

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

ESTUDOS REPRODUTIVOS, HIBRIDAÇÃO E
CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE
Wittmackia Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE)
ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA
ATLÂNTICA

Gleice Quelle Silva dos Santos Nascimento

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2024

**ESTUDOS REPRODUTIVOS, HIBRIDAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO
DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE:
BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA
MATA ATLÂNTICA**

Gleice Quelle Silva dos Santos Nascimento

Licenciada em Ciências Biológicas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2022

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

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

N244e	<p>Nascimento, Gleice Quelle Silva dos Santos. Estudos reprodutivos, hibridação e criopreservação de grãos de pólen de <i>Wittmackia</i> Mez (Bromelioideae: Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica / Gleice Quelle Silva dos Santos Nascimento. Cruz das Almas, BA, 2024. 153f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Everton Hilo de Souza. Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza. Coorientadora: Dra. Lidyanne Yuriko Saleme Aona.</p> <p>1.Bromeliaceae – Botânica – Reprodução. 2.Bromeliaceae – Criopreservação. 3.Mata Atlântica – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 635.9</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE GLEICE
QUELLE SILVA DOS SANTOS NASCIMENTO

ESTUDOS REPRODUTIVOS, HIBRIDAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO
DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE:
BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA
MATA ATLÂNTICA

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Gleice Quelle Silva dos Santos Nascimento

Aprovada em 09 de agosto de 2024

Documento assinado digitalmente
 EVERTON HILO DE SOUZA
Data: 04/09/2024 10:30:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Higor Antonio Domingues

Dr. Higor Antonio Domingues
Royal Botanic Garden, Kew
(Examinador Externo)

Documento assinado digitalmente
 CHRISTIANO FRANCO VEROLA
Data: 13/09/2024 07:34:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Christiano Franco Verola
Universidade Federal do Ceará
(Examinador Externo)

Dedicatória

À minha família, minha mãe pelo amor incondicional, em especial ao meu Marido pelo estímulo permanente e toda atenção e compreensão durante todo meu percurso acadêmico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda força, sabedoria, equilíbrio e tranquilidade nos momentos de fraqueza;

Gratidão aos meus sogros por todo apoio emocional e estrutural durante todo meu percurso acadêmico;

Ao meu orientador Prof. Dr. Everton Hilo de Souza pela oportunidade para desenvolver minha pesquisa, por toda instrução no desenvolvimento de minhas funções, por todo apoio profissional e pessoal, por toda compreensão em meus momentos difíceis;

A todos os meus colegas e amigos do grupo de Bromélias que contribuíram em minha pesquisa, Tiago Abreu da Silva, Railson de Almeida Júnior, Mirelli Souza, Sandra Souza, Simplício Mota, Ila Adriane Faro, Sara Cristina Oliveira, Rivã França, Lucas Daniel Silva, Danilo Andrade, obrigado pelos conhecimentos e auxílio nas atividades metodológicas do meu trabalho. Pelas as experiências educacionais e pessoais.

Às minhas coorientadoras Dr^a. Lidyanne Yuriko Saleme Aona e Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza pelas contribuições no meu trabalho e em demais momentos de aprendizagem;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo acesso a suas estruturas, uso dos equipamentos e materiais, além do suporte dos grandes profissionais do local;

Aos técnicos da Embrapa, Helder Lima Carvalho, Fabiana Ferraz Aud, e demais parceiros do laboratório de cultura de tecidos que me auxiliaram no processo metodológico da minha pesquisa;

A Cata (Benedito Conceição) por todo auxílio e ajuda com meu material de estudo no Banco de germoplasma de Bromélia da Embrapa Mandioca e Fruticultura;

À Mônica Lazoni Rossi pela disponibilidade de tempo e profissional na realização das lindas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) parte essencial do meu trabalho;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, a seus docentes e funcionários, todo apoio e suporte de excelentes profissionais;

À FAPESB, pela bolsa de pós-graduação concedida cujo o Termo de Outorga nº: 00065062099, por disponibilizar condições financeiras para concluir meu trabalho;

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 Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP pela disponibilização da infraestrutura para realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A Pedro Schwambach pelos ensinamentos e disponibilidade sendo essencial nessa pesquisa;

À toda minha família e amigos pela compreensão das ausências e afastamento temporário;

A todos e todas que contribuíram para com meu percurso, meus sinceros agradecimentos!

ESTUDOS REPRODUTIVOS, HIBRIDAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA

RESUMO: O gênero *Wittmackia* inclui 44 espécies distribuídas em dois centros de diversidade: o “clado brasileiro”, concentrado no corredor central da Mata Atlântica, principalmente no sudeste do estado da Bahia; e o “clado caribenho” abrangendo Jamaica, Grandes Antilhas, e ilhas vizinhas no oeste do Caribe e Península de Yucatán. As espécies do “clado brasileiro”, foco deste estudo, são caracterizadas por plantas geralmente pequenas à médias, com inflorescências simples espigadas a ramificadas paniculadas. As flores são pequenas com pétalas estendidas, as sépalas são todas ecarinadas, enquanto o ovário é subcilíndrico ou obovoide, sem quilhas laterais. Esta dissertação está dividida em três capítulos: 1. “Morfologia, viabilidade polínica e receptividade estigmática em *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica” onde caracterizou a morfologia e a viabilidade dos grãos de pólen e a receptividade estigmática de 23 espécies do gênero, de acordo com os estádios de desenvolvimento floral; 2. “Sistemas reprodutivos e hibridação em *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica” onde foi caracterizada os sistemas reprodutivos o potencial de hibridização interespecífica, avaliando as possíveis barreiras reprodutivas de 16 espécies; 3. “Criopreservação de grãos de pólen de *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica” onde foram realizadas a criopreservação dos grãos de pólen de 16 espécies. O gênero *Wittmackia* apresentou grãos de pólen biporados, monades a tétrades, formato oblato, suboblato ou oblato-esferoidal, âmbito circular ou elíptico, heteropolares ou sub-isopolares, de tamanho médio variando em seu diâmetro equatorial, de $28,17 \pm 2,55 \mu\text{m}$ a $37,52 \pm 1,62 \mu\text{m}$ e, espessura da exina entre $1,12 \pm 0,10 \mu\text{m}$ a $2,93 \pm 0,14 \mu\text{m}$. A região estigmática é do tipo conduplicado-espiral com papilas tubulares ou denteadas, possuem diferenças na coloração (branca, verde ou arroxeada) e no tamanho ($4,33 \pm 0,21 \text{ mm}$ a $14,9 \pm 0,14 \text{ mm}$). Nos dois testes histoquímicos, os grãos de pólen apresentaram alta viabilidade principalmente na antese, com valores superiores a 80% muito próximo a germinação in vitro, o que coincide com a atividade enzimática do estigma, com resposta positiva muito forte. Todas as espécies são alógamas, com autocompatibilidade parcial em *W. burle-marxi*, *W. conduruensis*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. patentissima*. As hibridações foram bem-sucedidas em 44% das combinações, com 41 cruzamentos incongruentes. As porcentagens de germinação das sementes foram acima de 85% gerando plântulas normais, que estão sendo utilizadas para trabalhos de conservação e melhoramento genético. A criopreservação mostrou-se eficaz por até 360 dias, com sucesso na germinação in vitro e in vivo dos grãos de pólen. O sucesso dos cruzamentos com grãos de pólen criopreservados corresponde a 44%, sendo 37% em xenogamia e 63% em hibridação. As possíveis causas de incongruências estão relacionadas a eventos no tubo polínico, como enovelamento do tubo polínico ao longo do estilete, deposição irregular de calose no tubo polínico, interrupção do tubo polínico no estilete ou no interior do ovário, entre outros. A porcentagem de germinação das sementes com grãos de pólen criopreservados foi acima de 89,5%. Os dados deste estudo são fundamentais para taxonomia, reprodução, conservação e melhoramento genético das espécies de *Wittmackia*.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia reprodutiva, viabilidade polínica, conservação, sistema reprodutivo.

REPRODUCTIVITY STUDIES, HYBRIDIZATION AND CRYOPRESERVATION OF POLLEN GRAINS OF *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDEMIC TO BRAZIL AND OCCURRING IN ATLANTIC FOREST AREAS

ABSTRACT: The genus *Wittmackia* includes 44 species distributed in two centers of diversity: the “Brazilian clade”, concentrated in the central Atlantic Forest corridor, mainly in the southeast of the state of Bahia; and the “Caribbean clade”, encompassing Jamaica, the Greater Antilles and neighboring islands in the western Caribbean and the Yucatan Peninsula. The species of the Brazilian clade, the focus of this study, are characterized by generally small to medium-sized plants, with simple spike-shaped to paniculate branched inflorescences. The flowers are small with extended petals, the sepals are all ecarinate, while the ovary is subcylindrical or obovoid, without lateral keels. This dissertation is divided into three chapters: (i) “Morphology, pollen viability and stigmatic receptivity in *Wittmackia* endemic to Brazil and occurring in Atlantic Forest areas”, which characterizes the morphology and viability of pollen grains and stigmatic receptivity of 23 species of the genus, according to the stages of floral development; (ii) “Reproductive systems and hybridization of *Wittmackia* endemic to Brazil and occurring in Atlantic Forest areas”, which characterizes the reproductive systems and the potential for interspecific hybridization, by evaluating the possible reproductive barriers of 16 species; and (iii) “Cryopreservation of pollen grains of *Wittmackia* species endemic to Brazil and occurring in Atlantic Forest areas”, which describes cryopreservation of pollen grains of 16 species. Species of the genus *Wittmackia* have biporate pollen grains, monad to tetrad, oblate, with suboblate or oblate-spheroidal shape, circular or elliptical scope, heteropolar or sub-isopolar, of average size varying in their equatorial diameter, from $28.17 \pm 2.55 \mu\text{m}$ to $37.52 \pm 1.62 \mu\text{m}$ and with exine thickness between $1.12 \pm 0.10 \mu\text{m}$ and $2.93 \pm 0.14 \mu\text{m}$. The stigmatic region is of the conduplicate-spiral type with tubular or dentate papillae. The species have differences in color (white, green or purplish) and size ($4.33 \pm 0.21 \text{ mm}$ to $14.9 \pm 0.14 \text{ mm}$). In both histochemical tests, pollen grains showed high viability, especially at anthesis, with values above 80%, very close to the results of in vitro germination, coinciding with the enzymatic activity of the stigma, with a very strong positive response. All species are allogamous, with partial self-compatibility of *W. burle-marxi*, *W. conduruensis*, *W. laevigata*, *W. limae* and *W. patentissima*. Hybridizations were successful in 44% of combinations, with 41 incongruent crosses. Seed germination percentages were above 85%, with generation of normal seedlings, which are being used for conservation and genetic improvement efforts. Cryopreservation proved to be effective for up to 360 days, with successful in vitro and in vivo germination of pollen grains. The success of crosses with cryopreserved pollen grains corresponded to 44%, of which 37% were in xenogeny and 63% in hybridization. The possible causes of incongruences are related to events in the pollen tube, such as coiling of the tube along the style, irregular deposition of callose in the tube, and interruption of pollen tube growth in the style or inside the ovary, among other factors. The germination percentage of seeds with cryopreserved pollen grains was above 89.5%. The data from this study are essential for the taxonomy, reproduction, conservation and genetic improvement of *Wittmackia* species.

KEYWORDS: Reproductive biology, pollen viability, conservation, reproductive system.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA	16
Mata Atlântica	16
Bromeliaceae	17
<i>Wittmackia</i>	18
Reprodução em Bromeliaceae	20
Hibridação em Bromeliaceae	22
Morfologia e viabilidade dos grãos de pólen e estigma	23
Criopreservação dos grãos de pólen	25
REFERÊNCIAS	26
CAPITULO 1	37
MORFOLOGIA, VIABILIDADE POLÍNICA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM <i>Wittmackia</i> Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICA DO BRASIL E ECORRENTES NA MATA ATLÂNTICA	
INTRODUÇÃO	40
MATERIAIS E MÉTODOS	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 2	82
SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA EM <i>Wittmackia</i> Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA	
INTRODUÇÃO	85
MATERIAIS E MÉTODO	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	111

CAPÍTULO 3	118
CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE <i>Wittmackia</i> Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA	
INTRODUÇÃO	121
MATERIAIS E MÉTODOS	123
RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
CONCLUSÃO	145
REFERÊNCIAS	146
CONSIDERAÇÕES FINAIS	149

INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior riqueza específica de Bromeliaceae, abrigando 63 gêneros e 1.713 espécies, das quais 85% são endêmicas, com grande representatividade na Mata Atlântica (Gouda et al., atualização contínua). Essas espécies estão distribuídas em oito subfamílias (Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae) (Givnish et al., 2011) e ocorrem desde o sul dos Estados Unidos, passando pela América Central, Caribe, abrangendo a América do Sul até o sul da Argentina e Chile (Benzing, 2000; Souza et al., 2022).

Bromeliaceae abriga uma variedade de hábitos, tamanhos, colorações e potencialidades de uso, incluindo ornamentais, alimentícias, produção de fibras, enzimas, entre outras (Souza et al., 2017). Essas plantas se destacam na floricultura por suas folhagens atraentes e inflorescências vistosas, características presentes na grande maioria das espécies. Notavelmente, apresentam uma variação nas cores, formas e tamanhos, o que, associado à sua resistência e durabilidade, as torna adequadas para uso em interiores e jardins (Oliveira et al., 2021; Souza et al., 2022). Além de sua relevância estética, essas espécies exercem grande importância para os ecossistemas, apresentando cisternas com capacidade de acumular água e resíduos orgânicos, facilitando o estabelecimento de diversas espécies de animais e microrganismos (Islair et al., 2017). O material orgânico acumulado no interior das folhas das bromélias funciona como pequenos ecossistemas, favorecendo o estabelecimento dos primeiros níveis tróficos (Givnish et al., 2014).

No estado da Bahia, a família Bromeliaceae apresenta 32 gêneros e 358 espécies, encontrando-se nos três domínios fitogeográficos: Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (Forzza et al., 2023). Algumas espécies de *Wittmackia* Mez (Bromelioideae) são endêmicas principalmente da Mata Atlântica, com predominância em fragmentos

florestais do sul da Bahia (Aguirre-Santoro et al., 2017). As espécies desse gênero estão distribuídas principalmente em dois centros de diversidade. O primeiro está localizado no corredor central da Mata Atlântica brasileira, no sudeste da Bahia, com algumas espécies também ocorrendo em Sergipe e ao norte do Ceará (Aguirre-Santoro, 2017). O segundo centro de diversidade corresponde à Jamaica, além de um pequeno grupo de espécies que ocorrem nas Antilhas, em ilhas adjacentes ao oeste do Caribe, e na Península de Yucatán (Aguirre-Santoro, 2017).

Conforme o Relatório Anual do Desmatamento no Brasil, considerando a perda da biodiversidade dos domínios fitogeográficos brasileiros como referência, a Mata Atlântica ocupa o segundo lugar com os maiores aumentos de alertas de desmatamento em termos proporcionais (Fundação SOS Mata Atlântica, 2021). Mesmo com a redução da área de vegetação original, a Mata Atlântica ainda sofre grandes níveis de desflorestamento. No estado da Bahia, no período de 2018/2019, registrou-se um aumento de 78% em relação ao biênio anterior, com um acréscimo de 54% em 2020/2021 e 15% em 2021/2022 (Fundação SOS Mata Atlântica, 2020; 2022; 2023).

O estudo dos sistemas reprodutivos contribui com informações importantes para a taxonomia, evolução, radiação adaptativa e interações ecológicas em Bromeliaceae (Benzing, 2000; Rogy et al., 2020; Antonetti et al., 2021). Além disso, aspectos reprodutivos de *Wittmackia* são importantes para o conhecimento das espécies existentes em áreas específicas, fornecendo dados sobre a diversidade, distribuição, formas de vida e conservação do gênero (Zorzanelli et al., 2017). A criopreservação é um método seguro e econômico para a conservação do grão de pólen a longo prazo, possibilitando cruzamentos com espécies de florescimento assíncronos (Souza et al., 2015; Rocha et al., 2023).

Neste trabalho, foram estudadas 23 espécies do gênero *Wittmackia* [*W. amorimii* (Leme) Aguirre-Santoro, *W. andersoniana* (Leme & H. Luther) Aguirre-Santoro, *W. bicolor* (L.B.Sm.) Aguirre-Santoro, *W. brasiliensis* (E.Pereira & I.A.Penna) Aguirre-Santoro, *W. burle-marxii* (E.Pereira) Aguirre-Santoro, *W. canaliculata* (Leme & H. Luther), Aguirre-Santoro, *W. carvalhoi* (Martinelli & Leme) Aguirre-Santoro, *W. conduruensis* Leme & E.H.Souza, *W. froesii* (L.B.Sm.) Aguirre-Santoro, *W. gregaria* (Leme & L.Kollmann) Aguirre-Santoro, *W. guedesiae* E.H.Souza & Leme, *W. incompta* (Leme & H. Luther) Aguirre-Santoro, *W. ituberaensis* (Leme & L. Kollmann) Aguirre-Santoro, *W. laevigata* (Leme) Aguirre-Santoro, *W. limae* (Leme) Aguirre-Santoro, *W.*

lingulatoides (Leme & H. Luther) Aguirre-Santoro, *W. linharesiorum* (Leme) Aguirre-Santoro, *W. neoregelioides* (Leme) Aguirre-Santoro e *W. patentissima* (Mart. ex Schult. & Schult. f.) Mez, *W. pendulispica* (Leme & L.Kollmann) Aguirre-Santoro, *W. sulbahianensis* (Leme, Amorim & J.A.Siqueira) Aguirre-Santoro, *W. turbinocalyx* (Mez) Aguirre-Santoro, *W. viridostigma* (Leme & H. Luther) Aguirre-Santoro] (Figura 1 e 2).

Esta dissertação está subdividida em três capítulos, que abrangem estudos de morfologia, viabilidade polínica, receptividade do estigma, sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas com grãos de pólen frescos e criopreservados.

O primeiro capítulo intitulado “**Morfologia, viabilidade polínica e receptividade do estigma em *Wittmackia* Mez (Bromelioideae: Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica**” teve como objetivo caracterizar a morfologia dos grãos de pólen e do estigma de 23 espécies de *Wittmackia* presentes na Mata Atlântica, além de avaliar a viabilidade polínica e a receptividade do estigma em diferentes metodologias e estádios de desenvolvimento floral.

O segundo capítulo intitulado “**Sistemas reprodutivos e hibridações em *Wittmackia* Mez (Bromelioideae: Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica**” teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos e as possíveis hibridações interespecífica, bem como avaliar as possíveis barreiras reprodutivas de 16 espécies de *Wittmackia*. Isso foi feito através da avaliação da germinação dos grãos de pólen e do crescimento do tubo polínico no pistilo, utilizando microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Adicionalmente, as sementes geradas foram semeadas para avaliação da viabilidade.

Por fim, o terceiro capítulo, intitulado “**Criopreservação de grãos de pólen de *Wittmackia* Mez (Bromelioideae: Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica**” teve como objetivo avaliar a criopreservação dos grãos de pólen de 16 espécies de *Wittmackia*, por meio da germinação in vitro em meio de cultura, da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo, e da fertilização in vivo em diferentes hibridações interespecíficas.



Figura 1. Espécies de *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica da Bahia. A) *W. amorimii* (Leme) Aguirre-Santoro. B) *W. andersoniana* (Leme & H.Luther) Aguirre-Santoro. C) *W. bicolor* (L.B.Sm.) Aguirre-Santoro. D) *W. brasiliensis* (E.Pereira & I.A.Penna) Aguirre-Santoro. E) *W. burle-marxii* (E. Pereira) Aguirre-Santoro. F) *W. carvalhoi* (Martinelli & Leme) Aguirre-Santoro. G) *W. canaliculata* (Leme & H. Luther), Aguirre-Santoro; H) *W. conduruensis* Leme & E.H.Souza. I) *W. froesii* (L.B.Sm.) Aguirre-Santoro. J) *W. gregaria* (Leme & L.Kollmann) Aguirre-Santoro. K) *W. guedesiae* E.H.Souza & Leme. L) *W. incompta* (Leme & H.Luther) Aguirre-Santoro. Fotos: E.H.Souza.

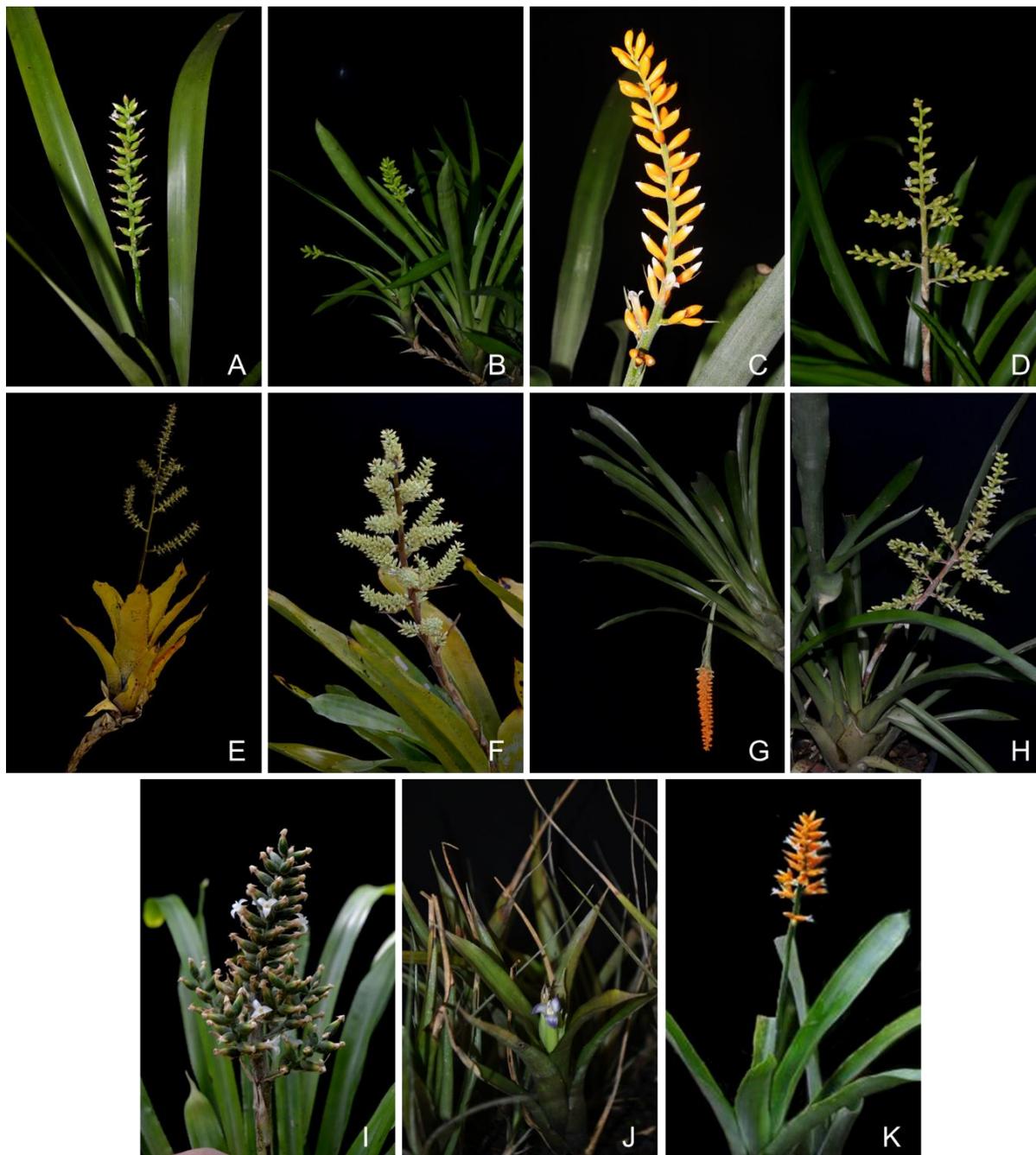


Figura 2. Espécies de *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica da Bahia. A) *W. ituberaensis* (Leme & L.Kollmann) Aguirre-Santoro. B) *W. limae* (Leme) Aguirre-Santoro. C) *W. laevigata* (Leme) Aguirre-Santoro. D) *W. linharesiorum* (Leme) Aguirre-Santoro. E) *W. lingulatoides* (Leme & H.Luther) Aguirre-Santoro. F) *W. patentissima* (Mart. ex Schult. & Schult. f.) Mez G) *W. pendulispica* (Leme & L.Kollmann) Aguirre-Santoro. H) *W. sulbahianensis* (Leme, Amorim & J.A.Siqueira) Aguirre-Santoro. I) *W. turbinocalyx* (Mez) Aguirre-Santoro. J) *W. neoregelioides* (Leme) Aguirre-Santoro. K) *W. viridostigma* (Leme & H.Luther) Aguirre-Santoro. Fotos: A-J) E.H.Souza; K) E.Leme.

REVISÃO DE LITERATURA

Mata Atlântica

A Mata Atlântica é reconhecida como um dos domínios fitogeográficos mais biodiversos do planeta. Entre os estados brasileiros, está presente em 17 deles, incluindo a Bahia (França et al., 2023). Segundo a Fundação SOS Mata Atlântica (2022), essa floresta engloba diversos ecossistemas, tanto florestais quanto não-florestais, classificados de acordo com os critérios botânicos, fitofisionômicos, geológicos, geográficos e outros: Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, Floresta Ombrófila Aberta, Restingas, Manguezais e Campos de Altitude.

Este domínio fitogeográfico é considerado um dos 36 *hotspots* globais de biodiversidade, abrigando mais de 20 mil espécies de plantas, das quais 50% são endêmicas (Rezende et al., 2018). Os *hotspots* são áreas no planeta que concentram espécies endêmicas ameaçadas e possuem menos de 30% da cobertura vegetal original (Myers et al., 2000). Conservar esses *hotspots* implica na redução da perda da biodiversidade observada em diversos ecossistemas terrestres.

No entanto, as principais ameaças à diversidade biológica estão relacionadas à destruição e fragmentação dos ambientes naturais (Haddad et al., 2015). A conversão das florestas nativas no Brasil causa vários impactos positivos, especialmente porque a fragmentação altera as condições climáticas dos remanescentes florestais, sendo o efeito de borda e a perda de biodiversidade os aspectos mais preocupantes do processo de fragmentação florestal (Santos et al., 2016).

Além disso, a Mata Atlântica está sendo devastada pelo processo de urbanização (Ferreira et al., 2019), onde mais de 60% da população brasileira reside em área deste domínio fitogeográfico (Scarano e Ceotto, 2015). A intensa intervenção humana no Brasil é marcada principalmente pelas atividades agrícolas, parcelamentos de terras para a expansão urbana e incêndios, resultando em apenas 12% da área original deste domínio fitogeográfico (Amorin et al., 2019).

Entre as espécies de plantas encontradas nos fragmentos da Mata Atlântica estão as Bromeliaceae, que possuem grande valor ecológico para a floresta, contribuindo para uma relação harmônica de inquilinismo com outras plantas. O Brasil

abriga 45% do total de espécies de Bromeliaceae, distribuídas por todos os domínios fitogeográficos, com maior predominância na Mata Atlântica e no Cerrado, sendo que 85% delas são endêmicas do território (Gouda et al., atualização contínua; Flora e Funga do Brasil, 2020).

Dessa forma, a riqueza biológica e o elevado número de espécies endêmicas, somados ao processo acelerado de fragmentação deste domínio fitogeográfico e à consequente perda de cobertura vegetal, colocam essas florestas entre as áreas mais prioritárias para ações de conservação em todo o mundo.

Bromeliaceae

A família Bromeliaceae Juss. pertence a Ordem Poales (APG IV, 2016) e, atualmente, conta com 82 gêneros e 3.781 espécies, das quais 1.713 são encontradas no Brasil (Gouda et al., atualização contínua). Este grupo possui centros de diversidade no Peru, Chile, Venezuela, Brasil, Bahamas e México. Além disso, foram identificados centros de endemismo na Mata Atlântica do Brasil, México Central e sul da Venezuela (Aguirre-Santoro, 2017; Zizka et al., 2019).

Bromeliaceae é caracterizada por plantas herbáceas, perenes, a maioria epífitas, raramente arborescentes ou arbustivas, com caules curtos e geralmente com entrenós curtos. Apresentam folhas alternas, espiraladas em forma de rosetas distribuídas ao longo do caule, com margens foliares variando de inteiras a serrilhadas (Benzing, 2000; Vasconcellos e Oliveira, 2019). As flores possuem variadas combinações de coloração, sendo poucas ou numerosas, com simetria actinomorfa ou levemente zigomorfa, trímeras, hipóginas a epíginas, muitas vezes unidas a brácteas normalmente vistosa, que têm a função de atrair polinizadores (Cronquist, 1981; Dahlgren et al., 1985; Wanderley e Givnish et al., 2014).

As pétalas e sépalas podem ser soldadas ou livres, com ou sem apêndices petalinos. Os estames, em número de seis, são diplostêmones, podendo ser livres ou adnatos às pétalas, formando um tubo com crescimento dos filetes ou não. As anteras são tetrasporangidas, bitecas, com deiscência rimosa (Benzing, 2000; Wanderley e Martins, 2007; Oliveira et al., 2020). O gineceu possui três carpelos unidos entre si, ovário súpero, ínfero ou semi-ínfero, tricarpelar, trilocular, com estilete terminal trífido (Benzing, 2000).

Os estigmas apresentam variações e são classificados 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 (Brown e Gilmartin, 1984; Barfuss et al., 2016; Leme et al., 2022; Siqueira et al., 2023).

Os grãos de pólen apresentam uma variação quanto ao padrão de abertura, podendo ser porados (com duas a muitas aberturas), monocarpados ou inaperturados (Smith e Downs, 1974; Souza et al., 2017). Os óvulos podem ser escassos ou numerosos, com placentação axilar, e os frutos variam de cápsulas septicidas, raramente loculicidas, bagas, ou composto, como no gênero *Ananas* Mill (Souza, 2017).

Na economia, Bromeliaceae desempenham um papel importante em atividades comerciais, seja na alimentação in natura ou industrializada como no caso do abacaxizeiro (Faostat, 2024) ornamentação (Souza et al., 2015), alimentação animal (Nunes et al., 2016), propriedades medicinais com atividades farmacológicas (Carvalho et al., 2010), produção de fibras como matéria-prima para a fabricação de artesanatos e utensílios (Souza et al., 2022), entre outros. 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. e *Vriesea* Lindl. (Vanhoutte et al., 2016; Viehmannova et al., 2016; Anacleto et al., 2019; Zucchi et al., 2019; Oliveira et al., 2021; Lima et al., 2020; Lidueña-Peréz et al., 2022).

***Wittmackia* Mez**

O gênero *Wittmackia* abriga 44 espécies (Gouda et al., atualização contínua), distribuídas em dois centros de diversidade distintos: o “clado brasileiro”, concentrado no corredor central da Mata Atlântica brasileira, principalmente no sudeste do estado da Bahia; e o “clado caribenho” que engloba a Jamaica, as Grandes Antilhas (exceto Hispaniola), suas ilhas adjacentes no oeste do Caribe e a Península de Yucatán (Aguirre-Santoro, 2017). Essas espécies habitam uma grande variedade de ambientes, desde florestas montanhosas higrófilas até habitats secos em florestas semidecíduas e floresta tropical seca, com predominância em terras baixas (Aguirre-Santoro, 2015; 2020).

Wittmackia foi inicialmente descrito como *Aechmea* subgênero *Pironneava* Gaudch inserida para comportar a *Aechmea lingulata* (L.) Baker (Sousa e Wanderley,

2000). Em 1891, Mez, levou este subgênero para o gênero *Wittmackia* e apresentou a *Wittmackia lingulata* como espécie típica (Sousa e Wanderley, 2000; Aguirre-Santoro 2017). Em seguida, *Wittmackia* foi considerado sinônimo de *Aechmea* (Smith, 1955).

Wittmackia, *Hohenbergia* Schult. & Schult.f. e *Ronnbergia* E.Morren & Andre fazem parte de um grupo polifilético da “Aliança *Ronnbergia*”, que se diversificou em três centros: a Mata do Pacífico, a Mata Atlântica e o Caribe (Aguirre-Santoro, 2020). A “aliança *Ronnbergia*” se originou na Mata Atlântica cerca de 5,2 milhões de anos atrás, e a diversificação de *Wittmackia* começou na Mata Atlântica cerca de 3,2 milhões de ano atrás. Em *Wittmackia*, a dispersão de longa distância da Mata Atlântica para a Jamaica deu origem as espécies do “clado Caribenho”, que se diversificaram rapidamente e experimentaram taxas significativamente mais altas de evolução floral (Aguirre-Santoro, 2020).

Após a recircunscrição realizada por Aguirre-Santoro (2018), com base na atualização de características taxonômicas e morfológicas em espécies de *Wittmackia*, o gênero é caracterizado por plantas terrestres, rupícolas ou epífitas, cespitosas ou solitário, estoloníferas ou acaulescente; roseta ampla, formando fitotelmatas; folhas distintamente diferenciadas em bainha e lâmina; bainhas elípticas, oblongas ou ovais, verde, marrom claro ou irregularmente arroxeadas, lepidotas em ambos os lados, inteiras ou serrilhadas em direção ao ápice; lâminas lineares para lingulares, ocasionalmente estreitadas em direção à base, verde, ocasionalmente vinácea, como por exemplo em *W. brasiliensis* (E.Pereira & I.A.Penna) Aguirre-Santoro, lepidotas em ambos os lados, mais densamente no lado abaxial, canalizadas ou sem canal mediano, margens inteiras até fortemente serrilhadas, ápice atenuado a arredondado, apiculado a mucronado (Aguirre-Santoro (2017).

Corola tubular, espalhando-se apicalmente, ocasionalmente suberetas, projetando-se 2–8 mm além do cálice; pétalas livres, elípticas ou subespatuladas, brancas, verde, ápice agudo a obtuso, apêndices petalínos ausentes ou presente, quando presentes, lobulado, surgindo acima de 2 mm ou mais da base da pétala; estames incluídos; filamentos achatados, subconstritos no ponto de inserção da antera; anteras retangulares, apiculadas a mucronadas (Aguirre-Santoro, 2017).

Ovário ovóide, elipsoidal, cilíndrico, obovóide ou clavado, branco, creme, verde, amarelo, laranja, rosa, roxo ou brilhante vermelho, glabro a densamente tricomado;

placentação apical, óvulos numerosos; estigma conduplicado-espiral e papiloso. Fruto ovóide, elipsoidal, cilíndrico, obovóide ou clavado, amarelo, vermelho, azul ou preto, com sépalas persistentes (Aguirre-Santoro, 2017).

Reprodução em Bromeliaceae

Em Bromeliaceae, algumas espécies podem apresentar reprodução sexuada via polinização cruzada e autopolinização (Rogalski et al., 2017; Pinangé et al., 2020), enquanto outras exibem propagação vegetativa por meio de brotos laterais ou rizomas subterrâneos curtos ou longos (Givnish et al., 2007). Além disso, há sistemas mistos nos quais ambas as estratégias podem ser observadas (Rogalski et al., 2017; Pinangé et al., 2020).

Bromeliaceae também possui sistema autocompatível, autoincompatível, potencialmente alógamas ou autógamas, com cleistogamia, protândria e até mesmo apomixia (Culley e klooster, 2007; Souza et al., 2017; Cavalcante, 2018; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024). Contudo, acredita-se que a alogamia seja o sistema reprodutivo basal em Bromeliaceae, sendo comum em várias espécies já descritas na literatura de diferentes gêneros (Givnish et al., 2007; Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017; Cavalcante, 2018; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024).

Dentre os principais vetores de grãos de pólen da família estão morcegos (quiropterofilia) (Marques, 2015), mariposas (esfingofilia) (Benzing, 2000), abelhas (melitofilia) (Siqueira filho e Leme, 2006; Kamke et al., 2011) e aves (ornitofilia) (Santana e Machado, 2010). Apesar das abelhas serem registradas visitando bromélias de diversas espécies, tanto sendo oportunistas como polinizadoras efetivas, os beija-flores (ornitofilia) são considerados os agentes com maior potencial de polinização (Benzing, 2000; Givnish et al., 2014; Bastos et al., 2017).

Em Bromeliaceae, o mecanismo de polinização geralmente tem sido associado às características morfológicas do estigma (Varadarajan e Brown, 1988). No entanto, alguns autores têm combinado este atributo com outros, como o tipo de inflorescência, o tempo de abertura das flores, a cor e orientação das flores e a produção e concentração de néctar, para determinar o tipo de polinização (Bernadello et al., 1991).

Diversos estudos relatam barreiras pré-zigóticas e pós-zigóticas presentes em Bromeliaceae (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024). A autoincompatibilidade gametofítica, a diferença de comprimento entre

o pistilo e o comprimento do tubo polínico, a morfologia e tamanho dos grão de pólen, a inviabilidade dos grãos de pólen, a ausência de germinação dos grãos de pólen por conta de ausência e insuficiência de nutrientes e hidratação no estigma, a ausência de fatores associados ao quimiotropismo na área da micrópila para estimular o crescimento do tubo polínico, a degeneração precoce dos tecidos de reserva e do embrião, e a relação entre o tempo de receptividade do estigma e a ação dos agentes polinizadores são alguns fatores já descritos em Bromeliaceae (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017; Mota et al., 2023).

A utilização da microscopia de epifluorescência com filtro ultravioleta utilizando azul de anilina é uma técnica que permite a visualização da presença de calose nos tubos polínicos e, conseqüentemente, o sucesso e o insucesso da fertilização (Souza et al., 2017). Em estudos desenvolvidos por Mota et al. (2023) em espécies de *Lymania* Read, foi possível observar o crescimento do tubo polínico nos diferentes sistemas reprodutivos e em hibridações interespecíficas com mais de 70% de sucesso. Souza et al. (2017), trabalhando com hibridação interespecífica e intergenérica de diferentes gêneros de Bromeliaceae, observaram inconsistências em hibridizações interespecíficas com espécies de *Vriesea* Lindl., com interrupção do crescimento do tubo polínico no início do terço superior do estilo e com deposição irregular de calose nas pontas dos tubos polínicos. O sucesso da fertilização pode ser evidenciado pelo crescimento e deposição de calose e penetração dos tubos polínicos na micrópila (Souza et al., 2017; Mota et al., 2023). A deposição irregular de calose no tubo polínico, o envelhecimento dos tubos polínicos no estilete e a paralisação do crescimento em uma determinada região do estilete evidenciam as possíveis barreiras gametofíticas presentes nas espécies ou incongruências nos casos das hibridações (Souza et al., 2017; Mota et al., 2023).

Estudos sobre os aspectos reprodutivos dentro das espécies podem contribuir para a compreensão da evolução e da radiação adaptativa das espécies (Levin, 2012; Paggi et al., 2015). Conforme Paggi et al. (2015), muitas características associadas à fertilidade da planta têm sido usadas para determinar a viabilidade das populações, como o tamanho das plantas/ inflorescência, produção de flores, produção de frutos e sementes e viabilidade dos grãos de pólen.

Hibridações em Bromeliaceae

Há décadas, a hibridação tem sido considerada um evento extremamente comum em plantas e uma importante fonte de variações genéticas. Esse fenômeno é relativamente bem conhecido e documentado, desempenhando um papel crucial na evolução das plantas (Grant, 1981) e sendo responsável por 50 a 70% da diversificação entre as angiospermas (Rieseberg, 1997). Essas características permitem a criação de cultivares ou variedades com novas combinações de formas e cores (Souza et al., 2017).

A hibridação é descrita tanto como uma ruptura dos limites entre as espécies, que pode resultar na perda de espécies puras, quanto como uma força que pode levar à formação de novas linhagens recombinantes (Mallet, 2005).

Em Bromeliaceae, embora muitas espécies hibridizem facilmente em cultivo, existem poucos registros de híbridos naturais entre espécies simpátricas proximamente relacionadas, como nos gêneros *Dyckia* Schult. & Schult.f. (Schulte et al., 2010) e *Vriesea* (Hirsch et al., 2020). A *Bromeliad Society International* (2024) tem publicando continuamente informações sobre híbridos, mas na maioria dos casos, esses híbridos são produzidos empiricamente por produtores ou colecionadores, sem relatos de dados, métodos, falhas e dificuldades de hibridização. Estudos científicos voltados a hibridizações controladas corroboram o aumento de registros da família Bromeliaceae, ultrapassando 600 híbridos envolvendo inúmeras espécies de mais de 35 gêneros (Bromeliad Society International, 2024).

Mota et al. (2023), estudaram 441 hibridações interespecíficas com de *Lymania* Read e observaram em 238 cruzamentos com formação de sementes. Estudos desenvolvidos por Souza et al. (2017), demonstram que os sistemas reprodutivos e as possíveis barreiras reprodutivas em hibridações interespecíficas e intergenéricas em espécies de *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms e *Vriesea* Lindl. Esses autores observaram 33,74% de sucesso nas hibridações, sendo a maioria associada às variedades botânicas do gênero *Ananas*, com 24,96%.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura tem desenvolvendo estudos com abacaxizeiros para fins ornamentais, buscando folhagem atraente, flores de corte, minifrutos, resistência às principais doenças e ausência de espinhos (Souza et al., 2009). Esses autores já protegeram e registraram quatro cultivares: BRS Anauê, BRS Porã, BRS Potyra e BRS Boyrá. Dessa forma, a hibridização permite associar

fenótipos desejáveis presentes em diferentes linhagens, subsidiando o melhoramento genético para diversas aplicabilidades comerciais.

Morfologia e viabilidade dos grãos de pólen e estigma

Os avanços na caracterização da morfologia polínica promovem progressos na identificação dos grãos de pólen contidos em suas amostras, além de fornecer importantes dados para a taxonomia, conservação e melhoramento genético (Wanderley e Melhem, 1991; Halbritter, 1992; Liskoski, 2018; Souza et al., 2017; Mota et al., 2023). Este estudo também pode verificar algumas causas de anormalidade e barreiras existentes, como inviabilidade dos grãos de pólen, má formação da exina, tamanho e uniformidade dos grãos, entre outras (Moreira et al., 2005; Souza et al., 2015).

Durante a formação do micrósporo, a parede de calose se dissolve, liberando os quatro micrósporos individualmente, que se desenvolvem e diferenciam nos grãos de pólen do tipo mônade (Blackmore e Crane, 1988; Harder e Johnson, 2008). Esses micrósporos também podem permanecer unidos (Maheshwari, 1950) e serem liberados em díades, tétrades ou políades, mássulas e polínias (Erdtman, 1952; Walker e Doyle, 1975; Copenhaver, 2005; Harder e Johnson, 2008). Essa condição pode gerar grãos de pólen estéreis, como observado em *Cyperaceae* Juss (Rocha et al., 2016), e em espécies de *Leucopogon* R.Br (Ericaceae Durande) (Furness e Rudall, 2011).

Para análise da morfologia polínica, é necessário extrair o conteúdo celular para melhor visualização da exina e das aberturas dos grãos de pólen, uma vez que anormalidades nestas fases podem dar origem a grãos inviáveis, comprometendo o sucesso reprodutivo das espécies (Santos, 2020). A viabilidade do grão de pólen também é fator importante para o sucesso reprodutivo de uma espécie (Santos, 2020). Espécies que apresentam alta viabilidade polínica demonstram alto potencial de fertilidade, aumentando a possibilidade de formação de sementes e variabilidade genética durante o processo de polinização.

Os testes histoquímicos utilizam corantes e substâncias químicas específicas que interagem com elementos celulares nos grãos de pólen, permitindo estimar a viabilidade polínica a partir de reações químicas ou respiração celular (Techio et al., 2006). Contudo, diferentes espécies podem apresentar reações de coloração variadas aos testes utilizados (Lauton et al., 2016). A metodologia baseada em testes

histoquímicos é mais simples, barata e rápida que outras, mas não é tão conclusiva sobre a real viabilidade dos grãos de pólen e sua efetividade para uso na polinização. Dentre os corantes mais utilizados destacam-se o carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Sharma; Sharma, 1994), 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (Shivanna e Rangaswamy, 1992; diacetato de fluoresceína (Mota et al., 2024) e combinações de substâncias como a solução de Alexander (1969; 1980). A coloração citológica polínica atua na integridade celular, seja ela cromossômica (Kearns e Inouye, 1993), protoplasmática ou de parede celular (Alexander, 1969) ou sobre as atividades enzimáticas desidrogenases, como no caso do 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (Shivanna e Rangaswamy, 1992).

Para a germinação *in vitro*, deve-se utilizar um meio de cultura composto por elementos orgânicos e inorgânicos que reproduzam, da forma mais similar possível, as condições oferecidas pelo estigma da flor ao receberem o grão de pólen (Figueiredo et al., 2017). Dessa forma, a germinação *in vitro* dos grãos de pólen requer hidratação e substâncias químicas como sacarose, boro, nitrato de cálcio, nitrato de potássio, entre outros (Nogueira et al., 2016; Mota et al., 2024). A composição do meio de cultura também inclui um agente solidificante (ágar ou gelatina), açúcar e, em certos casos, nutrientes em concentrações específicas para cada espécie (Soares et al., 2008; Souza et al., 2010; Mota et al., 2024). Essas substâncias desempenham um papel fundamental na germinação e crescimento do tubo polínico (Nogueira et al., 2016).

Contudo, vários fatores podem interferir nesta metodologia, como o estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e presença de micro e macronutrientes no meio de cultura (Brewbaker e Kwach, 1963).

Por outro lado, a superfície estigmática tem um papel importante nos processos de adesão dos grãos de pólen, hidratação, germinação e desenvolvimento do tubo polínico no estigma (Crispim et al., 2017). Assim, os estigmas geralmente são classificados em dois grupos: estigmas úmidos, que são cobertos por secreção superficial viscosa contendo proteínas, lipídeos, polissacarídeos e pigmentos; e estigmas secos, que são aqueles que apresentam uma cutícula cerosa e uma película protéica (Heslop-Heslop-Harrison e Shivanna, 1977).

A receptividade do estigma também está relacionada com atividade enzimática, como peroxidase, esterase e desidrogenase (Heslop-Heslop-Harrison e Shivanna,

1977; Dafni e Maués, 1998). A observação da atividade dessas enzimas pode ser usada para caracterizar a receptividade do estigma (Dafni, 1992; Kearns e Inouye, 1993; Souza et al., 2016) o entanto, o método usado para avaliar a receptividade estigmática pode variar de acordo com a espécie e o desenvolvimento floral (Stone et al., 1995).

O estigma é caracterizado como receptivo quando é capaz de receber os grãos de pólen e promover sua germinação (Crispim et al., 2017). No entanto, as flores podem apresentar separação temporal dos elementos reprodutivos, fenômeno denominado de dicogamia (Otárola e Rocca, 2014).

De acordo com Cardoso et al. (2018), essa separação temporal consiste em diferentes tempos entre a liberação dos grãos de pólen e a receptividade do estigma. A dicogamia é mais um mecanismo adaptativo que promove a polinização cruzada e reduz a interferência física entre as plantas, a probabilidade de autopolinização e a depressão endogâmica (Cardoso et al., 2018).

Desse modo, a receptividade do estigma é um dos fatores que deve ser analisado para identificar possíveis barreiras reprodutivas, uma vez que estas podem interferir no processo de polinização e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo das espécies.

Criopreservação dos grãos de pólen

A conservação dos grãos de pólen é uma ferramenta importante para a manutenção dos recursos genéticos vegetais e criação de bancos de amostras para uso imediato ou futuro em programas de melhoramento genético (Wang, 1975). O sucesso da conservação dos grãos de pólen depende de vários fatores, como o estágio fenológico da flor, a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, bem como seu próprio nível de umidade dos grãos (Giordano et al., 2003).

Dentre os métodos de conservação, a criopreservação surgiu como um método eficiente (Vargas et al., 2009). Essa técnica consiste na conservação de material biológico (estruturas vegetativas e reprodutivas) a temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -150°C (Karth, 1985), mantendo as características do material após o descongelamento.

Os cristais de gelo nas células é um dos grandes problemas encontrados na criopreservação, pois, à medida que a temperatura decresce e aproxima-se de 0°C ,

a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento (“*supercooling*”), e posteriormente ocorre a formação de gelo no meio extracelular. A parede celular e a membrana plasmática agem como barreiras, prevenindo que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem a célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma. Dessa forma, o conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado (Santos, 2000). Com a formação desses cristais de gelo, pode ocorrer o rompimento da membrana celular, tornando os grãos de pólen inviáveis (Almeida et al., 2011; Souza et al., 2015).

Algumas das vantagens da criopreservação incluem a demanda por um pequeno espaço físico para a manutenção de coleções, a simplicidade de manuseio das condições de armazenamento e por fim o baixo custo do processo (Almeida et al., 2002). Além disso, essa técnica tem se mostrado eficiente e prática para conservação a longo prazo, especialmente em relação a espécies que apresentam sementes recalcitrantes ou intermediárias e plantas com períodos distintos de floração (Santos, 2000).

A falta de sincronia nos períodos de florescimento é um dos principais problemas de cruzamentos em Bromeliaceae (Souza et al., 2017). A criopreservação do grão de pólen permite o cruzamento entre plantas que florescem em épocas diferentes, que crescem em locais distantes, ou que florescem poucas vezes ao ano (Bajaj, 1995). Com isso, esta técnica pode ser utilizada para aperfeiçoar os programas de melhoramento genético (Dinato et al., 2016).

Questões relacionadas com a manutenção dos grãos de pólen e às estimativas sobre a qualidade após o armazenamento são de interesse para geneticistas e conservacionistas (Georgieva e Kureleva, 1994). A otimização do meio de cultura é um dos métodos confiáveis para se determinar a qualidade funcional do grão de pólen e monitorar a viabilidade durante o tempo de armazenamento (Shivanna e Rangaswamy, 1992). A germinação *in vitro* do tubo polínico é eficiente e oferece resultados rápidos (Einhardt et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-SANTORO J. Taxonomy of the *Ronnbergia alliance* (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 303, p. 615–640, 2017.
- AGUIRRE-SANTORO, J. A.; NELSON, R.; SALINAS; FABIÁN, A. MICHELANGEL, I. The influence of floral variation and geographic disjunction on the evolutionary dynamics of *Ronnbergia* and *Wittmackia* (Bromeliaceae: Bromelioideae) **Botanical Journal**, West Sussex, v. 192, p. 609-624, 2020.
- AGUIRRE-SANTORO, J. Taxonomic revision of the Caribbean-endemic species of *Wittmackia* (Bromeliaceae). **Phytotaxa**, Auckland, v. 336, n. 2, p.101-147, 2018.
- AGUIRRE-SANTORO, J.; MICHELANGELI, F. A.; STEVENSON, D. W. Molecular Phylogenetics of the *Ronnbergia Alliance* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into their morphological evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 100, p. 1-20, 2016.
- ALEXANDER, M. P. Aversatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 1, p.13-18,1980.
- ALMEIDA, C.; AMARAL, A. D.; NETO, J.; SERENO, M. D. M. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 493-497, 2011.
- ALMEIDA, F. A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambicana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas Grande, v. 6, n. 2, p. 295-302, 2002.
- AMORIN, A.T; SOUZA, A. P; LOURENÇO; R. W. Indicador dos Estágios de Sucessão de Fragmentos Florestais do Bioma Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Cartografia**, Minas Gerais, v. 71, n. 3, p.756-780, 2019.
- 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.
- BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm: Biotechnology in agriculture and Forestry**. Berlin, v. 32, p. 3-28, 1995.
- 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.

- BASTOS, M. J. S. M.; BASTOS, L. P.; SOUZA, E. H.; SOARES, T. L.; MORAIS, D. V.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, Alta Floresta, v. 31, p. 665-676, 2017.
- BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation**. Cambridge University Press, Cambridge, 2000. 690 p.
- BERNADELLO, L.M.; GALETTO, L.; JULIANI, H.R. 1991. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. **Annals of Botany**, Oxford, v. 67, p. 401-411, 1991.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1993.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, Oxford. v. 76, n. 5, p. 657-665, 1989.
- CARVALHO, K. I. M.; FERNANDES, H. B.; MACHADO, F. D. F.; OLIVEIRA, I. S.; OLIVEIRA, F. A.; NUNES, P. H. M.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA, R. C. M. Antiulcer activity of ethanolic extract of *Encholirium spectabile* Mart. ex *Schult & Schult.f.* (Bromeliaceae) in rodents. **Biological Research**, Santiago, v. 43, n. 4, p. 459-465, 2010.
- CAVALCANTE, B. C.; SOUZA, E. H.; WILLIAMS, J. H.; VERSIEUX, L. M. Reproductive systems and post-pollination barriers between two closely related eubromelioids (Bromeliaceae) in the Atlantic Forest of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 192, n. 4, p.828-839, 2020.
- COPENHAVER, G. P. A compendium of plant species producing pollen tetrads. **Journal of the North Carolina Academy of Science**, Raleigh, v. 121, n. 1, p. 17-35, 2005.
- CRISPIM, J. G.; RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; NASCIMENTO, N. F. F.; BARROSO, P. A. Stigma receptivity and anther dehiscence in ornamental pepper. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 609-612, 2017.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. 2.ed. New York: New York Botanical Gardens, 1981. 1262 p.
- CULLEY, T. M.; MARTINE, 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. 250 p.
- DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple method to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 117-180, 1998.

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

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy.** Angiosperms. Atockholm: Almqvist and Wiksell, 1952. 248 p.

FAGUNDES, A.; SOUZA, E. H.; SILVEIRA FUNCH, L.; MACHADO, I. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Autogamy ensures reproductive success in the bromeliad *Dyckia dissitiflora* Schult.f., endemic to the Brazilian caatinga domain. **Plant Species Biology**, Cambridge, v. 39, n. 1, p.1-15, 2024.

FAOSTAT. Produtos agrícolas e pecuários. Produção de abacaxi em 2021, safras/regiões/lista mundial/quantidade de produção. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, Base de Dados Estatísticos Corporativos. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> acesso em: 11 mar. 2024.

FERREIRA, I. J. M. BORGES, K. A.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, R. C.; PEREIRA, F. H.; GONÇALVES, P. B.; LIMA, E. S. Landscape pattern changes over 25 years across a hotspot zone in southern Brazil, **Southern Forests**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 175-184, 2019.

FIGUEREDO, A. L.; SILVA, D. F.; NOGUEIRA, P. V.; SILVA, P. A. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 2, p. 48, 2017.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. **Bromeliaceae.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 04 out. 2023.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; MACIEL, J. R.; KESSOUS, I. M.; MONTEIRO, R. F.; FARIA, A. P.G.; TARDIVO, R. C.; BÜNEKER, H. M.; SARAIVA, D. P.; MOREIRA, B. A.; JACQUES, S. S. A.; ALMEIDA, M. M.; SANTOS-SILVA, F.; LOUZADA, R. B.; MOURA, R. L.; COUTO, D. R.; NEVES, B.; OLIVEIRA, F. M. C.; ARAÚJO, C. C.; GONÇALVES-OLIVEIRA, R. C.; VERSIEUX, L. M.; ROMANINI, R. P.; MACHADO, T. M.; SILVA, R. S. A.; PAIXÃO SOUZA, B.; GOMES-DA-SILVA, J.; URIBBE, F. P.; GUARÇONI, E. A. E.; SOUSA, L. O. F.; PONTES, R. A. S.; NOGUEIRA, M. G. C.; SOUSA, G. M.; KOCH, A. K.; PICANÇO, W. L.; CARDOSO, P. H.; MARTINS, S. E.; BARBOSA-SILVA, R. G.; WANDERLEY, M. G. L. **Bromeliaceae in Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB66>. Acesso em: 12 dez. 2023.

FRANÇA, P. F.; ALMEIDA, G. S.; BRITO, G. Modeling the geographic distribution of *Mikania micrantha* Kunth. to the Atlantic Forest of Bahia: Modelagem da distribuição geográfica de *Mikania micrantha* Kunth. para a Mata Atlântica da Bahia. **Concilium**, Norwich, v. 23, n. 22, p. 284-293, 2023.

FUKUDA, W. M. G.; IGLESIAS, C. Melhoramento Genético. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. (Ed.). **Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 325-355.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**: período 2019/2020, relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2021. 73 p.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica**: Relatório técnico 2020/2021. São Paulo: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2022.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica**: Relatório técnico 2021/2022. São Paulo: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2023.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório anual 2020**. São Paulo: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2020.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen and anther characters in monocot systematics. **Grana**, Viena, v. 40, n. 1-2, p. 17-25, 2001.

GEORGIEVA, L. D., KURELEVA, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 72, n. 1-2, p. 87-94, 1994.

GIORDANO, L. B.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Melhoramento genético do tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 43-57, 2003.

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

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

GOUDA, E.J.; BUTCHER, D.; DIJKGRAAF, L. **Encyclopaedia of Bromeliads, Version 5**. 2023. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> Utrecht University Botanic Gardens. Acesso em: 01 jan. 2024.

GRANT, V. **Plant speciation**, 2nd ed. Columbia University Press, New York, 1981. 459 p.

HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. A.; CLOBERT, J.; DAVIES, K. F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R. D.; LOVEJOY, T. E.; SEXTON, J. O.; AUSTIN, M. P.; COLLINS, C. D.; COOK, W. M.; DAMSCHEN, E. I.; EWERS, R. M.; FOSTER, B. L.; JENKINS, C. N.;

KING, A. J.; LAURANCE, W. F.; LEVEY, D. J.; MARGULES, C. R.; MELBOURNE, B. A.; NICHOLLS, A. O.; ORROCK, J. L.; SONG, D. X.; TOWNSHEND, J. R. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, Bristol, n.1, v. 2, p. 15-52, 2015.

HALBRITTER, H. Morphologie und systematische bedeutung des pollens der Bromeliaceae. **Grana**, London, v. 31, p. 197-2012, 1992.

HARDER, L. D.; JOHNSON, S. D. Function and evolution of aggregated pollen in angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 169, n. 1, p. 59-78, 2008.

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

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

ISLAIR, P.; CARVALHO, K. S.; FERREIRA, F. C.; ZINA, J. Bromeliads in Caatinga: an oasis for invertebrates. **Revista Biotemas**, Ponta Grossa, v. 28 n. 1, p. 67-77, 2017.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. **Cryopreservation of plant cells and organs**, Florida: CRC Press, 1985. p. 115-134.

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

KNOX, R. B.; MCCONCHIE, C. A. Structure and function of compound pollen. In: BLACKMORE, S.; FERGUSON, I. K. (Eds). *Pollen and Spores: form and function*. **Linnean Society Symposium Series**, London, n. 12, p. 265–282, 1986.

LEME, E. M. C.; SOUZA, E. H.; AONA, L.Y.S.; SOUZA, F.V. D. Two new *Wittmackia* species (Bromeliaceae: Bromelioideae) from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 583, n. 3, 241-250, 2023.

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.

LEVIN, D. A. The evolutionary significance of pseudo-self-fertility. **The American Naturalist**, Chicago, v. 148, n. 1, p. 321-332, 1996.

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, n. 3, e. 248865, 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, n. 12, e. 20180922, 2020.
- LISKOSKI, P. E.; EVALD, A. C. P.; RADAESK.; J. N.; BAUERMANN, S. G.; SECCHI, M. I. Descrição morfológica dos grãos de pólen dos campos e florestas do município de arvorezinha, planalto do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Estudo & Debate**, Lajeado, v. 25, n. 3, p. 176-197, 2018.
- MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1950. 472 p.
- MARQUES, J. S.; TAGLIATI, M. C.; FARIA, A. P. G. Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p.835–842, 2015.
- MARTINELLI, G.; VALENTE, A. S. M.; MAURENZA, D.; KUTSCHENKO, D. C.; JUDICE, D. M.; SILVA, D. S.; FERNANDEZ, E. P.; MARTINS, E. M.; BARROS, F. S. M.; SFAIR, J. C.; SANTOS FILHO, L. A. F.; ABREU, M. B.; MORAES, M. A.; MONTEIRO, N. P.; PIETRO, P. V.; FERNANDES, R. A.; HERING, R. L. O.; MESSINA, T.; PENEDO, T. S. A. Avaliação de risco de extinção das espécies da flora brasileira. In: JAKOBSSON, A. (Org.). **Livro Vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. pp. 60-103.
- 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. 4, p. 521-531, 2016.
- MEZ, C. **Bromeliaceae**. In: MARTIUS, K. F. P. VON, EICHLER, A. G. & URBAN, I. (Eds.) *Flora Brasiliensis*. Frid. Fleischer, Lipsiae, v. 3, n.3 1891, p. 176-286.
- MOREIRA, B.; CRUZ-BARRO, M. A. V e WANDERLEY M.G.L. Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* L.B.Sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo. **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, p. 61-70, 2005.
- MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; CAVALCANTE, B. P. C.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, E. H. Reproductive systems and hybridization of *Lymania* species (Bromeliaceae) endemic to Northeast Brazil threatened with extinction. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 322, e. 112447, 2023.
- MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; SOARES, T. L.; ALMEIDA, P. S.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROSSI, M. L.; SOUZA, E. H. Pollen morphology and viability of *Lymania* (Bromeliaceae) species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 338, e. 112890, 2024.
- MYERS, N. MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, New York, v. 403, p. 853-858, 2000.

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**, Oxford, v. 177, n. 1, p. 66-77, 2015.

NUNES, A. T.; CABRAL, D. L. V.; AMORIM, E. L. C.; SANTOS, M. V. F.; ALBUQUERQUE, U. P. Plants used to feed ruminants in semi-arid Brazil: A study of nutritional composition guided by local ecological knowledge. **Journal of Arid Environments**, London, v. 135, n. 1, p. 96–103, 2016.

OLIVEIRA, F. M. C.; RODRIGUES, A. C.; LUSA, M. G.; ALBUQUERQUE-MELO, G. F. Androecium and gynoecium anatomy of Bromeliaceae species. **Flora**, Jena, v. 263, p. 151538, 2020.

OTÁROLA, M. F.; ROCCA, M. A. **Flores no tempo: a floração como uma fase da fenologia reprodutiva**. In: RECH A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. (Eds.). *Biologia da polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, pp. 113-126, 2014.

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**, Jena, v. 211, p. 1-10, 2015.

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**, Oxford, v. 192, n. 4, p. 706-725, 2020.

REZENDE, C. L.; SCARANO, F. R.; ASSAD, E. D.; JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; STRASSBURG M.; TABARELLI, M.; FONSECA, G. A.; MITTERMEIR, R. A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 208-214, 2018.

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

ROCHA, C. S.; SILVA, C.; CARVALHO, A. C.; FARIAS, D. T.; ARAUJO, P. C. Viabilidade e conservação de grãos de pólen da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Miller) H.E. **Advances in floresty Science**, Cuiabá, v.10, n. 2, p.1919-1927, 2023.

ROCHA, D. M.; MARQUES, A.; ANDRADE, C. G. T. J.; GUYOT, R.; CHALUVADI, S. R.; PEDROSA-HARAND, A.; HOUBEN, A.; BENNETZEN, J. L.; VANZELA, A. L. L. Developmental programmed cell death during asymmetric microsporogenesis in holocentric species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 18, p. 5391–5401, 2016.

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**, Cary, v. 108, n. 3, p. 299-307, 2017.

ROGY, P.; HAMMILL, E.; SMITH, M. A.; ROST-KOMIYA, B.; SRIVASTAVA, D. S. Bromeliads affect the interactions and composition of invertebrates on their support tree. **Oecologia**, Rio de Janeiro, v. 192, n. 4, p. 879-891, 2020.

SANTOS, A. R.; RIBEIRO, C. A. A. S.; PELUZIO, T. M. O.; PELUZIO, J. B. E.; QUEIROZ, V. T.; BRANCO, E. R. F.; LORENZON, A. S.; DOMINGUES, G. F.; MARCATTI, G. E.; CASTRO, N. L. M.; TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. M. A. D. A.; MOTA, P. H. S.; SILVA, S. F.; VARGAS, R.; CARVALHO, J. R.; MACEDO, L. L.; ARAÚJO, C. S.; ALMEIDA, S. L. H. Geotechnology and landscape ecology applied to the selection of potential forest fragments for seed harvesting. **Journal of Environmental Management**, London, v. 183, n. 3, p. 1050-1063, 2016.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Viçosa, v. 12, (Esp.), p. 70-84, 2000.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P. Brazilian Atlantic Forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 24, n. 1, p. 2319-2331, 2015.

SCHULTE, K.; SILVESTRO, D.; KIEHLMANN, E.; VESELY, S.; NOVOA, P.; ZIZKA, G. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p. 1105-1119, 2010.

SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Chromosome techniques**, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994. 367 p.

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

SIQUEIRA, S. F. H.; COSTA, A. F.; TONI, K. L. G. Beyond SEM: Stigmatic margins in Bromeliaceae. **Flora**, Jena, v. 298, n. 1, p. 152-195, 2023.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph**, New York. v. 14, n. 3, p. 20-64, 1979.

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.

SOUZA, V. A.; SCHEMBERG, E. A.; AGUIAR, A. V. Germinação in vitro do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 86, p. 147-151, 2010.

SOUZA, E. H.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P. Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 203, n. 1, p. 118-125, 2016.

- SOUZA, E. H.; SILVA, T. A.; AONA, L. Y. S.; SOUZA, F. V. D.; LEME, E. M. C. *Hohenbergia amargosensis* (Bromeliaceae: Bromelioideae), a new ornamental species from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 567, n. 1, p. 086–092, 2022.
- 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, n. 1, p. 13–28, 2015.
- SOUZA, E. H.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P. Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 203, n. 1, p. 118–125, 2016.
- SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. D. C.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 223, n. 1, p. 53–61, 2017.
- SOUZA, G. M.; WANDERLEY, M. G. L. *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v.14, p. 77–97, 2000.
- SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras Bromeliaceas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Org.) **Aspectos básicos da micropropagação de plantas**: Embrapa Mandioca e Fruticultura tropical, Cruz das Almas, v.1, pp.177-205, 2009.
- STONE, J. L.; THOMSON, J. D.; DENT-ACOSTA, S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 82, n. 1, p. 1186- 1197, 1995.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Scientiarum. Biological Science*, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.
- VANHOUTTE, B.; CEUSTERS, J.; PROFT, M. P. The tubing phenomenon in commercial cultivation of *Guzmania*: Morphology, physiology and anatomy. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 205, n. 1, p.112-118, 2016.
- VARADARAJAN, G. S.; BROWN, G. K. Morphological variation of some floral features of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and their significance in pollination biology. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 149, n. 1, p. 82-91, 1998.
- VARGAS, D. P.; SOUZA, S. A. M.; ANJOS-SILVA, S. D.; BOBROWSKI, V. L. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae): conservação e viabilidade. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 115-120, 2009.

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.

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**, New York, v. 125, n. 1, p. 293-302, 2016.

WALKER, J. W.; DOYLE, J. A. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 62, n. 3, p. 664-723, 1975.

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, pp. 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, n. 1, p. 5-42. 1991.

WANG, B. S. P. Metodología de la conservación de los recursos genéticos forestales. **Roma: FAO**, São Paulo, p. 93-103, 1975.

ZIZKA, A.; AZEVEDO, J.; LEME, E.; NEVES, B.; COSTA, A. F.; CÁCERES, D.; ZIZKA, G. Biogeography and conservation status of the pineapple family (Bromeliaceae). **Diversity and Distributions**, West Sussex, v. 26, n. 1, p.183–195, 2019.

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**, Campinas, v. 25, p. 425-433, 2019.

CAPITULO 1

MORFOLOGIA, VIABILIDADE POLÍNICA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA¹

¹ Manuscrito a ser ajustado e submetido ao Periódico "Genetic Resources and Crop Evolution".

MORFOLOGIA, VIABILIDADE POLÍNICA E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA

RESUMO: O gênero *Wittmackia* possui 44 espécies distribuídas em dois centros de diversidade: o “clado brasileiro” e o “clado caribenho”. O clado brasileiro engloba 29 espécies com distribuição geográfica concentrada no Nordeste do Brasil e são caracterizadas por plantas geralmente de pequeno a médio porte, com inflorescências simples espigadas a paniculadas ramificadas. A morfologia dos grãos de pólen e dos estigmas têm fornecidos dados importantes para a taxonomia, filogenia, conservação e pesquisas evolutivas. Os estudos da viabilidade dos grãos de pólen e da receptividade do estigma são fundamentais para subsidiar trabalhos de conservação e melhoramento genético das espécies. Este trabalho tem como objetivo estudar a morfologia, ultraestrutura, viabilidade polínica e receptividade do estigma de 23 espécies do gênero *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A morfologia polínica foi avaliada pela Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Luz pelo método da Acetólise Láctica Fraca (ACLAC 40). Os testes histoquímicos foram realizados com as soluções de Alexander e diacetato de fluoresceína em três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese). Para germinação in vitro dos grãos de pólen, foram avaliados dois meios de cultura (SM e BM). A receptividade do estigma foi avaliada com peróxido de hidrogênio (3%) e α -naftil-acetato + acetona e fast blue B salt. O gênero *Wittmackia* apresentou grãos de pólen biporados, monades a tétrades, formato oblato, suboblato ou oblato-esferoidal, âmbito circular ou elíptico, heteropolares ou sub-isopolares. Os estigmas são do tipo conduplicado-espiral, possuem diferenças na coloração e no tamanho. Nos dois testes histoquímicos, foi observado alta viabilidade, principalmente na antese, o que coincide com a germinação in vitro. As espécies apresentam alta atividade enzimática durante a receptividade, com resposta positiva muito forte, principalmente na antese. Os estudos da morfologia e viabilidade polínica oferecem informações importantes para a conservação e melhoramento genético das espécies de *Wittmackia*, auxiliando também na taxonomia do gênero e no sucesso reprodutivo de futuros cruzamentos controlados.

PALAVRAS-CHAVE: Bromélia, biologia reprodutiva, endemismo, plantas ornamentais, conservação e taxonomia.

MORPHOLOGY, POLLEN VIABILITY AND STIGMA RECEPTIVITY IN *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDEMIC TO BRAZIL AND OCCURRING IN ATLANTIC FOREST AREAS

ABSTRACT: The genus *Wittmackia* has 44 species distributed in two centers of diversity: the “Brazilian clade” and the “Caribbean clade”. The Brazilian clade includes 29 species, with geographic distribution concentrated in the Northeast of Brazil and characterized by plants that are generally small to medium-sized, with simple spike-shaped to branched paniculate inflorescences. The morphology of pollen grains and stigmas has provided important data for taxonomy, phylogeny, conservation and evolutionary research. Studies of pollen grain viability and stigma receptivity are essential to support conservation and genetic improvement efforts of the species. This study reports the morphology, ultrastructure, pollen viability and stigma receptivity of 23 species of the genus *Wittmackia* endemic to Brazil and occurring in Atlantic Forest areas. Pollen morphology was evaluated by scanning electron microscopy and light microscopy by the weak lactic acetolysis method (ACLAC 40). Histochemical tests were performed with Alexander's solution and fluorescein diacetate at three stages of floral development (pre-anthesis, anthesis and post-anthesis). For in vitro germination of pollen grains, two culture media (SM and BM) were evaluated. Stigma receptivity was evaluated with hydrogen peroxide (3%) and α -naphthyl acetate + acetone and fast blue B salt. The *Wittmackia* genus presented biporate pollen grains, monads to tetrads, with oblate, suboblate or oblate-spheroidal shape, circular or elliptical scope, and heteropolar or sub-isopolar morphology. The stigmas are of the conduplicate-spiral type, with differences in color and size. In both histochemical tests, high viability was observed, mainly at anthesis, coinciding with in vitro germination. The species presented high enzymatic activity during receptivity, with a very strong positive response, mainly at anthesis. Studies of pollen morphology and viability provide important information for the conservation and genetic improvement of *Wittmackia* species, also assisting in the taxonomy of the genus and the reproductive success of future controlled crosses.

KEYWORDS: Bromeliad, reproductive biology, endemism, ornamental plants, conservation and taxonomy.

INTRODUÇÃO

O gênero *Wittmackia* Mez pertence à família Bromeliaceae e inclui 44 espécies, das quais 29 compõem um “clado brasileiro”, enquanto as outras 17 um clado monofilético formado por espécies endêmicas do Caribe (Aguirre-Santoro et al., 2016, 2017; Leme, et al., 2023; Gouda et al., 2024, atualização continua). O “clado brasileiro” tem sua distribuição geográfica concentrada no Nordeste do Brasil, principalmente no Sul da Bahia, exceto *W. lingulata* (L.) Mez, cuja distribuição alcança a Amazônia, América Central, Grandes Antilhas, Pequenas Antilhas e Bahamas (Leme e Siqueira filho, 2006), *W. patentissima* (Mart. ex Schult. & Schult.f.) Mez, presente desde os estados do Sudeste do Rio de Janeiro e Espírito Santo até Pernambuco (Aguirre-Santoro, 2017), e *W. burle-marxii* (E.Pereira) Aguirre-Santoro, encontrada em Minas Gerais e Bahia (Leme e Kollmann, 2011; Faria et al., 2024).

As espécies do “clado brasileiro” se caracterizam por plantas geralmente de pequeno a médio porte, inflorescências simples espigadas a paniculadas ramificadas, brácteas florais imperceptíveis (exceto para as espécies com inflorescências simples, quase nidulares), mais longas do que largas ou minúsculas, textura fina e não envolvendo a base do ovário (Leme et al., 2023). Flores pequenas (10–28 mm de comprimento, pétalas estendidas), não comprimidas dorsiventralmente, dispostas de forma laxa ou adensada ao longo de uma raque delgada e alongada; sépalas ecarinadas; ovário é subcilíndrico ou obovóide, sem quilhas laterais (Leme et al., 2023).

Todas as espécies estudadas ocorrem em fragmentos florais da Mata Atlântica do Sul da Bahia. Esses fragmentos florestais são remanescentes de um dos domínios fitogeográficos mais ricos em biodiversidade do mundo (Ferreira et al., 2024). Este domínio fitogeográfico abriga inúmeras espécies endêmicas de plantas, muitas das quais estão ameaçadas de extinção devido à perda de habitat, espécies exóticas invasoras, desmatamento e atividades humanas como a agricultura e a urbanização (Ribeiro et al., 2009). A fragmentação dessas florestas resulta em áreas isoladas que dificultam a sobrevivência e a reprodução das espécies vegetais, além de reduzir a diversidade genética (Metzger et al., 2009).

A biologia reprodutiva de plantas é essencial para entender os mecanismos de reprodução e perpetuação das espécies, investigar aspectos como morfologia e viabilidade dos grãos de pólen e estigma, polinização, fecundação e desenvolvimento

de sementes e frutos (Souza et al., 2017; Mota et al., 2023, 2024; Fagundes et al., 2024). A integração desses conhecimentos é fundamental para a conservação da biodiversidade e para a implementação de práticas agrícolas sustentáveis (Rocha et al., 2021; Ferreira et al., 2024).

Investigações da morfologia e ultraestrutura dos grãos de pólen e estigma são frequentemente usadas para resolver entraves sistemáticos, contribuindo para o refinamento taxonômico de alguns grupos específicos em Bromeliaceae (Vervaeke et al., 2003; Souza et al., 2016; Souza e Leme, 2021; Leme et al., 2017; 2022). No gênero *Wittmackia*, estudos palinológicos e da morfologia estigma são raros, com destaque os estudos de Souza et al. (2016; 2017), com a espécie *A. bicolor* L.B.Sm. sinonímia de *W. bicolor* (L.B.Sm.) Aguirre-Santoro (2017) e Aguirre-Santoro (2018) para espécies do “clado caribenho”.

Além da morfologia, a viabilidade polínica e receptividade do estigma são importantes para os estudos reprodutivos, conservacionistas e de melhoramento genético de diversas espécies (Souza et al., 2021). A germinação *in vitro* é o método mais prático, viável e seguro de se verificar a viabilidade dos grãos de pólen, já que simula a interação do grão de pólen com o estigma e permite observar o crescimento do tubo polínico (Soares et al., 2013; Souza et al., 2017). Outro método muito utilizado é o teste histoquímico, que oferece vantagem devido a rapidez e o baixo custo (Macedo et al., 2016; Mota et al., 2024; Fagundes et al., 2024). Diversos corantes podem ser utilizados para os testes histoquímicos: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Sharma; Sharma, 1994), 2,3,5-cloreto-de-trifeniltetrazólio (Shivanna e Rangaswamy, 1992), diacetato de fluoresceína (Mota et al., 2024) e combinações de substâncias como a solução de Alexander (1969).

Em experimentos envolvendo reprodução, é crucial monitorar o tempo e a duração da receptividade do estigma (Stone et al., 1995) para determinar o momento ideal de deposição dos grãos de pólen no estigma, visando o sucesso em cruzamentos controlados (Souza et al., 2016).

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a morfologia e ultraescultura dos grãos de pólen e a morfologia do estigma de 23 espécies de *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica da Bahia. Além disso, buscou-se avaliar a viabilidade polínica e a receptividade do estigma com diferentes metodologias e estádios de desenvolvimento floral. Essas análises podem

subsidiar estudos taxonômicos, de conservação e melhoramento genético dessas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e área de estudo

Foram estudadas 23 espécies de *Wittmackia* endêmicas do Brasil, coletadas em populações naturais na Mata Atlântica (Tabela 1). Os vouchers foram incorporados no Herbário do Recôncavo da Bahia (HURB), e amostras foram introduzidas em cultivo no Banco de Germoplasma de Bromélias (BGB Bromélias) do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

As coletas foram realizadas conforme autorização do SISBIO n. 69870-1, e as atividades estão devidamente cadastradas no SISGEN, sob a autorização A9E9F8D, em atendimento à legislação brasileira para espécies nativas.

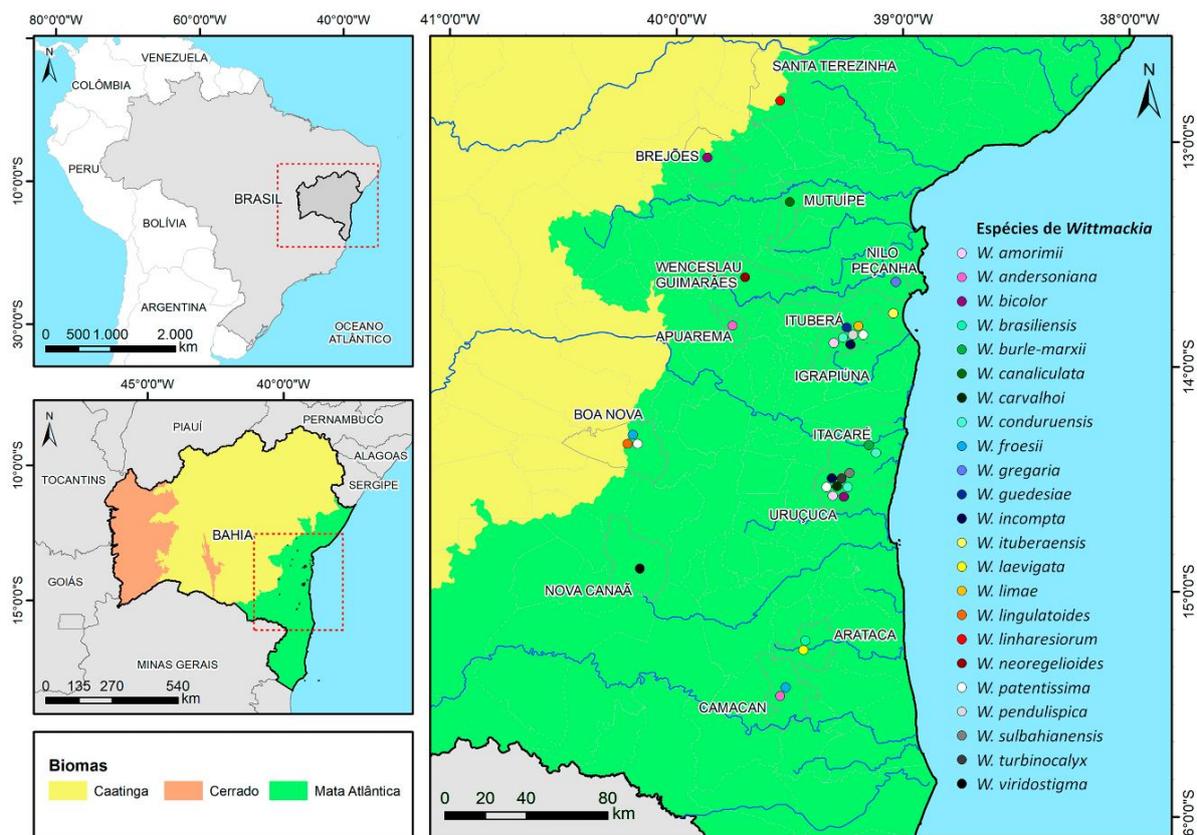


Figura 1. Mapa com os respectivos pontos de coleta das espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae).

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

Espécies	Município de coleta na Bahia	HURB (voucher)	Endemismo	Status de Ameaça
<i>W. amorimii</i>	Igrapiúna	30415		
	Uruçuca	27808	BA	NE
<i>W. andersoniana</i>	Apuarema	6007		
	Camacã	25957	BA	EM
<i>W. bicolor</i>	Brejões	17903		
	Uruçuca	30553	BA	NE
<i>W. brasiliensis</i>	Arataca	26118	BA	NE
<i>W. burle-marxii</i>	Itacaré	23966	BA, MG	NE
<i>W. canaliculata</i>	Mutuípe	34898	BA	VU
<i>W. carvalhoi</i>	Uruçuca	27807	BA	EM
	Uruçuca	22229		
<i>W. conduruensis</i>	Igrapiúna	32023	BA	CR
	Itacaré	27184		
<i>W. froesii</i>	Boa nova	32089		
	Camacã	25958	AL, BA, PE	NE
<i>W. gregária</i>	Nilo Peçanha	34900	BA	NE
<i>W. guedesiae</i>	Igrapiúna	27182	BA	CR
<i>W. incompta</i>	Igrapiúna	31979		
	Uruçuca	32825	BA	NE
<i>W. ituberaensis</i>	Ituberá	30421	BA	NE
<i>W. laevigata</i>	Arataca	26402	BA	NE
<i>W. limae</i>	Igrapiúna	31986	BA	NE
<i>W. lingulatooides</i>	Boa nova	32074	BA, SE	LC
<i>W. linharesiorum</i>	Santa Teresinha	24546	BA	NE
<i>W. neoregeliooides</i>	Wenceslau Guimarães	38644	BA	EM
	Igrapiúna	32000	AL, BA, CE,	
<i>W. patentissima</i>	Boa nova	32090	MA, PB, PE,	NE
	Uruçuca	29493	RN, SE, ES, RJ	
<i>W. pendulispica</i>	Igrapiúna	30549	BA	NE
<i>W. sulbahianensis</i>	Uruçuca	27832	BA	NE
<i>W. turbinocalyx</i>	Uruçuca	27800	BA	CR
<i>W. viridostigma</i>	Nova Canaã	34916	BA	VU

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

Morfologia e morfometria dos grãos de pólen e estigma

Para a caracterização morfológica dos grãos de pólen, as anteras foram coletadas em pré-antes e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) contendo glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4%, CaCl₂ 0,1 M, em tampão cacodilato de sódio 0,2 M e pH 7,2. Após 48 horas de fixação, o material foi desidratado em série

etílica crescente (35-100%), por 20 minutos em cada etapa. As amostras foram secas ao ponto crítico (Leica EM CPD 300, Balzers, Alemanha) por meio de CO₂ líquido. Posteriormente, os grãos de pólen foram montados em suportes metálicos e metalizados com ouro durante 180 segundos (Leica EM ACE 600 Balzers, Germany). As imagens digitais foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL JSM-IT300 LV Tokyo - Japão) no NAP/MEPA-ESALQ/USP, operando a 20 kV, sendo as imagens digitalizadas. Os grãos de pólen foram caracterizados de acordo com a nomenclatura descrita por Punt et al. (2007) e Halbritter et al. (2018), e estigmas de acordo com Brown e Gilmartin (1984; 1989) e Barffus et al. (2016).

Os dados morfométricos dos grãos de pólen frescos foram obtidos a partir da Acetólise Láctica Fraca - ACLAC 40 (Raynal e Raynal, 1979) e analisados em microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tokyo, Japão). As medidas foram realizadas utilizando o programa ImageJ 1.53s (Rasband, 1997; 2018), a partir do diâmetro polar e equatorial (em vista equatorial) e o diâmetro equatorial maior e menor (em vista polar), além da espessura da exina em 25 unidades de grãos de pólen. A polaridade assumida foi a mesma considerada por Wanderley e Melhen (1991), exceto para os grãos com dispersão em tétrade, em que a polaridade foi definida diretamente.

A forma dos grãos de pólen foi determinada pela razão entre diâmetro polar (P) e equatorial (E) por meio da fórmula P/E (Erdtman, 1952). Foram calculadas a média aritmética e o desvio padrão.

Para a morfometria do estigma e estilete, foram medidas três flores de diferentes plantas de cada espécie, utilizando o programa ImageJ 1.53s. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott ($p < 0,01$), no programa R Core Team (2023). A nomenclatura adotada para o estigma está conforme Brown e Gilmartin (1984; 1989) e Barfuss et al. (2016).

Quantificação dos grãos de pólen

A estimativa do número de grãos de pólen foi realizada por meio da contagem em câmara de Neubauer. Anteras de três flores de plantas diferentes, em pré-antese, foram removidas individualmente e colocadas em tubo de Eppendorf® de 2 mL, contendo 1 mL de ácido láctico. Em seguida, as anteras foram maceradas e a suspensão foi agitada em vórtex. Com auxílio de uma micropipeta, todo o volume da mistura foi transferido para a canaleta da câmara de Neubauer, onde foi contado

utilizando um microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tóquio, Japão).

Histoquímica dos grãos de pólen

Para os testes histoquímicos, foram empregadas duas metodologias: solução de Alexander (Alexander, 1969) e solução de diacetato de fluoresceína - FDA (Heslop-Harrison e Heslop-Harrison, 1970). Anteras de três flores coletadas de diferentes plantas, procedências e estádios de desenvolvimento floral foram distribuídas sobre lâminas de vidro, onde uma gota do corante específico foi adicionada, cobertas com lamínula e avaliadas em seguida.

Para obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, utilizou-se o método de varredura da lâmina em microscópio de luz (para Alexander) e microscópio de fluorescência com filtro UV (para FDA) Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital Olympus DP175 (Olympus, Tokyo, Japão). Foram contabilizados 100 grãos de pólen por lâmina, com três repetições para cada metodologia, totalizando 300 grãos de pólen para cada teste.

Os dados de percentagem de viabilidade foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística. O delineamento experimental para os testes histoquímicos foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 x 23 (teste histoquímico x estágio de desenvolvimento floral x espécie), com três repetições. Para comparação, os dados foram submetidos à análise de variância e os valores foram comparados utilizando os testes: 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 as espécies, por meio do software R Core Team (2023).

Germinação in vitro de grão de pólen

Na germinação in vitro, três flores de diferentes plantas e procedência, em diferentes estádios de desenvolvimento floral conforme descrito anteriormente, foram coletadas. As anteras foram removidas e os grãos de pólen foram espalhados com auxílio de um pincel uniformemente nas placas de Petri, contendo 25 mL de dois meios de cultura diferentes: BM com 0,01% de H_3BO_3 ; 20% de sacarose e solidificado com 0,5% de ágar (Parton et al., 2002); e SM com 0,01% de H_3BO_3 ; 0,03% de $Ca(NO_3)_2$; 0,02% de $MgSO_4$; 0,01% de KNO_3 ; 15% de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar,

pH ajustado para 6,5 (Soares et al., 2008). As placas contendo os grãos de pólen foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C.

A contagem dos grãos de pólen germinados e a medida do comprimento do tubo polínico foram realizadas 24 horas após a inoculação nos meios de cultura. Para facilitar o contraste, cinco gotas de azul de toluidina a 0,01% foram depositadas, seguidas imediatamente pela obtenção de microfotografias utilizando um estereomicroscópio Leica EZ4 W (Leica Microsystems, Alemanha).

Para calcular a percentagem de germinação, todos os grãos de pólen na placa foram contabilizados. Para a medição do comprimento do tubo polínico, foram aleatoriamente mensurados cinco tubos em cada quadrante, totalizando 60 tubos polínicos para cada tratamento. Considerou-se germinado o grão de pólen que apresentasse um tubo polínico com comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. As medidas foram realizadas utilizando o programa ImageJ 1.53s.

O delineamento experimental para germinação de grãos de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 3 \times 23$ (meio de cultura x estádios de desenvolvimento floral x espécie), com 12 repetições. Os dados de percentagem de germinação foram transformados para $\arcsin(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística. Para comparação, os dados foram submetidos à análise de variância e os valores comparados utilizando os testes: Tukey ($p < 0,01$) para os estádios de desenvolvimento floral, F ($p < 0,01$) para os dois meios de cultura por meio do software R Core Team (2023).

Receptividade do estigma

A receptividade do estigma foi realizada utilizando duas metodologias: peróxido de hidrogênio (3%) e solução de α -naftil-acetato com fast blue B salt e acetona. Três flores em diferentes plantas, procedências e estádios de desenvolvimento floral como descrito anteriormente, foram coletadas para cada solução, totalizando 9 repetições por metodologia.

Os estigmas foram cuidadosamente removidos das flores para evitar danos que pudessem interferir nos resultados e imediatamente imersos nas diferentes soluções. Na solução com peróxido de hidrogênio (3%), os estigmas permaneceram por três minutos, onde se observou a formação de bolhas de ar em resposta a reação enzimática da peroxidase (Zeisler, 1933).

Para avaliação com α -naftil-acetate com fast blue B salt + acetona, os estigmas foram imersos solução por cinco minutos e depois lavados com água destilada. A coloração intensa marrom ou preta nos estigmas receptivos foi observada devido à reação da enzima esterase com a solução, na superfície do estigma e/ou das papilas (Pearse, 1972; Dafni, 1992).

Para ambas as metodologias, o grau de receptividade foi avaliado conforme adaptação de Dafni e Maués (1998): (-) sem reação; (+) resposta positiva fraca; (++) resposta positiva forte; (+++) resposta muito forte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Morfologia polínica

O gênero *Wittmackia* apresentou grãos de pólen bipolarizados com variabilidade morfológica nas 23 espécies estudadas, principalmente em relação à forma dos grãos de pólen (oblato, suboblato ou oblato-esferoidal), polaridade (sub-isopolar ou heteropolar) e âmbito (elíptico ou circular). Não há uma característica palinológica padrão para o gênero, uma vez que, além das variações na forma, polaridade e no âmbito, os grãos de pólen variam desde monades até tétrades, além de apresentarem ornamentação reticulada-heterobrocada, microreticulada e psilada, apenas *W. pendulispica* apresentou teto psilado com microverrugos (Tabela 2, Figuras 2, 3 e 4).

Com base nas análises morfométricas, todas as espécies de *Wittmackia* apresentam grãos de pólen com tamanho médio variando em seu diâmetro equatorial, de $20,76 \pm 1,81 \mu\text{m}$ em *W. brasiliensis* a $37,52 \pm 1,62 \mu\text{m}$ em *W. amorimii*. A partir da acetólise láctica (ACLAC 40), observou-se variação na espessura da exina, no teto e no tamanho/ comprimento do lumem. A menor espessura da exina foi observada em *W. andersoniana*, com $1,12 \pm 0,10 \mu\text{m}$, e a maior em *W. limae*, com $2,93 \pm 0,14 \mu\text{m}$. A variação para a espessura do teto foi de $0,34 \pm 0,05 \mu\text{m}$ para *W. andersoniana* e $0,94 \pm 0,08 \mu\text{m}$ para *W. laevigata*. Quanto ao tamanho/ comprimento do lumem, a menor variação foi de $0,30 \pm 0,04 \mu\text{m}$ para *W. froesii*, e maior em *W. viridostigma*, com $2,74 \pm 0,65 \mu\text{m}$ (Tabela 3). O lumem foi ausente em algumas espécies por possuírem grãos de pólen com ornamentação psilada.

A exina dos grãos de pólen constitui o estrato mais externo da esporoderme; sua ornamentação é altamente conservada e geneticamente estável, sendo frequentemente utilizada para investigar a origem e evolução das plantas (Sarwar e

Takahashi, 2012; Zhang et al., 2017). A espessura da exina, do teto e do lumem está diretamente relacionada com a ornamentação dos grãos de pólen e pode influenciar na desidratação e na ruptura durante a conservação do grão de pólen, principalmente na técnica de criopreservação (Souza et al., 2015, 2020).

Houve variação morfológica no formato dos grãos de pólen nas espécies de *Wittmackia*, com predominância no formato oblato; apenas as espécies *W. sulbahianensis* e *W. turbinocalyx* apresentaram a forma suboblata e *W. andersoniana*, *W. brasiliensis* e *W. burle-marxii* a forma oblato-esferoidal.

Com relação a polaridade, a conformação sub-isopolar predominou, havendo variação morfológica heteropolar na espécie *W. andersoniana*. A polaridade dos grãos de pólen em monocotiledôneas, de um modo geral, é bastante definida, e as espécies amostradas mantêm este padrão (Wanderley e Melhen, 1991; Hesse et al., 2009).

Tabela 2. Morfologia dos grãos de pólen de 23 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécie	Formato ¹	Polaridade ¹	Amb ¹	Abertura ¹	
<i>W. amorimii</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. andersoniana</i>	Mônade	Oblato-esferoidal	Heteropolar	Circular	Biporado
<i>W. bicolor</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. brasiliensis</i>	Tétrade	Oblato-esferoidal	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. burle-marxii</i>	Tétrade	Oblato-esferoidal	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. canaliculata</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. carvalhoi</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. conduruensis</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. froesii</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. gregária</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. guedesiae</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. incompta</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. ituberaensis</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. laevigata</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. limae</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. lingulatoides</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. linharesiorum</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. neoregelioides</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. patentíssima</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. pendulispica</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. sulbahianensis</i>	Mônade	Suboblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. turbinocalyx</i>	Mônade	Suboblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
<i>W. viridostigma</i>	Mônade	Oblato	Sub-isopolar	Elíptico	Biporado
Espécie	Exina ¹	Ornamentação ¹		Lumem ¹	
<i>W. amorimii</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Muitas báculos	
<i>W. andersoniana</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Muitas báculos	
<i>W. bicolor</i>	Eutectada	Psilada		Ausente	
<i>W. brasiliensis</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. burle-marxii</i>	Eutectada	Psilada		Ausente	
<i>W. canaliculata</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. carvalhoi</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. conduruensis</i>	Semitectada	Microreticulado		Muitas báculos	
<i>W. froesii</i>	Semitectada	Microreticulado		Poucas báculos	
<i>W. gregária</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Muitas báculos	
<i>W. guedesiae</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. incompta</i>	Semitectada	Microreticulado		Poucas báculos	
<i>W. ituberaensis</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. laevigata</i>	Semitectada	Microreticulada		Muitas báculos	
<i>W. limae</i>	Semitectada	Microreticulada		Ausente	
<i>W. lingulatoides</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. linharesiorum</i>	Semitectada	Microreticulado		Poucas báculos	
<i>W. neoregelioides</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. patentíssima</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Muitas báculos	
<i>W. pendulispica</i>	Eutectada	Psilada		Ausente	
<i>W. sulbahianensis</i>	Eutectada	Psilada		Ausente	
<i>W. turbinocalyx</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Poucas báculos	
<i>W. viridostigma</i>	Semitectada	Reticulada-heterobrocada		Ausente	

¹ De acordo com Punt et al. (2007) e Halbritter et al. (2018).

Tabela 3. Morfometria dos grãos de pólen de 23 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécie	Vista equatorial ¹		Vista polar ¹		P/E ²
	Diâmetro polar (P) (µm)	Diâmetro equatorial (E) (µm)	Equatorial maior (µm)	Equatorial menor (µm)	
<i>W. amorimii</i>	25,47 ± 1,12	37,52 ± 1,62	32,94 ± 1,25	25,45 ± 1,60	0,68
<i>W. andersoniana</i>	31,98 ± 1,46	35,80 ± 2,63	32,41 ± 1,97	30,58 ± 2,09	0,89
<i>W. bicolor</i>	21,14 ± 1,68	31,14 ± 1,79	23,76 ± 2,96	21,98 ± 2,56	0,68
<i>W. brasiliensis</i>	21,02 ± 1,99	20,76 ± 1,81	21,48 ± 1,71	30,28 ± 1,96	0,98
<i>W. burle-marxii</i>	26,94 ± 1,24	24,11 ± 1,49	23,93 ± 1,78	33,11 ± 1,53	0,89
<i>W. canaliculata</i>	23,43 ± 0,91	33,39 ± 1,62	24,69 ± 1,59	22,88 ± 1,65	0,70
<i>W. carvalhoi</i>	21,57 ± 2,98	34,40 ± 2,20	28,90 ± 2,28	26,12 ± 2,23	0,63
<i>W. conduruensis</i>	24,97 ± 1,59	35,34 ± 1,53	24,50 ± 1,43	34,00 ± 1,58	0,71
<i>W. froesii</i>	19,53 ± 2,25	36,08 ± 1,62	28,74 ± 2,56	24,42 ± 1,84	0,54
<i>W. gregária</i>	24,10 ± 1,28	36,50 ± 1,89	30,30 ± 2,35	26,03 ± 1,98	0,66
<i>W. guedesiae</i>	23,64 ± 1,98	37,49 ± 1,60	27,70 ± 1,70	23,97 ± 2,15	0,63
<i>W. incompta</i>	19,85 ± 1,49	34,55 ± 1,34	27,49 ± 1,49	21,46 ± 2,05	0,57
<i>W. ituberaensis</i>	25,44 ± 1,21	35,69 ± 1,48	31,96 ± 1,52	29,64 ± 1,08	0,71
<i>W. laevigata</i>	25,78 ± 1,21	36,01 ± 1,98	27,27 ± 1,72	24,06 ± 2,09	0,72
<i>W. limae</i>	23,91 ± 1,88	32,70 ± 2,24	26,77 ± 1,45	24,25 ± 1,54	0,73
<i>W. lingulatoides</i>	21,88 ± 1,14	31,25 ± 2,38	26,28 ± 1,78	21,62 ± 1,92	0,70
<i>W. linharesiorum</i>	20,14 ± 1,70	28,17 ± 2,55	23,29 ± 2,41	22,18 ± 1,85	0,72
<i>W. neoregelioides</i>	23,70 ± 2,10	38,13 ± 2,01	31,51 ± 2,34	25,74 ± 1,36	0,62
<i>W. patentíssima</i>	19,58 ± 1,51	34,41 ± 1,34	27,48 ± 1,36	21,31 ± 2,05	0,57
<i>W. pendulispica</i>	23,11 ± 2,04	36,20 ± 1,72	28,45 ± 2,45	24,19 ± 1,78	0,64
<i>W. sulbahianensis</i>	27,38 ± 1,32	33,00 ± 1,21	27,28 ± 1,87	26,50 ± 1,58	0,83
<i>W. turbinocalyx</i>	23,73 ± 1,79	29,93 ± 1,37	28,56 ± 2,57	26,02 ± 2,00	0,79
<i>W. viridostigma</i>	28,02 ± 3,12	38,38 ± 1,87	29,88 ± 2,21	27,09 ± 1,21	0,73

Espécie	Espessura ¹		Tamanho/comprimento ¹	Número de grãos de pólen ³
	Exina (µm)	Teto (µm)	Lumem (µm)	
<i>W. amorimii</i>	1,63 ± 0,10	0,39 ± 0,02	1,11 ± 0,17	183.333 ± 11.547
<i>W. andersoniana</i>	1,12 ± 0,10	0,34 ± 0,05	1,06 ± 0,14	88.666 ± 5.325
<i>W. bicolor</i>	1,48 ± 0,17	0,64 ± 0,06	Ausente	69.333 ± 2.886
<i>W. brasiliensis</i>	2,29 ± 0,16	0,42 ± 0,02	1,01 ± 0,27	65.000 ± 5.250
<i>W. burle-marxii</i>	1,52 ± 0,14	0,50 ± 0,09	Ausente	77.666 ± 5.859
<i>W. canaliculata</i>	2,12 ± 0,13	0,43 ± 0,09	1,13 ± 0,09	89.333 ± 1.154
<i>W. carvalhoi</i>	1,19 ± 0,19	0,39 ± 0,06	1,27 ± 0,14	83.750 ± 2.850
<i>W. conduruensis</i>	1,96 ± 0,10	0,38 ± 0,08	0,75 ± 0,10	81.666 ± 7.637
<i>W. froesii</i>	1,25 ± 0,06	0,42 ± 0,04	0,30 ± 0,04	83.333 ± 1.527

<i>W. gregária</i>	2,16 ± 0,05	0,42 ± 0,07	1,19 ± 0,12	75.000 ± 3.500
<i>W. guedesiae</i>	1,70 ± 0,05	0,60 ± 0,04	1,02 ± 1,12	63.666 ± 2.080
<i>W. incompta</i>	2,38 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,79 ± 0,10	59.000 ± 4.725
<i>W. ituberaensis</i>	1,63 ± 0,07	0,75 ± 0,17	1,21 ± 0,07	75.400 ± 10.016
<i>W. laevigata</i>	1,79 ± 0,05	0,94 ± 0,08	0,37 ± 0,04	88.333 ± 7.637
<i>W. limae</i>	2,93 ± 0,14	0,76 ± 0,09	0,37 ± 0,07	64.666 ± 7.637
<i>W. lingulatoides</i>	1,89 ± 0,13	0,59 ± 0,10	1,65 ± 0,05	68.333 ± 4.433
<i>W. linharesiorum</i>	1,81 ± 0,16	0,74 ± 0,09	0,57 ± 0,09	84,333 ± 1.150
<i>W. neoregelioides</i>	1,75 ± 0,13	0,47 ± 0,05	1,26 ± 0,21	84,333 ± 1.150
<i>W. patentíssima</i>	2,06 ± 0,12	0,39 ± 0,02	1,10 ± 0,08	63.333 ± 2.886
<i>W. pendulispica</i>	2,10 ± 0,02	0,90 ± 0,09	Ausente	75.333 ± 7.637
<i>W. sulbahianensis</i>	1,32 ± 0,15	0,83 ± 0,08	Ausente	82.500 ± 4.200
<i>W. turbinocalyx</i>	1,45 ± 0,08	0,46 ± 0,02	2,01 ± 0,15	74.666 ± 1.154
<i>W. viridostigma</i>	2,12 ± 0,13	0,52 ± 0,10	2,74 ± 0,65	85.200 ± 2.500

¹Os grãos de pólen foram submetidos à ACLAC 40 conforme Raynal e Raynal (1979). Os resultados correspondem à média de 25 repetições ± desvio padrão; ²De acordo com o método descrito por Punt et al. (2007) e Halbritter et al. (2018). ³Conforme metodologia de Kearns e Inouye (1993).

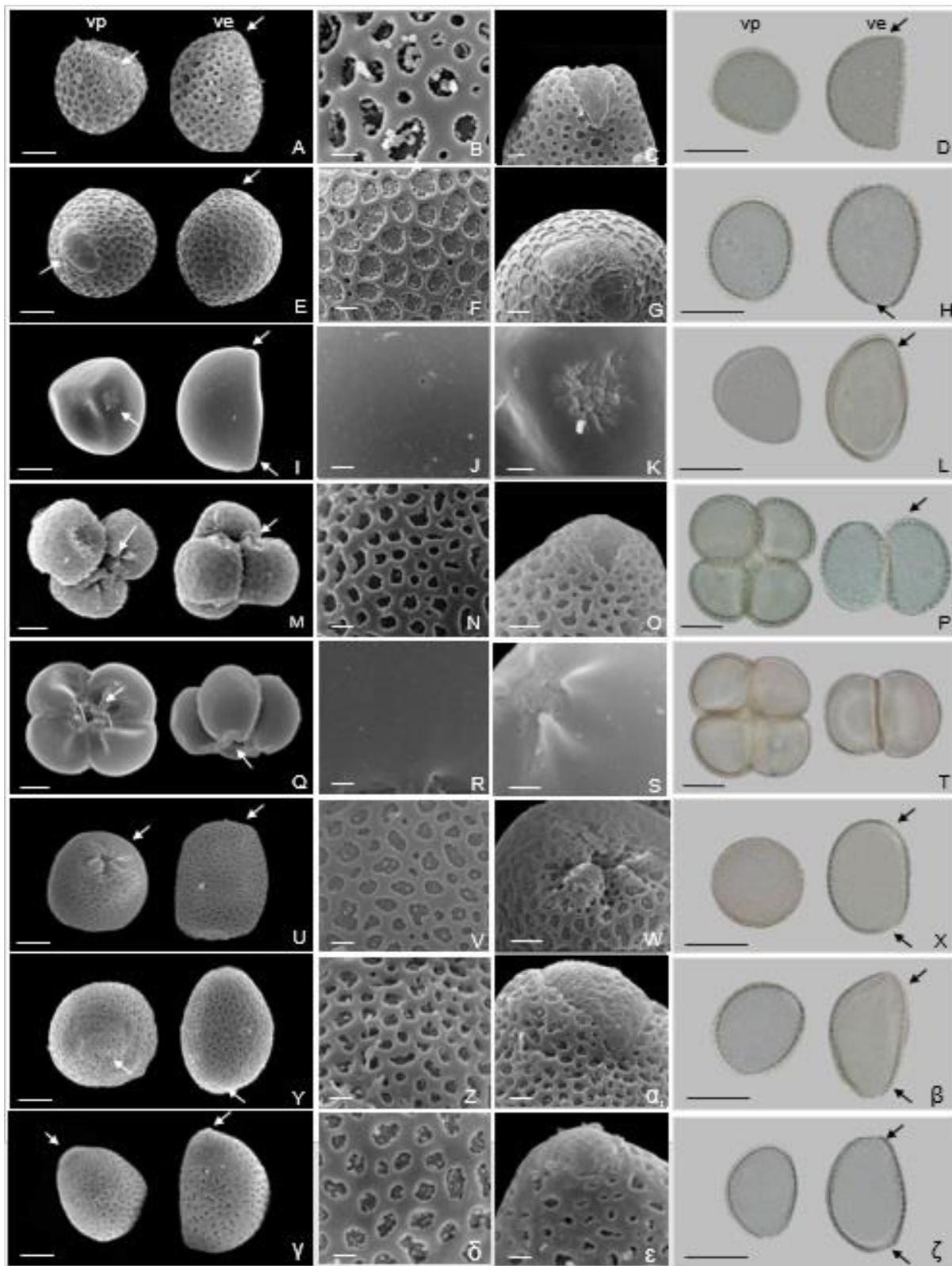


Figura 2. Morfologia dos grãos de pólen de *Wittmackia* (Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A-D) *Wittmackia amorimii*; E-H) *W. andersoniana*; I-L) *W. bicolor*; M-P) *W. brasiliensis*; Q-T) *W. burle-marxii*; U-X) *W. canaliculata*; Y-β) *W. carvalhoi*; γ-ζ) *W. conduruensi*. A, E, I, M, Q, U, Y, γ) vista polar (vp), vista equatorial (ve) obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). B, F, J, N, R, V, Z, δ) detalhe da ornamentação da exina; D, H, L, P, T, X, β, ζ) grão de pólen

após acetólise lática. Barras: D, H, L, P, T, X, β , ζ = 50 μm ; A, E, I, M, Q, U, Y, γ = 10 μm ; B, C, F, G, J, K, N, O, R, S, V, W, Z, α , δ , ε = 2 μm .

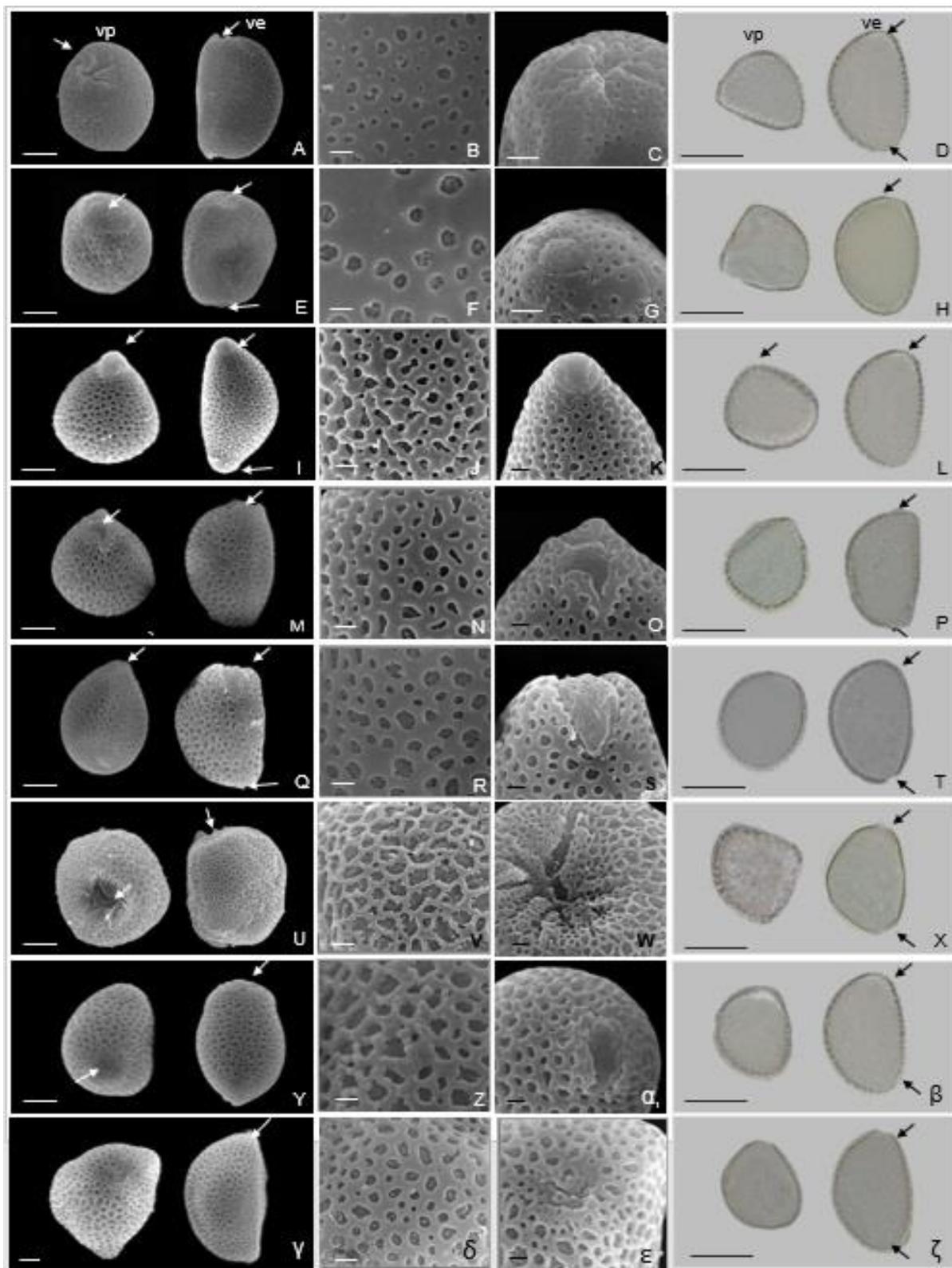


Figura 3. Morfologia dos grãos de pólen de *Wittmackia* (Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A-D) *Wittmackia froesii*; E-H) *W. gregaria*; I-L) *W. guedesiae*; M-P) *W. incompta*; Q-T) *W. ituberaensis*; U-X) *W. laevigata*; Y- β) *W. limae*; γ - ζ) *W. lingulatooides*. A, E, I, M, Q, U, Y, γ) vista polar (vp), vista equatorial (ve)

obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). B, F, J, N, R, V, Z, δ) detalhe da ornamentação da exina; D, H, I, P, T, X, β , ζ) grão de pólen após acetólise láctica. Barras: D, H, L, P, T, X, β , ζ = 50 μ m; A, E, I, M, Q, U, Y, γ = 10 μ m; B, C, F, G, J, K, N, O, R, S, V, W, Z, α , δ , ϵ = 2 μ m.

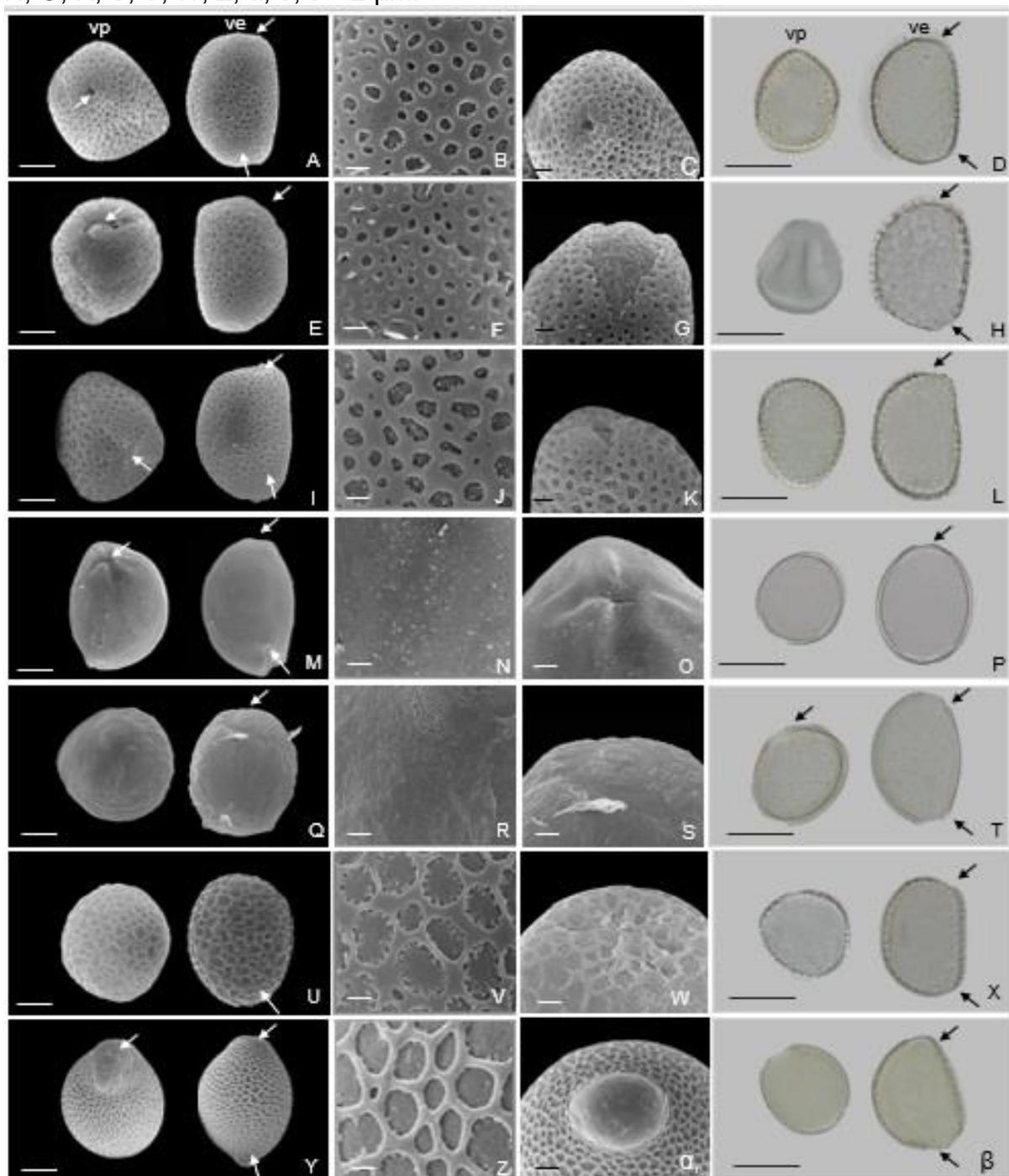


Figura 4. Morfologia dos grãos de pólen de *Wittmackia* (Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A-D) *Wittmackia linharesiorum*; E-H) *W. neoregelioides*; I-L) *W. patentissima*; M-P) *W. pendulispica*; Q-T) *W. sulbahianensis*; U-X) *W. turbinocalyx*; Y- β) *W. viridostigma*. A, E, I, M, Q, U, Y) vista polar (vp), vista equatorial (ve) obtidas em microscopia eletrônica de varredura (MEV); B, F, J, N, R, V, Z) detalhe da ornamentação da exina; D, H, I, P, T, X, β , ζ) grão de pólen após acetólise láctica. Barras: D, H, L, P, T, X, β , ζ = 50 μ m; A, E, I, M, Q, U, Y = 10 μ m; B, C, F, G, J, K, N, O, R, S, V, W, Z, α , δ , ϵ = 2 μ m.

A grande maioria das espécies de *Wittmackia* nesse estudo são monades, com exceção de *W. brasiliensis* e *W. burle-marxii*, que apresentam dispersão em tétrade. Resultados do presente estudo corroboram com pesquisas desenvolvidas por Mota et al. (2024) avaliando a morfologia e viabilidade dos grãos de pólen em espécies de *Lymania* Read (Bromeliaceae) com potencial ornamental. Esses autores observaram grãos de pólen com variação nas formas oblata e suboblata, além de dispersão em tétrade em *Lymania languida* Leme.

Grãos de pólen arranjados em tétrade são relatadas em várias famílias de angiospermas; no entanto, este aspecto é raramente mencionado para Bromeliaceae (Carvalho e Oliveira, 2021). Nesta família, existem registros de grãos de pólen arranjados em tétrades em *Androlepis skinneri* Brongniart ex Houliet (Halbritter et al., 2012), *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant (Santos et al., 2018), e *Lymania languida* Leme (Mota et al., 2024). Vale ressaltar que em *Alcantarea nahoumii*, os autores só encontraram esta conformação em apenas uma amostra com inflorescências imaturas (Santos et al., 2018), o que é coerente, pois na microsporogênese, os microsporócitos sofrem meiose e se dividem em quatro, havendo redução da carga genética (Rudall, 2007). Essa diferença ocorre devido à permanência dos micrósporos unidos após a meiose, nas células-mãe dos grãos de pólen (Halbritter et al., 2018).

Fatores como estresse causado por altas temperaturas e baixa disponibilidade de água (Storme e Geelen, 2013), ou citomixia (migração de organelas, produtos gênicos e material genético entre meiócitos por meio de conexões citoplasmáticas ou canais citomíticos) (Haroun, 1995; Kumar et al., 2010; Singhal e Kaur, 2011), são potenciais causas de desvios e interrupções no desenvolvimento dos grãos de pólen que pode ou não levar a essa conformação.

Além disso, a conformação dos grãos de pólen arranjados como díades, tétrades e políades podem estar associadas à citocinese, incluindo a segregação cromossômica irregular caracterizada pela migração precoce ou por cromossomos retardatário em metáfase I e anáfase I (Pagliarini, 2000). Erros meióticos podem ocorrer devido a mutações em genes que controlam a gametogênese ou como resultado de efeitos ambientais (Karsburg e Battistin, 2006; Belo et al., 2018).

O atual estudo morfológico é muito utilizado em pesquisa da diversidade vegetal, auxiliando no reconhecimento taxonômico e filogenético de espécies, além

de contribuir com trabalhos de conservação ex situ (bancos genéticos de grãos de pólen) (Sarwar e Takahashi, 2012; Zhang et al., 2017; Jiménez-Zamora et al., 2023).

Morfologia e morfometria do estigma

O tipo de estigma “conduplicado-espiral” está presente em todas as espécies de *Wittmackia* estudadas (Tabela 4, Figuras 5, 6 e 7), formando três superfícies estigmáticas em espiral, com um forte grau de retorcimento na maioria das espécies, com exceção da *W. neoregelioides* e *W. canaliculata* que apresentaram menor grau de retorcimento entre os lóbulos (Tabela 4, Figuras 5J, 7B).

Houve variação na coloração do estigma entre as espécies de *Wittmackia*, com predominância na coloração branca. A cor verde foi observada nas espécies *W. incompta*, *W. linharesiorum*, *W. turbinocalyx* e *W. viridostigma*; verde claro em *W. limae* e lilás em *W. brasiliensis* (Tabela 4).

Em Bromeliaceae, o estigma consiste em três lobos laminados com papilas estigmáticas de diferentes tamanhos e especializadas para a aderência e germinação dos grãos de pólen (Dahlgren et al., 1985). Estigmas do tipo conduplicado-espiral foram observados em representantes de diferentes gêneros da família: *Aechmea* Ruiz & Pav, *Ananas* Miller, *Alcantarea* (E. Morren ex Mez) Harms, *Pseudananas* Hassl. ex Harms, *Tillandsia* L., *Wittmackia* Mez, entre outros (Souza et al., 2016; Souza et al., 2020, Leme et al., 2023).

Das 29 espécies do gênero *Wittmackia* com distribuição no Brasil (Gouda et al., 2024, atualização contínua), 23 apresentaram estigma conduplicado-espiral, sugerindo que essa pode ser uma característica morfológica marcante das espécies de *Wittmackia* do “clado brasileiro”.

Análises morfométricas indicaram variações significativas, especialmente no comprimento do estilete, estigma e papilas estigmáticas. As espécies *Wittmackia carvalhoi*, *W. guedesiae* e *W. neoregelioides* destacaram-se pelo maior comprimento do estilete, medindo $14,9 \pm 0,14$ mm; $14,4 \pm 0,17$ mm, e $13,45 \pm 0,17$ mm, respectivamente. Em contraste, as espécies *W. linharesiorum* e *W. incompta* apresentaram os menores valores para essa característica, $4,33 \pm 0,21$ mm e $5,24 \pm 0,07$ mm (Tabela 4). Os resultados obtidos para o comprimento do estilete foram consistentes com o tamanho das flores; ou seja, espécies com flores maiores exibiram estiletos mais longos, e vice-versa.

Para o comprimento do estigma, *W. amorimii* apresentou o maior valor, com $4,30 \pm 0,11$ mm, enquanto *W. linharesiorum* registrou $0,84 \pm 0,01$ mm. O diâmetro tanto do estilete quanto do estigma foi proporcional na maioria das espécies, ou seja, aquelas com estilete/ estigma mais longos também apresentaram maior diâmetro.

Características morfométricas do estigma são de fundamental importância para estudos reprodutivos. A morfometria do estilete pode influenciar a polinização, favorecer o tipo de reprodução mais benéfico para a espécie e dificultar cruzamentos interespecíficos (Parton et al., 2001; Souza et al., 2017). Além disso, o posicionamento do estigma em relação às anteras pode promover a autofecundação na planta ou resultar em hercogamia (Souza et al., 2020).

Todas as espécies de *Wittmackia* apresentaram lobos estigmáticos recobertos por cutícula ornamentada e margens laminar papilosas, variando de papilas estigmáticas levemente denteadas a papilas tubulares (Figuras 5-7).

As espécies *Wittmackia guedesiae* e *W. neoregelioides* apresentaram papilas estigmáticas tubulares bem desenvolvidas, medindo $127,68 \pm 2,51$ μm e $89,53 \pm 8,32$ μm , respectivamente, enquanto as espécies *W. pendulispica* e *W. ituberaensis* exibiram papilas denteadas com $21,40 \pm 2,11$ μm e $24,19 \pm 4,66$ μm (Figuras 5 e 6). O aumento das papilas estigmáticas promove maior eficiência e área para aderência dos grãos de pólen no estigma (Brown e Gilmartin, 1989), sugerindo conseqüentemente maior eficiência na polinização.

Em estudos desenvolvidos por Souza et al. (2020), os autores observaram que em várias espécies de *Tillandsia* L., as papilas tubulares estão restritas à borda da lâmina estigmática e são desprovidas de ornamentação, variando apenas em comprimento. Papilas tubulares também foram observadas em diferentes gêneros de Bromeliaceae, com lobos estigmáticos altamente contorcidos e cobertos por uma cutícula ornamentada em *A. bicolor*, *A. distichantha*, *A. fasciata* e *A. nudicaulis* (Souza et al., 2016).

Dentre as funções do estigma está a ação de reter os grãos de pólen, manter a hidratação e promover a germinação, além de fornecer pontos de entrada e orientação para os tubos polínicos em direção aos ovários (Edlund et al., 2004). Além disso, a morfologia do estigma em Bromeliaceae possui uma importância significativa para a caracterização da família. Sua morfologia incomum tem sido utilizada inclusive para distinguir Bromeliaceae de outras famílias de monocotiledôneas (Brown e Gilmartin, 1984).

Tabela 4. Caracteres morfológicos do estigma e estilete de 23 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécies	Tipo	Coloração	Estigma (mm)		Estilete (mm)		Comprimento das papilas (μm)
			Comprimento	Diâmetro	Comprimento	Diâmetro	
<i>W. amorimii</i>	Conduplicado-espiral	Branco	4,30 \pm 0,11 a	0,79 \pm 0,02 a	10,10 \pm 0,89 d	0,81 \pm 0,02 a	46,92 \pm 3,46
<i>W. andersoniana</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,58 \pm 0,03 d	0,75 \pm 0,03 a	8,85 \pm 0,03 f	0,68 \pm 0,02 a	23,02 \pm 5,15
<i>W. bicolor</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,31 \pm 0,06 e	0,80 \pm 0,08 b	8,64 \pm 0,14 f	0,77 \pm 0,02 a	33,43 \pm 4,71
<i>W. brasiliensis</i>	Conduplicado-espiral	Lilás	2,42 \pm 0,02 c	0,75 \pm 0,01 a	8,21 \pm 0,42 f	0,42 \pm 0,01 b	35,23 \pm 8,40
<i>W. burle-marxii</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,42 \pm 0,01 e	0,52 \pm 0,01 b	6,81 \pm 0,07 g	0,63 \pm 0,02 a	26,99 \pm 2,90
<i>W. canaliculata</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,50 \pm 0,02 d	0,74 \pm 0,03 a	12,50 \pm 0,38 b	0,44 \pm 0,02 b	75,23 \pm 9,47
<i>W. carvalhoi</i>	Conduplicado-espiral	Branco	3,79 \pm 0,01 b	1,00 \pm 0,01 a	14,90 \pm 0,14 a	0,65 \pm 0,04 a	73,74 \pm 4,45
<i>W. conduruensis</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,45 \pm 0,03 e	0,85 \pm 0,02 a	9,84 \pm 0,04 e	0,70 \pm 0,01 a	58,84 \pm 1,37
<i>W. froesii</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,19 \pm 0,04 e	0,48 \pm 0,01 b	9,16 \pm 0,11 e	0,47 \pm 0,02 b	38,30 \pm 5,99
<i>W. gregaria</i>	Conduplicado-espiral	Branco	2,09 \pm 0,48 c	1,02 \pm 0,02 a	11,00 \pm 0,11 c	0,48 \pm 0,90 b	53,60 \pm 2,57
<i>W. guedesiae</i>	Conduplicado-espiral	Branco	3,34 \pm 0,06 b	1,04 \pm 0,03 a	14,40 \pm 0,17 a	0,76 \pm 0,02 a	127,68 \pm 2,51
<i>W. incompta</i>	Conduplicado-espiral	Verde	1,10 \pm 0,02 e	0,73 \pm 0,02 a	5,24 \pm 0,07 h	0,35 \pm 0,02 c	34,83 \pm 3,70
<i>W. ituberaensis</i>	Conduplicado-espiral	Branco	2,37 \pm 0,07 c	0,53 \pm 0,03 b	8,38 \pm 0,03 f	0,43 \pm 0,01 b	24,19 \pm 4,66
<i>W. laevigata</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,16 \pm 1,10 e	0,75 \pm 0,02 a	8,17 \pm 0,49 f	0,47 \pm 0,01 b	54,06 \pm 7,00
<i>W. limae</i>	Conduplicado-espiral	Verde claro	1,25 \pm 0,04 e	0,79 \pm 0,02 a	9,34 \pm 0,02 e	0,70 \pm 0,03 a	43,71 \pm 5,15
<i>W. lingulatoides</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,12 \pm 0,05 e	0,67 \pm 0,02 b	6,25 \pm 0,02 g	0,52 \pm 0,02 b	41,71 \pm 9,05
<i>W. linharesiorum</i>	Conduplicado-espiral	Verde	0,84 \pm 0,01 f	0,45 \pm 0,02 b	4,33 \pm 0,21 i	0,24 \pm 0,02 c	46,14 \pm 6,59
<i>W. neoregelioides</i>	Conduplicado-espiral	Branco	3,52 \pm 0,06 b	1,02 \pm 0,03 a	13,45 \pm 0,17 a	0,80 \pm 0,02 a	89,53 \pm 8,32
<i>W. patentissima</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,10 \pm 0,05 e	0,69 \pm 0,02 b	6,32 \pm 0,02 g	0,44 \pm 0,02 b	31,71 \pm 3,81
<i>W. pendulispica</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,14 \pm 0,05 e	0,73 \pm 0,02 a	6,20 \pm 0,06 g	0,53 \pm 0,04 b	21,40 \pm 2,11
<i>W. sulbahianensis</i>	Conduplicado-espiral	Branco	1,11 \pm 0,03 e	0,45 \pm 0,01 b	7,01 \pm 0,10 f	0,45 \pm 0,02 b	31,72 \pm 1,71
<i>W. turbinocalyx</i>	Conduplicado-espiral	Verde	1,85 \pm 0,02 d	0,71 \pm 0,02 a	9,64 \pm 0,24 e	0,58 \pm 0,02 b	30,06 \pm 18,50
<i>W. viridostigma</i>	Conduplicado-espiral	Verde	1,18 \pm 1,10 e	0,78 \pm 0,02 a	8,65 \pm 0,49 f	0,52 \pm 0,01 b	30,03 \pm 2,71
CV (%)			12,32	9,26	11,13	7,21	35,14

Médias seguidas da mesma letra não diferiram pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,01$).

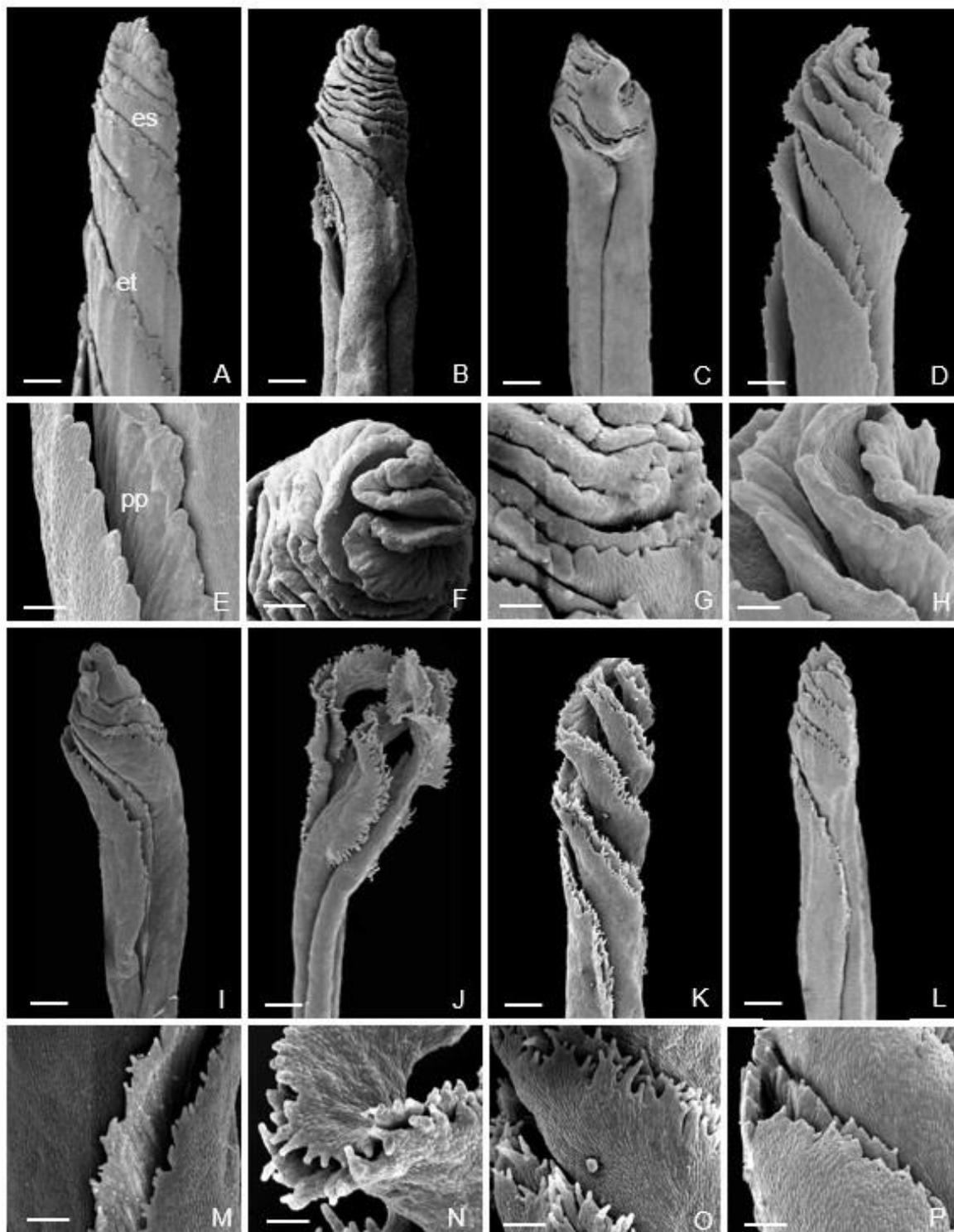


Figura 5. Morfologia do tipo conduplicado-espiral com papilas estigmáticas levemente denteadas e tubulares no gênero *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A, E) *Wittmackia amorimii*; B, F) *W. andersoniana*; C, G) *W. bicolor*; D, H) *W. brasiliensis*; I, M) *W. burle-marxii*; J, N) *W. canaliculata*; K, O) *W. carvalhoi*; L, P) *W. conduruensis* (es=estigma, et=estilete, pp=papilas. Barras: A, B, C, D, I, J, K e L =500 μ m; E, F, G, H, M, N, O e P) 100 μ m.

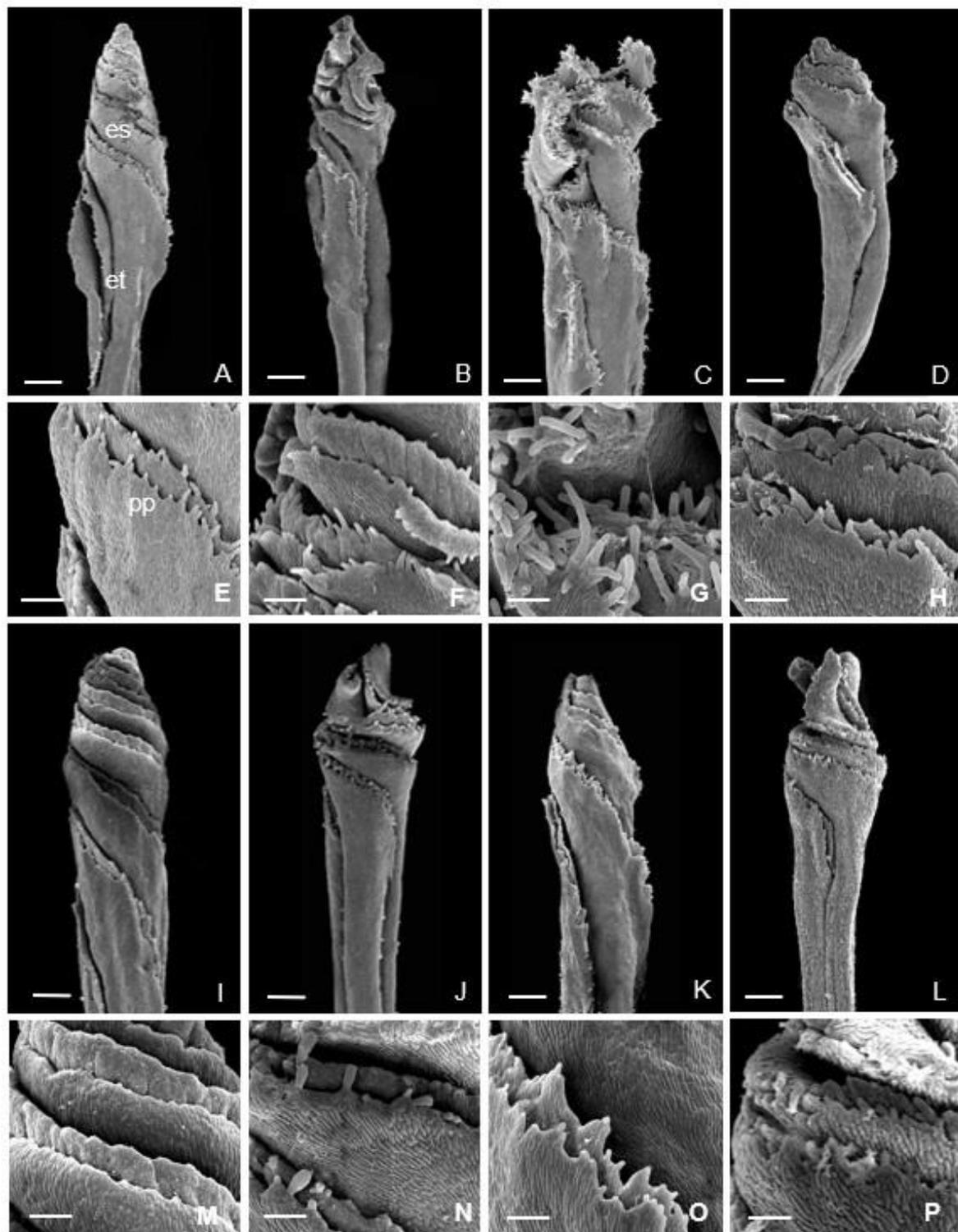


Figura 6. Morfologia do tipo conduplicado-espiral com papilas estigmáticas levemente denteadas e tubulares no gênero *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A, E) *Wittmackia froesii*; B, F) *W. gregaria*; C, G) *W. guedesiae*; D, H) *W. incompta*; I, M); *W. ituberaensis*; J, N) *W. laevigata*; K, O) *W. limae*; L, P) *W. lingulatoides*. (es=estigma, et=estilete, pp=papilas. Barras: A, B, C, D, I, J, K e L =500 μm ; E, F, G, H, M, N, O e P) 100 μm .

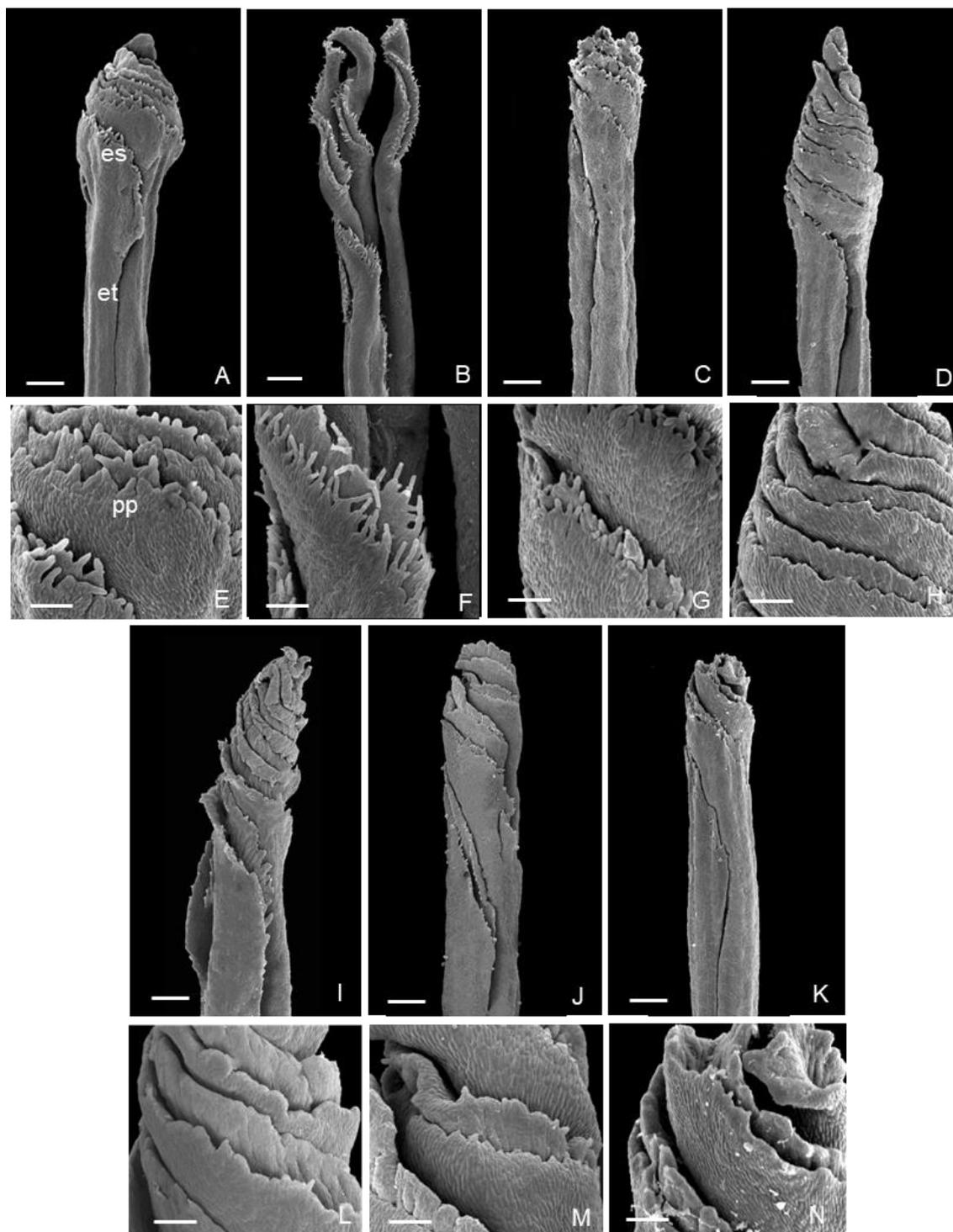


Figura 7. Morfologia do tipo conduplicado-espiral com papilas estigmáticas levemente denteadas e tubulares no gênero *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A, E) *Wittmackia linharesiorum*; B, F) *W. neoregelioides*; C, G) *W. patentissima*; D, H) *W. pendulispica*; I, L) *W. sulbahianensis*; J, M) *W. turbinocalyx*; K, N) *W. viridostigma*. (es=estigma, et=estilete, pp=papilas. Barras: A, B, C, D, I, J, K e L =500 µm; E, F, G, H, M, N, O e P) 100 µm.

Testes histoquímicos

Verificaram-se interações significativas nos três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese) (teste Tukey, $p < 0,01$), com valores superiores na antese para todas as espécies de *Wittmackia*. Em contrapartida, durante a pré-antese, observou-se uma redução da viabilidade em *W. carvalhoi* (43,50% para Alexander e 60,14% para FDA) e *W. gregaria* (57,09% para Alexander e 45,05% para FDA) (Tabela 5, Figura 8A, D).

As análises estatísticas indicam diferenças significativas (Teste F, $p < 0,01$) entre os testes histoquímicos, com maiores resultados para a solução de Alexander (1969) na maioria das espécies. Ainda que a variação seja significativa, é possível verificar que a maioria das espécies demonstram alta viabilidade para os dois testes histoquímicos, o que evidencia a confiabilidade nos métodos utilizados.

Tabela 5. Histoquímica dos grãos de pólen de 23 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil, ocorrentes na Mata Atlântica e avaliada em duas metodologias (Alexander e diacetato de fluoresceína - FDA) e três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese).

Espécie	Histoquímica	Pré-antese	Antese	Pós-antese
<i>W. amorimii</i>	Alexander	82,52 aB	96,60 aA	83,50 aB
	FDA	86,30 Ab	94,00 aA	72,57 bC
<i>W. andersoniana</i>	Alexander	83,12 aB	93,00 aA	73,35 aC
	FDA	82,15 aA	86,13 bA	67,28 aB
<i>W. bicolor</i>	Alexander	91,03 aA	96,10 aA	93,70 aA
	FDA	81,20 bB	95,50 aA	91,20 aA
<i>W. brasiliensis</i>	Alexander	80,40 aB	88,77 aA	65,30 bC
	FDA	87,00 aAB	91,23 aA	74,30 aBC
<i>W. burle-marxii</i>	Alexander	92,30 aAB	97,01 aA	88,50 aBC
	FDA	93,80 aA	95,19 aA	91,29 aA
<i>W. canaliculata</i>	Alexander	89,00 aB	97,40 aA	93,20 bAB
	FDA	90,30 aBC	98,13 aA	95,53 aAB
<i>W. carvalhoi</i>	Alexander	43,50 bB	81,20 bA	78,50 bA
	FDA	60,14 aC	98,50 aA	85,00 aB
<i>W. conduruensis</i>	Alexander	88,40 aA	88,20 aA	82,40 aAB
	FDA	79,30 bB	89,19 aA	71,29 bC
<i>W. froesii</i>	Alexander	88,70 aA	88,00 aA	81,03 aAB
	FDA	85,03 aA	88,85 aA	87,34 aA
<i>W. gregária</i>	Alexander	57,09 aC	93,93 aA	89,03 aB
	FDA	45,05 bB	87,76 bA	85,97 aA
<i>W. guedesiae</i>	Alexander	83,10 aAB	91,50 bA	89,30 bA
	FDA	86,12 aB	98,47 aA	96,10 aA
<i>W. incompta</i>	Alexander	93,20 aA	98,00 aA	96,50 aA
	FDA	91,50 aAB	97,42 aA	64,47 bC
<i>W. ituberaensis</i>	Alexander	58,10 aB	89,70 aA	89,01 aA
	FDA	63,00 aC	90,44 aA	86,17 aAB
<i>W. laevigata</i>	Alexander	80,80 aC	97,80 aA	93,09 aAB
	FDA	82,90 aB	96,90 aA	94,88 aA
<i>W. limae</i>	Alexander	64,80 aB	93,50 aA	67,07 aB
	FDA	68,10 aB	93,90 aA	69,19 aB
<i>W. lingulatoides</i>	Alexander	93,60 aA	94,60 aA	92,80 aA

	FDA	90,16 aA	92,52 aA	90,15 aA
<i>W. linharesiorum</i>	Alexander	80,00 aA	85,40 aA	83,20 aA
	FDA	53,35 bC	87,50 aA	65,39 bB
<i>W. neoregelioides</i>	Alexander	82,75 aB	93,51 aA	88,50 aB
	FDA	83,28 aB	92,57 aA	90,49 aA
<i>W. patentíssima</i>	Alexander	88,60 aB	95,60 aA	93,80 aA
	FDA	88,68 aB	98,92 aA	86,40 bB
<i>W. pendulispica</i>	Alexander	70,20 aA	77,40 bA	73,30 aA
	FDA	65,50 aBC	83,37 aA	70,38 aB
<i>W. sulbahianensis</i>	Alexander	88,80 aA	88,11 aA	78,40 aB
	FDA	83,20 aA	85,59 aA	75,59 aB
<i>W. turbinocalyx</i>	Alexander	92,80 aA	98,61 aA	91,40 aA
	FDA	63,20 bB	88,59 bA	84,59 bA
<i>W. viridostigma</i>	Alexander	89,15 aB	98,71 aA	80,18 aC
	FDA	88,11 aAB	95,57 aA	70,51 bC
CV%			12,17	

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

Em estudos conduzidos por Fagundes et al. (2024), com *Dyckia dissitiflora* Schult.f., os grãos de pólen demonstraram alta viabilidade com a solução de Alexander (1969), registrando estimativas superiores a 97% independentemente do estágio de desenvolvimento floral. O presente estudo também está alinhado com Mota et al. (2024), que investigaram a viabilidade polínica em nove espécies de *Lymania*. Os autores observaram alta viabilidade com a solução de Alexander e diacetato de fluoresceína, indicando que esses testes histoquímicos são bons indicadores de viabilidade polínica e estão correlacionados com a germinação in vitro.

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 (Souza et al., 2017). 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 8A-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 ao atravessar as membranas é hidrolisado pelas esterases intercelulares e a fluoresceína se acumula no citoplasma (Impe et al., 2020). Grãos de pólen com membranas plasmáticas intactas são considerados viáveis e refletem uma cor verde brilhante, já os inviáveis emitem luz atribuível à fluorescência da exina e à pequena

adsorção de fluoresceína pelo conteúdo celular residual (Heslop-Harrison; Heslop-Harrison, 1970) (Figura 8D-F).

Valores de viabilidade polínica acima de 70% são classificados como altos e são adequados para serem utilizados em programa de melhoramento de plantas (Hister e Tedesco, 2016). Os resultados deste estudo sugerem que as espécies de *Wittmackia* possuem alta viabilidade, indicando uma maior possibilidade de formação de sementes. No entanto, é importante notar que o teste histoquímico, apesar de ser um procedimento simples e barato, pode superestimar os valores de viabilidade (Dafni, 1992; Souza et al., 2016).

Germinação in vitro dos grãos de pólen

As análises estatísticas demonstraram diferenças significativas entre os meios de cultura com maior germinação observada em meio de cultura SM independente do estágio de desenvolvimento floral (Tabela 6, Figura 8).

Após 24 horas de incubação, a maioria das espécies de *Wittmackia* exibiu alto percentual de germinação com valores superiores a 80%, principalmente na antese.

As médias observadas na germinação in vitro indicaram valores próximos aos obtidos nos testes histoquímicos em todas as espécies de *Wittmackia*, destacando maior germinação na antese e valores inferiores na pré-antese, conforme observado nas espécies *W. carvalhoi* ($37,20 \pm 1,12$) e *W. gregaria* ($46,80 \pm 2,20$) (Tabela 6, Figura 8H).

O meio de cultura SM também mostrou maior eficiência quanto ao comprimento do tubo polínico, alcançando $1,24 \pm 0,02$ mm para *W. andersoniana*, enquanto *W. incompta* apresentou o menor comprimento com $0,23 \pm 0,05$ mm (Tabela 6, Figura 8J). Já no meio de cultura BM, *W. lingulatoides* obteve o maior comprimento com $1,10 \pm 0,08$ mm, e o menor comprimento do tubo polínico foi observado em *W. pendulispica* com $0,17 \pm 0,04$ mm (Tabela 6, Figura 8I). De maneira geral, observou-se que as flores em antese resultaram em grãos de pólen com maior porcentagem de germinação e maior comprimento do tubo polínico em todas as espécies estudadas.

Tabela 6. Porcentagem de germinação in vitro e comprimento do tubo polínico de 23 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil, ocorrentes na Mata Atlântica e avaliada em dois meios de cultura (BM e SM) e três estádios de desenvolvimento floral (pré-antese, antese e pós-antese).

Espécie	Meio de Cultura	Germinação (%)		
		Pré-antese	Antese	Pós-antese
<i>W. amorimii</i>	BM	68,23 bC	84,32 aA	70,66 bB
	SM	86,65 aA	87,45 aA	85,03 Aa
<i>W. andersoniana</i>	BM	86,00 aAB	92,03 aA	60,89 aC
	SM	90,90 aA	94,03 aA	67,81 aB
<i>W. bicolor</i>	BM	82,80 bB	96,29 aA	97,05 aA
	SM	95,42 aA	98,45 aA	95,65 aA
<i>W. brasiliensis</i>	BM	82,38 aA	85,28 aA	67,21 aB
	SM	84,84 aA	87,02 aA	71,36 aB
<i>W. burle-marxii</i>	BM	90,56 aA	94,43 aA	83,85 bB
	SM	93,72 aA	96,85 aA	92,53 aA
<i>W. canaliculata</i>	BM	68,70 bB	85,09 bA	81,08 bA
	SM	91,10 aA	95,77 aA	90,36 aA
<i>W. carvalhoi</i>	BM	37,20 bB	87,50 aA	82,70 aA
	SM	52,20 aB	90,70 aA	87,40 aA
<i>W. conduruensis</i>	BM	71,26 bB	77,04 bA	62,77 bC
	SM	80,37 aAB	85,00 aA	80,05 aAB
<i>W. froesii</i>	BM	78,63 bAB	80,49 aA	83,04 aA
	SM	88,90 aA	89,03 aA	79,18 bB
<i>W. gregária</i>	BM	48,78 aC	84,98 bA	78,56 aB
	SM	46,80 aC	95,78 aA	77,92 aB
<i>W. guedesiae</i>	BM	85,40 aB	95,06 aA	85,93 bB
	SM	90,23 aB	98,14 aA	92,11 aB
<i>W. incompta</i>	BM	87,68 aAB	93,22 aA	60,37 bC
	SM	93,33 aA	95,28 aA	92,63 aA
<i>W. ituberaensis</i>	BM	63,23 aB	90,51 bA	93,32 aA
	SM	68,65 aC	98,35 aA	87,17 bB
<i>W. laevigata</i>	BM	74,16 aB	91,47 aA	87,17 aA
	SM	77,27 aB	94,33 aA	90,06 aA
<i>W. limae</i>	BM	66,05 bB	81,23 bA	60,03 aBC
	SM	75,15 aB	88,63 aA	65,27 aC
<i>W. lingulatoides</i>	BM	91,60 aA	93,16 aA	89,80 aA
	SM	93,10 aA	94,52 aA	91,10 aA
<i>W. linharesiorum</i>	BM	54,37 bC	84,24 aA	60,45 bB
	SM	72,22 aB	87,58 aA	85,56 aA
<i>W. neoregelioides</i>	BM	81,75 aBC	91,81 aA	85,50 aAB
	SM	86,28 aBC	97,57 aA	90,41 aAB
<i>W. patentíssima</i>	BM	91,62 aA	92,92 aA	80,05 bB
	SM	89,78 aBC	94,19 aA	92,29 aAB
<i>W. pendulispica</i>	BM	62,50 bB	80,61 aA	61,20 bB
	SM	70,89 aBC	84,95 aA	75,93 aB
<i>W. sulbahianensis</i>	BM	84,18 aA	83,13 aA	74,40 aB
	SM	85,10 aA	87,59 aA	75,59 aB
<i>W. turbinocalyx</i>	BM	68,48 bC	83,39 bA	76,04 bB
	SM	82,86 aC	92,40 aA	87,07 aBC
<i>W. viridostigma</i>	BM	82,55 aB	95,51 aA	75,52 aC
	SM	86,31 aB	98,10 aA	78,33 aC
CV%			15,57	
Comprimento do tubo polínico (mm)				
<i>W. amorimii</i>	BM	0,25 bA	0,25 bA	0,22 bA
	SM	0,41 aB	0,81 aA	0,43 aB
<i>W. andersoniana</i>	BM	1,08 bA	1,04 bA	0,45 bB
	SM	1,24 aA	1,18 aA	0,66 aB
<i>W. bicolor</i>	BM	0,54 aB	0,65 bA	0,53 bB

	SM	0,53 aB	0,76 aA	0,72 aA
<i>W. brasiliensis</i>	BM	0,52 aA	0,49 bA	0,33 bB
	SM	0,58 aAB	0,63 aA	0,66 aA
<i>W. burle-marxii</i>	BM	0,39 bB	0,54 bA	0,50 bA
	SM	0,47 aB	0,63 aA	0,69 aA
<i>W. canaliculata</i>	BM	0,30 aA	0,32 bA	0,35 aA
	SM	0,27 aC	0,47 aA	0,32 bB
<i>W. carvalhoi</i>	BM	0,19 bC	0,52 bA	0,29 bB
	SM	0,36 aC	0,72 aA	0,48 aB
<i>W. conduruensis</i>	BM	0,49 bB	0,57 bA	0,47 bB
	SM	0,60 aA	0,69 aA	0,63 aA
<i>W. froesii</i>	BM	0,40 aA	0,39 bA	0,41 bA
	SM	0,48 aBC	0,72 aA	0,52 aB
<i>W. gregária</i>	BM	0,44 bB	0,53 bA	0,54 bA
	SM	0,61 aBC	1,12 aA	0,70 AB
<i>W. guedesiae</i>	BM	0,35 bBC	0,44 bA	0,38 bB
	SM	0,58 aB	0,66 aA	0,57 aB
<i>W. incompta</i>	BM	0,22 aA	0,24 bA	0,21 aA
	SM	0,23 aB	0,37 aA	0,27 aB
<i>W. ituberaensis</i>	BM	0,24 bBC	0,48 bA	0,30 bA
	SM	0,63 aA	0,71 aA	0,69 aA
<i>W. laevigata</i>	BM	0,43 bA	0,44 bA	0,39 bA
	SM	0,94 aA	0,91 aA	1,05 aA
<i>W. limae</i>	BM	0,48 bB	0,61 bA	0,35 bC
	SM	0,65 aB	1,18 aA	1,04 aA
<i>W. lingulatoides</i>	BM	1,10 aA	1,05 Aa	0,98 aA
	SM	0,98 aA	1,08 aA	1,01 aA
<i>W. linharesiorum</i>	BM	0,46 bA	0,43 bA	0,51 aA
	SM	0,65 aB	1,02 aA	0,48 aC
<i>W. neoregelioides</i>	BM	0,81 aA	0,89 bA	0,79 Aa
	SM	0,88 aB	1,01 aA	0,82 aB
<i>W. patentíssima</i>	BM	0,22 bA	0,25 bA	0,19 bA
	SM	0,46 aA	0,46 aA	0,42 aA
<i>W. pendulispica</i>	BM	0,17 bA	0,20 bA	0,19 bA
	SM	0,45 aBC	0,63 aA	0,50 aB
<i>W. sulbahianensis</i>	BM	0,73 aB	0,89 bA	0,78 aB
	SM	0,83 aB	1,02 aA	0,81 aB
<i>W. turbinocalyx</i>	BM	0,70 aA	0,70 bA	0,50 bB
	SM	0,81 aA	0,87 aA	0,66 aB
<i>W. viridostigma</i>	BM	0,68 bB	0,81 aA	0,62 aB
	SM	0,81 aA	0,85 aA	0,68 aB
CV%		28,33		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha dentro do mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de F e Tukey ($p \leq 0,01$), respectivamente. Meios de cultura: BM (PARTON et al., 2002). SM (SOARES et al., 2008).

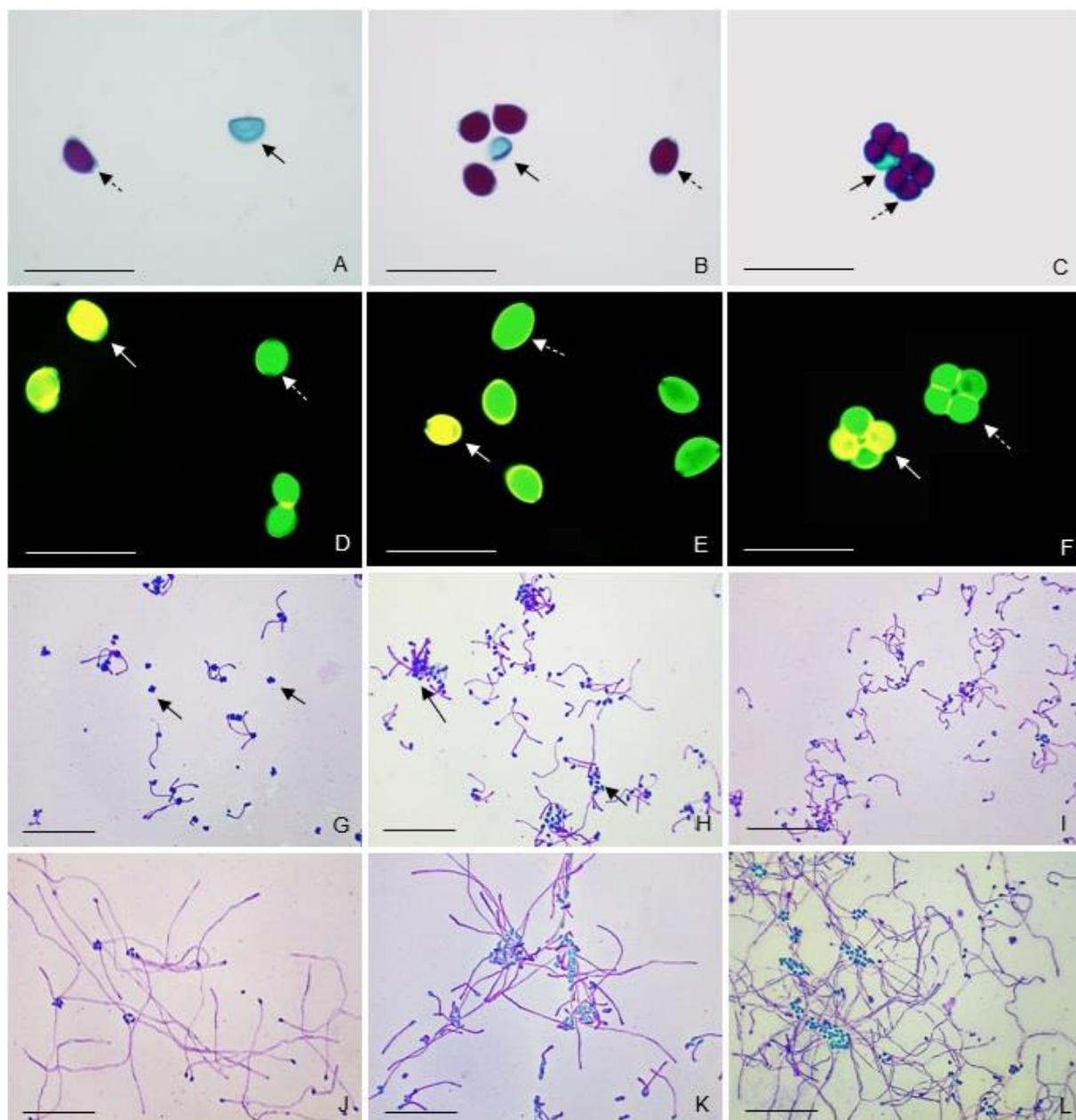


Figura-8. Viabilidade dos grãos de pólen de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A-F) Testes histoquímicos evidenciando grãos de pólen viáveis (seta tracejada) e inviáveis (seta contínua). A-C) Solução de Alexander 2%. D-F) Diacetato de fluoresceína. G-I) Germinação de pólen in vitro em meios de cultura BM (PARTON et al., 2002). J-L) Germinação de pólen in vitro em meios de cultura SM (SOARES et al., 2008). A) Teste de Alexander com grãos de pólen de *Wittmackia carvalhoi* evidenciando baixa viabilidade na pré-antese; B) Teste de Alexander com grãos de pólen de *W. canaliculata* evidenciando altas taxas de germinação na antese; C) Teste de Alexander com grãos de pólen de *W. brasiliensis* evidenciando grãos de pólen tetrades viáveis e inviáveis na pós-antese; D) Teste com diacetato de fluoresceína (FDA) de *W. gregaria* evidenciando baixa viabilidade na pré-antese; E) Teste com (FDA) de *W. guedesiae* evidenciando alta viabilidade na antese; F) Teste com (FDA) de *W. burle-marxii* evidenciando grãos de pólen tetrades viáveis e inviáveis na pós-antese; G) Germinação dos grãos de pólen de *Wittmackia brasiliensis* evidenciando grãos de pólen tetrades germinados na antese; H) Germinação dos grãos de pólen de

W. carvalhoi evidenciando alguns grãos de pólen sem germinar na pré-antese; I) Germinação dos grãos de pólen de *W. pendulispica* evidenciando menor comprimento do tubo polínico na pós-antese; J) Germinação dos grãos de pólen de *W. andersoniana* evidenciando grande comprimento do tubo polínico na pré-antese; K) Germinação dos grãos de pólen de *W. lingulatoides* evidenciando grande comprimento do tubo polínico na antese; L) Germinação dos grãos de pólen de *W. ituberaensis* evidenciando alta germinação na antese. Barras: A-F= 100 µm; G-L) = 0,5 mm.

O presente estudo está alinhado com pesquisas de Souza et al. (2020) e Mota et al. (2024), realizadas com espécies dos gêneros *Tillandsia* L. e *Lymania* Read. Em ambos os estudos, o meio de cultura SM (Soares et al., 2008) promoveu maior porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico para todas as espécies investigadas. A literatura também relata a falta de eficiência no meio de cultura BM em *Aechmea* Ruiz & Pav (Souza et al., 2017). No mesmo estudo, com a espécie *W. bicolor*, o comprimento do tubo polínico apresentou valores mais elevados para o meio de cultura SM em comparação ao BM.

Vale ressaltar que os dados de germinação do grão de pólen variam também conforme a espécie, obedecendo a fisiologia da planta, como pode ser verificado em diversos estudos na área (Zambon et al., 2014; Bastos et al., 2017; Souza et al., 2020; Ferreira et al., 2021).

Provavelmente, o sucesso na germinação in vitro em meio de cultura SM no atual e demais estudos se justifica pela composição do meio de cultura, uma vez que o meio de cultura SM apresenta constituição mais rica em nutrientes como: nitrato de cálcio, sulfato de magnésio e nitrato de potássio, substâncias essenciais para maximizar a germinação do pólen dessas espécies (Soares et al., 2008).

Além dos constituintes químicos a concentração de sacarose utilizada nos meios de cultura BM (20%) e SM (15%) é fator importante. A adição de sacarose como fonte de carboidratos visa suprir as necessidades metabólicas dos explantes, participando na geração de energia ou como fonte de esqueletos carbônicos para os processos biossintéticos implicados na diferenciação celular (Soares et al., 2011). A sacarose fornece a energia necessária para auxiliar no processo de desenvolvimento do tubo polínico e integridade polínica (Baloch et al., 2001). Entretanto, é importante avaliar a melhor concentração para cultura, visto que, em altas concentrações (maior que 30%) causam desequilíbrio, impedindo a germinação dos grãos de pólen

(Abdelgadir et al., 2012; Almeida et al., 2019) e, em baixa concentração pode ocasionar o rompimento do tundo polínico, devido ao aumento de pressão osmótica e baixa resistência da parede celular, ocorrendo um rápido influxo de água nos grãos de pólen, causando perda de substâncias e íons solúveis no citoplasma (Loguercio, 2002).

Receptividade do estigma

Os dois métodos avaliados foram eficazes para determinação da receptividade do estigma nas 23 espécies estudadas, com resultados semelhantes para as duas metodologias (Tabela 7, Figura 9).

Quanto aos estádios de desenvolvimento floral, houve variação. Durante a pré-antese predominou resposta positiva muito forte (+++), com exceção das espécies *W. bicolor*, *W. brasiliensis*, *W. canaliculata* e *W. gregaria* que apresentaram resposta positiva forte (++) e, *W. burle-marxii*, *W. pendulispica* e *W. viridostigma*, com resposta positiva fraca (+) nos dois métodos utilizados (Tabela 9, Figura 9B, C, D e F).

O período da antese e pós-antese resultou em alta atividade enzimática em quase todas as espécies, com exceção da *W. brasiliensis*, que apresentou uma resposta positiva forte (++) . Esses dados indicam que a antese e pós-antese são os estádios florais mais propícios para a polinização.

O teste com peróxido de hidrogênio a 3% é bastante simples e utiliza reagente facilmente disponível, sendo amplamente empregado em estudos voltados de viabilidade estigmática de plantas. Contudo, de acordo com Dafni e Maués (1998) e Souza et al. (2016) não é aconselhável utilizar apenas o peróxido de hidrogênio como único indicador, pois danos no estigma pode inferir em um falso positivo com a presença de bolhas de ar.

Os resultados aqui apresentados comprovam a eficiência dessa solução nas espécies estudadas, já que não diferenciou da solução de α -naftil-acetate + fast blue B salt (Tabela 7, Figura 9B, D e F).

Por outro lado, o método α -naftil-acetato + fast blue B salt permite identificar de forma rápida a atividade da enzima esterase com uma coloração marrom escura na região exata do estigma receptivo (Tabela 7, Figura 9A, C e E), (Souza et al., 2016; Souza et al., 2020).

Tabela 7. Receptividade do estigma em 23 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil, ocorrentes na Mata Atlântica e avaliada na pré-antese, antese e pós-antese em duas diferentes metodologias.

Espécies	<i>α-naftil-acetate + fast blue B salt</i>			Peróxido de Hidrogênio 3%		
	Pré-antese	Antese	Pós-antese	Pré-antese	Antese	Pós-antese
<i>W. amorimii</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. andersoniana</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. bicolor</i>	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>W. brasiliensis</i>	++	++	++	++	++	++
<i>W. burle-marxii</i>	+	+++	+++	+	+++	+++
<i>W. canaliculata</i>	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>W. carvalhoi</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. conduruensis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. froesii</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. gregária</i>	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>W. guedesiae</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. incompta</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. ituberaensis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. laevigata</i>	+++	+++	+++	+	+++	+++
<i>W. limae</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. lingulatoides</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. linharesiorum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. neoregelioides</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. patentissima</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. pendulispica</i>	+	+++	+++	+	+++	+++
<i>W. sulbahianensis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. turbinocalyx</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>W. viridostigma</i>	+	+++	+++	+++	+++	+++

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

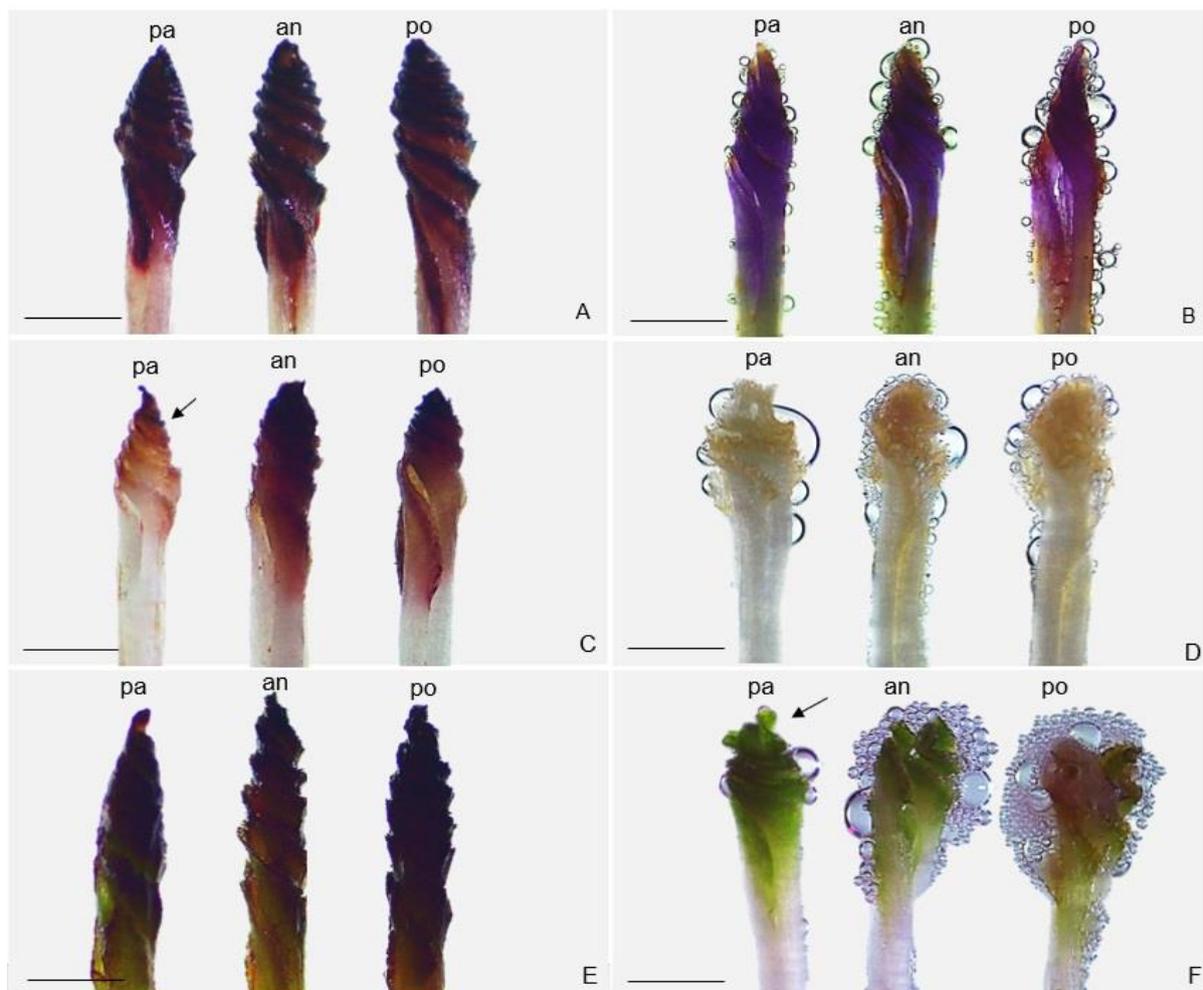


Figura 9. Receptividade do estigma com solução α -naftil-acetate + fast blue B salt (A, C e E) e com peróxido de hidrogênio (B, D e F) em *Wittmackia* endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A) *Wittmackia conduruensis* evidenciando resposta positiva muito forte (+++) com α -naftil-acetate durante os três períodos de desenvolvimento floral; B) *W. brasiliensis* evidenciando resposta positiva forte (++) com peróxido de hidrogênio durante os três períodos de desenvolvimento floral; C) *W. pendulispica* evidenciando resposta positiva fraca (+) com α -naftil-acetate durante a pré-antese e resposta positiva muito forte (+++) na antese e pós-antese; D) *W. canaliculata* evidenciando resposta positiva forte (++) durante a pré-antese e resposta positiva muito forte (+++) na antese e pós-antese; E) *W. turbinocalyx* evidenciando resposta positiva muito forte (+++) com α -naftil-acetate durante os três períodos de desenvolvimento floral; F) *W. viridostigma* evidenciando resposta positiva fraca (+) com peróxido de hidrogênio durante a pré-antese e resposta positiva muito forte (+++) na antese e pós-antese. pa = pré-antese, an = antese, po = pós-antese. Barras: A-F=1 mm.

Os resultados do presente estudo demonstram maior atividade enzimática durante a antese e pós-antese, semelhante aos estudos de Souza et al. (2016; 2020), que avaliaram a receptividade do estigma em espécies de Bromeliaceae de diferentes gêneros. Esses autores observaram maior receptividade durante a antese na maioria das espécies, sendo que algumas o estigma permaneceu receptivo até dois dias após a antese.

Herrero e Dickinson (1981) e Dafni e Maués (1998) relataram que a receptividade estigmática está associada à produção de secreção estigmática e à atividade das enzimas esterase e peroxidase. Essa atividade enzimática está relacionada à abertura floral e ao tempo que a flor permanece aberta Souza et al. (2016). No entanto, é essencial que a receptividade do estigma e viabilidade polínica estejam sincronizadas em todos os estádios florais para o sucesso reprodutivo, evitando uma barreira temporal como a dicogamia, ou seja, protoginia (amadurecimento do gineceu antes do androceu) ou protandria (amadurecimento do androceu antes do gineceu) (Souza et al., 2016).

Para realizar cruzamentos entre progenitores, é crucial entender a variação da receptividade estigmática nos indivíduos a serem cruzados e o período em que o pistilo está receptiva ao grão de pólen. A receptividade do estigma desempenha um papel essencial em estudos de hibridação (Souza et al., 2022), pois para que ocorra a fecundação, os grãos de pólen precisam estar viáveis e o estigma deve estar em condição receptiva (Zulkarnain et al., 2019).

CONCLUSÃO

O gênero *Wittmackia* não apresenta uma característica palinológica padrão; suas espécies possuem grãos de pólen dispersos em monades ou tétrades, com variabilidade morfopolínica quanto a forma, polaridade, simetria e ornamentação da exina.

Todos os estigmas encontrados em *Wittmackia* spp. são do tipo conduplicado-espiral com papilas estigmáticas denteadas ou tubulares, variando em coloração entre branca, verde ou lilás.

Nas diferentes análises histoquímicas, as espécies de *Wittmackia* demonstraram alta viabilidade dos grãos de pólen, independentemente da conformação do grão de pólen, o que está em concordância com os resultados da germinação in vitro.

Observou-se que tanto os grãos de pólen quanto os estigmas apresentam viabilidade ou receptividade por períodos semelhantes na maioria das espécies estudadas, sugerindo a ausência de dicogamia.

Estudos da morfologia e viabilidade polínica oferece informações importantes para a conservação e melhoramento genético de *Wittmackia* spp., auxiliando também na taxonomia do gênero e no sucesso reprodutivo de futuros cruzamentos controlados.

REFERÊNCIAS

- ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; STADEN, V. J. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, Amsterdã, v. 79, n. 1, p. 132-139, 2012.
- AGUIRRE-SANTORO, J.; MICHELANGELI, F. A.; STEVENSON, D. W. Molecular phylogenetics of the *Alliance Ronnbergia* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into its morphological evolution. **Filogenética Molecular e Evolução**, São Paulo, v. 100, n. 1, p. 1-20, 2016.
- AGUIRRE-SANTORO, J. Taxonomy of the *Ronnbergia* alliance (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. **Plant Systematics and Evolution**, Berlim, v. 303, n. 2, p. 615-640, 2017.
- AGUIRRE-SANTORO, J. Taxonomic revision of the Caribbean-endemic species of *Wittmackia* (Bromeliaceae). **Phytotaxa**, Auckland, v. 336, n. 2, p.101-147, 2018.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, n. 1, p. 117-22, 1969.
- 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.
- 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**, Belo Horizonte, v. 31, p. 665-676, 2017.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Stigma structure and variation in Bromeliaceae- Neglected taxonomic caracteres. **Brittonia**, New York, v. 36, p. 364-374, 1984.
- BROWN, G. K.; GILMARTIN, A. J. Chromosome numbers in Bromeliaceae. **American Journal of Botany**, Oxford, v. 76, p. 657-665, 1989.

- BALOCH, M. J.; LAKHO, A. R.; BHUTTO, H.; SOLANGI, M. Y. Impact of sucrose concentrations on in vitro pollen germination of Okra, *Hibiscus esculentus*. **Journal of Biological Sciences**, Hoboken, v. 4, n. 4, p. 402-403, 2001.
- CARVALHO, J. D. T.; CARVALHO, T.; OLIVEIRA, J. M. S.; FREITAS, C. C.; MARTINS, M. S. Stamen morphoanatomy of *Dyckia Schult.f.* (Bromeliaceae, Pitcarnioideae) species: new data for taxonomic use. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3, p. 389-400, 2016.
- DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach (the practical approach series). New York: University Press, 1992. 250, p.
- DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple method to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, Amsterdam, v. 2, p. 117-180, 1998.
- ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy**. Angiosperms. Stockholm: Almqvist & Wiksell; 1952. 553, p.
- FAGUNDES, A.; SOUZA, E. H.; SILVEIRA, F. L.; MACHADO, I. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. Autogamy ensures reproductive success in the bromeliad *Dyckia dissitiflora Schult.f.*, endemic to the Brazilian caatinga domain. **Plant Species Biology**, Cambridge, v.39, n. 5, p.1-15, 2024.
- FARIA, A. P. G.; ROMANINI, R. P.; KOCH, A. K.; SOUSA, G. M.; SOUSA, L. O. F.; WANDERLEY, M. G. L.; SILVA, T. S. **Aechmea in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB5753>>. Acesso em: 21 jun. 2024
- FERREIRA, M. S.; SOARES, T. L.; COSTA, E. M. R.; SILVA, R. L.; JESUS, O. N.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Optimization of culture medium for the in vitro germination and histochemical analysis of *Passiflora* spp. pollen grains. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 15, p.110298, 2021.
- FERREIRA, M. D. F.; LEME, E. M.; AONA, L. Y.; SOUZA, F. V. D.; MOURA, H.; SOUZA, E. H. Microendemism, high diversity and taxonomic novelties in Bromeliaceae: studies from an Atlantic Forest hotspot in Bahia, Brazil. **Journal for Nature Conservation**, São Paulo, v. 79, p. 126599, 2024.
- HABRITTER, H.; HESSE, M. WEBER, M. The unique design of pollen tetrads in Dionae and Drosera. **Grana**, Stockholm, v. 51, p. 148-157, 2012.
- 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.
- HALBRITTER, H. *Aechmea andersoniana*. In: **PalDat** - A palynological database. 2016k. Disponível em: https://www.palдат.org/pub/Aechmea_andersoniana/301202; Acesso em 09 jun 2024.

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.; FROSCHRADIVO, A.; ULRICH, S. **Pollen terminology**. An illustrated handbook. Wien: Springer, 2009, 259 p.

HERRERO, M.; DICKINSON, H.G. Ultrastructural and physiological differences between buds and mature flowers of *Petunia* hybrid prior to and following pollination. **Planta**, São Paulo, v.148, n. 2, p.138-145, 1981.

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.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. 137-138A, 1965.

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

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.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). **The IUCN red list of threatened species**. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/> > Acesso em 30 maio de 2024.

LEME, E. M. C.; KOLLMANN, L. J. C. New species and a new combination of Brazilian Bromeliaceae, **Phytotaxa**, Auckland, v.16, n.1, p. 1-36, 2011.

LEME, E. M.; HALBRITTER, H.; BARFUSS, M. H. *Waltillia*, a new monotypic genus in Tillandsioideae (Bromeliaceae) arises from a rediscovered, allegedly extinct species from Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 299, p. 001–035, 2017.

LEME, E. M. C.; COUTO, D. R.; KOLLMANN, L. J.; FRAGA, C. N. Novelty 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.

LEME, E. M. C.; SOUZA, E. H.; AONA, L.Y.S.; SOUZA, F.V. D. Two new *Wittmackia* species (Bromeliaceae: Bromelioideae) from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 583, n. 3, 241-250, 2023.

LOGUERCIO, L. L. Pollen treatment in high osmotic potencial: a simple tool for in vitro preservation and manipulation of viability in gametophytic populations. **Journal Plant Physiology**. Amsterdã, v.14, n.1, p.65- 70, 2002.

METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; DIXO, M.; BERCACCI, L. C.; RIBEIRO, M. C.; TEIXEIRA, G. A. M.; PARDINE, R. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. **Biological Conservation**, Oxford, v. 142, n. 6, p. 1166-1177, 2009.

MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; CAVALCANTE, B. P. C.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, E. H. Reproductive systems and hybridization of *Lymania* species (Bromeliaceae) endemic to Northeast Brazil threatened with extinction. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 322, p. 1-11, 2023.

MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; SOARES, T. L.; ALMEIDA, P. S.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROSSI, M. L.; SOUZA, E. H. Pollen morphology and viability of *Lymania* (Bromeliaceae) species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 338, p. 1-10, 2024.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DEROOSE, M. P.; PROFT, D. Interspecific and intergeneric fertilization barriers in Bromeliaceae. **Acta Horticulture**, Leuven, v.552, p. 43-54, 2001.

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

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, n. 1-2, p.1-81, 2007.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2023.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2018. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>> Acesso em: 06 jun 2023.

ROCHA, L. D. A.; BEZERRA, J. J. L.; PRATA, A. P. N.; COFFANI-NUNES, J. V.; ASSUNÇÃO, A. C. R.; FARIAS, M. C. V. Florística, aspectos fenológicos e agrupamentos ecológicos de Bromeliaceae na Caatinga em Sergipe. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, Amsterdam, v.6, n.3, p. 248-258, 2021.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PANZONI, F. G.; MÁCIA, M. H. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Oxford, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

SARWAR, A. K. M. G.; TAKAHASHI, H. Pollen morphology of *Kalmia* (*Phyllodoceae*, Ericaceae) and its taxonomic significance. **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy**. Bangladesh, v. 19, p.123-133, 2012.

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.

SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Chromosome techniques**, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994. 367 p.

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

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

SOUZA, E. H.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P. Stigma structure and receptivity in Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 203, n. 1, p. 118-125, 2016.

SOUZA, E. H.; 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, S. O.; OLIVEIRA, R. S.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. L.; ROSII, M. L.; SOUZA, E. H. Morphoanatomy and stigma receptivity in *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) occurring in Bahia. **Nordic journal Botany**, Chichester, v. 38. n. 9, p. 1-10, 2020.

SOUZA, C. G. F.; RAMOS, S. M. B.; NIETSCHKE, S.; POSSOBOM, C. C.; ALMEIDA, E. F. A.; PEREIRA, M. C. T. Viability of pollen grains and stigma receptivity in Desert Rose Received. **Scientific Article**. Curitiba, v. 28, n.1, p. 92-98, 2022.

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.

SOUZA, E. H. LEME, E. M. C.; New *Cryptanthus* species (Bromeliaceae: Bromelioideae) from the state of Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 523, n. 2, p. 179-191, 2021.

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.

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.

STONE, J. L. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria Suerrensii*; Rubiaceae). **American Journal of Botany**. Hoboken, v.82, n. 11, p.1390- 1398, 1995.

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DEROOSE, R.; PROFT, M. P. Flower Biology of Six Cultivars of the Bromeliaceae I. Pollen, Pistil, and Petal Appendages. **Selbyana**, Sarasota, v. 24, n.1, p.78-86, 2003.

WANDERLEY, M. G. L.; MELHEM, T. S. A. Flora polínica da reserva do parque estadual das fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). **Hoehnea**, São Paulo, v. 18, n.1, p. 4-41, 1991.

ZAMBON, C. R.; SILVA, L. F. O.; PIO, R.; FIGUEIREDO, M. A.; SILVA, K. N. Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 400-407, 2014.

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

ZHANG, W.; ZHAO, M.; FAN, J.; ZHOU, T.; CHEN, Y.; CAO, F. Study on relationship between pollen exine ornamentation pattern and germplasm evolution in flowering crabapple. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 39759, 2017.

ZULKARNAIN, Z.; ELIYANTI, E.; SWARI, E. I. Pollen viability and stigma receptivity in *Swainsona formosa* (G. Don) J. Thompson (Fabaceae), an ornamental legume native to Australia. **Ornamental Horticulture**, Viçosa, v. 25, p.158-167, 2019.

CAPÍTULO 2

SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÕES PARA USO ORNAMENTAL DE *Wittmackia* (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA

¹ Manuscrito a ser ajustado e submetido ao Periódico “Scientia Horticulturae”.

SISTEMAS REPRODUTIVOS E HIBRIDAÇÕES PARA USO ORNAMENTAL DE *Wittmackia* (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA

RESUMO: Bromeliaceae exibe uma vasta diversidade de sistemas reprodutivos, características florais e estratégias de polinização. A autocompatibilidade é amplamente relatada entre os representantes da família, assim como a ocorrência de autoincompatibilidade e sistemas de reprodução mistos, nos quais uma planta pode utilizar tanto a autofertilização quanto a polinização cruzada. A hibridação permite criar genótipos com novas combinações de formas e cores, desenvolvendo novos cultivares ornamentais em contextos de paisagismo e horticultura. O conhecimento da biologia reprodutiva é fundamental para assegurar a sobrevivência e o estabelecimento dos indivíduos, subsidiando planos de manejo e conservação. O presente estudo teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos e as possíveis hibridações interespecíficas, bem como avaliar as possíveis barreiras reprodutivas de 16 espécies de *Wittmackia*, por meio da avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo com o uso de microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Para a identificação dos sistemas reprodutivo, foram avaliadas polinizações controladas: polinização natural; autopolinização espontânea; autopolinização artificial; polinização cruzada e agamospermia. A estratégia reprodutiva foi determinada através do índice de autogamia, índice de autoincompatibilidade e eficiência reprodutiva. Mais de 65% das espécies estudadas apresentaram autoincompatibilidade, sendo algumas parcialmente autocompatíveis, mas com forte tendência à polinização cruzada. Não foi observada agamospermia. Para obter possíveis híbridos foram realizadas 713 hibridações interespecíficas em 84 diferentes combinações com 16 espécies, resultando na produção de 285 frutos em 44% das polinizações. Os principais eventos de autoincompatibilidade e incongruência identificados após cruzamentos incluem: baixa germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma; inibição do crescimento do tubo polínico no estigma; interrupção dos tubos polínicos ao longo do estilete com deposição de calose; enovelamento dos tubos polínicos no interior do ovário, entre outros. As sementes geradas nos diferentes sistemas reprodutivos e nas hibridações apresentaram porcentagem de germinação acima de 85%, evidenciado a ausência de barreiras pós-zigóticas e a alta viabilidade das sementes. Os resultados deste estudo contribuem significativamente para o conhecimento dos sistemas reprodutivos e para os estudos de hibridações em Bromeliaceae, podendo gerar híbridos/ cultivares potencialmente ornamentais e na reintrodução de plantas no ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Microscopia de fluorescência, sistema reprodutivo, barreiras reprodutivas, autoincompatibilidade.

REPRODUCTIVE SYSTEMS AND HYBRIDIZATION FOR ORNAMENTAL USE OF *Wittmackia* (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDEMIC TO BRAZIL AND OCCURRING IN ATLANTIC FOREST AREAS

ABSTRACT: Bromeliaceae exhibits a vast diversity of reproductive systems, floral characteristics, and pollination strategies. Self-compatibility is widely reported among representatives of the family, as well as the occurrence of self-incompatibility and mixed reproductive systems, in which a plant can use both self-fertilization and cross-pollination. Hybridization allows the creation of genotypes with new combinations of shapes and colors for the development of new ornamental cultivars for landscaping and horticulture contexts. Knowledge of reproductive biology is essential to ensure the survival and establishment of individuals, supporting management and conservation plans. The present study identifies the reproductive systems and possible interspecific hybridizations, as well as evaluates possible reproductive barriers of 16 species of *Wittmackia*, by evaluating pollen grain germination and pollen tube growth in the pistil using fluorescence microscopy with ultraviolet filtration. To identify the reproductive systems, controlled pollinations were carried out: natural pollination; spontaneous self-pollination; artificial self-pollination; cross-pollination and agamospermy. The reproductive strategy was determined through the autogamy index, self-incompatibility index and reproductive efficiency. More than 65% of the studied species presented self-incompatibility, some of which were partially self-compatible, but with a strong tendency to cross-pollination. No agamospermy was observed. To obtain possible hybrids, 713 interspecific hybridizations were performed in 84 different combinations with 16 species, resulting in the production of 285 fruits in 44% of the pollinations. The main self-incompatibility and incongruity events identified after crosses included: low germination of pollen grains on the stigma surface; inhibition of pollen tube growth in the stigma; interruption of pollen tube growth along the style with callose deposition; and coiling of pollen tubes inside the ovary, among other factors. The seeds generated in the different reproductive systems and in the hybridizations presented germination percentages above 85%, evidencing the absence of post-zygotic barriers and high seed viability. The results of this study contribute significantly to knowledge of reproductive systems and to hybridization studies of Bromeliaceae, and can help generate potentially ornamental hybrids/cultivars and support efforts to reintroduce species in the environment.

KEYWORDS: Fluorescence microscopy, reproductive system, reproductive barriers, self-incompatibility.

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é bem diversificada, composta por 3.780 espécies e 82 gêneros (Gouda e Butcher, 2024, atualização contínua). Essas espécies são amplamente encontradas na região neotropical, ocupando desde os ambientes mais áridos até os mais úmidos (Benzing, 2000). O Brasil se destaca como um dos maiores centros de diversidade dessa família, abrigando cerca de 40% de todas as espécies, distribuídas em todos os domínios fitogeográficos (Forzza et al., 2024).

O gênero *Wittmackia* Mez pertence à subfamília Bromelioideae, com origem principalmente na Mata Atlântica do nordeste do Brasil. Suas espécies são encontradas em florestas montanhosas úmidas no sul da Bahia ou de forma mais heterogênea em diferentes condições ambientais (Aguirre-Santoro et al., 2020). As espécies de *Wittmackia* apresentam uma taxa significativa de frutificação tanto por autogamia (autofecundação) quanto por alogamia (cruzamento), indicando que a frutificação em condições de polinização aberta é assegurada por uma autopolinização espontânea (Souza et al., 2017). Essa adaptabilidade permite que as espécies de *Wittmackia* prospere em uma ampla gama de habitats, desde ambientes florestais específicos e montanhosos até áreas mais variadas, expostas a diferentes condições ambientais.

A família Bromeliaceae exibe diferentes sistemas reprodutivos, características florais e estratégias de polinização (Benzing, 2000; Givnish et al., 2011; Souza et al., 2017). Entre os representantes da família, observa-se frequentemente a autocompatibilidade, em que uma planta pode se autofertilizar com sucesso. No entanto, também são encontrados inúmeros casos de autoincompatibilidade, em que a planta não pode se autofertilizar devido a barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas, dependendo da polinização cruzada para reprodução eficaz. Além disso, existem sistemas de reprodução mistos, nos quais uma planta pode utilizar tanto a autofertilização quanto a polinização cruzada, dependendo das condições ambientais e dos recursos disponíveis (Matallana et al., 2010; Souza et al., 2017; Lenzi e Paggi, 2019; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024). A agamospermia, processo de reprodução assexuada por meio do desenvolvimento de sementes sem fertilização, também é relatada em algumas espécies de Bromeliaceae (Souza et al., 2017; Cavalcante et al., 2020). Essa variedade de estratégias reprodutivas contribui significativamente para a adaptação das Bromeliaceae aos diferentes ambientes ecológicos que ocupam em todo o mundo.

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 genotípica, o que permite a criação de cultivares ou variedades com novas combinações de formas e cores (Vervaeke et al., 2002; 2003; 2004; Souza et al., 2011). Essa capacidade de hibridação não só promove a diversidade genética dentro das Bromeliaceae, mas também é explorada no desenvolvimento de novas cultivares ornamentais, contribuindo para uma maior atratividade dessa família de plantas em contextos de paisagismo e horticultura.

Em Bromeliaceae, já foram relatados híbridos naturais, principalmente nos os gêneros *Fosterella* L.B.Sm, *Pitcairnia* L'Hér., *Tillandsia* L., *Vriesea* Lindl., entre outros (Gardner, 1984; Luther 1984; Wendt et al., 2000; 2001; 2008; Sousa et al. 2003; Wagner et al., 2015; Zanella et al., 2016); assim como relatos de híbridos artificiais como em *Aechmea* Ruiz & Pav., *Ananas* Mill., *Lymania* Read., *Vrieseae*, entre outros (Samyn, 1995; Souza et al., 2011; 2017; Mota et al., 2023). Além disso, a Sociedade Internacional de Bromélias “*Bromeliad Society International*” (BSI, 2024) e o “*Journal of the Bromeliad Society*” registram mais de 600 híbridos em inúmeras espécies de mais de 35 gêneros da família. Contudo, considerando inúmeras combinações possíveis na família Bromeliaceae, são poucas as combinações já realizadas.

O tipo de sistema reprodutivo e o sucesso das hibridações podem ser confirmados pelo método da microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta utilizando azul de anilina, o que permite a visualização do crescimento do tubo polínico e identifica algumas formas de incompatibilidade ou incongruência (Bandeira et al., 2011; Souza et al., 2017). A microscopia de fluorescência facilita a identificação de autofertilização e polinização cruzada, além de ser essencial para estudos de hibridação em programas de melhoramento genético de plantas.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar os sistemas reprodutivos e as possíveis hibridações interespecíficas, bem como avaliar as possíveis barreiras reprodutivas de 16 espécies de *Wittmackia*, por meio da avaliação da germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo com o uso de microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. Os resultados apresentados são inéditos, uma vez que não há registros de estudos anteriores sobre hibridação em espécies do gênero *Wittmackia*.

MATERIAIS E MÉTODO

Foram estudadas 16 espécies de *Wittmackia* endêmicas do Brasil, coletadas em populações naturais na Mata Atlântica (Tabela 1 e Figura 1). As avaliações foram realizadas partes em campo, nas populações naturais (avaliação da polinização aberta e eficiência reprodutiva), e parte 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, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

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

As coletas foram realizadas conforme a autorização do SISBIO n. 69870-1 e todas as atividades estão devidamente cadastradas no SISGEN, sob a autorização A9E9F8D, em atendimento à legislação brasileira para espécies nativas. Exemplares de cada espécie coletada em diferentes localidades foram incorporados ao acervo do Herbário do Recôncavo da Bahia (HURB).

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

Espécies	Município de coleta na Bahia	HURB (voucher)	Endemismo	Status de Ameaça*
<i>W. amorimii</i>	Igrapiúna	30415	BA	NE
	Uruçuca	27808		
<i>W. bicolor</i>	Brejões	17903	BA	NE
	Uruçuca	30553		
<i>W. brasiliensis</i>	Arataca	26118	BA	NE
<i>W. burle-marxii</i>	Itacaré	23966	BA, MG	NE
<i>W. canaliculata</i>	Mutuípe	34898	BA	VU
	Uruçuca	22229		
<i>W. conduruensis</i>	Igrapiúna	32023	BA	CR
	Itacaré	27184		
<i>W. froesii</i>	Boa nova	32089	AL, BA, PE	NE
	Camacã	25958		
<i>W. guedesiae</i>	Igrapiúna	27182	BA	CR
<i>W. incompta</i>	Igrapiúna	31979	BA	NE
	Uruçuca	32825		
<i>W. ituberaensis</i>	Ituberá	30421	BA	NE
<i>W. limae</i>	Igrapiúna	31986	BA	NE
<i>W. laevigata</i>	Arataca	26402	BA	NE
	Santa Teresinha	24546		
<i>W. patentíssima</i>	Igrapiúna	32000	AL, BA, CE, MA, PB, PE, RN, SE, ES, RJ	NE
	Boa nova	32090		
	Uruçuca	29493		
<i>W. pendulispica</i>	Igrapiúna	30549	BA	NE
<i>W. turbinocalyx</i>	Uruçuca	27800	BA	CR

*SEMA (2017), IUCN (2024), Forzza et al. (2013); Leme et al. (2023). CR = Criticamente Ameaçada; VU = Vulnerável; NE = Não avaliada.

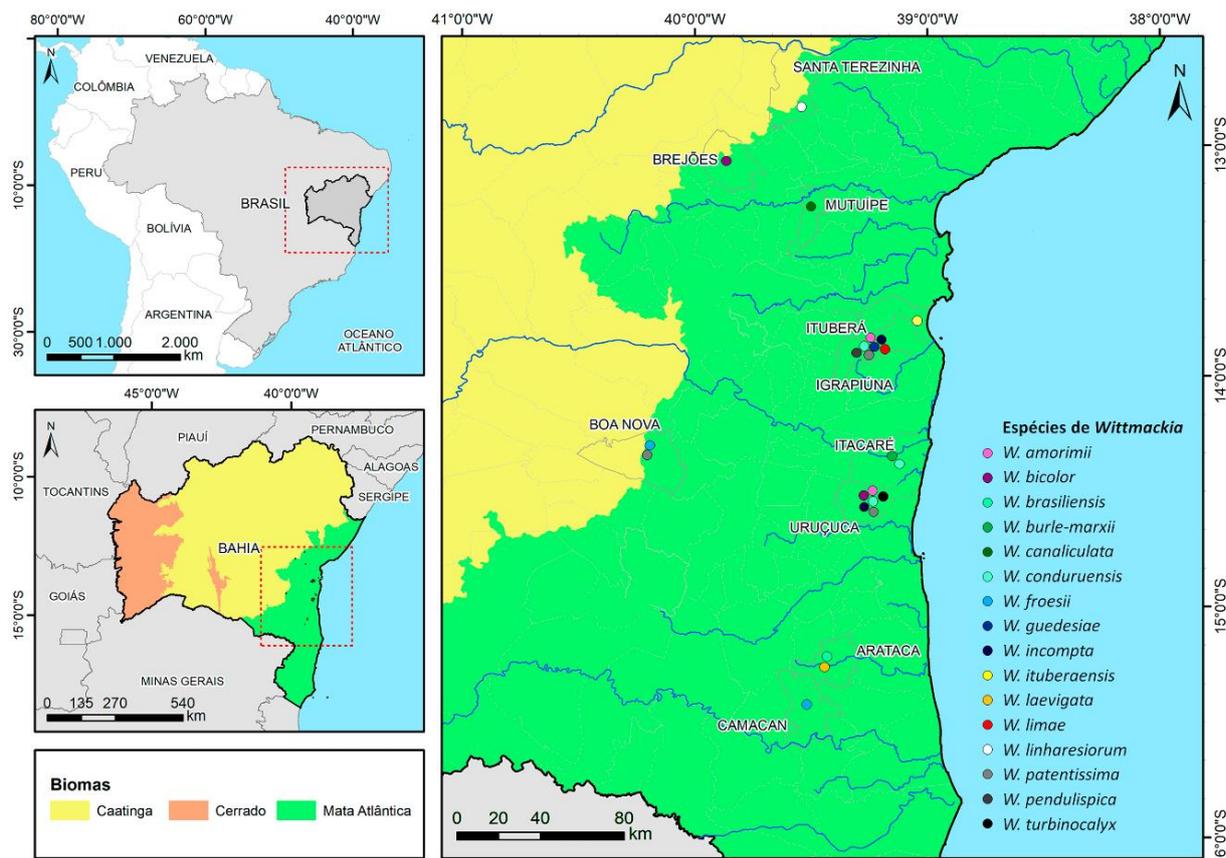


Figura 1. Mapa da Bahia com os respectivos pontos de estudo e coleta das espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) utilizadas nos experimentos reprodutivos.

Sistemas Reprodutivos

Para os sistemas reprodutivos das espécies de *Wittmackia*, foram realizadas as seguintes polinizações controladas e acompanhamento das polinizações naturais:

- Polinização natural: flores abertas em campo sem manipulação;
- Autopolinização espontânea: flores protegidas sem emasculação;
- Autopolinização artificial: flores polinizadas manualmente com grãos de pólen da mesma flor;
- Polinização cruzada (xenogamia): flores emasculadas previamente e subsequentemente polinizadas com grãos de pólen de outro indivíduo da mesma espécie;
- Agamospermia: emasculação das flores sem deposição de grãos de pólen no estigma.

As polinizações foram realizadas nas primeiras horas da manhã (6:00 – 7:30h), sob as mesmas condições de acordo com a disponibilidade de flores. Para cada

tratamento, foi utilizado um número diferente de flores, conforme indicado na Tabela 2. As flores foram etiquetadas com as informações de cada tratamento. A frutificação foi acompanhada semanalmente até a maturação dos frutos. Foram avaliadas a porcentagem de frutificação e o número de sementes por fruto. Para a polinização natural e para o cálculo da eficiência reprodutiva, plantas frutificadas foram coletadas e contabilizadas nas diferentes populações naturais.

Foram calculados os Índices de Autogamia (IA) dividindo-se o percentual de frutos formados em flores a partir da polinização espontânea pelo percentual de frutos formados em polinização cruzada. Considerou-se que as espécies são autógamas quando o índice de autogamia é superior a 0,30 (Ramirez e Brito, 1990). O índice de autoincompatibilidade (IAI) foi calculado dividindo o percentual de frutos formados por autopolinização manual pelo percentual de frutos formados em flores de polinização cruzada. Foram consideradas compatíveis ou parcialmente compatíveis as espécies com IAI superior a 0,30. Para espécies autoincompatíveis, o valor de IAI foi inferior a 0,30 (Ramirez e Brito, 1990).

A eficiência reprodutiva (EF) foi determinada pela porcentagem de frutos formados com sementes de polinização natural dividida pela porcentagem de frutos formados com sementes por polinização cruzada (Zapata e Arroyo, 1978). O índice mais próximo de 1 evidencia alta eficiência reprodutiva, índices mais próximos de 0 indicam baixa eficiência reprodutiva.

Hibridação interespecífica

Foram realizadas 713 hibridações interespecíficas envolvendo as 16 espécies de *Wittmackia* (Tabela 2). Nas plantas receptoras de grãos de pólen, as flores foram emasculadas e ensacadas em estágio de pré-antese, evitando-se assim 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 esse 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 o número de sementes por fruto produzidos em cada cruzamento, de acordo com Souza et al. (2017).

Desenvolvimento do tubo polínico no pistilo

Foram coletados cinco pistilos de cada sistema reprodutivo 24 horas após as polinizações, e fixados em solução Carnoy (3 partes de etanol 95% para 1 parte de ácido acético glacial) por 48 horas. Em seguida, os pistilos foram imersos em solução de sulfito de sódio a 10%, autoclavados a 120 °C por 20 minutos para clarificar e amolecer os tecidos. A coloração foi realizada com solução de azul de anilina (0,01%) em tampão de fosfato tribásico, deixando-se *overnight*. Para verificar a germinação dos grãos de pólen no estigma e o desenvolvimento dos tubos polínicos ao longo do pistilo, foi utilizado microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta (Martin, 1959; Souza et al., 2017). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51) equipado com câmera digital (Olympus DP175 Olympus, Tokyo, Japão), com filtro ultravioleta para detecção de fluorescência e verificar a presença de calose.

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) de 1 a 25 grãos de pólen; 2) de 25 a 50 grãos de pólen; 3) mais de 50 grãos de pólen.

Os óvulos fertilizados (OVFE) foram avaliados de acordo com a escala: 0) ausente; 1) de 1 a 5 óvulos; 2) de 5 a 10 óvulos; 3) mais de 10 óvulos.

O crescimento do tubo polínico no pistilo (CTPP) foi avaliado conforme adaptado de Souza et al. (2017) com a seguinte 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.

Germinação *in vitro* de sementes

Sementes maduras dos diferentes sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas de *Wittmackia* foram desinfestadas em etanol 70% por 5 minutos, solução de cloro ativo 1% de por 30 minutos, 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, sendo 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 ± 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 reprodutivo

Foram observados diferentes sistemas reprodutivos nas dezesseis espécies de *Wittmackia*, com a presença de alogamia em todas as espécies (Tabela 2). Mais de 65% das espécies de *Wittmackia* apresentaram autoincompatibilidade ($IAI < 0,30$), enquanto *W. burle-marxii*, *W. conduruensis*, *W. laevigata*, *W. limae*, *W. patentissima* foram parcialmente autocompatíveis com sistema misto, mas com forte tendência à polinização cruzada (Tabela 2). Não foi observada agamospermia em nenhuma das espécies de *Wittmackia* (Tabela 2, Figura 2). Para a autopolinização artificial, apenas seis espécies de *Wittmackia* apresentaram frutos com sementes, *W. burle-marxii*, *W. conduruensis*, *W. incompta*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. patentissima*, variando de 25% a 83% de frutos.

Tabela 2. Porcentagem de frutos com sementes e número de sementes produzidas nos diferentes sistemas reprodutivos de 16 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécies	Polinização natural	Autopolinização espontânea	Autopolinização artificial	Polinização cruzada	Agam.
*Frutos com sementes					
<i>W. amorimii</i>	100 (30/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	100 (30/30)	0 (0/10)
<i>W. bicolor</i>	100 (20/20)	0 (0/28)	0 (0/22)	100 (22/22)	0 (0/10)
<i>W. brasiliensis</i>	100 (12/12)	0 (0/10)	0 (0/10)	70 (7/10)	0 (0/10)
<i>W. burle-marxii</i>	93 (28/30)	10 (3/30)	30 (10/30)	100 (30/30)	0 (0/10)
<i>W. canaliculata</i>	100 (12/12)	0 (0/10)	0 (0/10)	100 (20/20)	0 (0/10)
<i>W. conduruensis</i>	100 (18/18)	0 (0/20)	25 (5/20)	75 (18/24)	0 (0/10)
<i>W. froesii</i>	70 (21/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	93 (28/30)	0 (0/10)
<i>W. guedesiae</i>	100 (9/9)	0 (0/20)	0 (0/20)	100 (20/20)	0 (0/10)
<i>W. incompta</i>	83 (25/30)	0 (0/30)	20 (6/30)	100 (30/30)	0 (0/10)
<i>W. ituberaensis</i>	100 (30/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	83 (25/30)	0 (0/10)
<i>W. laevigata</i>	67 (12/18)	23 (7/30)	50 (15/30)	100 (30/30)	0 (0/10)
<i>W. limae</i>	50 (15/30)	6 (2/30)	30 (9/30)	100 (30/30)	0 (0/10)
<i>W. linharesiorum</i>	100 (50/50)	0 (0/30)	0 (0/30)	90 (27/30)	0 (0/10)
<i>W. patentíssima</i>	87 (26/30)	70 (21/30)	83 (25/30)	100 (30/30)	0 (0/30)
<i>W. pendulispica</i>	100 (30/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	97(29/30)	0 (0/10)
<i>W. turbinocalyx</i>	83 (25/30)	0 (0/20)	0 (0/30)	93(28/30)	0 (0/10)
Sementes produzidas**					
<i>W. amorimii</i>	279,17 ± 25,68 (250/312)	0	0	199,25 ± 25,17 (162/235)	0
<i>W. bicolor</i>	118,89 ± 35,13 (68/184)	0	0	122,32 ± 41,21 (40/112)	0
<i>W. brasiliensis</i>	87,83 ± 13,08 (59/102)	0	0	75,00 ± 29,06 (42/119)	0
<i>W. burle-marxii</i>	59,03 ± 13,20 (36/90)	16,00 ± 1,63 (14/18)	75,40 ± 7,66 (56/82)	74,77 ± 26,87 (30/110)	0
<i>W. canaliculata</i>	258,83 ± 32,55 (213/301)	0	0	243,30 ± 41,60 (174/300)	0
<i>W. conduruensis</i>	153,33 ± 14,31 (51/234)	0	8,40 ± 2,07 (6/11)	132,79 ± 15,40 (102/157)	0
<i>W. froesii</i>	66,28 ± 16,72 (40/98)	0	0	64,76 ± 17,90 (30/85)	0
<i>W. guedesiae</i>	91,67 ± 10,25 (75/108)	0	0	100,00 ± 6,60 (90/110)	0
<i>W. incompta</i>	68,27 ± 6,33 (44/76)	0	8,16 ± 1,77 (6/11)	52,54 ± 16,92 (22/90)	0
<i>W. ituberaensis</i>	135,38 ± 16,84 (112/164)	0	0	136,73 ± 24,56 (62/152)	0
<i>W. laevigata</i>	147,27 ± 22,14 (135/180)	72,85 ± 12,53 (60/90)	98,00 ± 9,76 (70/120)	146,82 ± 40,25 (96/224)	0
<i>W. limae</i>	61,37 ± 7,98 (55/70)	5,50 ± 0,50 (5/6)	17,04 ± 2,15 (15/20)	47,96 ± 9,88 (36/61)	0
<i>W. linharesiorum</i>	145,73 ± 24,10 (105/175)	0	0	131,40 ± 26,94 (90/150)	0
<i>W. patentíssima</i>	39,27 ± 1,69 (35/41)	8,40 ± 1,01 (7/10)	13,54 ± 1,67 (11/16)	40,90 ± 8,14 (31/50)	0
<i>W. pendulispica</i>	145,75 ± 6,34 (135/150)	0	0	114,64 ± 31,68 (90/150)	0
<i>W. turbinocalyx</i>	117,33 ± 49,75 (24/180)	0	0	90,89 ± 7,08 (80/105)	0

	IA	IAI	EF	Sistema reprodutivo
<i>W. amorimii</i>	0,00	0,00	1,00	AI – Autoincompatível
<i>W. bicolor</i>	0,00	0,00	1,00	AI – Autoincompatível
<i>W. brasiliensis</i>	0,00	0,00	1,43	AI – Autoincompatível
<i>W. burle-marxii</i>	0,10	0,30	0,93	AC – Parcialmente autocompatível
<i>W. canaliculata</i>	0,00	0,00	1,00	AI – Autoincompatível
<i>W. conduruensis</i>	0,00	0,33	1,33	AC – Parcialmente autocompatível
<i>W. froesii</i>	0,00	0,00	0,75	AI – Autoincompatível
<i>W. guedesiae</i>	0,00	0,00	1,00	AI – Autoincompatível
<i>W. incompta</i>	0,00	0,20	0,83	AI – Autoincompatível
<i>W. ituberaensis</i>	0,00	0,00	1,20	AI – Autoincompatível
<i>W. laevigata</i>	0,23	0,50	0,67	AC – Parcialmente autocompatível
<i>W. limae</i>	0,06	0,30	0,50	AC – Parcialmente autocompatível
<i>W. linharesiorum</i>	0,00	0,00	1,11	AI – Autoincompatível
<i>W. patentíssima</i>	0,70	0,83	0,87	AC – Parcialmente autocompatível
<i>W. pendulispica</i>	0,00	0,00	1,03	AI – Autoincompatível
<i>W. turbinocalyx</i>	0,00	0,00	0,89	AI – Autoincompatível

*Porcentagem de frutos produzidos: número de frutos produzidos/ número de flores utilizadas. **Média ± desvio padrão de sementes obtidas por flor: (menor número de sementes por fruto/ maior número de sementes por fruto). 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 inferior a 0,30). AC = parcialmente autocompatível (IAI acima de 0,30).

A família Bromeliaceae apresenta uma variedade de sistemas reprodutivos, incluindo autogamia, alogamia, cleistogamia, agamospermia, ou sistemas de reprodução mistos (Gilmartin e Brown, 1985; Souza et al., 2017; Cavalcante, 2020; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024). Além disso, a maioria das espécies se propagam por mudas laterais ou estolões (Benzing, 2000).

Embora se acredite que a alogamia seja o sistema reprodutivo basal em Bromeliaceae (Givnish et al., 2007; Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024), inúmeras espécies autocompatíveis são relatadas na literatura, principalmente nas subfamílias Pitcairnioideae e Tillandsioideae (Cascante-Marín; Núñez-Hidalgo, 2023), como também em algumas Bromelioideae, como *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker ex. Benth. & Hook.f., *Aechmea distichantha* Lem., *Ananas macrodentes* E. Morren, *Wittmackia patentissima* (Mart. ex Schult. & Schult.f.) Mez, *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez, e *Lymania smith* Read (Wolowski et al., 2013; Souza et al., 2017; Cavalcante et al., 2020; Mota et al., 2023).

A autoincompatibilidade é um mecanismo genético e fisiológico que promove a alogamia, por não permitir a fecundação dos óvulos por autozigose, enquanto a autocompatibilidade permite que a espécie genitora seja compatível consigo mesma, levando à não rejeição de seus próprios grãos de pólen (Barrett, 2003). No entanto, as espécies podem ser autoincompatíveis e apresentar certo nível de compatibilidade, ou vice-versa como observado no atual estudo em algumas espécies de *Wittmackia*, assim como em estudos recentes (Souza et al., 2017; Cavalcante et al., 2020; Mota et al., 2023).

Foi observado que todos os frutos apresentaram sementes em polinização natural em todas as espécies, variando em 67% (*W. laevigata*) a 100% em metade das espécies (Tabela 2). Apenas *W. limae* apresentou 50% de frutos formados com sementes (Tabela 2). É importante destacar que as espécies de *Wittmackia* apresentam partenocarpia, sendo os frutos contabilizados apenas na presença de sementes.

A partenocarpia é o desenvolvimento de frutos sem sementes a partir do ovário, sem que tenha ocorrido a fecundação (Backiyarani et al., 2021), e já foi relatada na família Bromeliaceae nos gêneros *Aechmea* Ruiz & Pav. (Lenzi, et al., 2006), *Werauhia* J.R.Grant. (Cascante-Marín et al., 2019) e *Lymania* R.W.Read (Mota et al., 2023). A ocorrência da partenocarpia pode estar relacionada a problemas fisiológicos das plantas, à defesa dos frutos férteis contra predadores ou à ineficiência de

polinizadores (Werpachowski et al., 2004; Zangerl et al., 1991; Backiyarani et al., 2021).

Durante a polinização natural, a formação de frutos com sementes está relacionada à eficiência do polinizador, possibilitando novas combinações genéticas e fortalecendo a resiliência das espécies em condições adversas, promovendo assim a evolução de suas populações (Barrett, 2010). Alguns aspectos podem influenciar no tipo de sistema reprodutivo ou polinizador efetivo de uma espécie, como, por exemplo, a morfologia floral. Espécies de *Wittmackia* apresentam flores alvas de corola curta, algumas perfumadas, flores coplanares pouco vistosas, pétalas alvacentas ou raramente verdes, sugerindo melitofilia (polinização por abelhas) (Aguirre-Santoro, 2017).

As abelhas são frequentemente observadas visitando uma ampla diversidade de Bromeliaceae, tanto como oportunistas quanto como polinizadoras efetivas (Benzing, 2000; Araújo et al., 2004; Rios et al., 2010; Givnish et al., 2014; Bastos et al., 2017). No entanto, em *Wittmackia*, é reconhecida a necessidade de estudos sobre os visitantes florais para elucidar essa teoria. Durante os estudos de eficiência reprodutiva e coleta de espécimes, observou-se uma grande quantidade de abelhas de forma não sistematizada, principalmente *Apis mellifera* Linnaeus (1758), além de diversas espécies nativas como *Trigona spinipes* Fabricius (1793) e *Melipona scutellaris* Latreille (1811).

O sucesso na polinização natural em espécies de *Wittmackia* sugere uma alta eficiência dos agentes polinizadores nos fragmentos florestais estudados no sul da Bahia, considerando que a eficiência reprodutiva foi superior a 0,83 em todas as espécies, chegando 1,42 em *W. amorimii* (Tabela 2).

Em um estudo conduzido por Mota et al. (2023) com *Lymania globosa*, foi observado que a espécie apresentou 100% de frutos com sementes no fragmento florestal da Reserva Ecológica da Michelin, Igrapiúna, Bahia e nenhum fruto com sementes no Parque Estadual da Serra do Conduru, Uruçuca, Bahia. Esse fato evidencia a importância dos polinizadores para a reprodução e formação de frutos com sementes, especialmente em espécies que são autoincompatíveis.

Em autopolinização espontânea, foi observada a formação de frutos com sementes nas espécies *Wittmackia burle-marxii*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. patentissima*, variando de 6% a 70% de sucesso na formação de frutos com sementes (Tabela 2). Para que ocorra a autopolinização espontânea, os grãos de pólen

precisam cair sobre o estigma da mesma flor que os originou, resultando na autofecundação (Shivanna, 2015). Dessa forma, as anteras precisam estar na mesma altura e em contato com a superfície das papilas estigmáticas.

Todas as espécies estudadas possuem esse alinhamento, exceto a *W. amorimii*, onde o estigma está localizado acima das anteras, ocorrendo assim uma barreira física denominada de hercogamia.

Hercogamia é uma estratégia reprodutiva em que as peças florais (androceu e gineceu) têm comprimentos desiguais, dificultando a deposição dos grãos de pólen no estigma da mesma flor. Isso promove a polinização cruzada e, conseqüentemente, a troca de material genético (Souza et al., 2017; Cascante-Marín e Núñez-Hidalgo, 2023; Mota et al., 2023).

O estudo conduzido por Cascante-Marín e Núñez-Hidalgo (2023) realizou uma revisão sistemática dos mecanismos de melhoramento genético em Bromeliaceae, identificando espécies hercogâmicas em todas as subfamílias. Nessas espécies, a hercogamia reduz a capacidade de autofecundação devido a barreira espacial.

A polinização cruzada é considerada importante para a manutenção das espécies no ambiente, promovendo o fluxo gênico entre os indivíduos e aumentando a variabilidade genética (Vosgueritchian e Buzato, 2006). Como resultado da polinização cruzada, observou-se que 100% das espécies formaram frutos com número de sementes próximo ao da polinização natural e superiores aos demais sistemas reprodutivos (Tabela 2).

Verificou-se as espécies parcialmente autocompatíveis habitam diferentes locais em diferentes ambientes, desde de regiões montanhosas até florestas tropicais. Por exemplo, *W. burle-marxii* possui distribuição na Bahia e Minas Gerais, enquanto *W. patentissima* ocorre em Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará, Espírito Santos e Rio Grande do Norte. Dessa forma, sugere-se que mesmo na ausência de polinizadores, há produção de sementes e, conseqüentemente, maior possibilidade de dispersão dessas espécies.

Espécies autocompatíveis ou parcialmente autocompatíveis demonstram que a capacidade de autofertilização aumenta as chances de sucesso reprodutivo, como observado em *Vriesea gigantea* Gaudich (Paggi et al., 2015), *Aechmea bromeliifolia* Baker ex Benth. & Hoo. F.K, *A. distichantha* Lem., *Ananas macrodentes* E. Morren, (Souza, et al., 2017), *Wittmackia patentissima* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Cavalcante et al., 2020), *Lymania smithii* Read (Mota et al., 2023) e *Dyckia dissitiflora* Schult.f.

(Fagundes et al. 2024). A autofertilização também impede a deposição dos grãos de pólen heteroespecíficos no gineceu, pois a superfície do estigma se encontra parcial ou totalmente coberta pelos próprios grãos de pólen (Schifino-Wittmann; Dall Agnol, 2002; Anderson, 2012). Embora algumas espécies de *Wittmackia* apresentem-se como parcialmente autocompatíveis, a alogamia é o sistema reprodutivo principal no gênero (Souza et al., 2017; Cavalcante et al., 2020).

O conhecimento dos modos de reprodução é importante para implementações de conservação, seja ela *in situ* ou *ex situ*. A identificação de populações de espécies autoincompatíveis e com maior variação genética pode auxiliar na designação de áreas prioritárias para a conservação (Moritz, 1994). Dessa forma, estudos dos sistemas reprodutivos em *Wittmackia* podem contribuir com o manejo das espécies que merecem atenção especial, fornecendo matrizes para conservação *in situ* por meio do desenvolvimento de unidades de conservação ou reintrodução de espécies ameaçadas no ambiente.

Além disso, estudos com espécies alógamas com períodos de floração assíncronos podem subsidiar a conservação *ex situ* do material genético, com armazenamento dos grãos de pólen em baixas e ultrabaixas temperaturas, contribuindo para futuros cruzamentos controlados (Souza et al., 2017).

Desenvolvimento do tubo polínico no pistilo nos diferentes sistemas reprodutivos

Foram observados diferentes eventos no desenvolvimento do tubo polínico no pistilo, caracterizando a autoincompatibilidade como barreiras pré-zigóticas nas diferentes espécies de *Wittmackia* (Tabela 3, Figura 2). Diversos estudos relatam barreiras pré-zigóticas e pós-zigóticas presentes em Bromeliaceae (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024). Barreiras pré-zigóticas ocorrem pela incapacidade de germinação do grão de pólen no estigma, ou pela inibição do tubo polínico no estilete (Vervaeke et al., 2002), enquanto a ocorrência de barreiras pós-zigóticas resultam na não fertilização ou no aborto do embrião em diferentes fases do desenvolvimento (Vervaeke et al., 2001).

Tabela 3. Avaliação quanto à germinação dos grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos no pistilo nos diferentes sistemas reprodutivos de 16 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas da Bahia e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécies	Polinização natural				Autopolinização natural				
	GPSE	GPGE	CTPP	OTPM	GPSE	GPGE	CTPP	OTPM	
<i>W. amorimii</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	
<i>W. bicolor</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	
<i>W. brasiliensis</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (100%)	
<i>W. burle-marxii</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (20%) 5 (80%)	1 (30%) 0 (70%)	
<i>W. canaliculata</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	
<i>W. conduruensis</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	
<i>W. froesii</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	2 (30%) 3 (70%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	
<i>W. guedesiae</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	5 (20%) 1 (80%)	0 (100%)	
<i>W. incompta</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	2 (10%) 3 (90%)	3 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	
<i>W. ituberaensis</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	
<i>W. laevigata</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	1 (20%) 2 (20%) 3 (60%)	3 (100%)	3 (100%)	5 (40%) 7 (60%)	0 (40%) 2 (60%)	
<i>W. limae</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	1 (30%) 2 (20%) 3 (50%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (40%) 5 (60%)	1 (20%) 0 (80%)	
<i>W. linharesiorum</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	0 (100%)	
<i>W. patentíssima</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	1 (10%) 3 (90%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (60%) 5 (40%)	1 (25%) 0 (75%)	
<i>W. pendulispica</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	3 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	5 (100%)	0 (100%)	
<i>W. turbinocalyx</i>	3 (100%)	3 (100%)	7(100%)	2 (10%) 3 (90%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	
		Autopolinização artificial				Polinização Cruzada			
<i>W. amorimii</i>	3 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	3 (100%)	
<i>W. bicolor</i>	3 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	7 (100%)	3 (100%)	
<i>W. brasiliensis</i>	3 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	2 (80%) 3 (20%)	
<i>W. burle-marxii</i>	3 (100%)	3 (100%)	1 (45%) 7 (55%)	0 (40%) 3 (60%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	2 (75%) 3 (25%)	

<i>W. canaliculata</i>	3 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	3 (100%)
<i>W. conduruensis</i>	3 (100%)	3 (100%)	7 (40%) 1 (60%)	2 (30%) 0 (70%)	2 (100%)	2 (100%)	7 (100%)	3 (100%)
<i>W. froesii</i>	3 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	6 (10%) 7 (90%)	3 (75%) 1 (25%)
<i>W. guedesiae</i>	3 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	3 (100%)
<i>W. incompta</i>	3 (100%)	3 (100%)	7 (35%) 5 (65%)	2 (30%) 0 (70%)	3 (100%)	3 (100%)	6 (20%) 7 (80%)	2 (70%) 1 (30%)
<i>W. ituberaensis</i>	1 (30%) 3 (70%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	2 (100%)
<i>W. laevigata</i>	3 (100%)	3 (100%)	5 (30%) 7 (70%)	0 (35%) 3 (65%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	2 (100%)
<i>W. limae</i>	3 (100%)	3 (100%)	1 (50%) 7 (50%)	0 (40%) 3 (50%)	3 (100%)	3 (100%)	6 (40%) 7 (60%)	2 (65%) 1 (35%)
<i>W. linharesiorum</i>	3 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	2 (100%)
<i>W. patentíssima</i>	3 (100%)	3 (100%)	5 (20%) 7 (80%)	0 (50%) 3 (50%)	3 (100%)	1 (100%)	6 (30%) 7 (70%)	2 (60%) 1 (40%)
<i>W. pendulispica</i>	3 (100%)	2 (100%)	5 (100%)	0 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	1 (100%)
<i>W. turbinocalyx</i>	3 (50%) 2 (50%)	2 (100%)	1 (100%)	0 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	7 (100%)	1 (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

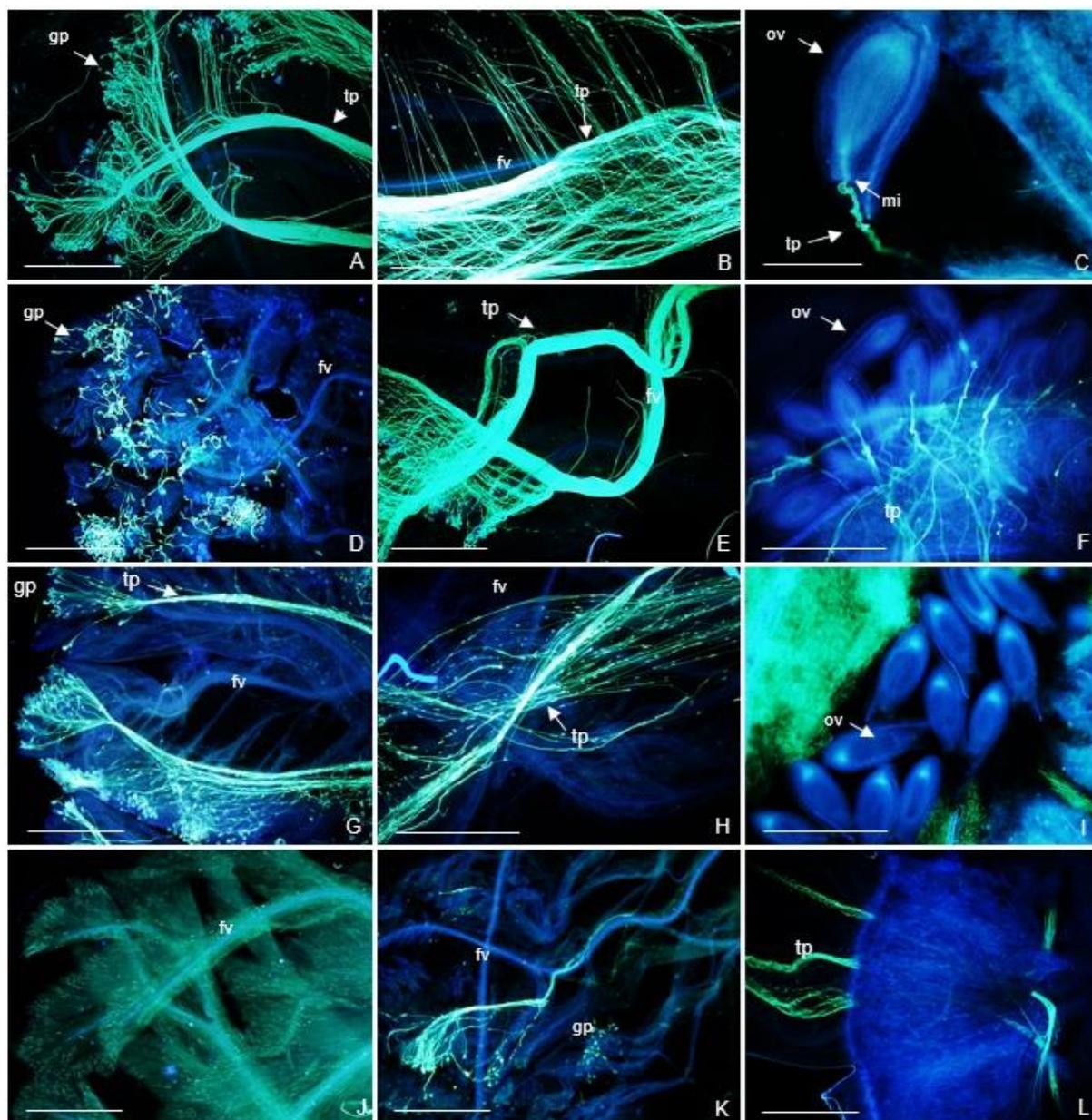


Figura 2. Crescimento do tubo polínico após polinizações no estigma observado através da microscopia de fluorescência em pistilos tratados com solução de azul de anilina no gênero *Wittmackia* Mez (Bromeliaceae). A) *Wittmackia froesii* evidenciando uma grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma em autopolinização artificial; B) *W. limae* evidenciando os tubos polínicos em autopolinização espontânea; C) *W. laevigata* evidenciando a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização em autopolinização espontânea; D) *W. turbinocalyx* evidenciando paralisação do tubo polínico no primeiro terço do estigma em autopolinização artificial; E) *W. conduruensis* evidenciando os tubos polínicos distribuídos em feixes em autopolinização artificial; F) *W. patentissima* evidenciando a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na fertilização em autopolinização artificial G) *W. ituberaensis* evidenciando uma grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma em polinização cruzada; H) *W. patentissima* evidenciando os tubos polínicos em polinização cruzada; I) *W. bicolor* evidenciando o óvulo sem a penetração do tubo polínico na micrópila em agamospermia. J) *W. amorimii* evidenciando a ausência de grãos de pólen na superfície do estigma na autopolinização espontânea; K) *W.*

linharesiorum evidenciando paralisação do tubo polínico do primeiro terço do estilete com deposição de calose na ponta dos tubos polínicos em autopolinização artificial; L) *W. incompta* evidenciando tudo polínico no vário em autopolinização artificial. gp=grão de pólen; tp=tubo polínico; fv=feixe vascular; ov=óvulo; mi=micrópila. Barras: C=500 µm; B, E, F, H, I=200 µm; A, D, G, J, K, L=1 mm.

Na autopolinização espontânea, houve pouca deposição de grãos de pólen na maioria das espécies estudadas, exceto em *Wittmackia amorimii*, onde não foi observada nenhuma deposição de grãos de pólen na superfície do estigma (Tabela 3, Figura 2J). Vale destacar que *W. amorimii* apresenta “heterostilia” (gineceu longos e androceu curtos) (morfo longistilo) (Barret, 1992; 2019).

Por meio da microscopia de fluorescência, foi observada a penetração dos tubos polínicos na micrópila dos óvulos nas espécies *W. burle-marxii*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. patentissima* (Tabela 3, Figura 2, C). Esses resultados corroboram com os dados apresentados na Tabela 2 referentes aos sistemas reprodutivos e à formação de sementes em autopolinização espontânea.

Os estudos de Mota et al. (2024) sobre sistemas reprodutivos e hibridações em oito espécies de *Lymania* observaram a ausência de grãos de pólen no estigma em *L. azurea* Leme, utilizando a mesma técnica de fluorescência, uma espécie com o mesmo tipo de hercogamia.

Na autopolinização artificial, as polinizações foram eficientes, resultando em maior deposição de grão de pólen na superfície do estigma (Figura 2A). No entanto, a simples deposição dos grãos de pólen não garante a fertilização e a produção de sementes, uma vez que diversas barreiras reprodutivas podem ocorrer ao longo do pistilo (Souza et al., 2017).

A autoincompatibilidade foi observada na superfície estigmática em mais de 40% dos pistilos estudados, evidenciando uma barreira pré-zigótica que impede a autofecundação, como observado em *W. turbinocalyx* (Figura 2D). Foram observados tubos polínicos paralisados no primeiro terço do estilete, com deposição reticulada de calose nas espécies *W. bicolor* e *W. linharesiorum* (Figura 2K), além de tubos polínicos na região do ovário sem penetração na micrópila nas espécies *W. laevigata*, *W. pendulispica* e em 65% dos pistilos de *W. incompta* (Figura 2L).

Autocompatibilidade foi observado nas espécies *W. burle-marxii*, *W. conduruensis*, *W. incompta*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. patentissima* com penetração dos tubos polínicos na micrópila em até 80% dos pistilos (Figura 2F).

O sistema reprodutivo com maior sucesso (100%) foi a polinização cruzada, onde todas as espécies apresentaram tubos polínicos penetrando na micrópila, ou tubos polínicos próximo ao óvulo sem penetração na micrópila. Em agamospermia, não houve deposição de grãos de pólen na superfície do estigma, confirmando a eficiência da emasculação das flores.

Os principais eventos observados na autopolinização em *Wittmackia* assemelham-se ao tipo de incompatibilidade gametofítica, que envolve a germinação dos grãos de pólen e a sua paralisação na superfície do estigma ou no interior do estilete. Em contraste, na incompatibilidade esporofítica, os grãos de pólen interrompem seu crescimento logo após a germinação na própria superfície do estigma (Levin, 1971; Schifino-Wittmann e Dall Agnol, 2002; Souza et al., 2017).

Acredita-se que, a incompatibilidade gametofítica seja a principal barreira reprodutiva nas espécies de Bromeliaceae, além de ser um dos fatores responsáveis pela dificuldade na produção de sementes (Benzing, 2000; Souza et al., 2017). A autoincompatibilidade gametofítica tem sido descrita como uma estratégia reprodutiva importante para evitar a depressão por endogamia, promover heterozigosidade e diversidade genética, e assim permitir a sobrevivência e adaptação das espécies em diferentes ambientes ao longo do tempo (Charlesworth, 2006).

Hibridação interespecífica

Foram realizadas 713 hibridações controladas em 84 diferentes combinações em 16 espécies de *Wittmackia* (Tabela 4). O sucesso obtido nas hibridações corresponde a 44%, sendo 54 frutos em *W. bicolor*, 44 frutos em *W. incompta*, 30 frutos em *W. linharesiorum* e *W. patentissima*, 25 frutos em *W. pendulispica* (Tabela 4). Vale destacar que só foram contabilizados os frutos com sementes.

Incongruência foram observadas em 41 combinações, sendo 18 recíprocas: *W. brasiliensis* ⇔ *W. burle-marxii*, *W. burle-marxii* ⇔ *W. turbinocalyx*, *W. froesii* ⇔ *W. incompta*, *W. froesii* ⇔ *W. ituberaensis*, *W. incompta* ⇔ *W. patentissima*, *W. incompta* ⇔ *W. pendulispica*, *W. ituberaensis* ⇔ *W. linharesiorum*, *W. linharesiorum* ⇔ *W. pendulispica* e *W. turbinocalyx* ⇔ *W. linharesiorum* (Tabela 4).

Entre espécies próximas morfologicamente foi observado 100% de sucesso com formação de frutos com sementes, como em *W. laevigata* ⇔ *W. canaliculata*, *W. bicolor* ⇔ *W. pendulispica*, *W. sulbahianensis* ⇔ *W. froesii*, *W. ituberaensis* ⇔ *W. conduruensis* e *W. linharesiorum* ⇔ *W. incompta* (Tabela 4). De acordo com Teixeira

et al. (2016) a semelhança da morfologia floral, sobreposição de floração são mecanismos que proporcionam o processo de hibridação entre as espécies.

Entre as hibridações de sucesso, o maior número de sementes geradas foi para combinações com espécies morfologicamente próximas, como em *W. canaliculata* x *W. laevigata* com 251 sementes por fruto, enquanto valores inferiores foram observados em combinações com espécies mais distintas morfologicamente, como *W. turbinocalyx* x *W. pendulispica* com média 3 sementes por fruto, seguido por *W. turbinocalyx* x *W. froesii* com média de 3,3 sementes por fruto (Tabela 4).

Vale ressaltar, que as diferenças morfológicas nesse gênero estão relacionadas principalmente com a cor das sépalas, tipo de inflorescência e tamanho das flores. De maneira geral, grande parte das flores de *Wittmackia* são morfologicamente parecidas, principalmente com relação aos órgãos reprodutivos; tamanho do grão de pólen (médio), tipos de estigmas (conduplicado-espiral papiloso), entre outros.

Em estudos filogenéticos realizados por Aguirre-Santoro et al. (2016) espécies pertencentes à *Hohenbergia* subg. *Wittmackiopsis* passou a compreender o gênero *Wittmackia*, juntamente com espécies de *Aechmea* e *Ronnbergia* que são endêmicas da Mata Atlântica central do sudeste do Brasil. Dessa forma, o gênero *Wittmackia* apresenta as espécies do complexo *Aechmea lingulata* (Linnaeus) Baker e *Hohenbergia* subg. *Wittmackiopsis*, com alto suporte filogenético e grande similaridade de características florais (Aguirre-Santoro et al. 2016). Esse fato demonstra que, além das similaridades morfológicas (estames, carpelo, frutos, entre outros) (Aguirre-Santoro, 2017), as espécies de *Wittmackia* endêmicas da Mata Atlântica apresentam relações filogenéticas próximas a partir também de dados moleculares.

Tabela 4. Híbridações interespecíficas de 16 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas da Bahia e ocorrentes na Mata Atlântica.

♀ \ ♂																
	<i>W. amorimii</i>	<i>W. bicolor</i>	<i>W. brasiliensis</i>	<i>W. burle-marxii</i>	<i>W. canaliculata</i>	<i>W. conduruensis</i>	<i>W. froesii</i>	<i>W. incompta</i>	<i>W. ituberaensis</i>	<i>W. laevigata</i>	<i>W. limae</i>	<i>W. linharesiorum</i>	<i>W. patentissima</i>	<i>W. pendulispica</i>	<i>W. sulbahianensis</i>	<i>W. turbinocalyx</i>
<i>W. amorimii</i>	*	-	-	-	-	0/6	-	-	-	-	-	-	-	0/5	-	-
<i>W. bicolor</i>	0/10	*	-	-	0/6	-	-	9/9 (23,3 s)	-	7/9 (68 s)	-	0/5	-	7/7 (129 s)	-	-
<i>W. brasiliensis</i>	-	10/10 (62 s)	*	3/9 (13 s)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. burle-marxii</i>	-	-	3/9 (8,6 s)	*	-	3/9 (10,3 s)	0/6	-	0/9	-	-	0/9	9/9 (9,3 s)	0/6	-	6/6 (39 s)
<i>W. canaliculata</i>	-	12/12 (75 s)	-	-	*	-	-	-	-	5/5 (251 s)	-	-	-	-	-	-
<i>W. conduruensis</i>	0/10	-	-	0/9	-	*	-	-	6/6 (138 s)	-	-	-	-	0/9	-	0/9
<i>W. froesii</i>	-	-	-	0/9	0/9	-	*	6/8 (101 s)	0/7	-	-	03/9 (19,6 s)	-	-	-	-
<i>W. incompta</i>	-	0/9	9/9 (6,3 s)	-	-	-	8/10 (68 s)	*	-	0/9	0/5	9/9 (23,9 s)	3/9 (76 s)	3/9 (10 s)	-	0/9
<i>W. ituberaensis</i>	0/12	-	-	3/9 (128 s)	-	8/8 (132 s)	0/5	-	*	-	-	3/9 (131 s)	-	0/6	4/4 (135 s)	*
<i>W. laevigata</i>	-	0/9	-	-	-	-	-	0/9	-	*	-	-	-	-	-	-
<i>W. limae</i>	-	3/9 (62 s)	-	-	-	-	-	3/9 (12 s)	-	-	*	-	9/9 (9 s)	-	-	-
<i>W. linharesiorum</i>	-	3/9 (5,6 s)	-	0/5	-	0/6	0/9	9/9 (33 s)	6/9 (30 s)	0/6	0/5	*	9/9 (16,2 s)	9/9 (15,1 s)	-	4/6 (12 s)
<i>W. patentissima</i>	-	0/12	-	0/7	-	-	-	8/10 (28 s)	-	0/9	0/9	0/9	*	0/9	-	-
<i>W. pendulispica</i>	-	18/18 (128 s)	-	0/9	-	0/9	-	9/9 (7,1 s)	6/9 (30 s)	-	-	6/9 (17,3 s)	0/9	*	-	0/9
<i>W. sulbahianensis</i>	-	8/8 (58 s)	-	-	-	-	6/6 (166 s)	-	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>W. turbinocalyx</i>	-	-	-	9/9 (136,6 s)	-	0/9	6/9 (3,3 s)	0/9	-	-	-	9/9 (39,2 s)	-	6/9 (3 s)	-	*

Número de frutos colhidos com sementes / número de polinizações realizadas / (Número médio de sementes por fruto).
Em cinza (sucessos em híbridações interespecíficas).

Desenvolvimento do tubo polínico no pistilo nas diferentes hibridações

A incongruência entre as espécies de *Wittmackia* pode ser observada e confirmada pela microscopia de fluorescência com azul de anilina, através da observação do tubo polínico no pistilo (Figura 3).

Alguns dos fenômenos observado que impediram a penetração dos tubos polínicos na micrópila foram: grão de pólen sem germinação na superfície do estigma (*W. limae* x *W. bicolor*, *W. linharesiorum* x *W. froesii*, *W. froesii* x *burle-marxii*, *W. turbinocalyx* x *W. conduruensis*, *W. linhasiorum* x *W. conduruensis*) (Figura 3D); tubo polínico com paralisação no terceiro terço do estilete com deposição irregular de calose (*W. burle-marxii* x *W. froesii*, *W. burle-marxii* x *W. pendulispica*, *W. burle-marxii* x *W. turbinocalyx* e *W. patentissima* x *W. pendulispica*) (Figura 3E, J); tubo polínico paralisado e enovelado no ovário em pelo menos 65% das espécies, sem penetração na micrópila (*W. patentissima* x *W. incompta*, *W. incompta* x *W. laevigata*, *W. turbinocalyx* x *W. froesii*, *W. froesii* x *W. linharesiorum*, *W. bicolor* x *W. canaliculata*, entre outras) (Figura 3H, K).

Os estudos realizados por Mota et al. (2023), utilizando a mesma metodologia adotada no presente trabalho, revelaram incongruência, incluindo a baixa germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma em espécies de *Lymania*. Pesquisas anteriores conduzidas por Souza et al. (2017), que exploraram hibridações interespecíficas e intergenéricas em diferentes gêneros de Bromeliaceae, mostraram que em *Aechmea* spp., o tubo polínico teve seu crescimento paralisado em um dos terços do estilete, além de apresentar enovelamento no terço superior do estilete, intumescimento e deposição irregular de calose na ponta do tubo polínico como foi observado no presente estudo em (*W. ituberaensis* x *W. pendulispica*; *W. linharesiorum* x *W. burle-marxii* e *W. laevigata* x *W. incompta*). Contudo, o enovelamento do tubo polínico em *Wittmackia* ocorreu principalmente no ovário, o que impediu sua penetração na micrópila na maioria das espécies.

A técnica de microscopia de fluorescência utilizando azul de anilina tem se destacado como uma ferramenta crucial na avaliação dos sistemas reprodutivos das plantas (Abdelgadir et al., 2012; Souza et al., 2017; Mota et al., 2023; Fagundes et al., 2024). Esta metodologia permite a visualização detalhada das interações entre os grãos de pólen e os tecidos do pistilo da flor, revelando aspectos como a germinação dos grãos de pólen e o crescimento e desenvolvimento dos tubos polínicos. O azul de anilina apresenta alta afinidade pelas caloses, um polissacarídeo presente em menor

concentração nas paredes celulares e em maior concentração nos andrósporos e ginósporos após a divisão meiótica, aumentando o contraste dos tubos polínicos, permitindo sua identificação das hibridações compatíveis (Martin, 1959; Bandeira et al., 2011; Souza et al., 2017).

A hibridização é um fenômeno central nos processos de especiação de plantas e permite a criação de novos genótipos desempenhando um papel estratégico no desenvolvimento de novas cultivares de interesse (Souza et al., 2017). A geração de novos híbridos para comercialização de plantas ornamentais pode também reduzir a atividade extrativista e os seus impactos negativos sobre a natureza (Souza et al., 2017), além de desenvolver híbridos/ cultivares superiores com maior apelo ornamental para diversificar um mercado que tem alta demanda por novidades.

O presente estudo fornece dados para futuros ensaios de propagação, inclusive pela cultura de tecidos, considerando que a produção de plantas com o potencial ornamental, visando a comercialização em larga escala por meio de produção de plantas saudáveis e geneticamente confiáveis (Almeida et al., 2023), é uma estratégia para evitar o extrativismo e a possível extinção dessas espécies.

Em Bromeliaceae, existem poucos registros científicos de híbridos naturais entre espécies simpátricas (Schulte et al., 2010; Tavares et al., 2022) ou com hibridações controladas (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017; Cavalcante et al., 2020; Costa et al., 2022; Mota et al., 2023). A Sociedade Internacional de Bromélias (BSI, 2024) tem publicado continuamente diversos híbridos, mas, em sua grande maioria, esses híbridos são produzidos por colecionadores ou produtores de forma empírica, sem relatos de pesquisas, metodologias, insucessos e dificuldades nas hibridações.

O conhecimento sobre hibridização e padrões de fluxo gênico entre espécies de Bromeliaceae são importantes para a compreensão dos processos de especiação e transferência de genes através das populações (Seehausen, 2004). Além disso, o desenvolvimento de híbridos controlados em Bromeliaceae visa a diversidade genética da família e formação de genes superiores em programas de melhoramento genético.

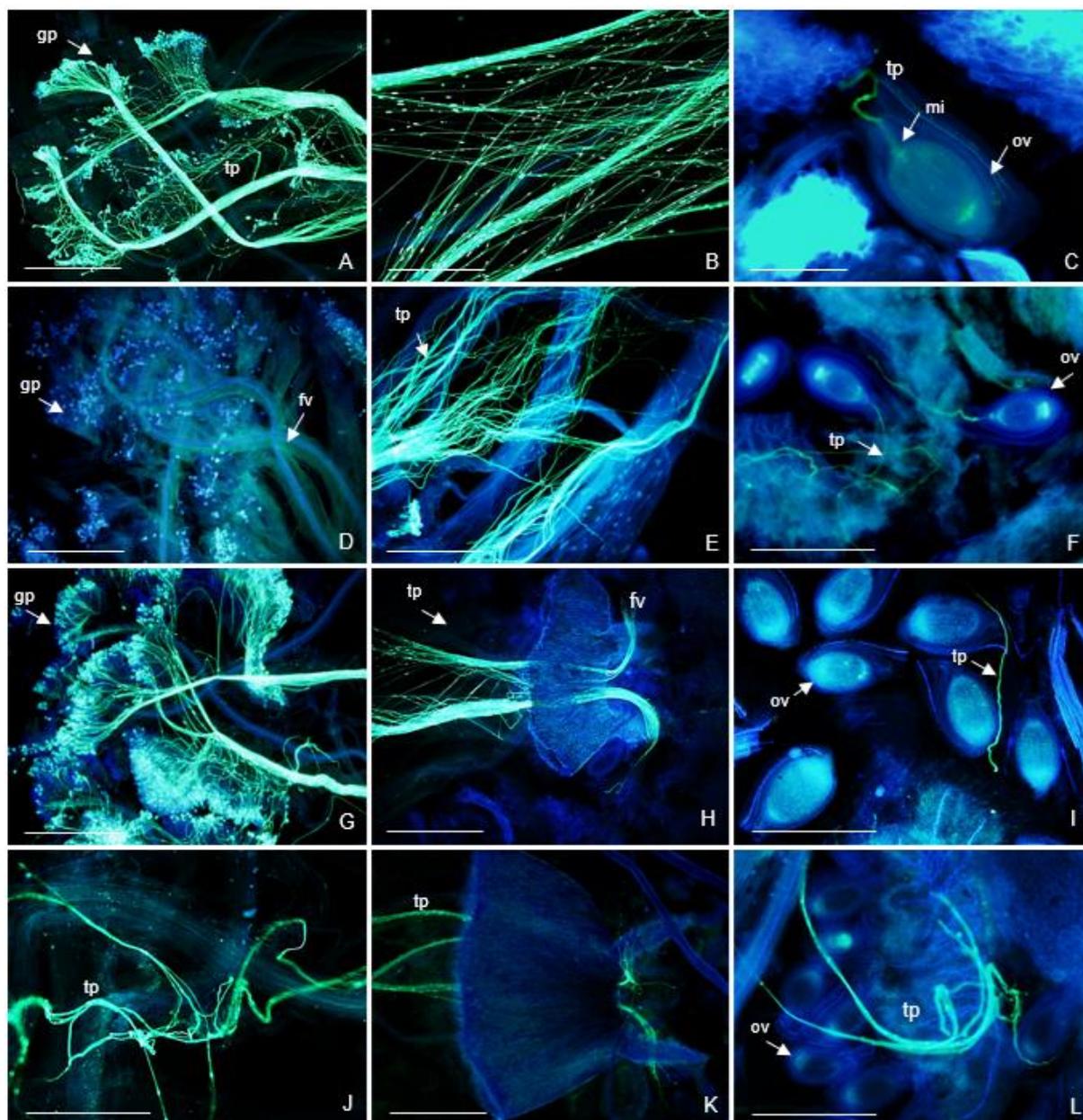


Figura 3. Híbridagens interespecíficas de Bromeliaceae (Bromelioideae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica, evidenciando o crescimento do tubo polínico e as incongruências por meio da microscopia de fluorescência com solução de azul de anilina. A) *Wittmackia patentissima* x *W. limae* evidenciando uma grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma com tudo polínico em feixes no estigma; B) *W. patentissima* x *W. incompta* evidenciando tubos polínicos em feixes no terço mediano do estilete; C) *W. burle-marxii* x *W. turbinocalyx* evidenciando penetração do tubo polínico na micrópila; D) *W. limae* x *W. bicolor* evidenciando grãos de pólen sem germinação na superfície do estigma; E) *W. patentissima* x *W. pendulispica* evidenciando paralisação do tubo polínico no terceiro terço do estilete; F) *W. laevigata* x *W. canaliculata* evidenciando penetração do tubo polínico na micrópila; G) *W. incompta* x *W. laevigata* evidenciando uma grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma; H) *W. turbinocalyx* x *W. froesii* evidenciando enovelamento do tubo polínico no interior do ovário; I) *W. patentissima* x *limae* evidenciando óvulo sem a penetração do tubo polínico na micrópila; J) *W. burle-marxii* x *W. turbinocalyx* evidenciando paralisação do tubo polínico e enovelamento no terceiro terço do

estigma com deposição irregular de calose; K) *W. conduruensis* x *W. turbinocalyx* evidenciando enovelamento do tubo polínico no ovário; L) *W. bicolor* x *W. canaliculata* evidenciando tubo polínico próximo aos óvulos sem penetração na micrópila. gp=grão de pólen; tp=tubo polínico; fv=feixe vascular; ov=óvulo; mi=micrópila. C= 500 µm; B, E, F, I, J, L= 200 µm; A, D, G, H, K=1 mm.

Germinação in vitro de sementes

Foram observadas altas porcentagens de germinação das sementes nos diferentes sistemas reprodutivos e hibridações interespecíficas, com valores superiores a 87%, indicando a ausência de barreiras pós-zigótica e alta viabilidade das sementes (Figura 4). Especificamente, a polinização cruzada e a polinização natural resultaram em 99% das sementes germinadas.

O início da germinação foi caracterizado pela emissão da radícula, ocorrendo a partir do sétimo e décimo dia para a maioria das espécies. A exceção foi observada na *W. ituberaensis* com polinização natural, cuja a germinação iniciou-se aos 15 dias após o estabelecimento. Segundo Frezato et al. (2021), a qualidade fisiológica das sementes influencia diretamente na emergência das plântulas, permitindo uma rápida germinação e desenvolvimento.

A contaminação das sementes foi considerada baixa, com apenas 5% de contaminação bacteriana e 2,63% de contaminação fúngica ao final da avaliação, demonstrando que o procedimento de assepsia adotado no estabelecimento das espécies foi satisfatório. As sementes afetadas por contaminação fúngica e bacteriana não apresentaram emissão de radícula durante o período de avaliação. Conforme observado por Parisi et al. (2019), os microrganismos podem causar a morte das sementes através da ação de enzimas e toxinas antes, durante ou após o processo de germinação.

A germinação in vitro de sementes das espécies estudadas mostrou-se viável, produzindo plântulas normais que estão sendo utilizadas em trabalhos de conservação in vitro e micropropagação. No caso das sementes provenientes de polinização cruzada, há planos futuros para a reintrodução das espécies em seus habitats naturais, respeitando sempre a variabilidade genética da espécie. As plântulas híbridas estão sendo avaliadas quanto ao seu potencial ornamental, visando possível lançamento como novas cultivares. O entendimento das características fisiológicas e sanitárias das sementes é crucial para o controle de qualidade das

mudas, preservação da diversidade genética e avanços no melhoramento genético (Santos et al., 2020; Koufan et al., 2022).



Figura 4. Germinação in vitro de sementes híbridas com grãos de pólen de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A) *Wittmackia froesii* (♀) x *W. incompta* (♂). B) *Wittmackia patentissima* em autopolinização artificial; C) *Wittmackia bicolor* (♀) x *W. pendulispica* (♂).

CONCLUSÃO

Todas as espécies de *Wittmackia* estudadas são alógamas com autocompatibilidade parcial nas espécies *W. burle-marxi*, *W. conduruensis*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. patentissima*.

O sucesso nas hibridações corresponde a 44% em 84 combinações, com incongruência em 41 cruzamentos.

Os principais eventos de autoincompatibilidade e incongruência identificados após cruzamentos foram: pouca germinação dos grãos de pólen na superfície do estigma; inibição do crescimento do tubo polínico no estigma; interrupção dos tubos polínicos ao longo do estilete com deposição reticulada de calose; enovelamento dos tubos polínicos no interior do ovário, entre outros.

As porcentagens de germinação das sementes foram acima de 85% evidenciando a ausência de barreiras pós-zigóticas, gerando plântulas normais, que estão sendo utilizadas para trabalhos de conservação e melhoramento genético. Esses resultados trazem contribuições para estudos de hibridações em Bromeliaceae,

tanto para obtenção de novidades para o mercado ornamental como na reintrodução de plantas no ambiente.

Este trabalho não apenas preenche uma lacuna importante no entendimento da reprodução dessas espécies de Bromeliaceae, mas também oferece subsídios essenciais para o desenvolvimento de planos de manejo e conservação voltados para a preservação dessas espécies. Compreender como essas plantas se reproduzem e interagem geneticamente não apenas contribui para a conservação *in situ* e *ex situ*, mas também pode orientar práticas de cultivo e propagação que ajudam a garantir a diversidade genética e a sustentabilidade dessas espécies a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. C.; FISCHER, E. A.; SAZIMA, M. As bromélias na região do Rio Verde. In: MARQUES, O; DULEBA, W. Estação ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna. **Holos editora**. Ribeirão Preto, p. 162-172, 2004.
- AGUIRRE-SANTORO, J.; MICHELANGELI, F. A.; STEVENSON, D. W. Molecular Phylogenetics of the *Ronnbergia Alliance* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into their morphological evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 100, n. 1, p. 1-20, 2016.
- AGUIRRE-SANTORO, J. A. Taxonomy of the *Ronnbergia alliance* (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 303, n. 1, p. 615-640, 2017.
- AGUIRRE-SANTORO, J. A.; NELSON, R. S.; FABIÁN, A.; MICHELANGELI, I. The influence of floral variation and geographic disjunction on the evolutionary dynamics of *Ronnbergia* and *Wittmackia* (Bromeliaceae: Bromelioideae). **Botanical Journal**, West Sussex, v. 192, n. 4, p. 609-624, 2020.
- ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; STADEN, J. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, Amsterdã, v. 79, n. 1, p.132-139, 2012.
- ALMEIDA, M. R. A.; SOUZA, E. H.; COSTA, E. M. R.; SOUZA, F. V. D. Vegetative propagation strategies in commercial pineapple cultivars Estratégias de propagação vegetativa em cultivares comerciais de abacaxizeiro. **Caatinga**, Mossoró, v. 36, n. 3, p. 513-523, 2023.
- ANDERSON, M. **Plant Reproduction Growth and Ecology**. New York, Britannica Educational Publishing, 2012. 87p.

BSI (BROMELIAD SOCIETY INTERNATIONAL). Bromeliad Cultivar Register: Lista de nomes. **Bromeliad Society International**, (Continuamente atualizado). Disponível em: <https://registry.bsi.org/>. Acesso em: 17 mar. 2024.

BACKIYARANI, S.; SASIKALA, R.; SHARMILADEVI, 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, n. 8, p. 860-867, 2011.

BARRET, S. C. H. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **Biological Sciences**, New York, v. 358, n. 1434, p. 991-1004, 2003.

BARRETT, S. C. H. Darwin’s legacy: the forms, function and sexual diversity of lowers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **Biological Sciences**, New York, v. 365, n. 1539, p. 351-368, 2010.

BARRETT, S. C. H. **Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis**. In: BARRETT, S. C. H. *Evolution and function of heterostyly*, Berlin, 1992. 1-24 p.

BARRETT, S. C. H. ‘A most complex marriage arrangement’: recent advances on heterostyly and unresolved questions. **New Phytologist**, Hoboken, v. 224, n. 3, p. 1051-1067, 2019.

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, n. 4, p. 665-676, 2017.

BRAZIL, **Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA n 148, de 7 de junho de 2022**. ICMBIO. Acesso 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_ameacadas_extincao.pdf. Acesso em 04 de set. 2024.

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

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

CASCANTE-MARÍN, A.; TREJO, C.; MORALES, J. F. First Description of the Nocturnal Flowers of the Little-known *Werauhia haberi* (Tillandsioideae) and Notes

about its Natural History. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 69, n. 1, p. 6-15, 2019.

CASCANTE-MARÍN, A.; NÚÑEZ-HIDALGO, S. A. Review of Breeding Systems in the *Pineapple* Family (Bromeliaceae, Poales). **Botanical Review**, New York, v. 89, n. 1, p. 308-329, 2023.

CNCFLORA, **Centro Nacional de Conservação da Flora**, 2024.
<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal>. Acesso em: 04 de set. 2024.

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.

CHARLESWORTH, D. Evolution of plant breeding systems. **Current Biology**, Dinamarca, v.16, n. 17, p. 726-735, 2006.

DUMAS, C.; KNOX, R. B. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 67, n. 1, p. 1-10, 1983.

FAGUNDES, A.; SOUZA, E. H.; SILVEIRA FUNCH, L.; MACHADO, I. C.; ALVES, D. E.; SIQUEIRA-FILHO, J. Autogamy ensures reproductive success in the bromeliad *Dyckia dissitiflora* Schult.f., endemic to the Brazilian caatinga domain. **Plant Species Biology**, Cambridge, v. 7, n. 3, p.1-15, 2024.

FREZATO, P.; BRAGA, A. O.; SORACE, M. A. F.; COSSA, C. A.; PIRES, C. E. M.; MACHADO, V. J.; LHAMAS, L. S.; OSIPI, E. A. F. Action of biostimulants and nutrients via seed treatment on germination and seedling development of Glycine Max L. **Brazilian Journal of Development**, São Paulo, v. 7, n. 2, p.18674-18679, 2021.

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.; GORGES, 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: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. pp. 315-396.

FORZZA, R. C.; COSTA, A. F.; MACIEL, J. R.; KESSOUS, I. M.; MONTEIRO, R. F.; FARIA, A. P.G.; TARDIVO, R. C.; BÜNEKER, H. M.; SARAIVA, D. P.; MOREIRA, B. A.; JACQUES, S. S. A.; ALMEIDA, M. M.; SANTOS-SILVA, F.; LOUZADA, R. B.; MOURA, R. L.; COUTO, D. R.; NEVES, B.; OLIVEIRA, F. M. C.; ARAÚJO, C. C.; GONÇALVES-OLIVEIRA, R. C.; VERSIEUX, L. M.; ROMANINI, R. P.; MACHADO, T. M.; SILVA, R. S. A.; PAIXÃO SOUZA, B.; GOMES-DA-SILVA, J.; URIBBE, F. P.; GUARÇONI, E. A. E.; SOUSA, L. O. F.; PONTES, R. A. S.; NOGUEIRA, M. G. C.; SOUSA, G. M.; KOCH, A. K.; PICANÇO, W. L.; CARDOSO, P. H.; MARTINS, S. E.; BARBOSA-SILVA, R. G.; WANDERLEY, M. G. L. **Bromeliaceae in Flora e Funga**

do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2023. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB66>. Acesso em: 10 jun. 2023.

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

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; DIJKGRAAF, L. **Encyclopaedia of Bromeliads, Version 5.** 2023. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> Utrecht University Botanic Gardens. Acesso em: 13 jun. 2023.

GIVNISH, T. K.; MILLAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhf sequence data. **Aliso**, Claremont, v. 23, n. 1, p. 3-26, 2007.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; VAN, E. E. B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, New York, v. 98, n. 5, p. 872-895, 2011.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; VAN, E. E. B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. A. C.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYSTMA, K. J. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 71, n. 1, p. 55-78, 2014.

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

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

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Germany, v. 67, p. 367-375, 1984.

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

LENZI, M.; PAGGI, G. M. Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophyte species from ironstone outcrops in central-western Brazil. **Plant Species Biology**, Durham, v. 35, n. 1, p. 97-108, 2019.

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

- LEVIN, D. A. The origin of reproductive isolating in flowering plants. **Taxon**, Weinheim, v. 20, n. 1, p. 93-104, 1971.
- LEME, E. M. C.; SOUZA, E. H.; AONA, L.Y.S.; SOUZA, F.V. D. Two new *Wittmackia* species (Bromeliaceae: Bromelioideae) from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 583, n. 3, 241-250, 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.
- MATALLANA, G.; GODINHO, M. A. S.; GUILERME, F. A.G.; BELISARIO, M.; COSER, T. S.; WENDT, T. Breeding systems of Bromeliaceae species: Evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, Heidelberg, v. 289, n. 1-2, 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. 1, p. 521-531, 2016.
- MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain Technology**, Baltimore, v. 34, n. 3, 125-128, 1959.
- MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; CAVALCANTE, B. P. C.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, E. H. Reproductive systems and hybridization of *Lymania* species (Bromeliaceae) endemic to Northeast Brazil threatened with extinction. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 322, e. 112447, 2023.
- MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; SOARES, T. L.; ALMEIDA, P. S.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROSSI, M. L.; SOUZA, E. H. Pollen morphology and viability of *Lymania* (Bromeliaceae) species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 328, e. 112890, 2024.
- MORITZ, C. **Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation**. Tree, Ed:10, Rome, v.5, 1994. 373p.
- 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.
- 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**, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 1-10, 2015.
- PARISI, J. J. D.; SANTOS, A. F.; BARBEDO, C. J.; MEDINA, P. F. Patologia de sementes florestais: danos, detecção e controle, uma revisão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, n. 2, p.129-133, 2019.

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.

RIOS, P. A. F.; SILVA, J. B.; MOURA, F. B. P. Visitantes florais de *Aechmea constantinii* (Mez) L.B.Sm. (Bromeliaceae) em um remanescente da Mata Atlântica do Nordeste Oriental. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 4, p. 29-36, 2010.

SANTOS, V. L. S.; WANDERLEY, M. G. L.; VERSIEUX, L. M.; LUZ, C. F. P. Pollen morphology of Brazilian species of *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae), **Grana**, Londres, v. 59, n. 2, p. 203-225, 2020.

SAMYN, G. *Vriesea* hybrids of today and yesteryear. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 45, n. 1, p. 99-109, 1995.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. **Trends Ecology Evolution**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 198-207, 2004.

SEMA, Secretaria do Meio Ambiente do Estado da Bahia, 2017. **Lista Oficial das Espécies Endêmicas da Flora Ameaçadas de Extinção do Estado da Bahia**.

Disponível em:

<https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=http%3A%2F%2Fwww.meioambiente.ba.gov.br%2Farquivos%2FFile%2FListaFlora.docx&wdOrigin=BROWSELIN>
K. Acesso em: 04 de set. 2024.

SHIVANNA, K. R. Reproductive assurance through autogamous self-pollination across diverse sexual and breeding systems. **Current Science**, Bengaluru, v. 109, n. 7, p. 1255-1263, 2015.

SCHULTE, K.; SILVESTRO, D.; KIEHLMANN, E.; VESELY, S.; NOVOA, P.; ZIZKA, G. Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v. 57, n. 3, p.1105-1119, 2010.

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.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JR., D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 1357-1376, 2011.

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, n. 1, p. 53-61, 2017.

SOUSA, G. M.; KOCH, A. K.; PICANÇO, W. L.; CARDOSO, P. H.; MARTINS, S. E.; BARBOSA-SILVA, R. G.; WANDERLEY, M. G. L. **Bromeliaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB66>. Acesso em: 13 jun. 2024.

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.

TAVARES, M. M.; FERRO, M.; LEAL, B. S. S.; SILVA, C. P.; Speciation with gene flow between two Neotropical sympatric species (*Pitcairnia* spp.: Bromeliaceae), **Ecology and Evolution**, v.12, n.5, p.8834, 2022.

TEIXEIRA, T. P. O.; COSTA, C. B. N. Sistema Reprodutivo e potencial de hibridação entre espécies simpátricas de senna (fabaceae) em ambiente de cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, São Paulo, v.13, n. 24, 2016.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). **The IUCN red list of threatened species**. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/> > Acesso em 13 Jun. 2024.

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

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.; WOUTERS, J.; LONDERS, E.; DERROOSE, R.; 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.

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

VOSGUERITCHIAN, S. B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. **Brazilian Journal of Botany**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 433-442, 2006.

WAGNER, N. D.; WÖHRMANN, T.; ÖDER, V.; BURMEISTER, A.; WEISING, K. Reproduction biology and chloroplast inheritance in Bromeliaceae: a case study in *Fosterella* (Pitcairnioideae). **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 301, n. 1, p. 2231-2246, 2015.

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

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, v. 21, n.132-136, 2000.

WENDT, T.; COSER, T. S.; MATAALLANA, 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**, Vienna, v. 275, p. 31-41, 2008.

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, n. 1, p. 69-79, 2013.

WERPACHOWSKI, J. S.; VARASSIN, I. G.; GOLDENBERG, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 607-613, 2004.

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.

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.

ZANGERL, A. R.; BEREMBAUM, M. R.; NITAO, J. K. Parthenocarpic fruits in wild parsnip: decoy defense against a specialist herbivore. **Evolutionary Ecology**, Boca Raton, v. 5, n. 1, p. 136-145, 1991.

YI, W.; LAW, E.; MCCOY, D.; WETZSTEIN, H.Y. Stigma development and receptivity in Almond (*Prunus dulcis*). **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 57-63, 2006.

CAPÍTULO 3

CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Wittmackia* Mez (BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA

¹ Manuscrito a ser ajustado e submetido ao Periódico “Cryobiology”.

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Wittmackia* Mez
(BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDÊMICAS DO BRASIL E
OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA**

RESUMO: O gênero *Wittmackia* Mez, pertencente à família Bromeliaceae, habita uma grande variedade de ambientes, desde florestas montanhosas higrofilas até habitats secos em florestas semidecíduas e florestas tropicais secas. A conservação dos grãos de pólen é crucial para facilitar cruzamentos entre espécies alógamas, obter híbridos e preservar o germoplasma. A criopreservação de grãos de pólen, além da conservação de alelos por longos períodos, é uma estratégia importante diante da falta de sincronização no florescimento entre potenciais genitores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a criopreservação dos grãos de pólen de 16 espécies de *Wittmackia* por meio da germinação in vitro em meio de cultura, crescimento do tubo polínico no pistilo e fertilização in vivo nos diferentes cruzamentos e hibridações interespecíficas. Os grãos de pólen foram desidratados em sílica gel ativada por três horas. Para a germinação in vitro, os grãos de pólen foram inoculados em 35 mL do meio de cultura SM. As amostras foram depositadas em tubos criogênicos e submetidas ao ensaio de criopreservação em nitrogênio líquido a -196 °C e as avaliações foram realizadas após 30, 180 e 360 dias. Para a viabilidade in vivo, grãos de pólen criopreservados foram depositados sobre o estigma das mesmas espécies e de outras do gênero, para avaliar a produção de frutos e sementes. Cinco flores de cada polinização foram fixadas e avaliadas quanto à germinação e crescimento do tubo polínico no pistilo, utilizando microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta. A desidratação dos grãos de pólen atendeu às expectativas para 87% das espécies, com o conteúdo de água variando de 20% a 31,02%, exceto para *W. limae* e *W. linharesiorum*, que apresentaram uma redução drástica no conteúdo de água. A porcentagem de grãos de pólen viáveis após a criopreservação variou de 14,96% em *W. linharesiorum* a 98,78% em *W. laevigata*, e o comprimento do tubo polínico variou de $0,25 \pm 0,02$ mm em *W. linharesiorum* a $1,12 \pm 0,07$ mm em *W. limae*. Observou-se que grãos de pólen com conteúdo de água abaixo de 20% apresentaram redução significativa na viabilidade e comprimento do tubo polínico. Foram realizadas 793 polinizações com grãos de pólen criopreservados nas 16 espécies, sendo 17% por xenogamia e 83% por hibridações interespecíficas em 71 combinações. Obteve-se sucesso em 37% das polinizações por xenogamia e 63% nas hibridações interespecíficas. Todas as polinizações por xenogamia resultaram em frutos, com quantidade de sementes variando entre 8 a 285 por fruto. Os principais fenômenos observados para incongruência foram: grãos de pólen sem germinação na superfície do estigma, tubo polínico com enovelamento no terceiro terço do estilete e tubo polínico no ovário sem penetração na micrópila. A germinação in vitro de sementes das espécies estudadas demonstrou-se viável, produzindo plântulas normais que estão sendo utilizadas em trabalhos de conservação in vitro.

PALAVRAS-CHAVE: Hibridização, Viabilidade polínica, Conservação de grãos de pólen.

**CRYOPRESERVATION OF POLLEN GRAINS FROM *Wittmackia* Mez
(BROMELIOIDEAE: BROMELIACEAE) ENDEMIC TO BRAZIL AND OCCURRING
IN ATLANTIC FOREST AREAS**

ABSTRACT: The genus *Wittmackia* Mez, belonging to the Bromeliaceae family, inhabits a wide variety of environments, from hygrophilous mountain forests to dry habitats in semideciduous forests and dry tropical forests. Pollen grain conservation is crucial to facilitate crosses between allogamous species, obtain hybrids and preserve germplasm. Cryopreservation of pollen grains, in addition to the conservation of alleles for long periods, is an important strategy in view of the lack of synchronization in flowering between potential parents. The objective of this study was to evaluate the cryopreservation of pollen grains of 16 *Wittmackia* species through in vitro germination in culture medium, growth of the pollen tube in the pistil and in vivo fertilization in different crosses and interspecific hybridizations. Pollen grains were dehydrated in activated silica gel for three hours. For in vitro germination, pollen grains were inoculated in 35 mL of SM culture medium. The samples were deposited in cryogenic tubes and subjected to cryopreservation assay in liquid nitrogen at -196 °C, and evaluations were performed after 30, 180 and 360 days. For in vivo viability, cryopreserved pollen grains were deposited on the stigma of the same species and others of the genus, to evaluate fruit and seed production. Five flowers from each pollination were fixed and evaluated for germination and growth of the pollen tube in the pistil, using fluorescence microscopy with ultraviolet filter. Pollen grain dehydration met expectations for 87% of the species, with water content ranging from 20% to 31.02%, except for *W. limae* and *W. linharesiorum*, which showed a drastic reduction in water content. The percentage of viable pollen grains after cryopreservation ranged from 14.96% in *W. linharesiorum* to 98.78% in *W. laevigata*, and the pollen tube length ranged from 0.25 ± 0.02 mm in *W. linharesiorum* to 1.12 ± 0.07 mm in *W. limae*. It was observed that pollen grains with water content below 20% showed a significant reduction in pollen tube viability and length. A total of 793 pollinations were performed with cryopreserved pollen grains in the 16 species, 17% by xenogamy and 83% by interspecific hybridizations in 71 combinations. Success was achieved in 37% of the pollinations by xenogamy and 63% in the interspecific hybridizations. All pollinations by xenogamy resulted in fruits, with the number of seeds varying between 8 and 285 per fruit. The main phenomena observed for incongruence were: pollen grains without germination on the surface of the stigma, pollen tube with coiling in the third third of the style and pollen tube in the ovary without penetration into the micropyle. In vitro germination of seeds of the species studied proved to be viable, producing normal seedlings that are being used in in vitro conservation studies.

KEYWORDS: Hybridization, Pollen viability, Pollen grain conservation.

INTRODUÇÃO

O gênero *Wittmackia* Mez, pertencente à família Bromeliaceae, habita uma grande variedade de ambientes, desde florestas montanhosas higrófilas até habitats secos em florestas semidecíduas e florestas tropicais secas (Aguirre-Santoro, 2016; 2020). Estudos filogenéticos e morfológicos recentes levaram à reclassificação do gênero *Wittmackia*, anteriormente considerado parte do complexo gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. e *Ronnbergia* E. Morren & André (Aguirre-Santoro, 2017). A recircunscrição de *Wittmackia* foi baseada em evidências filogenéticas, variações morfológicas, distribuição geográfica e habitat, resultando em uma maior clareza taxonômica e na identificação de novas espécies dentro do gênero (Aguirre-Santoro, 2017).

A família Bromeliaceae é conhecida por sua vasta diversidade, com espécies adaptadas a uma ampla gama de ambientes e amplamente distribuída em todo território brasileiro e em todos os domínios fitogeográficos, com maior diversidade na Mata Atlântica (Leme e Siqueira Filho, 2006). As espécies de Bromeliaceae enfrentam várias ameaças que têm levado muitas delas à extinção (Forzza et al., 2013; Souza et al., 2021; IUCN, 2023). A principal causa de ameaça é a destruição de habitats devido ao desmatamento, extrativismo predatório, expansão agrícola, urbanização, dentre outros (Haddad et al., 2015; Ferreira et al., 2019). A Mata Atlântica, onde muitas dessas espécies estão concentradas, é uma das regiões mais afetadas, com menos de 12% de sua cobertura original remanescente (Ribeiro et al., 2009). A coleta excessiva de plantas para o comércio ornamental também exerce pressão significativa sobre as populações naturais (Martinelli et al., 2008). Além disso, mudanças climáticas globais representam uma ameaça crescente, alterando os padrões de precipitação e temperatura, o que pode afetar negativamente a sobrevivência das espécies (Santos et al., 2016).

Essas espécies possuem grande potencial no mercado de plantas ornamentais devido à sua diversidade de formas, cores e adaptações ambientais (Souza et al., 2017a;). A criação de novos híbridos por meio de programas de melhoramento genético pode incrementar significativamente esse mercado (Souza et al., 2017a; Castro et al., 2022). Atualmente, poucos híbridos estão disponíveis comercialmente, e os que existem geralmente foram desenvolvidos de forma empírica por horticultores

e colecionadores (Souza et al., 2017a). Além do uso ornamental, as bromélias têm potencial para usos medicinais com atividades farmacológicas, produção de fibras como matéria-prima para a fabricação de artesanatos e utensílios, alimentação humana e animal, entre outros (Carvalho et al., 2010; Nunes et al., 2016; Souza et al., 2021). Em *Wittmackia*, não há relatos de hibridizações interespecíficas, já que o mercado de plantas ornamentais é reduzido a um pequeno número de espécies (Souza et al., 2017a).

Muitas espécies de *Wittmackia*, apresentam assincronia de florescimento, o que limita a disponibilidade de flores simultâneas para cruzamentos controlados (Souza et al., 2015; 2018). Algumas metodologias para contornar essa falta de sincronia já estão disponíveis na literatura, como no caso da conservação de grãos de pólen por meio da criopreservação (Souza et al., 2015; 2018; Silva et al., 2017).

A criopreservação de grãos de pólen permite armazenar grãos de pólen viáveis até que as flores femininas estejam disponíveis, facilitando cruzamentos que de outra forma seriam impossíveis devido à falta de sincronia (Souza et al., 2015; 2018; Silva et al., 2017).

A criopreservação é uma estratégia relevante para a conservação *ex situ*, oferecendo uma alternativa viável e de longo prazo para a preservação de germoplasma, principalmente de espécies ameaçadas (Forzza et al., 2013; Souza et al., 2021; IUCN, 2023). É uma estratégia fundamental para espécies com sementes recalcitrantes ou de propagação vegetativa e pode ser particularmente útil para espécies com assincronia de florescimento ou aquelas com populações pequenas e fragmentadas, que têm menor probabilidade de cruzamento natural (Santos, 2000). A técnica envolve a conservação de tecidos vegetais em nitrogênio líquido em temperaturas ultrabaixas (-196 °C), espaço físico pequeno e uma gestão e manejo facilitados (Rajasekharan e Rohine, 2023).

A eficácia da criopreservação depende da tolerância dos tecidos vegetais à desidratação, o que vai permitir sua sobrevivência em temperaturas ultrabaixas, assim como reduzir o metabolismo celular a um ponto em que, após o descongelamento, as atividades metabólicas possam ser retomadas (Santos, 2000; Pegg, 2007. Souza et al., 2015). Entre as vantagens da criopreservação estão a demanda por pouco espaço físico para a manutenção das coleções, a facilidade no manejo e gestão das condições de armazenamento e o baixo custo do processo (Almeida et al., 2002). Essa técnica também permite a criação de um criobanco de grãos de pólen, que tem como principal

objetivo conservar alelos importantes, garantindo a disponibilidade de material genético para futuros programas de melhoramento e conservação (Rajasekharan e Rohine, 2023). O criobanco de grãos de pólen pode ser crucial para manter parte da variabilidade genética, especialmente para espécies ameaçadas de extinção ou com populações fragmentadas, onde a diversidade genética é limitada (Haddad et al., 2015). A manutenção de um criobanco eficiente envolve protocolos rigorosos de coleta, de desidratação, congelamento e descongelamento dos grãos de pólen para garantir sua viabilidade e integridade genética ao longo do tempo (Kaya; Souza, 2017).

A viabilidade dos grãos de pólen, tanto frescos quanto criopreservados, pode ser avaliada por diversas técnicas, sendo que as mais comuns são os testes histoquímicos, a germinação *in vitro* e a fertilização *in vivo*, todas amplamente utilizadas no monitoramento de grãos de pólen armazenado (Soares et al., 2011; Souza et al., 2017a).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade e a funcionalidade de grãos de pólen criopreservados de 16 espécies de *Wittmackia* por meio da germinação *in vitro*, germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico no pistilo e pela fertilização *in vivo* em diferentes cruzamentos e hibridações interespecíficas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécies de *Wittmackia* foram coletadas em populações naturais nos fragmentos da Mata Atlântica 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, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

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, em atendimento à legislação brasileira para espécies nativas. Exemplares

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

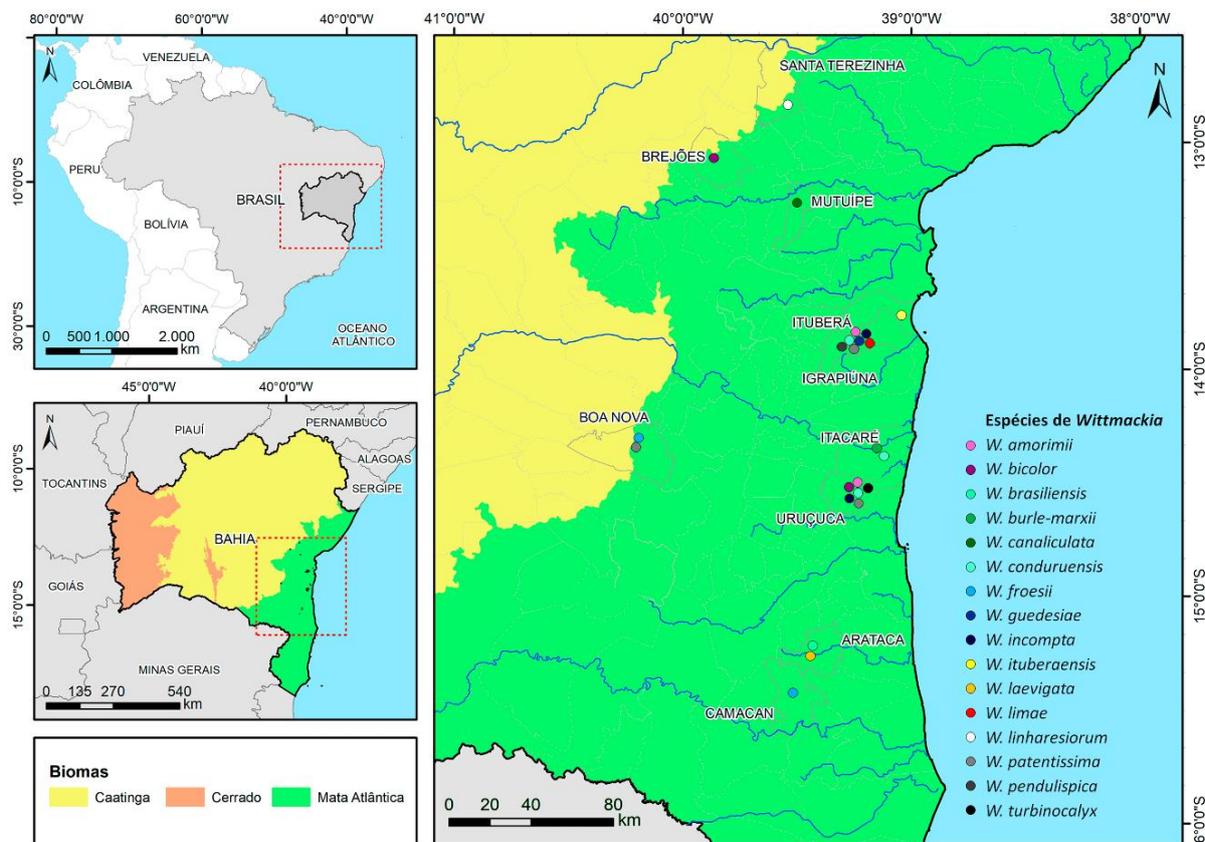


Figura 1. Mapa com os respectivos pontos de estudo e coleta das espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica, utilizadas nos experimentos de criopreservação dos grãos de pólen.

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

Espécies	Município de coleta na Bahia	HURB (voucher)	Endemismo	Status de Ameaça
<i>W. amorimii</i>	Igrapiúna	30415	BA	NE
	Uruçuca	27808		
<i>W. bicolor</i>	Brejões	17903	BA	NE
	Uruçuca	30553		
<i>W. brasiliensis</i>	Arataca	26118	BA	NE
<i>W. burle-marxii</i>	Itacaré	23966	BA, MG	NE
<i>W. canaliculata</i>	Mutuípe	34898	BA	VU
	Uruçuca	22229	BA	CR
<i>W. conduruensis</i>	Igrapiúna	32023		
	Itacaré	27184		
<i>W. froesii</i>	Boa nova	32089	AL, BA, PE	NE

	Camacã	25958		
<i>W. guedesiae</i>	Igrapiúna	27182	BA	CR
<i>W. incompta</i>	Igrapiúna	31979	BA	NE
	Uruçuca	32825		
<i>W. ituberaensis</i>	Ituberá	30421	BA	NE
<i>W. limae</i>	Igrapiúna	31986	BA	NE
<i>W. laevigata</i>	Arataca	26402	BA	NE
<i>W. linharesiorum</i>	Santa	24546	BA	NE
	Teresinha			
<i>W. patentissima</i>	Igrapiúna	32000	AL, BA, CE,	NE
	Boa nova	32090	MA, PB, PE,	
	Uruçuca	29493	RN, SE, ES,	
			RJ	
<i>W. pendulispica</i>	Igrapiúna	30549	BA	NE
<i>W. turbinocalyx</i>	Uruçuca	27800	BA	CR

Conforme IUCN (2023), Forzza et al. (2013) e Souza et al. (2021). CR = Criticamente Ameaçada; VU = Vulnerável; NE = Não avaliada.

Germinação in vitro dos grãos de pólen

Para os teste de germinação in vitro, as anteras com grãos de pólen frescos, que constituíram o controle, assim como os que foram desidratados e criopreservados, foram inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura SM, contendo 0,01% de H₃BO₃; 0,03% de Ca(NO₃)₂; 0,02% de MgSO₄; 0,01% de KNO₃; 15% de sacarose; solidificado com 0,8% de ágar; pH ajustado para 6,5 (Soares et al., 2008). As placas com os grãos de pólen foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C.

A contagem dos grãos de pólen germinados e a medida do comprimento do tubo polínico foram realizadas 24 horas após a inoculação em meio de cultura. Foram depositadas cinco gotas de azul de toluidina 0,01% para facilitar o contraste e, imediatamente, foram obtidas microfotografias com auxílio de estereomicroscópio Leica EZ4 W (Leica Microsystems, Alemanha).

Para a porcentagem de germinação, foram contabilizados todos os grãos de pólen da placa, enquanto que para o comprimento do tubo polínico, foram mensurados aleatoriamente cinco tubos em cada quadrante, totalizando 60 tubos polínicos de cada tratamento. Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. As medidas foram realizadas utilizando o programa ImageJ 1.53s (RASBAND, 1997-2018).

Para as anteras com grãos de pólen frescos (controle), e para as com grãos de pólen criopreservados, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição composta por uma flor com seis anteras e provenientes de diferentes plantas.

Os dados de percentagem de germinação foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística. Para comparação, os dados foram submetidos à análise de variância e os valores comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para as espécies, por meio do software R Core Team (2023).

Desidratação dos grãos de pólen

Em ensaios desenvolvidos por Souza et al. (2015; 2018) determinou-se que grãos de pólen de Bromeliaceae podem ser desidratados por 3 horas em sílica gel ativada em ambiente fechado (dessecador), mantendo a umidade em torno de 35 % a 20 %, adequada para a criopreservação. Em se tratando de outras espécies de Bromeliaceae, não descritas no trabalho Souza et al. (2015; 2018), foram realizados ensaios de desidratação neste mesmo intervalo de tempo e nas mesmas condições para confirmar o conteúdo de água e a manutenção da viabilidade dos grãos de pólen.

O conteúdo de água das anteras com grãos de pólen foi determinado através da pesagem de recortes de papel alumínio (Pt) em balança de precisão com quatro casas decimais; Em seguida, as anteras com os grãos de pólen foram depositadas sobre o papel, procedendo-se a uma segunda pesagem para determinação do peso úmido (Pu). As anteras foram desidratadas por meio da sílica em gel em ambiente fechado com intervalo de tempo de 3h. Após esse procedimento, os recortes foram fechados como envelopes e pesados em balança analítica para obtenção do peso seco (Ps). O conteúdo de água das anteras com grãos de pólen foi determinado pela seguinte equação:

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

onde: U= conteúdo de água das anteras (%), Pu= Peso úmido(g), Ps= Peso seco (g), Pt= Peso da tara (g).

O delineamento experimental utilizado para os ensaios de desidratação dos grãos de pólen foi inteiramente casualizado com três repetições por espécie, sendo cada repetição representada por uma flor contendo seis anteras. Após os ensaios de

desidratação, as anteras foram inoculadas no meio de cultura SM descrito anteriormente.

Criopreservação dos grãos de pólen

As anteras com grãos de pólen foram colocadas em recortes de papel alumínio, desidratadas em sílica gel ativada por 3 horas e inseridas em tubos criogênicos (2 mL), que foram diretamente imersos em nitrogênio líquido a -196°C , onde permaneceram por 30, 180 e 360 dias. Após esses períodos, os grãos de pólen foram retirados do nitrogênio e colocados para germinar no mesmo meio de cultura SM para avaliação da porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico, conforme descrito anteriormente.

O delineamento experimental utilizado para os ensaios de criopreservação dos grãos de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 16 (intervalos de tempo x espécies) com 12 repetições, sendo cada repetição representada por uma flor contendo seis anteras e de diferentes plantas.

Teste de viabilidade in vivo com grãos de pólen

Para os testes de viabilidade in vivo, foram utilizadas como parentais flores da mesma espécie (polinização cruzadas entre indivíduos da mesma espécie) e de espécies diferentes (hibridização). As polinizações com grãos de pólen criopreservados foram realizadas conforme a disponibilidade de flores e estão apresentadas na Tabela 3.

Nas plantas receptoras, as anteras foram removidas e as flores foram ensacadas na pré-antese. Os grãos de pólen criopreservados foram depositados no estigma das flores emasculadas que, em seguida, foram identificadas conforme a polinização e novamente ensacadas para evitar possíveis contaminações por outras espécies. Três amostras foram coletadas para os estudos do desenvolvimento do tubo polínico no pistilo, e as demais flores foram avaliadas quanto à formação de frutos e número de sementes.

Desenvolvimento do tubo polínico no pistilo

Três pistilos foram coletados 24 horas após as diferentes polinizações, fixados em solução de Carnoy (3 partes de etanol 95%: 1 parte de ácido acético glacial) por 48 horas, e clarificados em solução de sulfito de sódio (10%), autoclavada 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, foi utilizada microscopia de fluorescência com filtro ultravioleta (Martin, 1959; Yi et al., 2006). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51) acoplado com câmera digital (Olympus DP175, Olympus, Tokyo, Japão) com filtro ultravioleta que emite fluorescência para verificar a presença de calose.

Para avaliar o crescimento do tubo polínico no pistilo, foram consideradas regiões pré-determinadas segundo adaptação do trabalho de Souza et al. (2017a): tubo polínico na superfície do estigma, sem crescimento no estilete; tubo polínico no estilete (independente do terço); tubo polínico no interior do ovário; tubo polínico próximo ao óvulo e tubo polínico penetrando na micrópila.

Germinação in vitro de sementes

Sementes maduras, resultantes das polinizações cruzadas e hibridações com grãos de pólen criopreservados foram desinfestadas em etanol 70% por 5 minutos, seguidas de imersão em solução de cloro ativo 1% por 30 minutos, e enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada. As sementes foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), com a metade das concentrações de sais, com adição de 3% de sacarose, 0,7% de ágar e pH ajustado para 5,8. O número de sementes variou conforme o cruzamento (Tabela 3), sendo estabelecidas duas sementes em cada tubo de ensaio.

Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento, por 45 dias, sob condições de temperatura de 27 ± 1 °C, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações começaram a partir do sétimo dia e continuaram por 30 dias, contabilizando-se as sementes germinadas e não germinadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as 16 espécies de *Wittmackia*, na porcentagem de germinação e no comprimento do tubo polínico, tanto dos grãos de pólen frescos (Controle) como nos que foram desidratadas, (Tabela 2). Uma elevada taxa de viabilidade e comprimento do tubo polínico foram observados nas espécies, com valores acima de 84,95% para viabilidade em *W. pendulispica* e 0,37 mm de comprimento do tubo polínico em *W. incompta* (Tabela 2, Figura 2).

A manutenção da viabilidade polínica após a desidratação dos grãos de pólen foi registrada para 87% das espécies de *Wittmackia*, com conteúdo de água variando de 20% a 31,2%, exceto para *W. limae* e *W. linharesiorum*, que apresentaram uma redução muito drástica no conteúdo de água (18% e 10%, respectivamente) em comparação às demais espécies submetidas ao mesmo tratamento (Tabela 2).

A porcentagem de grãos de pólen viáveis nas diferentes espécies após a desidratação variou de 97,27% em *W. laevigata* a 81,37% em *W. conduruensis*, e o comprimento do tubo polínico variou de 1,10 mm em *W. sulbahianensis* a 0,50 mm em *W. incompta* quando os grãos de pólen mantiveram um conteúdo de água acima de 20%. Pode-se observar que em grãos de pólen com conteúdo de água abaixo de 20% houve uma redução drástica da viabilidade e comprimento do tubo polínico, como exemplificado por *W. linharesiorum*, que apresentou viabilidade de 24,58% e comprimento do tubo polínico de 0,35 mm (Tabela 2, Figura 2).

A desidratação é uma das etapas mais importantes durante a criopreservação, e deve garantir que o conteúdo de água seja adequado para garantir a integridade celular durante o congelamento sem comprometer as funções celulares. A formação de cristais de gelo causa danos celulares irreversíveis, altera o equilíbrio osmótico e a integridade estrutural e coligativa das células, com consequentes lesões na exina (Benson, 2008; Souza et al., 2015). Por outro lado, a retirada excessiva de água da célula compromete seu metabolismo e viabilidade após a imersão em nitrogênio líquido.

O meio de cultura SM (Soares et al., 2008) também foi eficiente para a germinação dos grãos de pólen nas espécies estudadas. Souza et al. (2017) testaram diferentes meios de cultura para Bromeliaceae e observaram que o meio de cultura SM, por ser mais completo em nutrientes como boro, cálcio, magnésio e potássio, apresentou valores superiores ao meio de cultura BM (Parton et al., 2002), desenvolvido especificamente para Bromeliaceae.

Souza et al. (2015) estudaram a morfologia polínica por meio de microscopia eletrônica de varredura e transmissão em grãos de pólen conservados em freezer (-5°C), ultrafreezer (-80°C) e nitrogênio líquido (-196°C), com e sem desidratação. Eles observaram diferenças estruturais no conteúdo citoplasmático e na integridade da exina dos grãos de pólen. Grãos de pólen mantidos em freezer e ultrafreezer por um ano apresentaram murchamento e desprendimento da intina, além de degeneração do citoplasma. Quando os grãos de pólen foram imersos em nitrogênio líquido sem desidratação, eclodiram pelo poro, ocorrendo fissuras e ruptura da exina com expulsão do conteúdo citoplasmático, devido à formação de cristais de gelo pelo excesso de água. Apenas os grãos de pólen conservados em nitrogênio líquido com desidratação mantiveram a integridade próxima ao tratamento controle (grãos de pólen recém-coletados e analisados).

Tabela 2. Germinação in vitro de grãos de pólen e comprimento de tubo polínico em grãos recém coletados (controle) e desidratadas por 3h em sílica gel, com respectivo conteúdo de água em 16 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécies	Grãos de pólen frescos (Controle)		
	Germinação (%)	Comprimento do tubo polínico (mm)	
<i>W. amorimii</i>	87,45 b	0,81 b	
<i>W. bicolor</i>	98,45 a	0,76 c	
<i>W. brasiliensis</i>	87,02 b	0,63 d	
<i>W. burle-marxii</i>	96,85 a	0,63 d	
<i>W. canaliculata</i>	95,77 a	0,47 e	
<i>W. conduruensis</i>	85,00 c	0,69 c	
<i>W. froesii</i>	89,03 b	0,72 c	
<i>W. incompta</i>	95,28 a	0,37 f	
<i>W. ituberaensis</i>	98,35 a	0,71 c	
<i>W. laevigata</i>	94,33 a	0,91 b	
<i>W. limae</i>	88,63 b	1,18 a	
<i>W. linharesiorum</i>	87,58 b	1,02 a	
<i>W. patentissima</i>	94,19 a	0,46 e	
<i>W. pendulispica</i>	84,95 c	0,63 d	
<i>W. sulbahianensis</i>	87,59 b	1,02 a	
<i>W. turbinocalyx</i>	92,40 b	0,87 b	
CV (%)	21,12	9,58	
Espécies	Grãos de pólen desidratados em sílica gel por 3h		
	Conteúdo de água (%)	Germinação (%)	Comprimento do tubo polínico (mm)
<i>W. amorimii</i>	31,02 a	86,65 a	0,88 b
<i>W. bicolor</i>	28,47 a	92,42 a	0,80 b
<i>W. brasiliensis</i>	28,84 a	84,84 a	0,62 d
<i>W. burle-marxii</i>	28,47 a	90,72 a	0,60 d
<i>W. canaliculata</i>	22,14 b	85,77 a	0,51 e
<i>W. conduruensis</i>	29,00 a	81,37 a	0,72 c
<i>W. froesii</i>	21,60 b	88,90 a	0,74 c
<i>W. incompta</i>	20,00 b	95,33 a	0,50 e
<i>W. ituberaensis</i>	26,00 a	90,35 a	0,68 c
<i>W. laevigata</i>	20,00 b	97,27 a	1,02 a
<i>W. limae</i>	18,19 b	72,63 b	1,05 a
<i>W. linharesiorum</i>	10,00 c	24,58 c	0,35 f
<i>W. patentissima</i>	21,43 b	89,78 a	0,58 d
<i>W. pendulispica</i>	27,94 a	89,95 a	0,72 c
<i>W. sulbahianensis</i>	25,00 a	88,32 a	1,10 a
<i>W. turbinocalyx</i>	23,75 b	87,86 a	0,85 b
CV (%)	12,35	18,13	11,18

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna se agrupam pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,01$).

Para os ensaios de criopreservação, observou-se diferença significativa entre as 16 espécies ($p < 0,01$) e não significativa para os três períodos de conservação (30, 180 e 36 dias) ($p = 0,872$). (Tabela 3). Todas as espécies apresentaram grãos de pólen viáveis acima de 83%, com exceção de *W. linharesiorum*, que apresentou viabilidade média de 15%. As maiores porcentagens de grãos de pólen viáveis foram encontradas nas espécies *W. burle-marxii*, *W. canaliculata*, *W. laevigata*, *W. limae* e *W. pendulispica* com médias acima de 94,61% independente do tempo de conservação (Tabela 3).

Tabela 3. Germinação in vitro de grãos de pólen e comprimento de tubo polínico em grãos desidratados por 3h em sílica gel e criopreservados por 30, 180 e 360 dias em 16 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica.

Espécies	Germinação (%)			Comprimento do tubo polínico (mm)		
	30 dias	180 dias	360 dias	30 dias	180 dias	360 dias
<i>W. amorimii</i>	86,87 c	85,71 c	86,12 c	0,82 b	0,85 b	0,81 c
<i>W. bicolor</i>	94,11 b	91,12 b	92,78 b	0,83 b	0,79 b	0,91 b
<i>W. brasiliensis</i>	83,86 d	85,70 c	86,13 c	0,54 d	0,64 c	0,64 c
<i>W. burle-marxii</i>	98,19 a	96,60 a	94,86 a	0,58 d	0,55 c	0,64 c
<i>W. canaliculata</i>	96,47 a	95,35 a	95,12 a	0,80 b	0,78 b	0,82 c
<i>W. conduruensis</i>	88,78 c	84,73 c	82,21 d	0,77 b	0,75 b	0,70 c
<i>W. froesii</i>	84,98 d	84,33 c	90,12 a	0,68 c	0,71 b	0,65 c
<i>W. incompta</i>	90,59 b	91,82 b	89,49 b	0,42 e	0,52 c	0,50 d
<i>W. ituberaensis</i>	93,16 b	91,72 b	92,58 b	0,95 a	0,91 a	0,95 a
<i>W. laevigata</i>	98,78 a	96,28 a	96,57 a	1,00 a	0,95 a	1,03 a
<i>W. limae</i>	98,31 a	97,81 a	94,61 a	1,08 a	1,06 a	1,12 a
<i>W. linharesiorum</i>	17,71 e	14,83 d	12,35 e	0,17 f	0,25 d	0,22 e
<i>W. patentissima</i>	94,28 b	93,65 b	91,12 b	0,59 d	0,59 c	0,63 c
<i>W. pendulispica</i>	98,46 a	95,11 a	93,61 a	0,84 b	0,80 b	0,77 c
<i>W. sulbahianensis</i>	90,65 c	87,25 c	88,45 c	0,96 a	1,00 a	1,08 a
<i>W. turbinocalyx</i>	87,89 c	86,30 c	90,91 c	0,82 b	0,85 b	0,78 c
CV (%)	28,72			16,32		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna se agrupam pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,01$).

Esses resultados corroboram a metodologia de criopreservação empregada neste trabalho e confirma que a desidratação prévia por 3 horas é eficiente para o atingimento do conteúdo de água adequado para as espécies estudadas. A única

espécie que registrou baixa viabilidade, *W. linharesiorum*, apresentou grãos de pólen com conteúdo de água de 10%, mostrando a necessidade de ajuste no tempo de desidratação.

Para o comprimento do tubo polínico, houve variação apenas entre as espécies de *Wittmackia* ($p < 0,01$), com os maiores valores observados em *W. ituberaensis*, *laevigata*, *W. limae* e *W. sulbahianensis* e médias superiores a 0,95 mm. *W. linharesiorum* apresentou o menor valor médio, de 0,17 mm independentemente do tempo de conservação. Os valores, referentes à viabilidade e ao comprimento do tubo polínico após a criopreservação estão próximos aos resultados observados para viabilidade dos grãos de pólen frescos (controle) e desidratados (Tabela 2 e 3), evidenciando assim o sucesso no procedimento de criopreservação.

Durante o armazenamento em temperaturas ultrabaixas, o metabolismo fisiológico do grão de pólen é praticamente interrompido, chegando a um estado de não divisão celular (Kantha, 1985; Bajaj, 1995; Kaya; Souza, 2017). Contudo, o tempo em que os grãos de pólen permanecem preservados, apesar da redução de atividade metabólica, a viabilidade pode ser mantida por um período indefinido, desde que as células mantenham sua estrutura intacta. Isso permitirá o retorno de suas atividades normais após o descongelamento (Medeiros e Cavallari, 1992; Carvalho e Vidal, 2003; Souza et al., 2015).

O tamanho do grão de pólen pode ser fator determinante para a técnica de criopreservação, quanto menor os grãos de pólen, mais rápido será a redução do conteúdo de água durante a desidratação. Nos estudos apresentados no Capítulo 1, *Wittmackia linharesiorum* apresentou um dos menores tamanhos de grãos de pólen em comparação com às demais espécies, com diâmetro polar de $20,14 \pm 1,70 \mu\text{m}$ e diâmetro equatorial com $28,17 \pm 2,55 \mu\text{m}$, enquanto *W. amorimii* apresentou diâmetro polar de $25,47 \pm 1,12 \mu\text{m}$ e diâmetro equatorial com $37,52 \pm 1,62 \mu\text{m}$.

A baixa porcentagem de germinação observada em *Wittmackia linharesiorum* pode estar relacionada com o baixo conteúdo de água após a desidratação. Estudos desenvolvidos por Rocha et al. (2023) para o ensaio de conservação à baixa temperatura: ultrafreezer ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-80 \text{ }^\circ\text{C}$), freezer ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) e nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) com mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae), observaram baixa germinação dos grãos de pólen em nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) em função do baixo conteúdo de água após o processo de desidratação em sílica gel por 24h. Esses autores relatam que o processo de desidratação pode ter causado danos à membrana

externa do grão de pólen (exina), o que ocasionou a queda abrupta da viabilidade polínica (Rocha et al., 2023).

Ensaio de desidratação de grãos de pólen de *Aechmea bicolor* L.B.Sm. (Bromeliaceae), conduzidos por Souza et al. (2015), observaram que a utilização de sílica gel ativada por 3 horas permitiu alcançar um teor de água entre 40% e 26%, resultando em uma germinação in vitro superior a 95%. Os autores investigaram diversos métodos de desidratação, como incubação a 27 °C, uso de câmara de fluxo laminar, estufa a 37 °C e dessecador com sílica gel ativada, concluindo que esse último método apresenta vantagens significativas devido ao seu controle preciso e eficiente da desidratação, fácil repetibilidade e capacidade de desidratar os grãos de pólen de maneira controlada, sem que ocorra a desidratação rápida ou excessiva. Esses resultados justificam a aplicação do método de desidratação por três horas em sílica gel para grãos de pólen de todas as espécies de *Wittmackia* estudadas neste trabalho. Com exceção de *W. linharesiorum*, estas espécies apresentaram, tanto no conteúdo de água, quanto nas porcentagens de germinação, resultados muito similares, ampliando ainda mais o escopo de aplicação deste protocolo.

Além do conteúdo de água, a composição do meio de cultura é outro fator relevante para os resultados. O equilíbrio osmótico entre o grão de pólen e o meio de cultura é importante para manter sua integridade, fundamental para a viabilidade após o congelamento (Galleta, 1983). Este equilíbrio é determinado pelas concentrações de sacarose e de outras substâncias no meio de cultura, como ácido bórico, nitrato de potássio e nitrato de cálcio; o excesso ou deficiência desses componentes pode promover o rompimento dos grãos de pólen, comprometendo o resultado do teste (Souza, et al., 2015; Silva et al., 2017).

A determinação da viabilidade polínica através da germinação in vitro foi observada em diversas espécies de Bromeliaceae (Souza et al., 2017; Mota et al., 2024; Fagundes et al., 2024), bem como por métodos indiretos baseados em parâmetros citológicos, como a histoquímica (Souza et. 2017b; Mota et al., 2024). Contudo, o sucesso da viabilidade in vitro ou histológica é um indicativo, mas não garante o sucesso da fertilização, sendo o teste in vivo, o mais eficaz (Dane e Ekici, 2011; Souza et al., 2015; Silva et al., 2017). A germinação in vitro, embora forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico in vivo e sua capacidade de fertilização do óvulo.

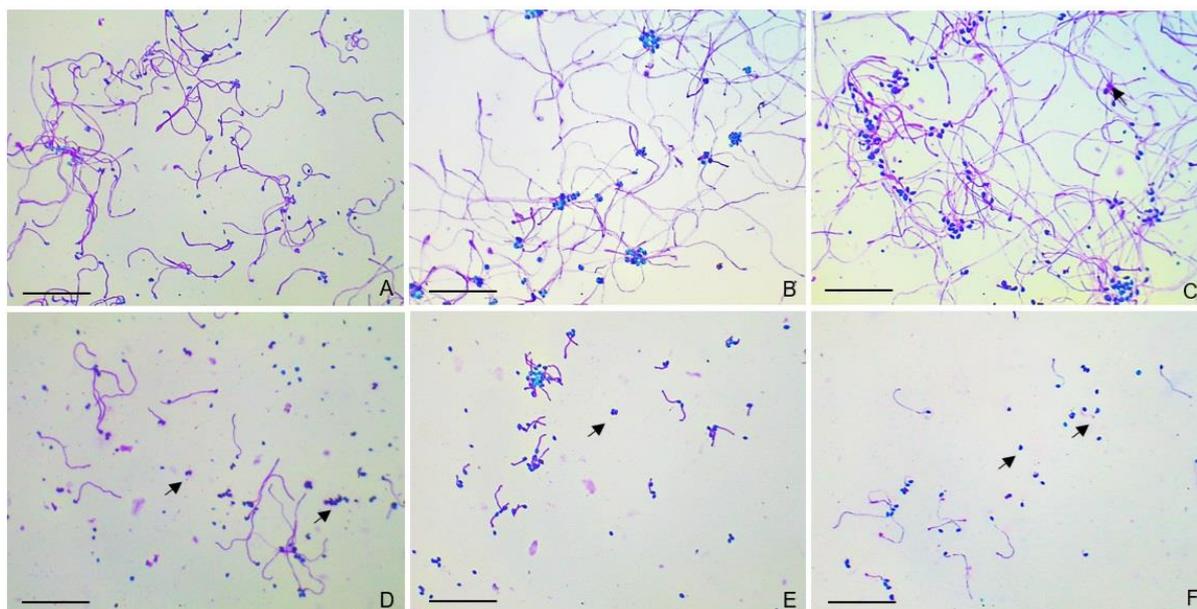


Figura 2. Germinação *in vitro* com grãos de pólen criopreservados em 16 espécies do gênero *Wittmackia* (Bromeliaceae). A) *Wittmackia pendulispica* (30 dias de criopreservação); B) *W. limae* (180 dias de criopreservação); C) *W. laevigata* (360 dias de criopreservação); D) *W. linharesiorum* (30 dias de criopreservação) E) *W. linharesiorum* (180 dias de criopreservação); F) *W. linharesiorum* (360 dias de criopreservação). Setas=pólenes inviáveis. Barras: A-F=5mm.

Viabilidade *in vivo* com grãos de pólen criopreservados

Para os testes de viabilidade *in vivo*, foram realizadas 793 polinizações utilizando grãos de pólen criopreservados das 16 espécies de *Wittmackia*. Desse total, 134 polinizações foram realizadas dentro da mesma espécie (xenogamia), enquanto 659 foram hibridações interespecíficas em 71 combinações (Tabela 4). Foi possível realizar 29,58% das 240 combinações de cruzamentos planejadas, resultando em um sucesso de 44% na formação de frutos, dos quais 37% ocorreram por xenogamia, e 63% por hibridações.

Verificou-se que todas as polinizações por xenogamia resultaram em frutos com sementes, com os valores mais elevados para *W. amorimii* (285 sementes) e, os menores valores para *W. patentissima* (8 sementes) (Tabela 4). A redução do número de sementes em *W. patentissima* pode estar associada à sua autocompatibilidade parcial relatada no Capítulo 2.

Polinização com grãos de pólen desidratados e criopreservados por 360 dias resultou na produção de quantidades satisfatórias de frutos e sementes, comparável à polinização com grãos de pólen frescos. Isso demonstra que o método de armazenamento mantém a integridade e viabilidade desses grãos de pólen. Em

estudos conduzidos de Souza et al. (2015) e Silva et al. (2017), com grãos de pólen de *Aechmea bicolor* e *Ananas* Mill. respectivamente, submetidos ao mesmo tratamento de desidratação e armazenamento, os resultados mostraram alta viabilidade, integridade morfológica e ultraestrutural, permitindo também a formação de frutos com sementes.

A conservação a longo prazo dos grãos de pólen pode apoiar futuros cruzamentos controlados em espécies de *Wittmackia* com florescimento assincrônico. Além disso, o presente estudo também pode facilitar cruzamentos por xenogamia entre populações reduzidas de *Wittmackia*, localizadas em diferentes fragmentos florestais, promovendo assim o fluxo gênico entre esses indivíduos.

Com relação às hibridações, espécies de *Wittmackia* com proximidades morfológicas registraram valores superiores quanto ao número de sementes, como em: *W. canaliculata* x *W. laevigata* (212 sementes); *W. sulbahianensis* x *W. froesii* (152 sementes); *W. conduruensis* x *W. ituberaensis* (140 sementes) e, *W. bicolor* x *W. pendulispica* (132 sementes). Valores inferiores para o número de sementes foram observados em *W. froesii* x *W. pendulispica* (6 sementes); *W. linharesiorum* x *W. pendulispica* (15 sementes) e, *W. ituberaensis* x *W. patentissima* (18 sementes) (Tabela 4). Essa semelhança floral, assim como a sobreposição de floração contribuem com o processo de hibridação entre as espécies (Teixeira et al., 2016).

Silva et al. (2017), ao realizar polinizações in vivo com grãos de pólen criopreservados de abacaxizeiros, tanto de acessos silvestres quanto cultivados, nas mesmas condições estabelecidas neste estudo, obtiveram resultados satisfatórios com geração de sementes por xenogamia e híbridadas em diversas combinações.

Para que ocorra uma polinização eficiente, é necessário realizar estimativas sobre a quantidade, qualidade, viabilidade e capacidade de germinação dos grãos de pólen a serem utilizados como já observado em estudos na literatura (Soares et al., 2011; Abdelgadir et al., 2012; Souza et al., 2017b; Mota, 2024). Os grãos de pólen armazenados precisam estar viáveis para garantir sucesso nas hibridações, sendo essencial monitorá-los antes e após a conservação (Souza et al., 2015).

Em programas de melhoramento, é crucial utilizar grãos de pólen no estágio de maturidade adequado para garantir a manutenção da viabilidade e da capacidade de germinação durante as hibridações (Franzon e Raseira, 2006). No presente estudo, os grãos de pólen frescos de *Wittmackia* coletados durante a antese demonstraram eficácia em todos os métodos de avaliação de viabilidade (histoquímica e germinação

in vitro), além de terem apresentado uma produção adequada de grãos de pólen (de 63.333 a 183.333 grãos) (Capítulo 1). Também foram conduzidos ensaios prévios de hibridizações com grãos de pólen frescos, confirmando sua eficiência na formação de frutos com sementes (Capítulo 2).

A conservação dos grãos de pólen em espécies de *Wittmackia* pode facilitar a geração de híbridos entre espécies que florescem em períodos distintos do ano. As espécies de *Wittmackia* têm um ciclo anual de floração, onde cada planta floresce apenas uma vez e posteriormente emite brotos laterais, como é comum na maioria das Bromeliaceae (Benzing, 2000). No entanto, muitas dessas espécies apresentam um padrão de floração assíncrono, o que requer o uso de indutores florais para promover a polinização cruzada e hibridizações (Souza et al., 2009; 2017).

A indução e sincronização do florescimento em Bromeliaceae utilizando etileno já vem sendo relatada na literatura, principalmente em espécies dos gêneros *Ananas*; *Aechmea*; *Guzmania* Ruiz & Pav; *Neoregelia* L. B. Sm; *Tillandsia* L. e *Vriesea* Lindl (Mekers et al., 1983; Almeida et al., 2003; Souza et al., 2009; 2017).

No entanto, o florescimento das Bromeliaceae pode levar até 16 semanas após a aplicação do indutor a depender do gênero, o produto aplicado, concentração, ou condições ambientais (Black e Dehgan, 1994). É importante também destacar que a indução do florescimento com indutores não é eficaz para todas as espécies. Em *Wittmackia*, não há registros de estudos sobre a indução de florescimento.

Com relação à ausência de sementes nas hibridações a partir dos cruzamentos controlados após a criopreservação, pode também estar relacionada às incongruências entre as espécies, conforme pode ser confirmado e observado nos estudos do crescimento do tubo polínico no pistilo realizados por microscopia de fluorescência com filtro UV, utilizando azul de anilina como marcador de calose (Figura 3).

Tabela 4. Xenogamia e cruzamentos interespecíficos com grãos de pólen criopreservados de 16 espécies de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas da Bahia e ocorrentes na Mata Atlântica.

♀ \ ♂	<i>W. amorimii</i>	<i>W. bicolor</i>	<i>W. brasiliensis</i>	<i>W. burle-marxii</i>	<i>W. canaliculate</i>	<i>W. conduruensis</i>	<i>W. froesii</i>	<i>W. incompta</i>	<i>W. ituberaensis</i>	<i>W. laevigata</i>	<i>W. limae</i>	<i>W. linharesiorum</i>	<i>W. patentissima</i>	<i>W. pendulispica</i>	<i>W. sulbalianensis</i>	<i>W. turbinocalyx</i>
<i>W. amorimii</i>	6/6 (285 s)	-	-	-	-	-	-	0/10	-	-	-	-	-	0/10	-	0/10
<i>W. bicolor</i>	0/10	18/18 (118 s)	-	-	0/9	-	-	14/20 (23 s)	-	3/5 (78 s)	-	0/9	0/9	5/5 (132 s)	-	-
<i>W. brasiliensis</i>	-	3/3 (58 s)	5/5 (72 s)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. burle-marxii</i>	-	-	-	5/5 (65 s)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/6 (22 s)
<i>W. canaliculate</i>	-	-	-	-	6/6 (188 s)	-	-	-	-	4/4 (212 s)	-	-	0/6	-	-	-
<i>W. conduruensis</i>	0/10	-	-	-	-	9/10 (128 s)	-	-	5/5 (140 s)	-	-	0/8	-	0/10	-	-
<i>W. froesii</i>	-	0/10	-	0/10	0/8	0/10	9/10 (92 s)	6/8 (92 s)	-	-	4/10 (30 s)	5/10 (20 s)	20/20 (27 s)	3/10 (6 s)	0/7	0/20
<i>W. incompta</i>	-	0/10	10/10 (78 s)	8/10 (59 s)	-	-	12/12 (75 s)	10/10 (85 s)	-	0/7	-	12/20 (22 s)	7/7 (78 s)	-	-	-
<i>W. ituberaensis</i>	-	0/10	0/7	10/10 (126 s)	0/10	5/5 (124 s)	-	-	6/6 (128 s)	-	-	5/10 (120 s)	7/9 (18 s)	-	9/9 (128 s)	-
<i>W. laevigata</i>	-	0/8	-	-	-	-	-	0/8	-	5/5 (186 s)	-	-	-	-	-	-
<i>W. limae</i>	-	-	-	10/10 (56 s)	-	-	-	-	-	-	9/9 (74 s)	08/10 (21 s)	0/3	0/10	-	-
<i>W. linharesiorum</i>	-	-	-	0/10	-	-	0/10	-	-	-	-	10/10 (186 s)	-	9/10 (15 s)	0/7	-
<i>W. patentissima</i>	-	-	-	-	-	-	-	6/6 (52 s)	-	0/7	-	-	16/16 (8 s)	-	-	0/10
<i>W. pendulispica</i>	0/10	5/5 (128 s)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/4	8/8 (145 s)	-	-
<i>W. sulbalianensis</i>	-	6/10 (28 s)	0/7	0/10	-	-	7/7 (152 s)	-	-	0/7	0/10	-	-	0/8	4/6 (147 s)	-
<i>W. turbinocalyx</i>	-	-	0/7	-	-	-	-	-	-	-	0/8	7/9 (122 s)	0/7	-	-	4/4 (128 s)

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

Em preto = Xenogamia; em cinza (sucessos em hibridações interespecíficas).

O acompanhamento das polinizações (xenogamia e hibridações) utilizando a técnica de microscopia de fluorescência com filtro UV, com azul de anilina, permitiu observar uma eficiente deposição de grãos de pólen na superfície do estigma (Figura 3A, E, F). As polinizações por xenogamia foram bem-sucedidas em todas as 16 espécies estudadas, sendo observado a presença de tubos polínicos no estilete e tubos polínicos penetrando a micrópila dos óvulos (Figura 2B, C). Das 30 hibridações de sucesso, apenas oito foram recíprocas, *W. conduruensis* ⇔ *W. ituberaensis*, *W. incompta* ⇔ *W. froesii*, *W. incompta* ⇔ *W. patentissima* e *W. bicolor* ⇔ *W. pendulispica* (Tabela 4, Figura 3G).

Nas hibridações com grãos de pólen criopreservados, ocorreu incongruência em 56% dos cruzamentos. Os principais fenômenos de incongruência foram: ausência de germinação de grãos de pólen na superfície do estigma, como foi observado em *W. laevigata* x *W. bicolor*, *W. froesii* x *W. conduruensis* e *W. froesii* x *W. burle-marxi* (Figura 3D); tubo polínico com enovelamento no terceiro terço do estilete em *W. linharesiorum* x *W. froesii*; *W. limae* x *W. patentissima* e *W. pendulispica* x *W. patentissima* (Figura 3H); e interrupção do tubo polínico no ovário, sem penetração na micrópila, em *W. incompta* x *W. laevigata*, *W. turbinocalyx* x *W. brasiliensis* e *W. sulbahianensis* x *W. burle-marxii* (Figura 3I).

Para a maioria das hibridações, observou-se que os cruzamentos com incongruências apresentaram tubos polínicos de forma aleatória e paralisação no pistilo, confirmando a ausência de fertilização (Figura 3J); por outro lado, as hibridações bem-sucedidas mostraram tubos polínicos agrupados em feixes com deposição de calose e penetração dos tubos polínicos na micrópila dos óvulos (Figura 3L, K).

A ausência de fertilização observada nas hibridações pode estar relacionada a barreiras pré ou pós-zigóticas. Mecanismos pré-zigóticos após a polinização incluem a heteroespecificidade dos grãos de pólen, ou seja, interações como polén-pistilo, polén-óvulo e tamanho do tubo polínico, que reduzem a chance dos tubos polínicos alcançarem o óvulo quando comparados com grãos de pólen de outra espécie, o que impede ou reduz as taxas de germinação interespecífica (Tiffin et al., 2001; Baack et al., 2015). Por outro lado, os mecanismos pós-zigóticos incluem a inviabilidade, esterilidade do híbrido, e a falha ou redução da reprodução bem-sucedida nas gerações seguintes, causados por incompatibilidades genéticas ou baixa adaptação

aos habitats das espécies parentais (Tiffin et al., 2001; Rieseberg e Willis, 2007; Goodwillie e Ness, 2013).

A interrupção dos tubos polínicos no estigma, estilete ou ovário, com grãos de pólen interespecífico apresentaram incongruência semelhante a autoincompatibilidade relatada em estudos dos sistemas reprodutivos de *Wittmackia* (Capítulo 2), onde espécies autoincompatíveis rejeitam seu próprio pólen (Rieseberg e Willis, 2007; Cavalcante et al., 2020). Provavelmente, as inconsistências observadas para incongruências são causadas pelos mesmos elementos de autoincompatibilidade (Hancock et al., 2003).

Os estudos das barreiras reprodutivas são de extrema importância para entender o papel do fluxo gênico interespecífico na especiação em Bromeliaceae (Palma-Silva et al., 2016). Além disso, o desenvolvimento de híbridos controlados utilizando grãos de pólen criopreservados em Bromeliaceae visa aumentar a variabilidade genética e produzir híbridos superiores para o mercado de plantas ornamentais, que valoriza constantemente novidades.

Os resultados apresentados sugerem que os grãos de pólen das espécies de *Wittmackia* podem ser armazenados em criobancos por longos períodos, conservando os recursos genéticos dessas espécies e oferecendo aos melhoristas uma alternativa viável para realizar polinizações cruzadas e hibridações entre espécies com períodos de florescimento assincrônico.

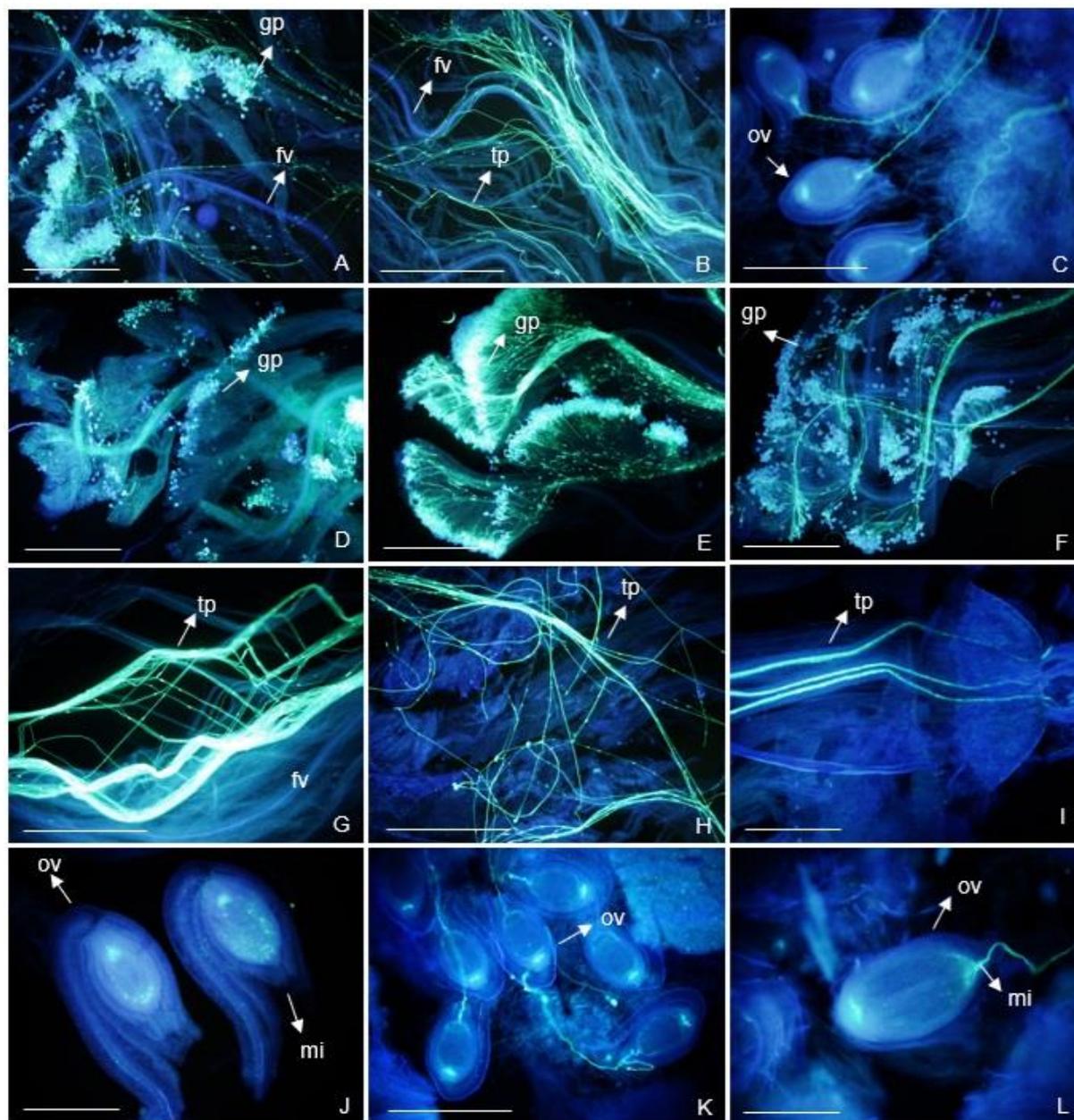


Figura 3. Teste de viabilidade in vivo com grãos de pólen criopreservados de *Wittmackia* (Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica, evidenciando o crescimento do tubo polínico no estigma e as incongruências por meio da microscopia de fluorescência com filtro UV e solução de azul de anilina. A-C) Polinizações por xenogamia; D-L) Hibridizações interespecíficas. A) Xenogamia em *Wittmackia bicolor* evidenciando grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma; B) Xenogamia em *W. amorimii* evidenciando tubos polínicos distribuídos em feixes; C) Xenogamia de *incompta* evidenciando penetração dos tubos polínicos na micrópila dos óvulos resultando na fertilização; D) Hibridação entre *W. laevigata* x *W. bicolor* evidenciando grãos de pólen na superfície do estigma sem germinação e poucos grãos de pólen com tubos polínicos paralisados na superfície do estigma; E) Hibridação entre *W. conduruensis* x *W. amorimii* evidenciando muitos grãos de pólen germinando no estigma; F) Hibridação entre *W. bicolor* x *W. pendulispica* evidenciando grande deposição de grãos de pólen na superfície do estigma; G) Hibridação entre *W. bicolor* x *W. pendulispica* evidenciando tubos polínicos distribuídos em feixes; H) Hibridação entre *W. linharesiorum* x *W. froesii* evidenciando

enovelamento dos tubos polínicos no terceiro terço do estilete; I) Hibridação em *W. incompta* x *W. froesii* evidenciando tubo polínico com paralisação no ovário; J) Hibridação entre *W. linharesiorum* x *W. sulbahianensis* evidenciando os óvulos sem a penetração do tubo polínico na micrópila resultando na ausência de fertilização; K) Hibridação entre *W. incompta* x *W. brasiliensis* evidenciando penetração do tubo polínico na micrópila dos óvulos resultando na fertilização; L) Hibridação em *W. canaliculata* x *W. laevigata* evidenciando penetração do tubo polínico na micrópila dos óvulos resultando na fertilização. gp = grãos de pólen, tp = tubo polínico, mi = micrópila, ov = óvulo, fv = feixe vascular. Barras: A, D-F, I = 1mm; J, L= 200 µm; B, C, G, H, K= 500 µm.

Germinação in vitro de sementes

Registrou-se germinação em 89,5% das sementes nos cruzamentos xenogâmicos e hibridações interespecíficas utilizando grãos de pólen criopreservados (Figura 4). Foi verificada uma baixa porcentagem de contaminação fúngica (4,5%). A emissão da radícula, que marca o início da germinação, foi registrada entre o sétimo e o décimo dia para todas as combinações, independentemente dos diferentes períodos de conservação.

A contaminação exerce influência significativa na fase inicial do cultivo in vitro, representando um desafio para a produção em larga escala de espécies de interesse econômico (Singh et al., 2013).

De acordo com Parisi et al. (2019), os microrganismos podem levar à morte das sementes por meio da ação de enzimas e toxinas produzidas pelos patógenos, o que pode ocorrer antes do início da germinação, durante o processo ou após o estabelecimento das plântulas, como *Dyckia* Schult.f. (Bertsouklis e Panagaki, 2022), *Vriesea*, *Hohenbergia* Schult. & Schult.f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Silva et al., 2021), *Aechmea* (Silva et al., 2022) e *Lymania* Read (Mota et al., 2023).

A germinação in vitro das sementes das espécies estudadas demonstrou viabilidade, resultando na produção de plântulas saudáveis que estão sendo utilizadas para trabalhos de conservação in vitro e micropropagação. No futuro, essas plântulas poderão ser reintroduzidas em ambientes naturais, no caso apenas de cruzamentos xenogâmicos. As sementes híbridas serão avaliadas quanto ao seu potencial ornamental e, uma vez confirmado, serão lançadas como novas cultivares.

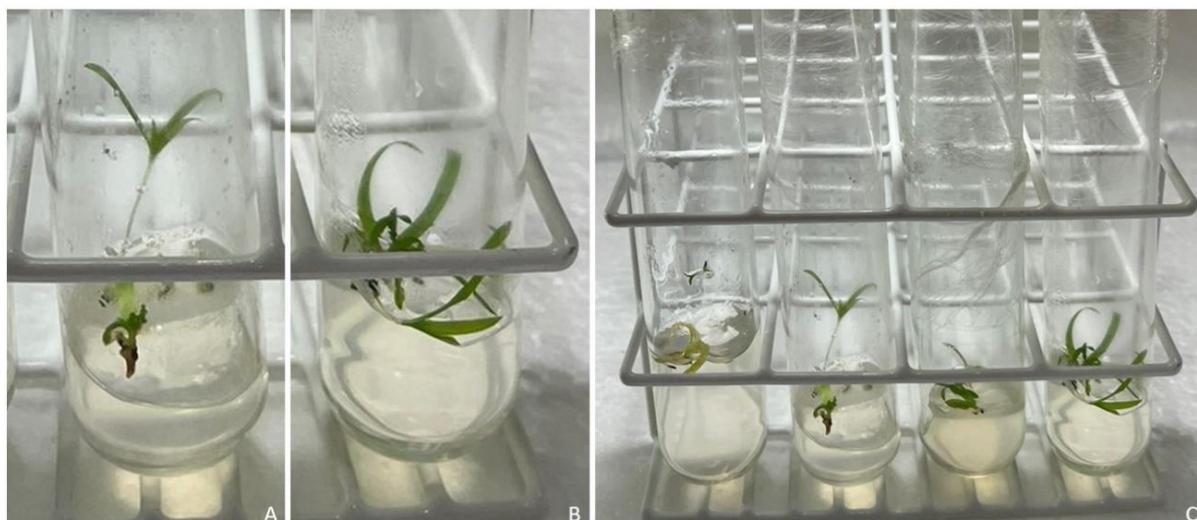


Figura 4. Germinação in vitro de sementes híbridas com grãos de pólen criopreservados de *Wittmackia* (Bromelioideae, Bromeliaceae) endêmicas do Brasil e ocorrentes na Mata Atlântica. A) *Wittmackia limae* (♀) x *W. linharesiorum* (♂). B) *Wittmackia froesii* (♀) x *W. limae* (♂). C) *Wittmackia limae* (♀) x *W. linharesiorum* (♂) e *Wittmackia froesii* (♀) x *W. limae*.

CONCLUSÃO

A criopreservação é um método eficiente para a conservação do grão de pólen de espécies de *Wittmackia* no período de um a 360 dias, demonstrando que o método de armazenamento mantém a integridade e viabilidade dos grãos de pólen, comprovado pelos testes in vitro e in vivo.

A técnica de microscopia de fluorescência com filtro UV, com azul de anilina, foi eficiente para observação de polinizações por xenogamia e hibridizações, confirmada pela observação de tubos polínicos penetrando a micrópila dos óvulos para as polinizações bem-sucedidas e incongruências com tubos polínicos de forma aleatória e paralisação do tubo polínico no pistilo.

A germinação das sementes com grãos de pólen criopreservadas foi satisfatória, e poderão ser avaliadas quanto o seu potencial ornamental ou reintroduzidas futuramente no ambiente.

Os resultados obtidos neste trabalho são inovadores e viabilizam a conservação em longo prazo de grãos de pólen em *Wittmackia* spp. Além disso, contribuem significativamente para programas de melhoramento genético e conservação de parte da variabilidade genética do gênero *Wittmackia*.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-SANTORO, J. A. Taxonomy of the *Ronnbergia alliance* (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 303, n. 1, p. 615-640, 2017.
- AGUIRRE-SANTORO, J.; MICHELANGELI, F. A.; STEVENSON, D. W. Molecular phylogenetics of the *Ronnbergia Alliance* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into their morphological evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 100, n. 1, p. 1-20, 2016.
- ALMEIDA, F. A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 295-302, 2002.
- ALMEIDA, E. F. A.; RODRIGUES, M. G. V.; SILVA, F. C.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, I. A.; CARVALHO, M. M.; ARAÚJO, R. A.; PARRELA, R. A. C. Indução floral em bromélia *Guzmania* 'Grand Prix'. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 129-134, 2003.
- ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, Y. J.; VAN, S. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, Amsterdã, v. 79, n. 1, p. 132-139, 2012.
- AZEVEDO, M. L.; TITON, M.; MARAVILHA, L. F.; SPERANDIO, H. V.; SILVA, A. V. S.; GORGENS, E. G. Estabelecimento in vitro do mogno africano (*Khaya grandifoliola*) a partir de sementes e explantes. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 26, n. 48, p. 175-179, 2023.
- BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (Org.). **Cryopreservation of plant germplasm**. Berlim: Biotechnology in agriculture and Forestry, 1995. pp. 3-28.
- BARNABÁS, B.; RAJKI, E. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at -196°C in liquid nitrogen. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 747-752, 1976.
- BLACK, R. J.; DEHGAN, B. **Bromeliads**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Cooperative Extension Service, 1994.
- BERTSOUKLIS, K.; PANAGAKI, K. P. In vitro germination and propagation of *Dyckia brevifolia*, an ornamental and endangered bromeliad. **Horticulturae**, The Hague, v. 8, n. 5, p. 390, 2022.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Org.). **Plant cryopreservation**. A practical guide. New York: Springer, 2008. pp. 15-32.

CASTRO, A. C. R.; CORREIA, D.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H.; FRANCO, J. CAVALCANTI, T. B.; SILVA, D. A. Brazilian ornamental phylogenetic resources in Embrapa germplasm banks: obstacles and opportunities. **Ornamental Horticulture, Campinas**, v. 28, n. 4, p. 396-406, 2022.

CAVALCANTE, B. C.; 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**, Oxford, v. 192, n. 4, p. 828-839, 2020.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 22p.

CARVALHO, K. I. M.; FERNANDES, H. B.; MACHADO, F. D. F.; OLIVEIRA, I. S.; OLIVEIRA, F. A.; NUNES, P. H. M.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA, R. C. M. Antiulcer activity of ethanolic extract of *Encholirium spectabile* Mart. ex Schult & Schult.f. (Bromeliaceae) in rodents. **Biological Research**, Santiago, v. 43, n. 4, p. 459-465, 2010.

DANE, F. Y.; EKICI, N. Pollen tube growth of *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae) in vitro and in vivo. **Bangladesh Journal of Botany**, Chichester, v. 40, n. 1, p. 93-95, 2011.

FAGUNDES, A.; SOUZA, E. H.; SILVEIRA, F. L.; MACHADO, I. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. Autogamy ensures reproductive success in the bromeliad *Dyckia dissitiflora* Schult.f., endemic to the Brazilian caatinga domain. **Plant Species Biology**, Cambridge, v. 39, n. 1, p.1-15, 2024.

FERREIRA, I. J. M.; BORGES, K. A.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, R. C.; PEREIRA, F. H.; GONÇALVES, P. B.; LIMA, E. S. Landscape pattern changes over 25 years across a hotspot zone in southern Brazil. **Southern Forests**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 175-184, 2019.

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.; GORGES, 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: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. 315-396, p.

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, n.1, p. 18-20, 2006.

GALLETA, G. J. Pollen end seed management. In: MOORE, J. N.; JANINICK, J. (Org.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. Pp. 23-47.

GOODWILLIE, C.; NESS, J. M. Interactions of hybridization and mating systems: a case study in *Leptosiphon* (Polemoniaceae). **American Journal of Botany**, Hoboken, v. 100, n. 6, p.1002-1013, 2013.

HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. A.; CLOBERT, J.; DAVIES, K. F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R. D.; LOVEJOY, T. E.; SEXTON, J. O.; AUSTIN, M. P.; COLLINS, C. D.; COOK, W. M.; DAMSCHEN, E. I.; EWERS, R. M.; FOSTER, B. L.; JENKINS, C. N.; KING, A. J.; LAURANCE, W. F.; LEVEY, D. J.; MARGULES, C. R.; MELBOURNE, B. A.; NICHOLLS, A. O.; ORROCK, J. L.; SONG, D. X.; TOWNSHEND, J. R. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, Bristol, v. 2, n. 1, p.15-52, 2015.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K. K. (Org.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. pp. 115-134.

KAYA, E.; SOUZA, F. V. D. Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. In **in vitro cellular & developmental Biology**, Philadelphia, v. 53, n.4, p. 410-417, 2017.

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

MEDEIROS, A. C. S.; CAVALLARI, D. A. N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* Fr. All.) Engl. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). **Revista Brasileira de Sementes**, Campina Grande, v. 14, n. 1, p. 73-75, 1992.

MEKERS, O.; PROFT, M.; JACOBS, L. Prevention of unwanted flowering of ornamental Bromeliaceae by grow regulating chemicals. **Acta Horticulture**, The Hague, v.1, n. 1, p. 217-224, 1983.

MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; CAVALCANTE, B. P. C.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, E. H. Reproductive systems and hybridization of *Lymania* species (Bromeliaceae) endemic to Northeast Brazil threatened with extinction. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 322, n. 1, p. 112-447, 2023.

MOTA, S. S.; FARO, I. A. M.; SOARES, T. L.; ALMEIDA, P. S.; SOUZA, F. V. D.; AONA, L. Y. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROSSI, M. L.; SOUZA, E. H. Pollen morphology and viability of *Lymania* (Bromeliaceae) species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 338, n.1, p. 112-890, 2024.

NUNES, A. T.; CABRAL, D. L. V.; AMORIM, E. L. C.; SANTOS, M. V. F.; ALBUQUERQUE, U. P. Plants used to feed ruminants in semi-arid Brazil: A study of nutritional composition guided by local ecological knowledge. **Journal of Arid Environments**, London, v.135, n.1, p. 96-103, 2016.

PALMA-SILVA, C.; LEAL, B. S. S.; CHAVES, C. J. N.; FAY, M. F. Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.181, n.1, p. 305-322, 2016.

PARISI, J. J. D.; SANTOS, A. F.; BARBEDO, C. J.; MEDINA, P. F. Patologia de sementes florestais: danos, detecção e controle, uma revisão. **Summa Phytopathol**, Florença, v. 45, n. 2, p.129-133, 2019.

PEGG, D. E. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New York: Humana Press, 2007. 347p.

RAJASEKHARAN, P. E.; ROHINE, M. R. **Pollen Cryopreservation Protocols**. New York: Humana Press, 2023. 1-18, p.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2018. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>> Acesso em: 9 jan. 2024.

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

ROCHA, L. B.; FREIRE, G. S.; MUNIZ, A. V. C.; LEDO, A. S. Conservação in vitro de grãos de pólen de mangabeira em diferentes condições de armazenamento. **Revista Observatório de la Economia Latino-americana**, Curitiba, v. 21, n.10, p. 16111-16121, 2023.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Viçosa, v. 12, n.1, p. 70-84, 2000.

SANTOS, A. R.; RIBEIRO, C. A. A. S.; PELUZIO, T. M. O.; PELUZIO, J. B. E.; QUEIROZ, V. T.; BRANCO, E. R. F.; LORENZON, A. S.; DOMINGUES, G. F.; MARCATTI, G. E.; CASTRO, N. L. M.; TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. M. A. D. A.; MOTA, P. H. S.; SILVA, S. F.; VARGAS, R.; CARVALHO, J. R.; MACEDO, L. L.; ARAÚJO, C. S.; ALMEIDA, S. L. H. Geotechnology and landscape ecology applied to the selection of potential forest fragments for seed harvesting. **Journal of Environmental Management**, London, v. 183, n. 3, p. 1050-1063, 2016.

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

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, n. 1, p. 13-28, 2015.

SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. D. C.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in

Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v. 223, n. 1, p. 53-61, 2017a.

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.b

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H.; SILVA, R. L. Cryopreservation of Pollen Grains of Pineapple and Other Bromeliads. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (Org.). **Plant Cell Culture Protocols**. New York: Humana Press, v.1815, 2018. pp. 13-26.

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, 2022.

SOUZA, C. P. F.; SOUZA, E. H.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D. Evaluation of the Potencial de micropropagação de híbridos de abacaxi curauá para produção de fibra. **Acta Amazonas**, Manaus, v. 48, n. 4, p. 290-297, 2018.

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; VIEIRA, L. V.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 219, n. 1, p. 326-334, 2017.

SILVA, S. S.; SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; MAX, D.; ROSSI, M. L.; COSTA, M. A. P. C. Postseminal development and cryopreservation of endemic and endangered bromeliads. **Anais de Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, 2021, 1678-2690, p.

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.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Amsterdam, v.19, n. 1, p. 21-41, 2013.

TEIXEIRA, T. P. O.; COSTA, C. B. N. Sistema Reprodutivo e potencial de hibridação entre espécies simpátricas de senna (fabaceae) em ambiente de cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, São Paulo, v.13, n. 24, 2016.

TIFFIN, P.; OLSON, M. S.; MOYLE, L. C. Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. **Proceedings of the royal society of London B**, London, v. 268, n. 1469, p. 861-867, 2001.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). **The IUCN red list of threatened species**. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/>> Acesso em 13 Jun. 2023.

Considerações Finais

O estudo detalhado das características polínicas e estigmáticas das espécies de *Wittmackia* revelou informações valiosas sobre a biologia floral e reprodutiva de 23 espécies do gênero. Os resultados demonstram que, apesar da variabilidade morfológica dos grãos de pólen e estigmas, as espécies de *Wittmackia* compartilham o mesmo horário de alta viabilidade polínica e receptividade estigmática. Essas descobertas são cruciais para entender a dinâmica reprodutiva das espécies e sua capacidade de realizar hibridações e cruzamentos controlados.

A evidência de autocompatibilidade parcial nas espécies estudadas sugere que, embora a maioria das hibridações seja bem-sucedida, existem desafios relacionados à autoincompatibilidade e incongruências durante o processo de polinização. As dificuldades identificadas, como a baixa germinação dos grãos de pólen e a interrupção do crescimento dos tubos polínicos, fornecem dados importantes para melhorar as técnicas de polinização e hibridação no futuro.

A alta porcentagem de germinação das sementes e a ausência de barreiras pós-zigóticas indicam que, após a polinização bem-sucedida, o desenvolvimento das sementes é robusto, contribuindo para a conservação e melhoramento genético das espécies. A criopreservação do grão de pólen também se mostrou eficaz, permitindo a conservação de longo prazo e a possibilidade de futuras pesquisas e reintroduções dessas espécies de *Wittmackia* nos ambientes naturais.

Além disso, a utilização de técnicas avançadas, como a microscopia de fluorescência com filtro UV, demonstrou ser eficaz na análise de polinizações e hibridações, oferecendo uma ferramenta valiosa para futuros estudos.

Como perspectivas futuras, estudos no aprimoramento das técnicas de hibridação e superar barreiras específicas de compatibilidade e melhorar a eficiência dos cruzamentos pode ampliar as possibilidades de desenvolvimento de novas variedades com características desejáveis. A análise dos mecanismos genéticos subjacentes à autoincompatibilidade e incongruências pode fornecer uma compreensão mais profunda das barreiras reprodutivas e ajudar na criação de estratégias para aumentar a compatibilidade entre diferentes espécies de *Wittmackia*.

A utilização de sementes germinadas a partir de grãos de pólen frescos e criopreservados para reintrodução no ambiente natural deve ser realizada no futuro,

bem como o monitoramento contínuo dessas plantas reintroduzidas para avaliar a sua adaptação e sucesso em ambientes naturais. Estudos adicionais sobre a ecologia e adaptação das plântulas ajudarão a garantir que as reintroduções sejam bem-sucedidas e sustentáveis.

A contínua exploração da morfologia polínica e estigmática em outras espécies do gênero são necessárias e podem fornecer dados valiosos para a taxonomia e conservação das espécies, além de contribuir para a diversificação e inovação no mercado ornamental.

Utilizar os conhecimentos adquiridos a partir dos nossos resultados sobre viabilidade polínica e características reprodutivas, pode-se desenvolver programas de melhoramento genético focados em características ornamentais e adaptativas, contribuindo para a criação de cultivares de *Wittmackia* que atendam a necessidades específicas do mercado e às exigências ambientais.

Essas perspectivas destacam a importância contínua da pesquisa e inovação na biologia reprodutiva de *Wittmackia*, com impactos diretos na taxonomia, conservação, melhoramento genético e uso ornamental das espécies.