | 88 (22/25)                | 0 (0/25)                | 0 (0/25)                   | 100 (25/25)               | 0 (0/25) |
| Espécies               | Sementes por frutos**     |                         |                            |                           |          |
| <i>L. azurea</i>       | 18,80 ± 8,99<br>(2–33)    | 0                       | 0                          | 12,67 ± 5,71<br>(5–23)    | 0        |
| <i>L. brachycaulis</i> | 48,62 ± 19,02<br>(7–86)   | 0                       | 1<br>(1)                   | 48,60 ± 16,91<br>(28–78)  | 0        |
| <i>L. corallina</i>    | 57,05 ± 27,20<br>(12–93)  | 0                       | 3,33 ± 2,2<br>(1–6)        | 60,70 ± 27,89<br>(7–98)   | 0        |
| <i>L. globosa</i>      | 52,50 ± 14,22<br>(28–68)  | 4,75 ± 0,50<br>(3–5)    | 3,00 ± 3,36<br>(1–8)       | 48,35 ± 19,21<br>(7–72)   | 0        |
| <i>L. involuocrata</i> | 92,13 ± 56,01<br>(22–195) | 0                       | 2<br>(2)                   | 87,52 ± 53,45<br>(15–192) | 0        |
| <i>L. languida</i>     | 42,59 ± 19,04<br>(1–65)   | 0                       | 1<br>(1)                   | 17,70 ± 15,10<br>(1–53)   | 0        |
| <i>L. smithii</i>      | 16,17 ± 10,35<br>(6–42)   | 1,00 ± 0,54<br>(1–2)    | 24,30 ± 2,65<br>(20–28)    | 44,30 ± 12,05<br>(21–62)  | 0        |
| <i>L. spiculata</i>    | 17,41 ± 9,93<br>(6–38)    | 0                       | 0                          | 36,44 ± 14,70<br>(12–60)  | 0        |
| Espécies               | Índice                    |                         |                            | Sistema de Melhoramento   |          |
|                        | IA                        | IAI                     | EF                         |                           |          |
| <i>L. azurea</i>       | 0,00                      | 0,00                    | 0,95                       | AI                        |          |
| <i>L. brachycaulis</i> | 0,00                      | 0,08                    | 0,84                       | AI                        |          |
| <i>L. corallina</i>    | 0,00                      | 0,12                    | 1,00                       | AI                        |          |
| <i>L. globosa</i>      | 0,23                      | 0,23                    | 0,29                       | AI                        |          |
| <i>L. involuocrata</i> | 0,00                      | 0,04                    | 0,92                       | AI                        |          |
| <i>L. languida</i>     | 0,00                      | 0,04                    | 0,85                       | AI                        |          |
| <i>L. smithii</i>      | 0,08                      | 0,80                    | 0,90                       | AC                        |          |
| <i>L. spiculata</i>    | 0,00                      | 0,00                    | 0,88                       | AI                        |          |

\* Porcentagem de frutos (frutos com sementes/ flores polinizadas).

\*\* Média ± desvio padrão de sementes obtidas por flor (menor número de sementes por frutos – maior número de sementes por fruto).

\*\*\* Plantas avaliadas de duas localidades: Parque Estadual da Serra do Conduru, Uruçuca (n = 20) – 0% de frutos gerados com sementes; Reserva Biológica da Michelin, Igrapiúna (n = 5) – 100 % de frutos gerados com sementes].

IA = índice de autogamia (autopolinização natural/ polinização cruzada); IAI = índice de autoincompatibilidade (autopolinização artificial/ polinização cruzada). EF = eficiência reprodutiva (porcentagem de frutos formados com sementes de polinização livre/ porcentagem de frutos formados com sementes por polinização cruzada). AI = autoincompatível (IAI é inferior a 0,30) AC = parcialmente autocompatível (IAI foram acima de 0,30).



**Figura 1.** A) Flores das espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção evidenciando as peças florais e a relação da altura das anteras com o estigma; B) Detalhe de *L. azurea* evidenciando uma hercogamia; C) Detalhe de *L. globosa* evidenciando o estigma e a antera na mesa alta; D) Detalhe de *L. smithii* evidenciando uma hercogamia; E-P) Crescimento do tubo polínico no estigma nos diferentes sistemas reprodutivos por meio da microscopia de fluorescência com solução de azul de anilina em espécies de *Lymania*. E) *Lymania azurea* evidenciando a pouca deposição de grãos de pólen na superfície do estigma em autopolinização natural. F) *Lymania azurea* evidenciando o óvulo sem a penetração do tubo polínico na micrópila em autopolinização artificial. G) *Lymania brachycaulis*



evidenciando uma grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma em autopolinização artificial. H) *Lymania brachycaulis* evidenciando os tubos polínicos com distribuição regular de calose em polinização cruzada; I) *Lymania corallina* evidenciando os tubos polínicos distribuídos em feixes com distribuição regular de calose em polinização cruzada; J) *Lymania corallina* evidenciando a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização em polinização cruzada. K) *Lymania globosa* evidenciando muitos grãos de pólen germinando na superfície do estigma e formando feixes de tubos polínicos em autopolinização artificial. L) *Lymania involucrata* evidenciando tubos polínicos crescendo e enovelando no primeiro terço do estilete em autopolinização artificial; M) *Lymania involucrata* evidenciando poucos tubos polínicos chegando ao ovário em autopolinização artificial; N) *Lymania languida* evidenciando poucos tubos polínicos penetrando e paralisando no segundo terço do estilete em autopolinização artificial; O) *Lymania smithii* evidenciando a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização em autopolinização artificial. P) *Lymania spiculata* evidenciando os óvulos sem a penetração do tubo polínico na micrópila em agamospermia. an = antera; ap = apêndice do óvulo; az = *L. azurea*; br = *L. brachycaulis*; co = *L. corallina*; es = estigma; et = estilete; fv = feixe vascular; gl = *L. globosa*; gp = grãos de pólen; in = *L. involucrata*; la = *L. languida*; mi = micrópila; or = ovário; ov = óvulo; pe = pétala; pl = placenta; pp = papilas estigmáticas; se = sépala; sm = *L. smithii*; sp = *L. spiculata*; tp = tubo polínico. Barras: A = 1 cm; B-D = 3 mm; E, G-I, K-N = 1 mm; F = 200 µm; J, O-P = 500 µm.

A família Bromeliaceae apresenta diferentes estratégias reprodutivas entre as espécies, que vão desde plantas alógamas, autógamas, cleistógamas e agamospérmicas (GILMARTIN; BROWN, 1985; MATAALLANA et al. 2010; SOUZA et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2020), além de se propagarem via rebentos (mudas laterais) ou estolões (BENZING, 2000). Muitas bromélias apresentam alogamia como sistema reprodutivo preferencial, sendo dependentes de polinizadores, como por exemplo, *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker, *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb., *Aechmea pineliana* (Brongn. ex Planch.) Baker, *Billbergia amoena* (Loddiges) Lindley, *Neoregelia pauciflora* L.B.Sm., *Vriesea carinata* Wawra e *Vriesea paraibica* Wawra, *Vriesea longicaulis* (Baker) Mez, *Wittmackia bicolor* (L.B.Sm.) Aguirre-Santoro, entre outros (MATAALLANA et al. 2010; SOUZA et al., 2017). A autoincompatibilidade tem sido descrita como um importante mecanismo reprodutivo para evitar a depressão endogâmica e promover heterozigosidade e diversidade genética, permitindo assim a sobrevivência ou adaptação de uma espécie em diferentes ambientes e ao longo do tempo (CHARLESWORTH, 2006).

Já a autocompatibilidade determina o sistema reprodutivo de autogamia e pode explicar a coesão e isolamento de espécies simpátricas em ambientes de alta diversidade (WENDT et al., 2002; MATALLANA et al., 2010) e estão presentes nas espécies *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker ex. Benth. & Hook.f., *Aechmea distichantha* Lem., *Ananas macrodontes* E.Morren, *Wittmackia patentissima* (Mart. ex Schult. & Schult.f.) Mez, *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez (WOLOWSKI et al., 2013; SOUZA et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2020). Além disso, algumas espécies apresentam sistema reprodutivo misto, podendo ser alógamas, autógamas ou até mesmo agamospérmicas, como é o caso de *A. bromeliifolia* e *A. distichantha* (SOUZA et al., 2017).

Foi observado a formação de frutos com sementes em polinização natural ocorreu em todas as espécies, com valores variando de 80% (como em *L. azurea*) e 100% (como em *L. corallina*) (Tabela 2). Apenas *L. globosa* apresentou 20% (Tabela 2). Os indivíduos de *L. globosa* foram avaliadas em dois fragmentos florestais, no Parque Estadual Parque Estadual da Serra do Conduru (PESC), em Uruçuca e na Reserva Ecológica Michelin (REM), em Igrapiúna. Vale ressaltar que 100% dos frutos avaliados na Reserva Ecológica Michelin gerando sementes e nenhuma semente nos frutos avaliados no PESC. A ausência de sementes em polinização aberta no PESC pode estar relacionada à baixa eficiência dos polinizadores neste fragmento florestal, uma vez que essa mesma espécie teve alta eficiência reprodutiva na REM. A eficiência reprodutiva foi superior a 0,84 em todas as espécies, chegando a 100% em *L. corallina*, com exceção de *L. globosa* que foi de 0,29 (Tabela 2).

Polatto (2020) estudando diferentes níveis de dependência de polinizadores em um conjunto de espécies vegetais, identificou que na ausência de polinizadores efetivos, foi registrado menores taxa de frutificação em espécies de Bignoniaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Rhamnaceae e Sapindaceae. Isso reforça a hipótese que os polinizadores são fundamentais para a reprodução e produção de frutos e sementes, principalmente em espécies que apresentam autoincompatibilidade.

Bastos et al. (2017) relataram que a polinização natural em *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant levou à formação de apenas 35% dos frutos e esse resultado foi atribuído à baixa frequência observada de visitas florais na área de estudo. Estudos da biologia reprodutiva e interação planta/ animal com essas

espécies são fundamentais para responder essa hipótese levantada. A partir de nossas observações em campo no PESC, ao coletarmos as espécies para o referido trabalho, foi observada uma baixa frequência de polinizadores, principalmente de beija-flores em campo.

Em autopolinização natural foi registrado sucesso apenas em *L. globosa* e *L. smithii* com porcentagem de 16% e 8% de frutos formados, respectivamente, mas com baixa produção de sementes ( $< 4,75$ ) (Tabela 2). Para que ocorra a autopolinização natural, as anteras precisam estar na mesma altura e em contato com a superfície das papilas estigmáticas. A única espécie que ocorre esse alinhamento é em *L. globosa*, onde as anteras estão no mesmo plano das papilas estigmáticas (Figura 1A e C). Já em *L. smithii*, o estigma está localizado bem acima das anteras, ocorrendo assim uma barreira física, denominada de hercogamia (Figura 1A, B e D).

Para que ocorra a autopolinização natural ou polinização direta, os grãos de pólen devem cair sobre o estigma da mesma flor que o originou, resultando na autofecundação em um processo chamado de autopolinização (SHIVANNA, 2015). No caso da hercogamia, existe uma separação espacial entre as anteras e estigmas (WEBB; LLOYD, 1986; OPEDAL, 2018). Essa forma de polinização é vantajosa em termos evolutivos e de diversidade, pois propicia uma maior variabilidade genética, pois potencializa o fluxo de grãos de pólen entre os diferentes morfos (GANGULY; BARUA, 2021).

Para o sistema de autopolinização artificial, foi registrado baixo número de frutos formados com sementes e um número de sementes muito reduzido nas seis espécies avaliadas, com exceção de *L. smithii* com 80% dos frutos formados e  $24,30 \pm 2,65$  sementes por fruto. *Lymania azurea* e *L. spiculata* não formaram frutos com sementes. Vale destacar que todas as espécies de *Lymania* formam frutos mesmo sem semente, o que caracteriza o gênero com frutos partenocárpicos. A partenocarpia é a produção de frutos sem sementes a partir do ovário, sem que tenha ocorrido a fecundação (BACKIYARANI et al., 2021) e já foi relatado em Bromeliaceae (LENZI et al., 2006; CASCANTE-MARÍN et al., 2019). Sua ocorrência pode estar relacionada a problemas fisiológicos das plantas e na ineficiência dos polinizadores, bem como, para a atração dos dispersores e defesa dos frutos férteis contra predadores (VERDÚ; GARCIA-

FAYOS, 2001; WERPACHOWSKI et al. 2004; LENZI et al., 2006; BACKIYARANI et al., 2021).

A maior produção de frutos e sementes ocorreu em polinização cruzada com valores superiores a 84% (*L. azurea*), sendo que em seis espécies 100% apresentaram frutos com grande número de sementes, muito próximo à polinização natural.

Das oito espécies estudadas, sete são alógamas, ou seja, apresentam autoincompatibilidade e necessitam de agentes polinizadores para a produção de frutos com sementes. *Lymania smithii* foi a única espécie que é parcialmente autocompatível com IAI de 0,80.

A autocompatibilidade verificada em *L. smithii* pode justificar uma maior distribuição nos estados de Bahia, Alagoas e Pernambuco, pois mesmo na ausência de polinizadores há uma produção de sementes e conseqüentemente maior possibilidade de dispersão. Foi constatada que as demais espécies do gênero são endêmicas no sul da Bahia apresentam populações bem reduzidas a poucos municípios, além de estarem ameaçadas de extinção. Isso pode estar relacionado, possivelmente, à baixa eficiência reprodutiva e o baixo número de sementes, como reportado no fragmento florestal do PESC na espécie *L. globosa* que apresentou zero de eficiência reprodutiva.

Todas as espécies *Lymania* se propagam também vegetativamente, por estolões que são emitidos após o florescimento, e é lenta e pouco eficiente. Cada espécie emite em média de um a três mudas/ ano provenientes de estolões, sendo *L. azurea* a menos eficiente (normalmente uma muda). *Lymania smithii* e *L. globosa* as mais eficientes chegando até três mudas. Essa baixa eficiência propagativa tem influenciado possivelmente na formação de pequenas populações dessas espécies corroborando com seu status de ameaça, além da fragmentação dos seus habitats.

Diferentes eventos foram observados no desenvolvimento do tubo polínico no pistilo, o que caracterizou a autoincompatibilidade como barreiras pré-zigóticas nas diferentes espécies (Figura 1). As barreiras pré-zigóticas, atuam no impedimento da ocorrência da fecundação entre os gametas femininos e masculinos e são de caráter espacial, temporal, por incompatibilidade genética ou por modificações na estrutura floral que alteram o comportamento do agente polinizador (RIESEBERG, 2007; GOUVEIA; PINHEIRO, 2015). Já as barreiras

pós-zigóticas envolvem a inviabilidade das sementes, ocasionada pela esterilidade ou degeneração do zigoto formado (LEXER et al., 2005; JOHNSON, 2010; GREINER et al., 2011) caso não observado neste trabalho, uma vez que as sementes geradas germinaram com sucesso.

Existem poucos registros do sistema reprodutivo em Bromeliaceae quando comparados com o grande número de espécies da família. Acredita-se que o principal sistema de incompatibilidade, para a maioria das espécies com ampla distribuição geográfica, seja o gametofítico (BENZING 2000; SOUZA et al., 2017). No entanto, a autocompatibilidade é mais frequente nesta família (MARTINELLI 1994; WENDT et al., 2001; WENDT et al., 2002; MATAALLANA et al. 2010), como verificado em *L. smithii*.

Na autopolinização natural, houve pouca deposição de grãos de pólen na superfície do estigma, principalmente em *L. azurea* (Tabela 3, Figura 1, E), *L. smithii* e *L. spiculata* com valores inferiores às demais espécies (Tabela 3), isso está relacionado a hercogamia, visto que estas espécies apresentam o estigma bem acima das anteras (Figura 1, A, D). Em *L. smithii*, observou-se em 20% das lâminas a penetração dos tubos polínicos na micrópila dos óvulos. Esses resultados estão de acordo com os dados apresentados na Tabela 2 para determinar os sistemas reprodutivos e formação de sementes em autopolinização natural.

Na autopolinização artificial, as polinizações foram eficientes resultando em nota três para todas as espécies que apresentaram grande quantidade de grãos de pólen depositados e germinados na superfície do estigma (Tabela 3, Figura 1, G, K), exceto *L. spiculata* com 20 % e com nota dois (Tabela 3). A deposição dos grãos de pólen não garante a fertilização e geração de sementes, uma vez que inúmeras barreiras reprodutivas podem acontecer ao longo do pistilo (SOUZA et al., 2017). A autoincompatibilidade nas espécies ocorreu ao longo do estilete, a exemplo da *L. azurea* e *L. spiculata*, onde o tubo polínico cessou o seu crescimento no final do primeiro e segundo terço do estilete, em 50% dos pistilos estudados em microscopia de fluorescência (Tabela 3). Em *L. brachycaulis* e *L. involucrata*, os tubos polínicos foram paralisados no terceiro terço do estilete e na região do ovário, sem indícios de penetração nos óvulos (Tabela 3, Figura 1, L, M). As espécies *L. corallina*, *L. globosa* e *L. languida* apresentaram tubos polínicos paralisados no primeiro ao terceiro terço do

estilete em 90% a 95% dos pistilos avaliados (Figura 1, N), mas em 5% a 10% os tubos polínicos estavam próximos aos óvulos sem penetração na micrópila. Apenas *L. smithii* verificou-se penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização (Figura 1, O). Em *L. azurea* e *L. languida*, foram observadas deposição de calose de forma reticulada na ponta dos tubos polínicos fazendo com que cessasse o crescimento.

Na polinização cruzada, foi verificada 100% de sucesso em todas as espécies com tubos polínicos penetrando na micrópila ou tubos polínicos dentro do ovário próximo aos óvulos (Figura 1, J). Em agamospermia, não houve deposição de grãos de pólen na superfície do estigma o que confirma a eficiência da emasculação das flores (Figura 1, P).

**Tabela 3.** Avaliação quanto à germinação dos grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos no pistilo nos diferentes sistemas reprodutivos em oito espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção.

| Espécie                | Autopolinização natural |                     |  |                    | Autopolinização artificial |                    |                               |                    |  |
|------------------------|-------------------------|---------------------|--|--------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|--|
|                        | GPSE                    | GPGE                | CTPP                                     | OTPM               | GPSE                       | GPGE               | CTPP                          | OTPM               |  |
| <i>L. azurea</i>       | 0 (50%)<br>1 (50%)      | 0 (100%)            | 0 (100%)                                 | 0 (100%)           | 3 (100%)                   | 2 (25%)<br>3 (75%) | 2 (50%)<br>3 (50%)            | 0 (100%)           |  |
| <i>L. brachycaulis</i> | 3 (100%)                | 2 (20%)<br>3 (80%)  | 2 (20%)<br>4 (80%)                       | 0 (100%)           | 3 (100%)                   | 3 (100%)           | 4 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. corallina</i>    | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 4 (100%)                                 | 0 (100%)           | 3 (100%)                   | 3 (100%)           | 4 (95%)<br>6 (5%)             | 0 (100%)           |  |
| <i>L. globosa</i>      | 2 (30%)<br>3 (70%)      | 3 (100%)            | 2 (50%)<br>3 (50%)                       | 0 (100%)           | 3 (100%)                   | 3 (100%)           | 3 (90%)<br>6 (10%)            | 0 (100%)           |  |
| <i>L. involucrata</i>  | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 3 (100%)                                 | 0 (100%)           | 3 (100%)                   | 3 (100%)           | 3 (80%)<br>5 (20%)            | 0 (100%)           |  |
| <i>L. languida</i>     | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 2 (100%)                                 | 0 (100%)           | 3 (100%)                   | 3 (100%)           | 2 (95%)<br>6 (5%)             | 0 (100%)           |  |
| <i>L. smithii</i>      | 1 (40%)<br>2 (60%)      | 1 (40%)<br>2 (60%)  | 3 (25%)<br>5 (20%)<br>6 (35%)<br>7 (20%) | 0 (60%)<br>1 (40%) | 3 (100%)                   | 3 (100%)           | 4 (30%)<br>6 (40%)<br>7 (30%) | 0 (50%)<br>1 (50%) |  |
| <i>L. spiculata</i>    | 1 (60%)<br>2 (40%)      | 1 (50%)<br>2 (50%)  | 2 (60%)<br>3 (40%)                       | 0 (100%)           | 2 (20%)<br>3 (80%)         | 3 (100%)           | 2 (50%)<br>3 (40%)            | 0 (100%)           |  |
|                        |                         | Polinização Cruzada |  |                    |                            | Agamospermia       |                               |                    |  |
| <i>L. azurea</i>       | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 6 (20%)<br>7 (80%)                       | 1 (40%)<br>2 (60%) | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. brachycaulis</i> | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 7 (100%)                                 | 2 (40%)<br>3 (60%) | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. corallina</i>    | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 7 (100%)                                 | 3 (100%)           | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. globosa</i>      | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 6 (30%)<br>7 (70%)                       | 3 (100%)           | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. involucrata</i>  | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 7 (100%)                                 | 3 (100%)           | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. languida</i>     | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 7 (100%)                                 | 3 (100%)           | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. smithii</i>      | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 6 (40%)<br>7 (60%)                       | 2 (40%)<br>3 (60%) | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |
| <i>L. spiculata</i>    | 3 (100%)                | 3 (100%)            | 6 (50%)<br>7 (50%)                       | 2 (30%)<br>3 (70%) | 0 (100%)                   | 0 (100%)           | 0 (100%)                      | 0 (100%)           |  |

GPSE = grãos de pólen que aderido à superfície do estigma; GPGE = grãos de pólen germinados na superfície do estigma foram avaliados de acordo a escala: 0) ausente; 1) 1 a 25 grãos de pólen; 2) 25 a 50 grãos de pólen; 3) > 50 grãos de pólen. OTPM = óvulos com tubo polínico penetrado na micrópila: 0) ausente; 1) 1 a 5 óvulos; 2) 5 a 10 óvulos; 3) > 10 óvulos. CTPP = crescimento do tubo polínico no pistilo foi avaliado conforme escala: 0) grãos de pólen não germinados na superfície do estigma; 1) grãos de pólen germinados na superfície do estigma; 2) tubos polínicos paralisados no primeiro terço do estilete; 3) tubos polínicos paralisados no segundo terço do estilete; 4) tubos polínicos paralisados no terceiro terço do estilete; 5) tubos polínicos na região do ovário; 6) tubo polínico próximo ao óvulo; 7) tubo polínico penetrando na micrópila.



### *Hibridações interespecíficas*

Foram realizadas 423 hibridações em 41 combinações entre as espécies estudadas. Destas, 228 obtiveram sucesso com formação de sementes (Tabela 4). Incongruência foram observadas em 12 combinações, sendo a maioria recíproca como no caso de *L. azurea* x *L. brachycaulis*; *L. brachycaulis* x *L. azurea*; *L. azurea* x *L. corallina*; *L. corallina* x *L. azurea*; *L. azurea* x *L. involucrata*; *L. involucrata* x *L. azurea*; *L. globosa* x *L. spiculata*; *L. spiculata* x *L. globosa*, e incongruência não recíproca em *L. azurea* x *L. languida* e *L. spiculata* x *L. azurea* (Tabela 4).

Entre espécies mais próximas morfologicamente, foi possível 100% de sucesso, à exemplo de *L. brachycaulis* x *L. corallina*; *L. corallina* x *L. brachycaulis*; *L. brachycaulis* x *L. involucrata*; *L. involucrata* x *L. brachycaulis*; *L. corallina* x *L. involucrata*; *L. involucrata* x *L. corallina* que registraram os maiores números de sementes geradas (36,28 a 143,50 sementes), o que demonstra a viabilidade das hibridações. Morfologicamente essas espécies são mais próximas e correlacionadas (SOUZA et al., 2021), mas não há estudo molecular e filogenético foi realizado com essas espécies para comprovar essa proximidade taxonômica. Em espécies estreitamente relacionadas, os sistemas de congruência interespecífica podem não rejeitar os grãos de pólen, possibilitando a hibridação (HISCOCK; ALLEN, 2008).

Dentre as hibridações com sucesso, o maior número de sementes foi obtido em *L. involucrata* x *L. corallina* com uma média de 143,50 sementes por fruto e *L. involucrata* e *L. brachycaulis* com uma média de 121,33 sementes por fruto (Tabela 4). Em contrapartida, os menores valores foram observados em *L. languida* x *L. azurea* com uma média 6,32 sementes, seguido de *L. smithii* x *L. globosa* com 12,13 sementes por fruto (Tabela 4). Além da eficiência da polinização e da congruência entre as espécies, o número de óvulos é um fator importante na produção de sementes.

**Tabela 4.** Híbridagens interespecíficas em oito espécies de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção.

| ♀ \ ♂                  | <i>L. azurea</i> | <i>L. brachycaulis</i> | <i>L. corallina</i> | <i>L. globosa</i> | <i>L. involucrata</i> | <i>L. languida</i> | <i>L. smithii</i> | <i>L. spiculata</i> |
|------------------------|------------------|------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| <i>L. azurea</i>       | *                | 0/12 (0,00)            | 0/6 (0,00)          | 8/10 (16,21)      | 0/15 (0,00)           | 0/10 (0,00)        | -                 | 4/10 (23,18)        |
| <i>L. brachycaulis</i> | 0/8 (0,00)       | *                      | 15/15 (36,28)       | -                 | 8/8 (72,15)           | 8/8 (27,39)        | -                 | -                   |
| <i>L. corallina</i>    | 0/10 (0,00)      | 12/12 (57,08)          | *                   | 4/8 (19,57)       | 15/15 (69,20)         | 9/9 (52,17)        | -                 | -                   |
| <i>L. globosa</i>      | 13/13 (18,08)    | 5/15 (34,83)           | 6/10 (25,90)        | *                 | 6/10 (14,20)          | 3/8 (12,21)        | 6/12 (10,13)      | 0/15 (0,00)         |
| <i>L. involucrata</i>  | 0/8 (0,00)       | 12/12 (121,33)         | 10/10 (143,50)      | 7/10 (4,30)       | *                     | 9/10 (102,16)      | 0/8 (0,00)        | 0/10 (0,00)         |
| <i>L. languida</i>     | 1/8 (6,32)       | 10/10 (36,21)          | 8/8 (26,78)         | 4/6 (38,00)       | -                     | *                  | 7/7 (31,18)       | -                   |
| <i>L. smithii</i>      | -                | -                      | -                   | 11/12 (12,13)     | -                     | 8/8 (18,31)        | *                 | 9/10 (24,36)        |
| <i>L. spiculata</i>    | 0/10 (0,00)      | 2/15 (0,08)            | -                   | 0/12 (0,00)       | -                     | -                  | 8/10 (27,18)      | *                   |

Número de frutos colhidos com sementes/ número de polinizações realizadas (Número médio de sementes por fruto).

Utilizando a microscopia de fluorescência com corante azul de anilina, foi possível observar os tubos polínicos no interior do estilete, o que pode comprovar a presença de incongruências entre as espécies.

Diversos eventos aconteceram que impediram a penetração do tubo polínico na micrópila nas hibridações realizadas. Em *L. brachycaulis* x *L. azurea* e *L. azurea* x *L. involucrata*, apesar de apresentarem inúmeros grãos de pólen germinando na superfície do estigma, os tubos polínicos paralisaram no segundo terço do estilete com deposição irregular de calose (Figura 2, G). Em *Lymania corallina* x *L. azurea*, os tubos polínicos paralisaram no primeiro terço do estilete evidenciando um enovelamento (Figura 2, H). *Lymania globosa* x *L. spiculata* e *L. spiculata* x *L. azurea*, os grãos de pólen germinaram na superfície do estigma, mas paralisaram no terceiro terço do estilete com deposição irregular de calose (Figura 2, L). Já em *Lymania azurea* x *L. languida*, houve pouca germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma e os grãos de pólen que germinaram tiveram os tubos polínicos paralisados no primeiro terço do estilete com intumescimento e deposição irregular de calose (Figura 2, K, M).

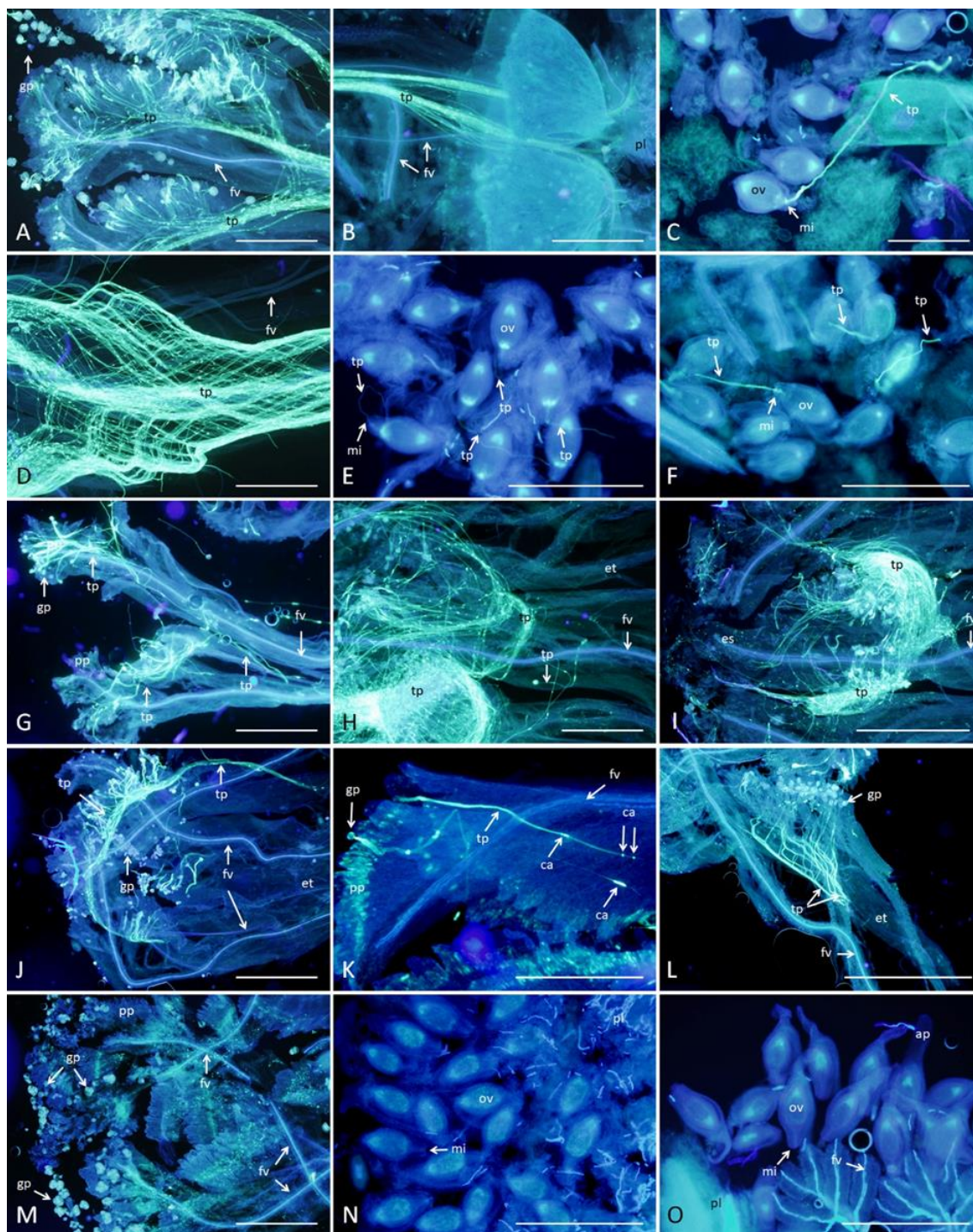
Souza et al. (2017) trabalhando com hibridações interespecíficas e intergenéricas em diferentes gêneros de bromélias, observaram que, em hibridações interespecíficas com espécies do gênero *Vriesea*, foram observadas incongruências com o crescimento do tubo polínico paralisado no início do terceiro terço do estilete e com deposição de calose nas pontas dos tubos polínicos fazendo com que cessasse o crescimento. Entre as espécies do gênero *Aechmea* Ruiz & Pav., houve enovelamento dos tubos polínicos no terço superior do estilete, germinação dos grãos de pólen e paralisação do crescimento do tubo polínico no próprio estigma, tubos polínicos cresceram até a região do ovário, mas não foi verificada penetração do tubo polínico na micrópila.

As espécies que receberam grãos de pólen interespecífico apresentam incongruência, tubos polínicos paralisados no estilete, algo semelhante ao que acontece com as espécies autoincompatíveis quando recebem grãos de pólen intraespecífico (RIESEBERG; WILLIS, 2007; CAVALCANTE et al., 2020). Acredita-se que estas incongruências sejam formadas a partir dos mesmos elementos da autoincompatibilidade (HANCOCK et al., 2003).

Poucos são os registros envolvendo trabalhos com hibridações em Bromeliaceae quando pensamos na diversidade das espécies e possibilidades

de hibridações (VERVAEKE et al., 2002; 2003; RÔÇAS et al., 2004; MATAALLANA et al., 2016; ZANELLA et al., 2016; SOUZA et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2020; LOISEAU et al., 2021; COSTA et al., 2021). Hibridização não é um fenômeno raro para bromélias, já que existem vários registros de híbridos interespecíficos e intergenéricos no mercado, o que vem suprindo a demanda do segmento de flores e plantas ornamentais. Além de híbridos artificiais são relatados na literatura alguns híbridos naturais envolvendo, principalmente, os gêneros *Pitcairnia* L'Hér., *Tillandsia* L., *Vriesea*, *Fosterella* L.B.Sm., entre outros (GARDNER, 1984; LUTHER 1984; WENDT et al., 2000; 2001; 2008; SOUSA et al. 2003; WAGNER et al., 2015; ZANELLA et al., 2016). Esses híbridos normalmente são putativos obtidos em populações simpátricas. A Sociedade Internacional de Bromélias (BSI, 2023) vem publicando continuamente diversos híbridos, mas na sua grande totalidade são realizados por produtores ou colecionadores de forma empírica sem relatos de pesquisas, metodologias, insucessos e dificuldades nessas hibridações.

Vale também relatar que as muitas espécies apresentaram assincronia de florescimento em um curto intervalo de tempo, mesmo dentro do próprio gênero, limitando a disponibilidade de flores e potenciais cruzamentos interespecíficos. Algumas metodologias para contornar essa falta de sincronia já estão disponíveis na literatura, como no caso da conservação de grãos de pólen em Bromeliaceae por meio da criopreservação (SOUZA et al., 2015; 2018; SILVA et al., 2017).



**Figura 2.** Híbridagens interespecíficas de *Lymania* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Nordeste do Brasil e ameaçadas de extinção, evidenciando o crescimento do tubo polínico e as incongruências por meio da microscopia de fluorescência com solução de azul de anilina. A) *Lymania languida* x *L. azurea* evidenciando uma grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma com penetração dos feixes de tubo polínico no estilete. B) *Lymania languida* x *L. azurea* evidenciando tubos polínicos organizados em feixes penetrando na região do ovário. C) *Lymania globosa* X *L. azurea* evidenciando poucos tubos polínicos penetrando na micrópila dos óvulos. D) *Lymania languida* x *L. corallina* evidenciando inúmeros tubos polínicos com deposição de calose regular no terço mediano do estilete. E) *Lymania corallina* X *L. involucrata* evidenciando vários tubos

polínicos penetrando nas micrópilas dos óvulos. F) *Lymania smithii* x *L. spiculata* evidenciando vários tubos polínicos penetrando nas micrópilas dos óvulos. G) *Lymania brachycaulis* x *L. azurea* evidenciando inúmeros tubos polínicos paralisados no primeiro e segundo terço do estilete com deposição irregular de calose. H) *Lymania corallina* x *L. azurea* evidenciando enovelamento dos tubos polínicos no primeiro terço do estilete. I) *Lymania involucrata* x *L. spiculata* evidenciando enovelamento dos tubos polínicos no primeiro terço do estilete. J) *Lymania spiculata* x *L. globosa* evidenciando grãos de pólen germinados e paralisados na superfície do estigma e no primeiro terço do estilete. K) *Lymania azurea* x *L. languida* evidenciando o intumescimento e deposição irregular de calose nos tubos polínicos no primeiro terço do estilete. L) *Lymania globosa* x *L. spiculata* evidenciando o intumescimento e deposição irregular de calose principalmente na extremidade do tubo polínico no primeiro terço do estilete. M) *Lymania azurea* x *L. languida* evidenciando os grãos de pólen em tetrade não germinados na superfície do estigma. N) *Lymania involucrata* x *L. spiculata* evidenciando os óvulos sem penetração do tubo polínico na micrópila. O) *Lymania globosa* x *L. spiculata* evidenciando os óvulos sem penetração do tubo polínico na micrópila. ap = apêndice do óvulo; ca = plugues de calose; es = estigma; et = estilete; fv = feixe vascular; gp = grãos de pólen; mi = micrópila; ov = óvulo; pl = placenta; pp = papilas estigmáticas; tp = tubo polínico. Barras: A, B, E, F, H, K, N, O = 500 µm; C, D, G, I, J, M = 1 mm; L, 200 µm.

#### *Germinação in vitro de sementes*

Foram registradas baixas porcentagens de contaminação bacteriana, com 5% em *L. globosa* e 10% em *L. involucrata*. Não foram registradas contaminações fúngicas. A emissão da radícula caracterizou o início da germinação tendo sido registrada a partir do sétimo dia para todas as espécies estudadas, com exceção de *L. smithii* que ocorreu a partir do quarto dia. Essas diferenças podem ser devido a fatores diversos, destacando-se o estado fisiológico ou às características genéticas das espécies (SILVA et al., 2021).

As porcentagens de germinação foram acima de 94% independente do sistema reprodutivo ou hibridações, evidenciando a ausência de barreiras pós-zigóticas e a alta viabilidade das sementes. O sucesso no estabelecimento de bromélias via sementes e as baixas taxas de contaminação em cultura de tecidos é relatado em diversos gêneros, a exemplo de *Dyckia* Schult.f. (BERTSOUKLIS; PANAGAKI, 2022), *Vriesea*, *Hohenbergia* Schult. & Schult.f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (SILVA et al., 2021) e *Aechmea* Ruiz & Pav. (SILVA et al., 2022).

A germinação *in vitro* de sementes das espécies estudadas mostrou-se viável, gerando plântulas normais que estão sendo utilizadas para trabalhos de conservação *in vitro*, de micropropagação e, futuramente, de reintrodução das espécies em ambientes naturais. Vale destacar que apenas as sementes dos

sistemas reprodutivos serão usadas para os trabalhos de reintrodução das espécies em ambiente natural. As sementes híbridas após germinadas estão sendo cultivadas em casa de vegetação para posterior avaliação, caracterização e identificar potencialidades como planta ornamental e futuro lançamento como novas cultivares.

## **CONCLUSÃO**

Todas as espécies apresentaram autoincompatibilidade, exceto *L. smithii*, que apresentou autogamia. Agamospermia não foi observada. Nas hibridações houve 54% de sucesso em 41 combinações. Apenas 12 combinações apresentaram incongruência.

Os principais fenômenos de incongruência identificados após cruzamentos interespecíficas foram: pouca germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma; inibição do crescimento do tubo polínico ao longo do estilete; enovelamento dos tubos polínicos ao longo do estilete; tubos polínicos no interior do ovário, mas sem penetração na micrópila; deposição reticulada de calose no tubo polínico, entre outros.

Os resultados demonstraram que é possível realizar hibridação com algumas espécies do gênero *Lymania*, embora as barreiras reprodutivas pré-zigóticas sejam o principal mecanismo para impedir o fluxo genético interespecífico.

As porcentagens de germinação das sementes foram acima de 94% evidenciando a ausência de barreiras pós-zigóticas, mostrando-se viável e gerando plântulas normais, que estão sendo utilizadas para trabalhos de micropropagação e futuramente reintrodução na natureza.

## REFERÊNCIAS

- BACKIYARANI, S.; SASIKALA, R.; SHARMILADEVI, S.; UMA, S. Decoding the molecular mechanism of parthenocarpy in *Musa* spp. through protein–protein interaction network. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 14592, 2021.
- 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.
- BASTOS, M. J. S. M.; BASTOS, L. P.; SOUZA, E. H.; SOARES, T. L.; MORAIS, D. V.; SOUZA, F. V. D.; COSTA M. A. P. C. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 31, p. 665-676, 2017.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: Profile of an adaptative radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BERTSOUKLIS, K.; PANAGAKI, K.-P. In Vitro Germination and Propagation of *Dyckia brevifolia*, An Ornamental and Endangered Bromeliad. **Horticulturae**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 390, 2022.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. **ICMBIO**. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P\\_mma\\_148\\_2022\\_altera\\_anexos\\_P\\_mma\\_443\\_444\\_445\\_2014\\_atualiza\\_especies\\_amea\\_cadas\\_extincao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_amea_cadas_extincao.pdf). Acesso: 30 Nov. 2022.
- BSI (BROMELIAD SOCIETY INTERNATIONAL). Bromeliad Cultivar Register: Lista de nomes. **Bromeliad Society International**, (Continuamente atualizado). Disponível em: <https://registry.bsi.org/>. Acesso em: 19 Jan. 2023.
- CASCANTE-MARÍN, A.; TREJO, C.; MORALES, J. F. Primeira descrição das flores noturnas da pouco conhecida *Werauhia haberi* (Tillandsioideae) e notas sobre sua história natural. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 69, n. 1, pág. 6-15, 2019.
- CAVALCANTE, B. P.; SOUZA, E. H.; WILLIAMS, J. H.; VERSIEUX, L. M. Reproductive systems and post-pollination barriers between two closely related eu-bromelioids (Bromeliaceae) in the Atlantic Forest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 192, n. 4, p. 828-839, 2020.
- CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE, M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v.22, n.3, p.828-833, 2008.
- CHARLESWORTH, D. Evolution of plant breeding systems. **Current Biology**, Cambridge, v. 16, n. 17, p. R726-R735, 2006.



COSTA, L. M. S.; GOETZE, M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; HIRSCH, L. D.; BERED, F. Hybridization and species boundaries between three sympatric bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, n.198, v.4, 2021.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. *Lymania* R.W.Read. **REFLORA**. 2020. (continuamente atualizado). Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 6 Janeiro de 2023.

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

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

GARDNER, C. S. Natural hybridization in "*Tillandsia*" subgenus "*tillandsia*". **Selbyana**, Sarasota, v. 7, n. 2/4, p. 380-393, 1984.

GARDNER, C. S. Preliminary classification of *Tillandsia* based on floral characters. **Selbyana**, Sarasota, n.9, p.130-146, 1986.

GILMARTIN, A. J.; BROWN, Gregory K. Cleistogamy in *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae). **Biotropica**, Washington, v. 17, n. 3, p. 256-259, 1985.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. Encyclopaedia of Bromeliads, Version 4. **Utrecht University Botanic Gardens**. (continuamente atualizado). Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso 02 Jan. 2023.

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

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

HANCOCK, J. F. **Plant Evolution and the Origin of Crop Species**. Wallingford: CABI Publishing. 2ed. 2003.

HISCOCK, S. J.; ALLEN, A. M. Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. **New Phytologist**, Oxford, v. 179, n. 2, p. 286-317, 2008.

JOHNSON, N. A. Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield?. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 26, n. 7, p. 317-325, 2010.

LEME, E. M. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. **Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas**. Fragmentos de Mata Atlântica do nordeste, biodiversidade, conservação e suas bromélias. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio p. 190-381, 2006.

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

LEXER, C.; FAY, M. F.; JOSEPH, J. A.; NICA, M. S.; HEINZE, B. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. **Molecular Ecology**, United Kingdom, v. 14, n. 4, p. 1045-1057, 2005

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

LUTHER, H. E. Miscellaneous new taxa of Bromeliaceae (IV). **Selbyana**, Sarasota, v. 7, n. 2/4, p. 348-353, 1984.

MARINHO, F. J. E.; CUNHA, M. S.; FONTOURA, T. Fenologia da espécie *Lymania azurea* Leme (Bromeliaceae) na reserva biológica de Una, BA. *In*: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais [...]** São Paulo: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain technology**, Londres, v. 34, n. 3, p. 125-128, 1959.

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

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

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**, Viena, v.289, p. 57-65, 2010.

MATALLANA, G.; OLIVEIRA, P. E.; SILVA, P. R. R.; WENDT, T. Post - pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south - eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.181, n. 3, p. 521–531, 2016.

MORREN, É. RONNBERGIA, M. L.; ANDRÉ, R. M. Broméliacées. **L 'Illustration Horticole**, Bruselas, v.21, p.119-121, 1874.

MURASHIGE, T. C.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, New York, v. 15, p. 473-497, 1962.

OPEDAL, Ø. H. Herkogamy, a principal functional trait of plant reproductive biology. **International Journal of Plant Sciences**, Illinois, v. 179, n. 9, p. 677-687, 2018.

PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; SILVEIRA, L. C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; BERED, F. Fertilidade de *Vriesea gigantea* Gaud.(Bromeliaceae) no sul do Brasil. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 94, n. 4, p. 683-689, 2007.

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

RAMÍREZ, N.; BRITO, Y. Reproductive biology of tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. **American Journal of Botany**, New York, v. 77, n. 10, p. 1260-1271, 1990.

READ, R.W. The 'Evolution' of a new genus, *Lymania* gen. nov. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 34, p. 199-216, 1984.

RIESEBERG, L. H.; WILLIS, J. H. Plant speciation. **Science**, Illinois, v. 317, n. 5840, p. 910-914, 2007.

RÔÇAS, G.; KLEIN, D. E.; MATTOS, E. A. Artificial hybridization between *Pitcairnia flammea* and *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae): analysis of the performance of parents and hybrids. **Plant Species Biology**, Durham, v. 19, n. 1, p. 47-53, 2004.

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

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

SILVA, P. P. A.; KURITA, F. M. K.; TAMAKI, V. In vitro propagation of *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (Bromeliaceae). **Científica**, Botucatu, v. 45, n. 3, p. 313-320, 2017.

SILVA, S. S. S.; SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; MAX, D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. C. Post-seminal development and cryopreservation of endemic and endangered bromeliads. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 93, 2021.

SILVA, T. C.; LUIZ, C.; OLIVEIRA, M. T.; BORGHEZAN, M.; PESCADOR, R.; JUNIOR, P. C. P. F. Physiological responses of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) in vitro cultured. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Palmas, v. 10, n. 1, p. 016-025, 2022.

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**, Brasília, v. 15, p. 427-443, 2001.

SOUSA, L. O. F.; SILVA, B. R.; SOUSA, R. C. O. S. *Hohenmea*, a new natural intergeneric hybrid in the Bromelioideae. **Journal of the Bromeliad Society**, Florida, v. 53, n. 2, p. 71-76, 2003.

SOUSA, L. O. F.; WENDT, T. Taxonomy and conservation of the genus *Lymania* (Bromeliaceae) in the southern Bahian Atlantic Forest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 157, n. 1, p. 47-66, 2008.

SOUZA, C. P. F.; SOUZA, E. H.; LÊDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D. Evaluation of the micropropagation potential of curauá pineapple hybrids for fiber production. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 48, p. 290-297, 2018.

SOUZA, E. H.; AONA, L.Y.; SOUZA, F. V.; LEME, E. M. *Lymania involuocrata* (Bromeliaceae: Bromelioideae), a new ornamental species from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 489, n. 2, p. 209-215, 2021.

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

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

VERDÚ, M.; GARCÍA-FAYOS P. The effect of deceptive fruits on predispersal seed predation by birds in *Pistacia lentiscus*. **Plant Ecology**, Oxford, v.156, p. 245–248, 2001.

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

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

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.

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

WEBB, C. J.; LLOYD, D. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. **New Zealand journal of botany**, New Zealand, v. 24, n. 1, p. 163-178, 1986.

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, n. 10, 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**, Viena, v.232, n.3-4, p.201-212, 2002.

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

WENDT, T.; PAZ, N. P. L.; RIOS, R. I. A morphometric analysis of a putative hybrid between *Pitcairnia albiflos* and *P. staminea* (Bromeliaceae). **Selbyana**, Sarasota, p. 132-136, 2000.

WERPACHOWSKI, J. S.; VARASSIN, I. G.; GOLDENBERG, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 27, p. 607-613, 2004.

WOLOWSKI, M.; SAAD, C. F.; ASHMAN, T. L.; FREITAS, L. Predominance of self-compatibility in hummingbird-pollinated plants in the Neotropics. **Naturwissenschaften**, Hamburg, v. 100, p. 69-79, 2013.

ZANELLA, C. M.; PALMA-SILVA, C.; GOETZE, M.; BERED, F. Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 181, n. 3, p. 491-504, 2016.

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