

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**KARINA SALOMÃO**

**Aspectos reprodutivos e micropropagação em *Dyckia distachya*  
Hassler, espécie ameaçada de extinção**

**Piracicaba**

**2013**



**KARINA SALOMÃO**

**Aspectos reprodutivos e micropropagação em *Dyckia distachya*  
Hassler, espécie ameaçada de extinção**

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Dissertação apresentada ao Centro de  
Energia Nuclear na Agricultura da  
Universidade de São Paulo, para a obtenção  
do título de Mestre em Ciências**

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

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

**Piracicaba**

**2013**

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Salomão, Karina

Aspectos reprodutivos e micropropagação em *Dyckia distachya* Hassler, espécie ameaçada de extinção / Karina Salomão; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

81 f.: il.

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

1. Biotecnologia de plantas 2. Bromeliales 3. Germinação de sementes  
4. Morfologia vegetal 5. Plantas em extinção 6. Propagação vegetal 7. Reprodução vegetal I. Título

CDU (581.165.7 + 631.547) : 582.548.1

Dedico esse trabalho aos meus pais Antoninho e Rosinei,  
Que nos momentos mais difíceis souberam compreender e auxiliar  
Para que esse trabalho fosse realizado.



## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por guiar meus passos durante a realização deste trabalho.*

*A Nossa Senhora, minha mãe, por sua proteção.*

*Aos meus pais Rosinei Metta Salomão e Antoninho Salomão pelo apoio, por sempre estarem ao meu lado e acreditarem em mim.*

*À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli (CENA/USP) pela oportunidade de mestrado e pelo auxílio, tornando possível a realização desse trabalho mesmo com seu tempo limitado e em momentos difíceis.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.*

*À pós-graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) por oferecer todo o apoio necessário para elaboração deste trabalho. Á todos os funcionários dessa instituição por permitirem o funcionamento desta estrutura oferecendo suporte aos alunos.*

*À Talitha Joana Kievitsbosch pelos primeiros ensinamentos práticos em cultura de tecidos vegetais.*

*Aos amigos dos laboratórios de Biologia Estrutural de Plantas e Biotecnologia Vegetal (CENA/USP): Carolina Rossi, Eveline Tavano, Fabiana Muniz, Leonardo Soriano, Marcelo Correa, Renata Cruz, Renan Packer, em especial: Sandra Rosa, Sylvia Silveira por tornarem o dia a dia mais divertido, pelas dicas para a realização do trabalho, pelo ombro amigo nas horas difíceis e pela equipe que formamos. Á Camila Heuser, amiga e confidente de todas as horas. A Everton Hilo de Souza, meu irmão de coração, pela ajuda, conselhos, sugestões, auxílio nos experimentos e na elaboração de tabelas e gráficos.*

*À Mônica Lanzoni Rossi, meu alicerce nos trabalhos que envolveram microscopia. Mô, muito obrigada pelo seu sorriso nas adversidades, por sua persistência e ânimo mesmo nos momentos mais difíceis, foi um privilégio poder conviver com você durante esse tempo. Obrigada por tudo!*

*Ao Núcleo de Apoio de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada A Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP pelo suporte e permissão para realização dos trabalhos em microscopia.*

*À Professora titular do departamento de Ciências Exatas da ESALQ Clarice Garcia Borges Demétrio e seu orientado Rafael Moral pela pronta disponibilidade no auxílio às análises estatísticas.*

*Aos amigos que mesmo não estando presentes durante a realização do trabalho, sempre torceram por mim: Alexandra Soares Rosa, Cíntia Masuco, Cibele Silva, Esther Holcman, Lucas Riboldi, Samira Athiê Reviere, Sarah Athiê Souza e Vanessa Voight.*

*À Banca Examinadora pelo aceite do convite.*

*Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu aprendizado durante esse período vai muito além do que aqui consta, coisas que ficarão eternamente em mim e que com certeza me ajudarão no futuro. Obrigada a todos!*

***“Ninguém é tão pequeno que não tenha algo a ensinar, e nem tão grande que não tenha algo a aprender”***

***(Blaise Pascal)***

## RESUMO

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

*Dyckia distachya* Hassler, bromélia endêmica da região Sul do Brasil, teve sua população acentuadamente reduzida devido às políticas públicas de aproveitamento hidrelétrico na região. Estudos que promovam maiores conhecimentos em relação à espécie são necessários no intuito de elaborar estratégias de conservação e reintrodução da mesma em seu ambiente natural. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou ampliar o conhecimento acerca da espécie *D. distachya* visando fornecer subsídios por meio dos estudos dos aspectos reprodutivos e da micropropagação, gerando informações que possam contribuir para a conservação da espécie. Nesse sentido, foram realizados diferentes experimentos: caracterização das flores por meio de microscopia de luz e eletrônica; viabilidade polínica por germinação *in vitro* e avaliação histoquímica; receptividade do estigma; caracterização dos mecanismos reprodutivos; concentração e composição do néctar, dentre outras variáveis. Foram realizados ensaios de germinação de sementes em diferentes ambientes e temperaturas, juntamente com o estudo do desenvolvimento pós-seminal. Em adição a esses estudos, foram realizados ensaios de micropropagação, utilizando diferentes meios de cultura em diferentes estados físicos. Os resultados demonstram que as flores são hipóginas, hermafroditas, tubulares, pediceladas, com três sépalas e três pétalas imbricadas. O androceu é formado por seis estames, com as anteras acima do estigma. O gineceu é constituído de três carpelos unidos e ovário parcialmente sincárpico, súpero e trilocular com estigma conduplicado-espiral. Os óvulos são anátropos e apresentam apêndice chalazal. Os nectários são septais, infraloculares com superfície em labirinto na base do ovário. Os grãos de pólen são de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, monocolpado, exina semitectada, reticulada e heterobrocada. A maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen foi observada em meio de cultura BKM. Foram observados todos os mecanismos reprodutivos, com formação de sementes viáveis, sendo superior na polinização cruzada e autopolinização artificial. O estigma mostrou-se receptivo durante todo o período de abertura floral. As sementes germinam em uma ampla faixa de temperatura, sendo que, as sementes alocadas em meio de cultura apresentaram as maiores porcentagens de germinação. A extrusão da raiz primária se deu no segundo dia após introdução das sementes *in vitro*. No 4º dia foi possível observar o surgimento do 1º eófilo. Aos 12 dias a planta jovem apresenta raiz primária curta e pilosa. Meios de cultura no estado líquido, sob agitação, ou estático, em combinação ou não com reguladores de crescimento vegetais são eficientes na multiplicação *in vitro* de *D. distachya*, apresentando elevadas taxas de produção de mudas em curto espaço de tempo. O meio de cultura semissólido apresentou menores taxas de multiplicação e massa fresca e seca em relação aos meios líquidos. A aclimatização foi eficiente em mudas provenientes de todas as condições *in vitro* utilizadas.

**Palavras-chave:** Bromélia. Germinação. Desenvolvimento pós-seminal. Mecanismos reprodutivos. Morfoanatomia. Micropropagação.



## ABSTRACT

SALOMÃO, K. **Reproductive aspects and micropropagation in *Dyckia distachya* Hassler, endangered species**. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

*Dyckia distachya* Hassler, bromeliad endemic to Southern Brazil, had its population markedly reduced due to the regional public policy of hydroelectric power. Studies that promote greater knowledge about the species are needed for to development of strategies for conservation and species reintroduction in their natural environment. In this context, this work aimed to enhance the knowledge on reproductive aspects and micropropagation *D. distachya*, generating information that can contribute to the conservation of the species. Thus, different experiments were performed: characterization of flowers through light and electron microscopy; pollen viability by *in vitro* germination and histochemical analysis; stigma receptivity; observation on the reproductive mechanisms; nectar concentration and composition, among other variables. Seed germination was evaluated in different conditions and temperatures and post-seminal development was characterized. In addition, micropropagation experiments were performed using liquid and semi-solid supplemented with different growth regulator compositions. The results showed that the flowers are hypogynous, hermaphrodite, tubular, pedicellate, with three imbricate sepals and three petals. The androecium consists of six stamens with anthers that develop above the stigma. The pistil consists of three carpels, the ovary is superior, partially syncarpous and trilocular, with a conduplicate-spiral stigma. The ovules are anatropous and have a chalazal appendage. Septal infralocular nectaries are observed, with a labyrinth surface, at the base of the ovary. The pollen grains are of medium size, with a bilateral symmetry, ovate, monocolpate, semitectate, reticulate and with a heterobroccate exine. The highest percentage of pollen grain germination was observed in BKM culture medium. All reproductive mechanisms were observed and the higher numbers of viable seeds were observed after cross-pollination and manual self-pollination. The stigma was receptive during the entire period the flower was opened, with the highest receptivity at anthesis. Seeds germinated in different temperatures and *in vitro* germination, showed the highest germination percentages. Post-seminal development initiated with the extrusion of the primary root at the second day after the introduction of the seeds *in vitro*. The emergency of the first eophyll was observed on the fourth day, and on the 12nd day the young plant shows a short primary root, with root hairs. Liquid medium under agitation, or static and semi-solid medium supplemented with different combinations of plant growth regulators were efficient for the micropropagation of *D. distachya*, with high rates of production of seedlings in a short period of time. The use of the semi-solid medium showed lower multiplication rates when compared to liquid media. Acclimatization was very efficient in all treatments, independently from the *in vitro* culture conditions.

**Keywords:** Bromeliad. Germination. Post-seminal development. Reproductive mechanisms. Morphoanatomy. Micropropagation.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1. A família Bromeliaceae.....	16
3.1.1. Características e distribuição geográfica.....	16
3.1.2. A Subfamília Pitcairnoideae.....	17
3.1.3. O gênero <i>Dyckia</i> .....	17
3.2. Morfoanatomia e biologia floral em Bromeliaceae.....	18
3.3. Morfologia e viabilidade do grão de pólen em Bromeliaceae.....	21
3.4. Reprodução em Bromeliaceae.....	23
3.5. Germinação e desenvolvimento pós-seminal em Bromeliaceae.....	24
3.6. Micropropagação em Bromeliaceae.....	27
3.6.1. Importância e características da propagação <i>in vitro</i> .....	27
3.6.2. Aclimatização.....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Morfoanatomia floral.....	32
4.2. Viabilidade dos grãos de pólen.....	32
4.3. Quantificação do néctar.....	33
4.4. Caracterização do mecanismo reprodutivo.....	34
4.5. Receptividade do estigma.....	34
4.6. Metodologias Microscópicas.....	35
4.6.1. Microscopia de luz (ML).....	35
4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
4.6.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	36
4.7. Estudo da germinação de sementes.....	36
4.8. Desenvolvimento pós-seminal.....	38
4.9. Micropropagação.....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1. Caracterização da planta e morfoanatomia floral.....	41
5.1.1. Caracterização da planta.....	41
5.1.1.2. Morfoanatomia floral.....	44
5.1.1.2.1. Caracterização do androceu.....	44
5.1.1.2.2. Morfoanatomia do gineceu e nectário.....	45
5.1.1.2.3. Morfologia dos grãos de pólen.....	50
5.1.1.2.4. Viabilidade dos grãos de pólen.....	52
5.2. Mecanismos reprodutivos.....	54
5.3. Receptividade do estigma.....	55
5.4. Germinação de sementes.....	57
5.5. Morfoanatomia do desenvolvimento pós-seminal.....	59
5.6. Micropropagação.....	62
5.6.1. <i>Multiplicação in vitro</i> .....	62
5.6.2. <i>Aclimatização</i> .....	67
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica apresenta acentuada diversidade genética representada em grande parte pelas bromélias. A manutenção dos recursos genéticos é imprescindível, e medidas que visem à proteção de espécies ameaçadas devem ser tratadas como prioridade. Dentro desse contexto, conhecimentos sobre a propagação, estratégias reprodutivas, assim como a caracterização morfoanatômica de plantas e flores dessas espécies são de acentuada importância para a elaboração de estratégias de manejo. Martinelli et al. (2008) enfatizam que Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos de maior relevância dentro desse bioma, devido ao endemismo e grande valor ecológico, consequência, principalmente da interação dessas plantas com a fauna.

Os estudos morfológicos das flores em Bromeliaceae fornecem dados descritivos e sistemáticos de grande valor para trabalhos taxonômicos (VARADAJAN; BROWN, 1988), a exemplo do trabalho de Brown e Gilmartin (1989) que baseados nas características dos estigmas, dividiram estes em cinco tipos morfológicos dentro da família Bromeliaceae.

As características morfológicas dos grãos de pólen como tamanho, forma, número, posição e tipo de abertura são importantes nos estudos sobre as relações filogenéticas das plantas, sendo também frequentemente utilizadas na identificação de táxons (SIMPSON, 2006; HESSE et al., 2009). A viabilidade do grão de pólen é um importante parâmetro para a ocorrência da fertilização, e pode ser determinada por meio de diferentes metodologias, como a germinação dos grãos de pólen *in vitro* ou ainda através de métodos indiretos baseados em características citológicas como a coloração dos grãos de pólen (KEARNS; INOUE, 1993).

O entendimento dos mecanismos relativos à germinação das sementes e o estabelecimento de plântulas são fundamentais para a conservação e regeneração natural ou artificial dos ecossistemas, uma vez que a germinação das sementes e seu desenvolvimento são fatores determinantes na preservação da diversidade genética de plantas em seu habitat natural (ANDRADE et al., 2003; ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Na natureza, as bromélias são propagadas sexuadamente, por meio de sementes, ou assexuadamente através de brotos laterais. No entanto, a propagação sexual apresenta algumas desvantagens como a limitada viabilidade das sementes, e por sua vez, a reprodução assexuada não é capaz de produzir plantas em larga escala (DAQUINTA; ALMEIDA; GUERRA, 1999), já que o número de brotos laterais produzidos por planta é relativamente baixo (KOH; DAVIES JÚNIOR, 1997) e os brotos só se desenvolvem após as plantas atingirem a fase reprodutiva.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas para a propagação massal e conservação de bromélias ameaçadas de extinção (BENCKE; DROSTE, 2008). Segundo Droste et al. (2005), diferentes métodos de cultivo *in vitro* têm servido como ferramentas práticas para conservação e multiplicação de genótipos específicos de bromélias. Daquinta et al. (1999), explicam que para a obtenção de mudas em quantidade e um rápido desenvolvimento de *Dyckia*, o emprego das técnicas de multiplicação *in vitro* é imprescindível, pois proporcionam a produção de materiais vegetais homogêneos. A aclimatização é a última etapa do processo de micropropagação. Lesar et al. (2012) ressaltam que essa fase é essencial para a sobrevivência e estabelecimento das plantas provenientes do cultivo *in vitro*.

*Dyckia distachya* Hassler é uma espécie terrestre endêmica, nativa do Brasil (POMPELLI; GUERRA, 2004), produz sementes em abundância que podem ser dispersas através da superfície da água e germinar sob condições de inundação (LEME et al., 2012). São plantas reófitas e possuem adaptações que as permitem sobreviver a períodos de cheia e vazante, sendo encontradas principalmente na região Sul do Brasil (REITZ, 1983). A destruição do ambiente onde vivem essas bromélias por meio das políticas públicas de aproveitamento hidrelétrico restringiu os locais de sobrevivência de *D. distachya*, estando atualmente ameaçada de extinção (POMPELLI; GUERRA, 2005; BRASIL, 2008). Wiesbauer et al. (2007), mencionam restarem poucas populações naturais na margem argentina do rio Uruguai e alguns indivíduos conservados *ex situ* em viveiros ou introduzidos em ambientes onde não existiam.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi ampliar o conhecimento reprodutivo de *Dyckia distachya* por meio da caracterização das estruturas florais, descrição da morfologia polínica, avaliação da germinação e viabilidade dos grãos de pólen e identificação dos mecanismos reprodutivos. Além disso, avaliar o processo de germinação das sementes, descrever as fases de desenvolvimento

pós-seminal e avaliar a influência do uso de reguladores de crescimento em combinação com diferentes estados físicos dos meios de cultura na multiplicação *in vitro*, visando o estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação para a espécie.

## 2. OBJETIVOS

O estudo objetivou ampliar o conhecimento acerca da espécie *Dyckia distachya* visando fornecer subsídios através de estudos de aspectos reprodutivos e da micropropagação, gerando informações que possam contribuir para a conservação da espécie.

Os objetivos específicos no desenvolvimento desse trabalho foram:

- a) Descrição morfoanatômica das flores de *Dyckia distachya*;
- b) Caracterização dos mecanismos reprodutivos da espécie;
- c) Identificação do período de maior receptividade do estigma;
- d) Avaliação da germinação das sementes de *D. distachya*;
- e) Descrição morfoanatômica do desenvolvimento inicial das plântulas;
- f) Descrição morfológica dos grãos de pólen, e avaliação da viabilidade e capacidade de germinação destes em diferentes meios de cultura;
- g) Avaliação da micropropagação em diferentes meios de cultura através de explantes obtidos por meio da germinação das sementes *in vitro*.
- h) Avaliação da taxa de sobrevivência durante o processo de aclimatização das plantas multiplicadas *in vitro*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A família Bromeliaceae

##### 3.1.1. Características e distribuição geográfica

A família Bromeliaceae, nativa da América tropical compreende 3172 espécies e 58 gêneros sendo pertencente à ordem Poales (LUTHER, 2008). As plantas estão distribuídas por toda América, com exceção de *Pitcairnia feliciana* (Aug. Chev) Harms & Mildbr nativa da África (GIVINISH et al., 2007; 2011).

No Brasil, encontram-se aproximadamente 40 gêneros e 1500 espécies, sendo 650 endêmicas do País. A maior diversidade dessas espécies é encontrada na região Sudeste, especialmente na região de Mata Atlântica (LEME; SIQUEIRA FILHO, 2006).

Além das características ornamentais que conferem grande potencial comercial, as bromélias possuem acentuada importância ecológica nos ecossistemas. Bromélias de hábito epífita são capazes de extrair nutrientes de ambientes úmidos, da chuva e de outros fluidos florestais. Esta característica associada aos microclimas criados pela formação de tanques pelas folhas, que por sua vez são fontes de água para muitas espécies animais, faz das bromélias espécies com características singulares. As espécies terrestres dessa família também apresentam eficiência na ciclagem de nutrientes, sobrevivendo em ambientes pobres em nutrientes, o que lhes confere papel importante na dinâmica de seus microclimas (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Muitas bromélias, dependendo das condições ambientais como radiação, temperatura e disponibilidade de água, apresentam metabolismo do tipo C<sub>3</sub>, CAM (Metabolismo Ácido das Crassulaceae) ou C<sub>3</sub>-CAM facultativo. O metabolismo CAM apresentado por algumas bromélias é um dos principais fatores que auxiliam na sobrevivência em ambientes áridos. Os estômatos dessas plantas apresentam abertura noturna, fechando-se durante o dia tornando a razão de perda de água por ocasião da absorção de CO<sub>2</sub> mais baixa do que em plantas C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub>. Isso acontece, porque os estômatos ficam abertos somente durante a noite e a ocorrência de

temperaturas mais baixas e umidade mais elevada durante esse período contribui para uma menor taxa de transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Tradicionalmente a família Bromeliaceae é composta de três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae, assim classificadas particularmente pelo hábito de crescimento, tipos de tricomas, frutos e sementes e pela posição do ovário (SMITH; DOWNS, 1974; 1977; 1979). As subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae são monofiléticas, enquanto Pitcairnioideae é considerada polifilética (GIVNISH et al., 2007; 2011).

Recentemente, Givinish et al. (2007), em estudos filogenéticos sobre a família Bromeliaceae com base no sequenciamento do gene *ndhF*, gene do cloroplasto, propuseram uma nova divisão, sugerindo que os clados pertencentes a Pitcairnioideae sejam caracterizados como subfamílias. Mais tarde, Givinish et al. (2011) confirmam a divisão da família Bromeliaceae em oito subfamílias, a saber: Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae.

### 3.1.2. A Subfamília Pitcairnioideae

A subfamília Pitcairnioideae possui 16 gêneros e aproximadamente 1048 espécies (LUTHER, 2008). As plantas pertencentes a este grupo são principalmente terrestres, com raízes fibrosas e folhas dispostas em rosetas que não formam tanque (BENZING; BURT, 1970). Os frutos são, em sua maioria, do tipo cápsulas deiscentes, o ovário pode ser súpero ou ínfero. As sementes apresentam apêndices pequenos, podendo ser facilmente transportadas pelo vento (SMITH; DOWNS, 1974).

### 3.1.3. O gênero *Dyckia*

O gênero *Dyckia* pertence à subfamília Pitcairnioideae e compreende aproximadamente 130 espécies, sendo considerado o terceiro maior da subfamília, ficando atrás apenas dos gêneros *Pitcairnia* (337) e *Puya* (230) (LUTHER, 2008). As

plantas do gênero *Dyckia* ocorrem em todo território nacional e em países vizinhos como Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (SMITH; DOWNS, 1974).

As bromélias pertencentes a esse gênero são terrestres com algumas espécies potencialmente ornamentais (SILVA et al., 2008). No Brasil são encontradas aproximadamente 83 % das espécies, ocorrendo desde o nível do mar até aproximadamente 1000 metros de altitude, estando, geralmente expostas ao sol. Representantes de *Dyckia* podem ser encontrados nos biomas da Mata Atlântica, Restinga, Caatinga, Campos Rupestres e Vegetação de Cerrado (LEME et al., 2012).

Essas plantas apresentam-se de forma individual quando dispersas pelas sementes, ou formando densos agrupamentos como consequência da propagação clonal. São usualmente terrestres ou rupícolas e crescem em solos bem drenados ou afloramentos rochosos. Algumas espécies, são aptas a sobreviver em ambientes frequentemente inundados (LEME et al., 2012), como é o caso de *Dyckia distachya* Hassler (WIESBAUER et al., 2007).

Espécies de *Dyckia* geralmente apresentam folhas coriáceas e suculentas, com freqüente desenvolvimento de espinhos marginais. As inflorescências laterais racemosas, simples ou ramificadas, mostram flores de coloração principalmente amarela, laranja ou vermelha, sendo que já foi observada coloração castanho-avermelhada em algumas espécies (LEME et al., 2012).

De acordo com Givinish et al. (2011), com base em análises moleculares, o gênero *Dyckia* é monofilético. Leme et al. (2012) relatam que estudos filogenéticos específicos em *Dyckia* reforçam essa ideia, tornando evidente que a dispersão na maioria das espécies do gênero é recente, o que possivelmente explica a dificuldade em se distinguir características morfológicas que são empregadas em estudos taxonômicos na diferenciação de espécies de *Dyckia*.

### **3.2. Morfoanatomia e biologia floral em Bromeliaceae**

O padrão de florescimento, característico para cada espécie, pode limitar a produção de frutos e sementes (PAGGI et al., 2007). Scrok e Varassin (2011) observaram em plantas de *Aechmea distichantha*, que inflorescências maiores, em plantas do mesmo tamanho, produziram mais flores e mais sementes por frutos. A

falta de uniformidade ao longo do período no florescimento de bromélias é uma característica prejudicial à produção comercial. Algumas espécies florescem de forma regular, enquanto que outras necessitam da utilização de indutores (SOUZA et al., 2009).

As características funcionais e morfológicas das flores apresentam influência no sucesso reprodutivo, na taxonomia e ecologia das espécies. A morfologia da corola pode servir como um mecanismo de isolamento, pois sua forma e comprimento determinam os tipos de visitantes florais, que por sua vez, exercem influência no grau de cruzamento (KEARNS; INOUE, 1993; NAVARRO; GUITIÁN, 2002). Outros exemplos são os trabalhos sobre a variação da morfologia do estigma que podem ser muito úteis aos estudos de sistemática (BROWN; GILMARTIN, 1984; 1989). As angiospermas apresentam grande diversidade de características florais e mecanismos reprodutivos. Estudos sobre suas alterações reprodutivas durante a evolução são importantes para as pesquisas em biologia vegetal evolutiva (BARRET, 2008).

A estrutura floral das bromélias pode se mostrar primitiva ou altamente evoluída (VERVAEKE et al., 2003). As flores de Bromeliaceae são geralmente bissexuais; gineceu apresentando ovário trilocular; corola composta por três pétalas alternadas com pequenas sépalas em igual número, e androceu composto por seis estames (VERVAEKE et al., 2003).

Provavelmente as bromeliáceas são as únicas plantas da ordem Poales a possuírem nectários septais e flores epíginas ou semi-epíginas. Existe grande variação em relação à posição do ovário na família Bromeliaceae, de súpero a ínfero em Tillandsioideae e Bromelioideae, respectivamente, até a presença dos dois tipos em Pitcairnoideae (SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004a).

Caracterizando espécies de diferentes gêneros de Bromeliaceae, Sajo et al. (2004a) descrevem a posição do ovário e relatam a presença ou ausência de apêndice petalar em algumas espécies de diferentes gêneros. Para o gênero *Dyckia*, as autoras relatam que o ovário é súpero com ausência de apêndice petalar.

A morfologia do estigma é uma importante informação na reconstrução filogenética da família. A descrição morfológica da flor, incluindo o estigma é uma das condições necessárias ao conhecimento da biologia da polinização em bromeliáceas (BROWN; GILMARTIN, 1984). Em Bromeliaceae são

relatados cinco tipos de estigma: conduplicado-espiral, lâmina-convoluta, simples-ereto, coraliforme e copulado (BROWN; GILMARTIN, 1989).

Os óvulos em bromélias são em sua maioria anátropos, possuem dois tegumentos, sendo cada um composto por duas ou mais camadas de células. No entanto, em óvulos de muitas espécies da família, pode-se notar um prolongamento acima da chalaza, denominado apêndice, enquanto outras espécies não apresentam essa estrutura (SMITH; DOWNS, 1974).

Sajo et al. (2004b) explicam que em algumas espécies já foi constatada a presença destes apêndices, mas, pouco se conhece a respeito dessas estruturas.

Em Bromeliaceae, o néctar é produzido e secretado por tecidos glandulares denominados nectários septais (GALLETO; BERNADELLO, 2004; STAHL et al., 2012). Benzing (2000) diz que nectários extraflorais podem existir em Bromeliaceae, o autor explica que há pelo menos três gêneros dentro da família que apresentam esse tipo de estrutura. Stahl et al. (2012) relatam que a rápida renovação do néctar em *Ananas comosus* var. *ananassoides* está relacionada com as características morfológicas do nectário.

Os nectários septais estão relacionados tanto com a presença de polinizadores vertebrados como de insetos polinizadores (BENZING, 2000) e sua superfície forma um labirinto que contém muitos feixes vasculares (SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004b).

Para *Dyckia tuberosa*, Vosgueritchian e Buzzato (2006) descrevem que o nectário se encontra na base do ovário. Em *Ananas comosus* var. *ananassoides*, o nectário septal se estende da base do ovário até a base do pistilo (STAHL et al., 2012). Já em *Dyckia floribunda*, foram encontrados nectários extraflorais muito simples e não vascularizados em diversas partes da planta (VESPRINI et al., 2003). Esses autores relatam que essas estruturas não possuem tecidos especializados para a produção do néctar

A receptividade do estigma é um estágio essencial no processo da maturação floral, uma vez que influencia as taxas de autopolinização e a ocorrência da polinização em diferentes fases do ciclo de vida da flor. A presença de diversas enzimas nesse estágio de desenvolvimento floral permite a determinação da receptividade do estigma por meio da identificação da atividade dessas enzimas (DAFNI; MAUÉS, 1998). Rogalski et al. (2009) determinaram o período de

receptividade estigmática de *Dyckia brevifolia* por meio da atividade da enzima catalase presente no peróxido de hidrogênio.

### 3.3. Morfologia e viabilidade do grão de pólen em Bromeliaceae

Informações taxonômicas de relevante importância sobre Bromeliaceae são fornecidas por meio de estudos da morfologia e ultraestrutura polínica, oferecendo auxílio na delimitação genérica e de espécies (MOREIRA; CRUZ-BARROS; WANDERLEY, 2005). No entanto, os autores enfatizam que o conhecimento acerca dos caracteres polínicos na família é escasso.

Em geral, a parede dos grãos de pólen é dividida em exina (externa) e intina (interna), sendo a exina formada por sexina e nexina. A região de abertura do grão de pólen, denominada colpo se caracteriza por meio do estreitamento das estruturas da exina ou por um aprofundamento desta com espessamento da intina (HESSE et al., 2009).

A divisão da família em três subfamílias (Tillandsioideae, Bromelioideae e Pitcairnoideae) foi feita por Mez (1934) com base em estudos sobre o tipo de abertura apresentada pelos grãos de pólen. Esses autores classificaram as subfamílias Tillandsioideae e Pitcairnoideae como estenopolínicas, por seus grãos de pólen apresentarem-se predominantemente monocolpados, enquanto Bromelioideae foi considerada euripolínica, com os grãos de pólen apresentando diversos tipos de abertura, ou até mesmo inaperturados. Assim, esses autores propuseram três tribos para a subfamília Bromelioideae: Integrae, com grãos de pólen inaperturados; Poratae, com grãos de pólen porados; e Sulcatae, com grãos de pólen sulcados (FORZZA; WANDERLEY, 1998; MOREIRA; CRUZ-BARROS; WANDERLEY, 2005). Souza et al. (2004), examinando grãos de pólen de espécies de *Dyckia*, *Tillandsia* e *Vriesea* observaram certa heterogeneidade, registrando algumas diferenças na ornamentação da exina e nos diâmetros em vista polar e equatorial. Moreira et al. (2005), estudando os gêneros *Neoregelia* e *Nidularium* propuseram uma classificação nos subgeneros a partir do tamanho dos grãos de pólen e poros.

Em adição aos estudos morfológicos, é importante que se tenha conhecimento sobre a viabilidade dos grãos de pólen e do crescimento do tubo

polínico, uma vez que o conhecimento desses parâmetros é fundamental no fornecimento de informações para pesquisas relacionadas à biologia reprodutiva e melhoramento genético (SALLES et al., 2006). A viabilidade do grão de pólen é considerada um indicador da capacidade deste, em garantir a ocorrência da fertilização (SHIVANNA; LINSKENS; CRESTI, 1991). A determinação da viabilidade polínica pode ser realizada por meio da germinação *in vitro*, que além de medir a fertilidade do grão de pólen, é de fácil aplicação, permitindo que os resultados sejam obtidos em curto espaço de tempo (PIO et al., 2007; SOARES et al., 2008).

Os trabalhos disponíveis na literatura envolvendo a germinação *in vitro* de grãos de pólen relatam, em sua maioria, a utilização de carboidratos e substâncias que estimulam a germinação, tais como micronutrientes e hormônios, empregados como principais componentes do meio de cultura (BREWBAKER; KWACK, 1963; PIO et al., 2007; SOARES et al., 2008). Outros componentes como ácido bórico, nitrato de cálcio e potássio e sulfato de magnésio também influenciam na germinação *in vitro* do pólen (PARTON et al., 2002).

A fonte de carboidrato favorece o equilíbrio osmótico entre o grão de pólen e o meio de germinação, fornecendo energia para o desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). O boro por sua vez, promove o crescimento do tubo polínico diminuindo a probabilidade de rompimento (FRANZON; RASEIRA, 2006).

A adição de cálcio ao meio de cultura favorece a formação de atributos fisiológicos reduzindo a sensibilidade dos grãos de pólen ao meio de cultura, além, de proporcionar rigidez ao tubo polínico favorecendo o crescimento de forma linear (STANLEY; LINSKENS, 1974).

Em condições laboratoriais, além da germinação *in vitro*, a viabilidade dos grãos de pólen pode ser avaliada por meio de testes histoquímicos com carmim acético, azul de anilina, solução de Alexander, entre outros. Esses testes apresentam a vantagem de serem mais rápidos na determinação da viabilidade polínica quando comparados à germinação dos grãos de pólen em meio de cultura, contudo, os diversos corantes podem superestimar os resultados (BOLAT; PIRLAK, 1997; WANG et al., 2004).

### 3.4. Reprodução em Bromeliaceae

As espécies vegetais podem apresentar um modo de reprodução (sexual ou assexual) e um sistema de cruzamento (autogamia ou alogamia) exclusivo, no entanto, há um modo de reprodução e um sistema de cruzamento predominante, com eventos esporádicos de um ou outro modo/sistema (BODANESE-ZANETTINI; CAVALLI, 2003).

O conhecimento acerca das características dos mecanismos reprodutivos é de fundamental importância na elaboração de estratégias de conservação (PEREIRA; BRITO; AMARAL, 2007). Acredita-se que a polinização cruzada seja mais vantajosa por dar origem a uma progênie superior, uma vez que favorece a diversidade genética. Por outro lado, a autopolinização garante a reprodução quando a fecundação cruzada é inadequada ou ausente (DARWIN, 1872<sup>1</sup> *apud* WENDT et al., 2002).

Para a família Bromeliaceae já foi confirmada a existência de diversos mecanismos reprodutivos, mostrando relações com aspectos evolutivos e ecológicos das espécies. As bromélias apresentam algumas estratégias que podem favorecer a alogamia, a exemplo da protoginia que é o amadurecimento do gineceu antes do androceu, ou a protandria que é o amadurecimento do androceu antes do gineceu. Além destas estratégias, a fecundação cruzada é reforçada pela incompatibilidade encontrada entre as bromeliáceas (BENZING, 2000).

A propagação sexual se dá por meio da fecundação e produção de sementes, sendo que a germinação da semente possui efetiva importância para manutenção da diversidade biológica no ambiente natural, como também para a produção de plantas para comercialização, porém, a limitada viabilidade das sementes é considerada como uma desvantagem na propagação sexual (DAQUINTA; ALMEIDA; GUERRA, 1999; ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). Em bromélias, a propagação sexual é considerada demorada, pois, dependendo da espécie, a maturação da semente pode ocorrer até um ano após a polinização (STRINGHETA et al., 2005).

A reprodução assexual por sua vez, ocorre por meio da emissão de brotos laterais que são emitidos após a floração. Esse processo é observado em plantas de

---

<sup>1</sup> DARWIN, C. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle life. 6<sup>th</sup> edn. John Murray, London, 1872.

idades variadas, mas nem todas as plantas adultas de bromélias apresentam essa forma de reprodução (BENZING, 2000).

Na família Bromeliaceae, a autocompatibilidade e a autoincompatibilidade podem coexistir dentro de um mesmo gênero (BENZING, 1980). Na caracterização dos mecanismos reprodutivos de 40 espécies de bromélias pertencentes às subfamílias Tillandsioideae e Bromelioideae, Matallana et al. (2010) relatam que 75% das espécies se apresentaram autocompatíveis, enquanto somente 25 % (10 espécies) mostraram autoincompatibilidade. A subfamília Bromelioideae representada pelos gêneros *Aechmea*, *Billbergia*, *Edmundoa*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Portea* e *Quesnelia* apresentou acentuada variação de mecanismos reprodutivos. Em Tillandsioideae esses autores verificaram autoincompatibilidade em apenas uma espécie, entre 17 espécies estudadas dos gêneros *Alcantarea*, *Racinaea*, *Tillandsia* e *Vriesea*.

No gênero *Dyckia* a autocompatibilidade foi relatada em *Dyckia brevifolia*. Esses autores observaram que esta espécie produz sementes por agamospermia, além de outros mecanismos reprodutivos (ROGALSKI et al., 2009). Em Pitcairnoideae, a agamospermia pode ocorrer também em *Pitcairnia corcovadensis* e *P. flammea* (WENDT et al., 2002).

A determinação do tempo em que o estigma permanece receptivo é um importante parâmetro, principalmente em experimentos que utilizam a polinização artificial, portanto, torna-se necessário o emprego de técnicas que determinem o tempo que o estigma permanece receptivo, período caracterizado por meio da alta atividade de enzimas presentes durante essa fase de desenvolvimento (DAFNI; MAUÉS, 1998).

### **3.5. Germinação e desenvolvimento pós-seminal em Bromeliaceae**

O estudo da germinação das sementes é de fundamental importância tanto no entendimento do estabelecimento de uma comunidade vegetal quanto para a sobrevivência e regeneração natural das espécies, uma vez que, a germinação das sementes pode determinar a distribuição das espécies em diferentes ambientes (FENNER; THOMPSON, 2005). Para que ocorra a germinação das sementes e conseqüentemente desenvolvimento das plântulas, as sementes devem ser alocadas em substratos e ambiente adequados (WINKLER; HÜLBER; HIETZ, 2005).

O interesse na propagação de espécies nativas tem se intensificado nas últimas décadas devido à acentuada importância dada aos problemas ambientais, enfatizando-se a necessidade de recuperação de áreas degradadas. Porém, conhecimentos sobre o manejo e análise das sementes para identificação de seus atributos físicos e fisiológicos ainda são limitados (POMPELLI, 2006).

Temperatura, luz, substrato e umidade são fatores de fundamental importância para a germinação das sementes. Os efeitos desses fatores na germinação variam conforme a espécie, maturidade fisiológica e condições sanitárias das sementes (ALBRECHT et al., 1986). É comum a interação entre esses fatores, sendo, a interação entre luz e temperatura, considerada uma das mais importantes (TAYLORSON; HENDRICKS, 1972; FERREIRA et al., 2001).

Marcos Filho (2005) relata que, na ausência de outros fatores limitantes, a germinação se dá em amplas faixas de temperatura, nas quais, os extremos dependem principalmente da espécie, características genéticas e condições do ambiente. O autor enfatiza que as variações de temperatura afetam também a velocidade, a porcentagem e a uniformidade do processo de germinação, tornando necessária a determinação de temperaturas em que a eficiência da germinação é máxima, assim como a determinação das temperaturas máximas e mínimas toleradas pelas sementes.

Avaliando a aptidão de sementes de *Aechmea nudicaulis* e *Streptocalyx floribundus* em diferentes condições de temperatura e luminosidade, Pinheiro e Borghetti (2003) observaram que as sementes de *A. nudicaulis* não germinaram no escuro, mostrando alta germinabilidade em luz vermelha entre 15 e 40 °C. Para a espécie *S. floribundus* as mais altas taxas de germinação ocorreram a uma temperatura de 15 e 40 °C na presença de luz, quanto no escuro, a germinação ocorreu apenas na temperatura de 40 °C.

O substrato possui acentuada importância durante o processo de germinação, pois fatores como textura, aeração e capacidade de retenção de água tendem a ser diferentes entre os substratos, resultando em diferenças na quantidade de água disponível para sementes, o que altera a velocidade e porcentagem de emergência (ESTEVAN et al., 2010).

Durante a escolha do substrato, o tamanho da semente, assim como a exigência com relação à umidade, sensibilidade à luz e a facilidade que o substrato oferece para o desenvolvimento e avaliação das plântulas, devem ser levados em

consideração. Os tipos de substratos mais utilizados descritos e prescritos nas Regras para Análises de Sementes são: pano, papel-toalha, papel-filtro, papel mata-borrão, terra e areia, sendo que para espécies nativas, poucas recomendações existem (FIGLIOLA; OLIVEIRA; PIÑA RODRIGUES, 1993).

A compreensão morfológica das fases de desenvolvimento das plântulas é importante no entendimento da dinâmica das populações, no entanto, a maioria das pesquisas inclui apenas plantas adultas em suas análises (WINKLER; HÜLBER; HIETZ, 2005). Paoli e Bianconi (2008) ressaltam que o estudo morfológico das plantas no início da fase de desenvolvimento permite a identificação de estruturas transitórias que desaparecem com o desenvolvimento da planta, porém, essas estruturas podem possuir significativa importância no estabelecimento de relações de parentesco ou vínculos filogenéticos com grupos que possuam órgãos adultos com as mesmas características dessas estruturas efêmeras.

De acordo com Tomlinson (1969) a morfologia das plantas durante a fase de desenvolvimento em Bromeliaceae é de grande utilidade, podendo ser empregada em análises taxonômicas do grupo. Além disso, trabalhos sobre a morfologia de plântulas fornecem subsídios para estudos sobre sucessão e regeneração em ambientes naturais (MORAES; PAOLI, 1999).

As espécies da família Bromeliaceae possuem sementes com morfologia muito diversificada, o que as tornam de acentuada importância para a sistemática da família (SCATENA; SEGECIN; COAN, 2006). Smith e Downs (1974) relatam que as sementes produzidas pelas espécies da subfamília Pitcairnoideae possuem apêndices inteiros pequenos e leves, podendo ser facilmente transportadas pelo vento e água.

Pereira et al. (2008), estudando o desenvolvimento pós seminal de espécies de Bromelioideae, Pitcairnoideae e Tillandsioideae, constataram que há diferenças morfológicas acentuadas entre as espécies. Os autores relatam que a subfamília Bromelioideae apresenta bainha cotiledonar curta, hipocótilo bem reduzido ou inexistente e raiz primária com crescimento moderado. Em Pitcairnoideae, a bainha cotiledonar é extensa, hipocótilo evidentemente alongado e raiz primária medianamente desenvolvida. Para Tillandsioideae a bainha cotiledonar apresenta-se com tamanho médio, hipocótilo pouco desenvolvido e a raiz primária tende a ser reduzida ou ausente.

### 3.6. Micropropagação em Bromeliaceae

#### 3.6.1. Importância e características da propagação *in vitro*

Tradicionalmente, as bromélias propagam-se por meio de sementes ou através da divisão de brotos laterais, porém, esses métodos não são adequados para a produção massal (CARNEIRO et al., 1999). Nesse contexto, as técnicas de micropropagação são importantes ferramentas na multiplicação dessas plantas (SILVA et al., 2007). Bellintani et al. (2007) mencionam a importância da obtenção de plântulas por meio da germinação de sementes *in vitro* oriundas de diferentes populações para preservação da diversidade genética.

Os estudos com multiplicação *in vitro* de bromélias tiveram início na década de 70, quando Jones e Murashige (1974) cultivaram pontas de raízes da espécie *Aechmea fasciata* em meio de cultura acrescido de ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (IBA).

Para muitas espécies de bromélias, o estabelecimento *in vitro* é complexo pela dominância apical inerente à família. Assim, para o sucesso da propagação *in vitro*, a escolha dos explantes é uma etapa crucial para o desenvolvimento e multiplicação *in vitro* (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Auxinas e citocininas são importantes reguladores de crescimento empregados na cultura de tecidos para o desenvolvimento e morfogênese de órgãos e tecidos vegetais. Tem-se observado que reguladores sintéticos possuem efeitos biológicos iguais ou superiores aos das substâncias equivalentes naturais de crescimento (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Para o crescimento e desenvolvimento das plantas na maioria dos sistemas em cultura de tecidos, a razão auxina/citocinina são fatores determinantes (MERCIER et al., 2003; GALVANESE et al., 2007).

A multiplicação *in vitro*, desenvolvimento e a sobrevivência dos explantes são consequência da interação de diversos fatores como o genético, estado fisiológico, das condições de cultivo e concentrações de hormônio (PEREIRA; FORTES, 2003).

As fontes de citocininas mais empregadas no cultivo *in vitro* são o 6-benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (CIN), pois estão associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, com ativa participação no controle da divisão celular (ASMAR et al., 2011). O BAP é uma citocinina que permite os melhores resultados *in*

*vitro* em relação à multiplicação das partes aéreas e indução de brotos adventícios (PAIVA et al., 2009). As auxinas são responsáveis pela ocorrência de processos básicos como a divisão e alongamento celular (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

O estado físico do meio de cultura pode interferir na multiplicação dos explantes. Diversos protocolos de propagação *in vitro* são empregados utilizando os meios semissólidos e líquidos (POMPELLI; GUERRA, 2005). O meio de cultura na forma líquida proporciona melhor contato dos explantes com os nutrientes, favorecendo a multiplicação dos brotos e aumento da matéria seca em bromeliáceas e proporcionando um aumento na absorção de água quando comparado ao meio semissólido (ZIV, 1995; PEREIRA; FORTES, 2003).

Benzing et al. (1976) observaram através de técnicas de microautoradiografia que várias espécies de bromeliáceas foram capazes de absorver através de tricomas foliares, soluções de glicina e leucina colocadas em superfícies de folhas intactas. Para algumas espécies de bromélias, a folha é o mais importante órgão vegetativo devido à capacidade desses tricomas em absorver e assimilar água e nutrientes minerais (TAKAHASHI; MERCIER, 2011), o que provavelmente explica a utilização de protocolos com meio líquido para muitas espécies de bromélias (POMPELLI; GUERRA, 2005).

Rech Filho et al. (2005) observaram eficiência na multiplicação de plântulas de *Vriesea reitzii* em meio de cultura MS suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Silva et al. (2008) obtiveram formação de calos na região basal de *Dyckia marítima* empregando uma combinação de BAP e ácido indolbutírico (AIB), o que levou à formação de gemas laterais. Posteriormente, os autores relataram resultados positivos na multiplicação dessas gemas com o uso combinado dos reguladores de crescimento BAP e CIN com altas taxas de multiplicação.

Para *D. distachya* os melhores resultados foram observados em meio MS suplementado com BAP ou com a combinação de ANA, BAP e paclobutrazol (PBZ), adicionados ao meio de cultura líquido (POMPELLI; GUERRA, 2005). O meio de cultura na forma líquida preveniu a oxidação dos explantes, sendo considerado uma alternativa promissora para a regeneração *in vitro* de *Neoregelia cruenta* (CARNEIRO et al., 1999).

### 3.6.2. Acclimatização

A aclimatização é uma etapa crucial para o desenvolvimento das plantas estabelecidas *in vitro*, uma vez que estas passam de condições heterotróficas para autotróficas com consequentes estresses fisiológicos. Essa fase se caracteriza pela adaptação da planta a um novo ambiente, o que é de grande importância para o desenvolvimento saudável das mudas (BANDEIRA et al., 2007; PENNISI, 2007).

Mudas obtidas por meio das técnicas de cultura de tecidos, geralmente apresentam acentuadas alterações provocadas pelas condições *in vitro*. Por sua vez, essas alterações advindas do efeito do ambiente hermético, alta umidade e baixa irradiância do ambiente *in vitro* podem causar diminuição nas taxas de sobrevivência após a transferência para ambiente de aclimatização (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999; BANDEIRA et al., 2007).

Em casa de vegetação ou no campo, a incidência da luz é muito alta e a umidade baixa em comparação com o estabelecimento *in vitro*. Mesmo o substrato apresentando maior potencial hídrico do que o meio contendo sacarose, as folhas podem murchar rapidamente, pois a perda de água através das folhas não é restringida. Somado a isso, existe o fato de que o fornecimento de água pode ser limitado devido à baixa condutividade hidráulica existente nas raízes e em suas conexões com o caule ou haste, sendo assim, muitas plantas não sobrevivem durante esse período. Após o transplante para ambiente de aclimatização, as plantas jovens normalmente necessitam de algumas semanas para adaptação com a redução na umidade do ar, entre outros fatores (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999). O número e a morfologia dos estômatos no cultivo *in vitro* são diferentes, comparados aos provenientes do cultivo convencional, características estas, que podem afetar a eficiência fotossintética das plantas (DOUSSEAU et al., 2008).

No período de aclimatização, fatores como o sistema de irrigação e tipo de substrato são de extrema importância (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). Segundo as autoras, na produção comercial, utiliza-se preferencialmente a nebulização, ou um sistema de aspersão para irrigação de um grande número de plantas.

Substratos são compostos por material sólido distinto do solo, composto por material natural, residual, mineral, ou matéria orgânica, os quais misturados ou puros são usados para a fixação do sistema radicular nas bandejas, vasos ou

canteiros, dando suporte às plantas (CADAHIA, 1998<sup>2</sup> *apud* ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006). Apesar de todos esses aspectos citados, a maioria das bromélias são plantas resistentes, sendo observadas baixas taxas de mortalidade durante o período de aclimatização (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

Avaliando a aclimatização das bromélias *Nidularium innocentii* e *Nidularium procerum* sob sistema de hidroponia e substrato comercial, Silva et al. (2012) observaram maiores taxas de sobrevivência para as duas espécies na aclimatização convencional (uso de substrato comercial), concluindo que essa forma de aclimatização, para as espécies estudadas, mostrou-se mais adequada.

Para *Dyckia macedoi*, Mercier e Kerbauy (1993) obtiveram 100 % de sobrevivência quando as plantas produzidas *in vitro* foram transplantadas para vasos contendo uma mistura de turfa, areia e vermiculita e mantidas em casa de vegetação sob luminosidade natural.

---

<sup>2</sup> CADAHIA, C. Fertirrigación: Cultivos Hortícolas y Ornamentales, Mundi-Prensa, Madrid, 1998.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba, SP nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal e de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas.

O material vegetal foi obtido de plantas matrizes de *Dyckia distachya* Hassler cultivadas em casa de vegetação e irrigadas automaticamente três vezes ao dia durante cinco minutos (Figuras 1A-B).



**Figura 1** – A) Plantas de *Dyckia distachya* mantidas em casa de vegetação. B) Planta com inflorescência

Para a obtenção das flores e posteriormente frutos com sementes, 40 plantas de *D. distachya*, foram induzidas ao florescimento com o regulador de crescimento do grupo etileno, Ethrel (240 g L<sup>-1</sup> de etileno) na concentração de 200 ppm.

Para a caracterização morfológica da planta (n=10), foram medidos o comprimento da flor, comprimento e diâmetro das pétalas e sépalas, comprimento da inflorescência, comprimento e diâmetro do filete e estilete, comprimento e diâmetro da antera e estigma, comprimento e diâmetro do escapo floral e comprimento e diâmetro das brácteas da base e ápice. As medidas foram realizadas com auxílio de régua, paquímetro e do programa Image J 1.46r (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). O número de flores abertas por dia e a duração da antese também foram observadas.

#### 4.1. Morfoanatomia floral

Flores de *D. distachya* foram coletadas na pré-antese, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, de acordo com as metodologias descritas no item 4.6. As estruturas florais foram descritas morfoanatomicamente de acordo com Brown e Gilmartin (1984; 1989) e Sajo et al. (2004a, 2004b).

Os grãos de pólen foram coletados na antese nas primeiras horas da manhã, fixados e processados para microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (item 4.6). Para a caracterização morfológica do grão de pólen, utilizou-se a nomenclatura de Punt et al. (2007) e Hesse et al. (2009).

Para as medidas dos grãos de pólen foi realizada a acetólise láctica (ACLAC 60), que consiste na retirada do conteúdo citoplasmático dos grãos para facilitar as medições e a visualização da parede polínica. A montagem das lâminas foi realizada em gelatina glicerinada conforme metodologia de Louveaux et al. (1970), modificada por Barth (1989), sendo mensurados 25 grãos de pólen.

A estimativa da produção de grãos de pólen foi realizada por meio da contagem do número de grãos de pólen produzidos por flor (seis anteras). Foram utilizadas três flores de diferentes plantas coletadas e armazenadas individualmente em tubos eppendorf, seguindo a metodologia descrita por Dafni (1992).

Para cálculo do número de grãos de pólen por flor, foi efetuada a multiplicação da estimativa média de grãos de pólen por antera pelo número de anteras da flor.

#### 4.2. Viabilidade dos grãos de pólen

A análise da viabilidade dos grãos de pólen foi realizada através do método do carmim acético (1%) que é baseado na coloração do citoplasma dos grãos de pólen. Para o teste, foram utilizadas anteras de três plantas diferentes, de flores em antese. Os grãos de pólen foram submersos em uma gota do corante e cobertos com lamínulas. Posteriormente foram observados ao microscópio de luz invertida (Zeiss Axiovert 35). O percentual de viabilidade foi estimado totalizando 100 grãos de pólen por lâmina com três repetições, totalizando 300 grãos de pólen.

Para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen foram avaliados quatro diferentes meios de cultura: **BM** (PARTON et al., 2002): 0,01 %  $H_3BO_3$ ; 20 % de sacarose; 0,5 % de ágar; **BKM** (BREWBAKER; KWACK, 1963): 0,01 %  $H_3BO_3$ ; 0,03 %  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,02 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,01 %  $KNO_3$ ; 10 % de sacarose; 0,5% de ágar; **MBKM** (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado): 0,01 %  $H_3BO_3$ ; 0,03 %  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,02 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,01 %  $KNO_3$ ; 20 % de sacarose; 0,5 % de ágar e **SM** (SOARES et al., 2008): 0,01%  $H_3BO_3$ ; 0,03 %  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,02 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,01 %  $KNO_3$ ; 15 % de sacarose; 0,8 % de ágar todos com pH ajustados para 6,5.

Com auxílio de um pincel, os grãos de pólen, foram distribuídos em placas de Petri contendo 35 mL dos diferentes meios de cultura e cultivados à temperatura de  $27 \pm 1^\circ C$  no escuro. Após 24 horas foi realizada a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento dos tubos polínicos com auxílio de estereomicroscópio (Leica EZ4 D) e micrografias digitais.

Para a porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições, sendo cada repetição, representada por três placas de Petri, cada uma, subdividida em quatro quadrantes. Para o comprimento do tubo polínico foram selecionados e mensurados aleatoriamente cinco tubos em cada quadrante, totalizando 60 tubos polínicos. Os grãos de pólen foram considerados germinados quando o comprimento do tubo polínico foi igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen (SOARES et al., 2008).

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados para arc sen ( $\sqrt{x}/100$ ) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o programa SAS (SAS INTITUTE, 2004).

### 4.3. Quantificação do néctar

O néctar produzido ao longo do dia foi coletado pela introdução de uma microseringa (Hamilton 100  $\mu L$ ) na corola da flor, em direção à base das pétalas, atingindo os nectários florais. O néctar de três flores foi coletado e a média obtida. O néctar foi colocado em um refratômetro digital (Atago PR-101) e o índice de refração

foi convertido em concentração de açúcar (equivalentes de sacarose) de acordo com Bolten et al. (1979) e Wolf et al. (1979), utilizando-se para tanto a equação:  $y = 0.00226 + (0.00937 x) + 0.0000585 x^2$ , onde “x” é o valor da concentração (i.e., a leitura do refratômetro) e “y”, mg L<sup>-1</sup> de açúcar por µL. A partir do volume e da concentração do néctar, o total de açúcar nele contido (equivalentes de sacarose) foi calculado, conforme Bolten et al. (1979) e Wolf et al. (1979).

#### 4.4. Caracterização do mecanismo reprodutivo

Para a caracterização do mecanismo reprodutivo foram realizados os seguintes tratamentos com cinco repetições: polinização natural (flores protegidas sem emasculas), autopolinização artificial (flores polinizadas manualmente com grãos de pólen da mesma flor), polinização cruzada (flores emasculadas com posterior polinização com grãos de pólen de flor de outra planta) e agamospermia (emasculação das flores, sem deposição de grãos de pólen). A viabilidade das sementes produzidas nos tratamentos foi avaliada *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com metade das concentrações dos macronutrientes e ferro descrito no item 4.7.

#### 4.5. Receptividade do estigma

A receptividade do estigma foi determinada na pré-antese (botão - 18:00 h); antese (flor aberta - 8:00 h); quatro horas após antese (12:00 h); 10 horas após antese (18:00 h) e 24 h pós-antese (8:00 h), utilizando cinco repetições em cada.

Para tanto, os pistilos foram mergulhados em solução de  $\alpha$ -naftil acetato com tampão fosfato, acetona e fast blue B salt por cerca de três minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e a atividade esterásica foi observada através de coloração marrom escura na superfície estigmática e/ou papilas (PEARSE, 1972; DAFNI, 1992). A receptividade dos estigmas foi observada e fotografada com auxílio de microscópio estereoscópio (Leica EZ4 D).

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

## 4.6. Metodologias Microscópicas

### 4.6.1. Microscopia de luz (ML)

As amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (glutaraldeído 2 %, paraformaldeído 2 %, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2), por 48 horas, desidratadas em série etílica crescente (40-100 %), infiltradas e emblocadas utilizando-se o kit historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heldelberg). A polimerização foi realizada à temperatura ambiente por 48 horas. Os cortes histológicos seriados (4-5  $\mu$ m) foram obtidos em micrótomo rotativo Leica (RM2155), dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina básica (0,1 % p/v), seguido de azul de toluidina (0,05 % p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz Axioskop 2 (Carl Zeiss, Alemanha) e fotografados.

### 4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram coletadas e fixadas em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificado (subitem 4.6.1) por 48 horas, desidratadas em soluções crescentes de etanol (40-100 %), secas ao ponto crítico através de CO<sub>2</sub>, preparadas em suportes metálicos, metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (Carl Zeiss, Alemanha).

### 4.6.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os grãos de pólen foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada (subitem 4.6.1), por 24 horas. Posteriormente, foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), seguido de pós-fixação em tetróxido de ósmio (1 %), lavagens em solução salina (0,9% de Cloreto de Sódio) e pré-coloração em acetato de uranila (2,5 %). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (40-100 %) e infiltradas em resina Spurr. As amostras foram

emblocadas em Spurr, por 48 horas, a 70 °C. Cortes semi-finos e ultrafinos foram obtidos em ultra-micrótomo. As secções ultrafinas obtidas foram depositadas sobre grades de cobre previamente recobertas com formvar, contrastadas com acetato de uranila (2,5 %) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As secções foram analisadas e imagens obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 (Carl Zeiss, Alemanha).

#### 4.7. Estudo da germinação de sementes

Foram avaliados a germinação e o desenvolvimento das plântulas em três diferentes substratos: substrato comercial Basaplant<sup>®</sup> (turfa, vermiculita, corretivos e casca de *Pinus*), papel Germitest<sup>®</sup> e cultivo *in vitro* em meio de cultura, sob três temperaturas 22 °C, 27 °C e 32 °C em diferentes intervalos de tempo, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para o estudo da germinação em substrato comercial Basaplant<sup>®</sup> e papel Germitest<sup>®</sup>, foram utilizadas caixas Gerbox<sup>®</sup>. O papel Germitest<sup>®</sup> e o substrato comercial foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C, sendo que nesses substratos, as sementes foram acondicionadas sobre duas folhas do papel e sobre 70 gramas do substrato, respectivamente. As sementes utilizadas nesses tratamentos passaram por processo de assepsia, sendo imersas em etanol 70 % por três minutos, com posterior imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5 % de cloro ativo) em água destilada autoclavada (1:1) durante 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada autoclavada.

Para o processo de germinação *in vitro*, a assepsia das sementes constou de imersão em etanol (70 %) sob agitação durante três minutos, com posterior imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,5% de cloro ativo) em água destilada autoclavada (1:1) por 30 minutos, seguida de três lavagens em água destilada autoclavada em capela de fluxo laminar. Após esse procedimento, as sementes foram introduzidas em meio de cultura contendo metade dos macronutrientes e ferro de MS (MURAHIGE; SKOOG, 1962), acrescido com as concentrações normais de micronutrientes e vitaminas do referido meio, além de 30 g L<sup>-1</sup> sacarose e 8 g L<sup>-1</sup> ágar, pH ajustado para 5,8 com posterior autoclavagem por 20 minutos, a 120 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial  $3 \times 3 + 1$  (temperaturas, ambientes de germinação + controle) com 6 repetições de 25 sementes por tratamento. Como controle, foram introduzidas 150 sementes em bandeja para aclimatização com fundo perfurado, que germinaram à temperatura ambiente em casa de vegetação. O experimento foi avaliado diariamente, considerando-se semente germinada quando foi possível a visualização da extrusão da raiz primária. Os dados obtidos foram transformados em porcentagem de germinação, e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi calculado. O IVG foi calculado com base na equação  $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_N/N_N$  descrita por Teixeira et al. (2004) onde  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_n$  representam o número de sementes normais germinadas até o enésimo dia e  $N_1$ ,  $N_2$  e  $N_N$  o número de dias em que se avaliaram as germinações  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_N$ , respectivamente.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados de porcentagem foram transformados para  $\arcsen(\sqrt{x}/100)$  visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Para as análises foram utilizados os programas estatísticos SAS (SAS Institute, 2004).

#### 4.8. Desenvolvimento pós-seminal

Para a coleta de amostras de plântulas em diferentes fases do desenvolvimento, sementes de *Dyckia distachya* foram introduzidas em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado, com metade das concentrações de macronutrientes e ferro, acrescido 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g L<sup>-1</sup> ágar, e mantidas em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. As diferentes fases foram estabelecidas de acordo com trabalho prévio de Pereira et al. (2008) e Silva e Scatena (2011), sendo considerado o início da germinação, quando foi visível a extrusão da raiz primária. Para a descrição do desenvolvimento pós-seminal, essas amostras foram submetidas a análises em microscopia de luz (extrusão da raiz primária) e microscopia eletrônica de varredura (fases referentes à extrusão da raiz primária, surgimento e desenvolvimento do primeiro eófilo e surgimento do segundo eófilo), sendo os procedimentos utilizados para essas análises descritos no item 4.6. As fases de desenvolvimento relativas às plantas jovens foram observadas e fotografadas por meio de estereomicroscópio (Leica EZ4 D).

#### 4.9. Micropropagação

Para os ensaios de micropropagação, sementes foram coletadas de cápsulas de plantas matrizes de *D. distachya*. Em condições laboratoriais, o apêndice alado foi retirado. Em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em etanol (70 %), por três minutos, seguido de solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) em água destilada autoclavada (1:1) durante 30 minutos e enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com metade da concentração de macronutrientes e ferro, acrescido de 8 g L<sup>-1</sup> ágar e sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. Foram utilizadas dez placas de Petri, com 25 mL de meio de cultivo e 25 sementes por

placa. As culturas foram mantidas em sala de crescimento por 60 dias, a  $27 \pm 2$  °C, densidade de fluxo de fótons de  $22 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Plântulas germinadas e cultivadas *in vitro* por 60 dias, com cerca de 1,5 cm de altura, foram utilizadas como explantes iniciais para a multiplicação *in vitro*. As raízes foram retiradas e plântulas transferidas para frascos com 20 mL de meio de cultura. Foram utilizados três meios de cultura (MS; MS + 2  $\mu\text{M}$  BAP + 1  $\mu\text{M}$  ANA e MS + 2  $\mu\text{M}$  CIN + 1  $\mu\text{M}$  ANA), em três estados físicos [semissólido (0,8 % ágar), líquido estático e líquido sob agitação (60 rpm em shaker orbital Innova™ 2300)], acrescidos de sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ). O pH foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento conforme descrito acima.

O experimento foi instalado com nove tratamentos, em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 X 3, sendo três meios de cultura e três estados físicos do meio. Cada tratamento foi composto por seis repetições, cada uma composta por um frasco contendo cinco plântulas no primeiro subcultivo. No segundo subcultivo foram consideradas seis repetições com dez plântulas e do terceiro ao quinto subcultivo, 18 repetições com dez plântulas. O primeiro subcultivo ocorreu 30 dias após a instalação do experimento, sendo realizado nesse intervalo até completar cinco subcultivos e contabilizadas as taxas de multiplicação. No quinto subcultivo foram extraídos os dados de matéria fresca e matéria seca.

Aos dados dos subcultivos foram ajustados modelos lineares generalizados com distribuição binomial negativa. A qualidade de ajuste foi verificada por meio do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulações (DEMÉTRIO; HINDE, 1997). As comparações múltiplas foram feitas por meio da obtenção dos intervalos de confiança (95 %) para as médias.

Para os dados de matéria fresca e seca foram ajustados modelos com distribuição normal. A normalidade dos resíduos foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e a homogeneidade de variâncias foi verificada por meio do teste de Bartlett (BARTLETT, 1937). As comparações múltiplas foram feitas por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram feitas usando o software gratuito R, versão 2.15.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

As plantas obtidas, após os cinco subcultivos foram transferidas para frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS líquido sem reguladores de crescimento para o desenvolvimento e enraizamento das mudas, onde permaneceram por aproximadamente 60 dias, havendo uma troca de meio durante esse período.

Posteriormente, essas plantas foram transferidas para bandejas de 16 X 8 células contendo substrato Basaplant<sup>®</sup>. Foram aclimatizadas 180 plantas de cada tratamento, totalizando 1620 plantas, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação. A irrigação foi automática, por microaspersão, três vezes ao dia. Os índices de sobrevivência foram observados 120 dias após a transferência das plantas para casa de vegetação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da planta e morfoanatomia floral

#### 5.1.1. Caracterização da planta

A planta de *Dyckia distachya* é caracterizada por possuir numerosas folhas estreitas densamente organizadas a partir de uma espessa base globosa, com espinhos nas margens ao longo da lâmina foliar (Figura 1A).

Os dados morfométricos relativos às plantas e flores de *D. distachya* encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** - Dados morfométricos dos órgãos florais de *Dyckia distachya*

Atributos Florais	Média* (mm)
Comprimento da flor	15,00 ± 1,90
Comprimento da pétala	12,70 ± 1,81
Diâmetro da pétala	6,49 ± 0,95
Comprimento da sépala	8,06 ± 0,97
Diâmetro da sépala	4,00 ± 1,01
Comprimento da inflorescência	336,00 ± 116,00
Comprimento do escapo floral	463,00 ± 84,80
Diâmetro do Escapo floral	6,5 ± 0,90
Comprimento da antera	2,69 ± 0,35
Diâmetro da antera	1,07 ± 0,10
Comprimento do filete	8,04 ± 0,17
Diâmetro do filete	1,32 ± 0,16
Comprimento do estigma	0,54 ± 0,18
Diâmetro do estigma	0,62 ± 0,15
Comprimento do estilete	2,97 ± 0,41
Diâmetro do estilete	0,64 ± 0,12
Comprimento das brácteas (base)	21,30 ± 3,30
Diâmetro das brácteas (base)	4,80 ± 0,80
Comprimento das brácteas (ápice)	0,46 ± 0,80
Diâmetro das brácteas (ápice)	1,40 ± 0,50

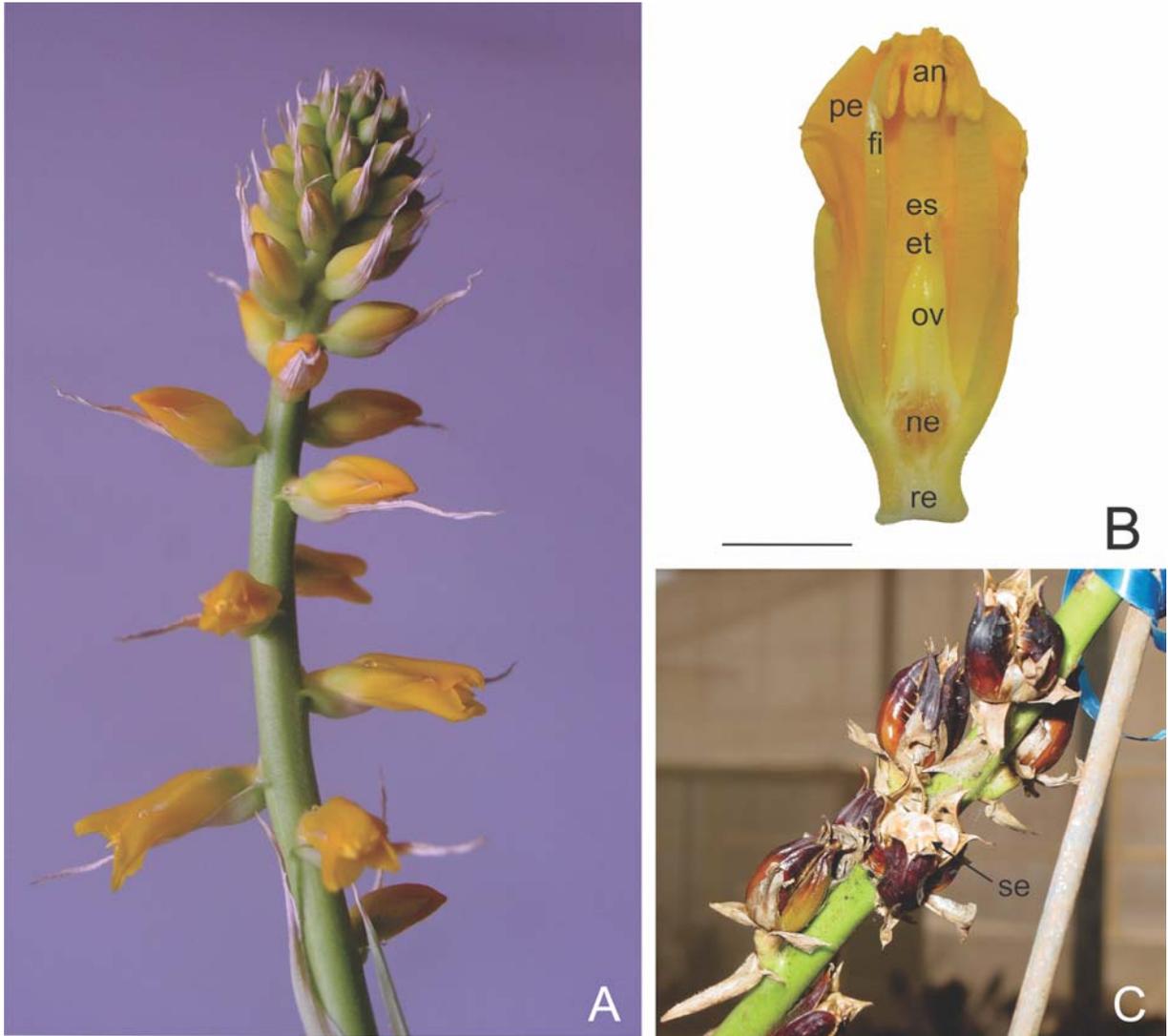
\* Os dados correspondem a média de 10 repetições ± desvio padrão

As plantas tratadas com Ethrel® (etileno) a 200 ppm começaram a emitir a haste floral 30 dias após a aplicação do produto. Nesse período observou-se a

emissão de brotos laterais, a partir do qual, a inflorescência foi emitida. Aproximadamente 10 % das plantas responderam à indução floral com a aplicação desse hormônio. O florescimento completo foi observado cerca de 60 a 70 dias após o uso do produto.

As inflorescências são eretas, racemosas simples ou raramente ramificadas, emitidas através das rosetas laterais (Figura 1B). Em uma mesma inflorescência observam-se diferentes fases fenológicas: botões, flores abertas, flores senescentes e frutos imaturos (Figura 1A). O número de flores é de  $66,7 \pm 3,10$  ( $n=4$ ) por inflorescência.

As flores de *D. distachya* são hipóginas, hermafroditas, tubulares, pediceladas e inodoras. O perianto é composto de três sépalas e três pétalas (Figuras 2A-B). As sépalas são verdes durante a fase de botão, tornando-se amarelas conforme ocorre o desenvolvimento da flor; as pétalas são amarelas, imbricadas em formato de sino. A antese das flores ocorre nas primeiras horas da manhã, sendo que as flores permanecem abertas por dois dias. O número de flores abertas por dia variou de 1 a 9, com média de  $3 \pm 0,38$  ( $n=35$ ). A abertura das flores ocorreu na direção da base para o ápice da inflorescência (Figura 2A). Os frutos são do tipo cápsula deiscente (Figura 2C).



**Figura 2** – A) Detalhe da inflorescência de *Dyckia distachya*. B) Corte longitudinal da flor. C) Frutos maduros do tipo cápsulas deiscentes contendo sementes. (an) antera; (es) estigma; (et) estilete; (fi) filete; (ne) nectário; (ov) ovário; (pe) pétala; (re) receptáculo floral; (se) sementes. Barra: 1 mm

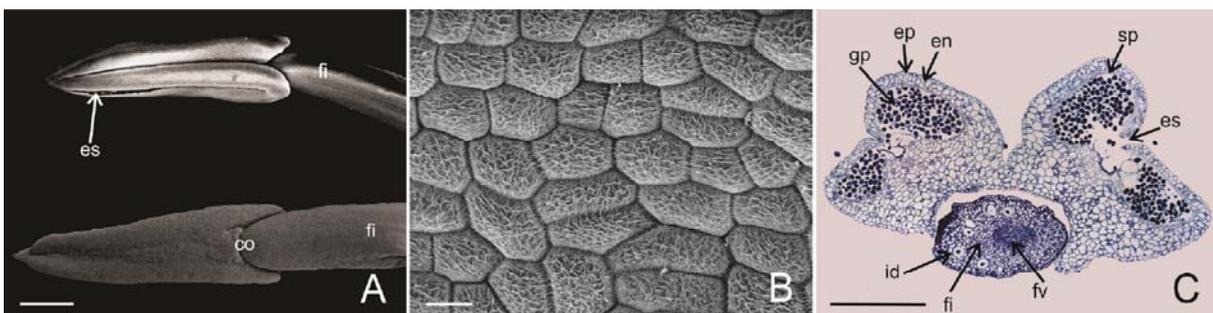
Guarçoni et al. (2012) observaram que inflorescências de *D. inflexiflora* são eretas, medindo de 26-56 cm de comprimento formadas por ráquis simples ou compostas, apresentando flores com pétalas e sépalas vermelhas. Vosgueritchian e Buzato (2006) citam que *Dyckia tuberosa* apresenta em média 15 flores por inflorescência. Rogalski et al. (2009) observaram que o número de flores por inflorescência em *D. brevifolia* variou de 28 a 92, com média de  $60,4 \pm 14,5$  flores.

Enquanto neste trabalho observou-se que as flores ficaram abertas por dois dias, em flores de *D. distachya*, Rogalski et al. (2009) observaram que as flores de *D. brevifolia* apresentam antese ao longo do dia, permanecendo abertas por um dia e meio. Em *D. tuberosa* a antese ocorreu no início da manhã, sendo que as flores ficaram abertas por um dia (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006). Provavelmente, a duração do período de abertura floral está ligada à quantidade de visitas dos polinizadores às flores, aumentando ou diminuindo a probabilidade da polinização (ROGALSKI et al., 2009).

### 5.1.1.2. Morfoanatomia floral

#### 5.1.1.2.1. Caracterização do androceu

O androceu é composto por seis estames com filetes conados; as anteras são basefixas, com deiscência longitudinal (Figura 3A), possuem cutícula ornamentada (Figura 3B), sendo a epiderme uniestratificada e o endotécio pluriestratificado (Figura 3C). Nota-se a presença do estômio e dos quatro sacos polínicos fundidos em dois, além da presença de feixe vascular simples no filete (Figura 3C). Na antese as anteras encontram-se posicionadas acima do estigma (Figura 2B).



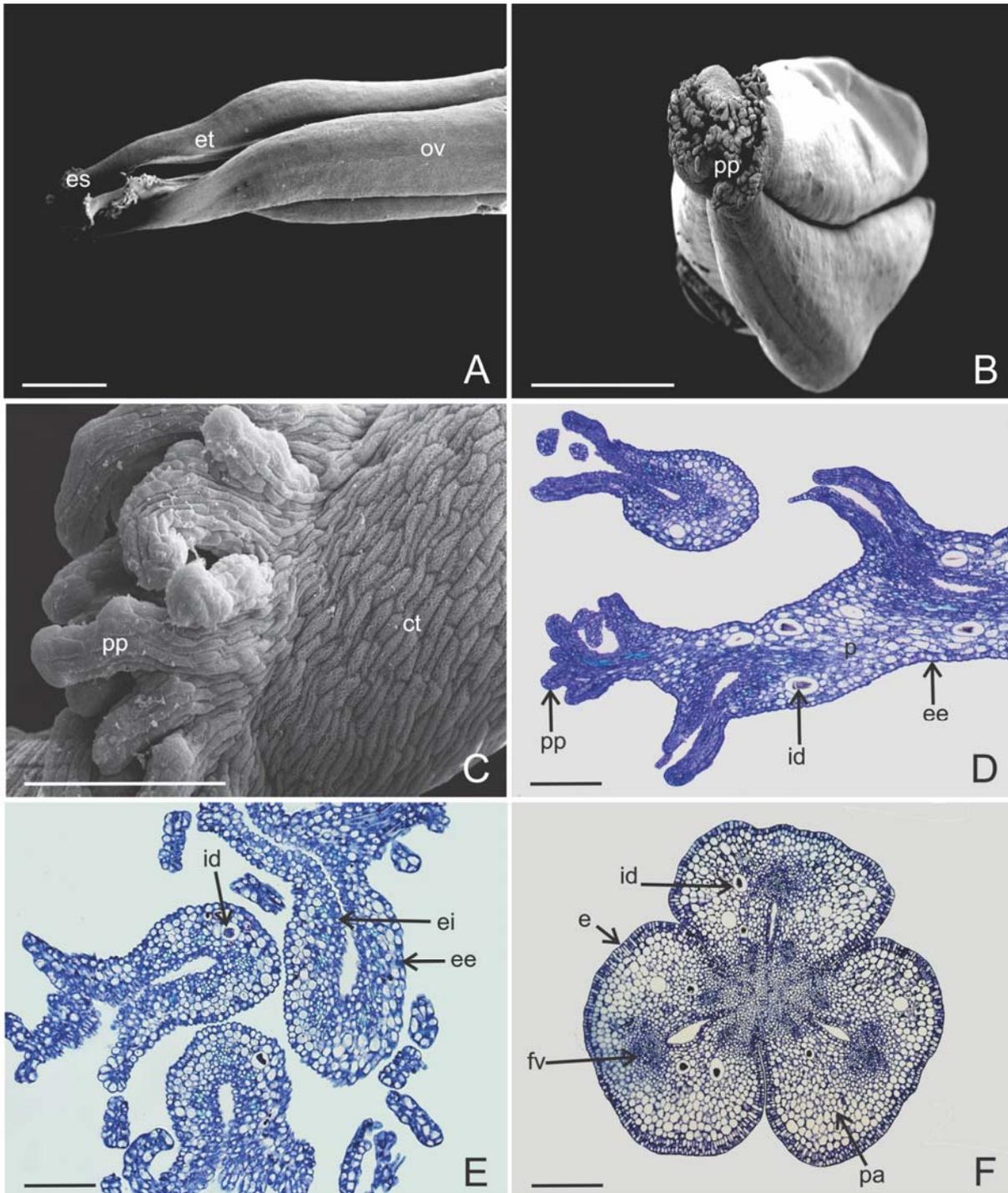
**Figura 3** – Anteras de *Dyckia distachya*. A) Anteras observadas por microscopia eletrônica de varredura, faces ventral e dorsal. B) Detalhe da epiderme ventral recoberta por cutícula estriada. C) Secção transversal da antera por microscopia de luz. (co) conectivo; (en) endotécio; (ep) epiderme; (es) estômio; (fi) filete; (fv) feixe vascular; (gp) grãos de pólen; (id) idioblastos; (sp) vestígios de estratos parietais. Barras: A = 1 mm; B = 20  $\mu$ m; C = 500  $\mu$ m

Rogalski et al. (2009) relatam que durante a fase de botão, as anteras de *D. brevifolia* encontram-se ligeiramente acima do estigma, diferentemente do observado no presente trabalho, para *D. distachya* onde as anteras encontram-se totalmente acima do estigma desde a fase de botão. A disposição conada dos estames também foi observada em *D. brevifolia* por Rogalski et al. (2009). Segundo Benzing (2000), a disposição conada dos estames favorece o acúmulo do néctar.

#### 5.1.1.2.2. Morfoanatomia do gineceu e nectário

O estigma é do tipo conduplicado-espiral com epiderme uniestratificada. As papilas são salientes e recobertas por cutícula estriada. Nota-se ao longo do estigma, a presença de idioblastos com cristais de ráfide em seu interior (Figuras 4A-E).

O estilete apresenta epiderme uniestratificada, e feixe vascular imerso no parênquima fundamental em cada carpelo. Foram observados diversos idioblastos contendo cristais de ráfides em seu interior (Figura 4F), que provavelmente estão relacionadas à proteção contra herbivoria.



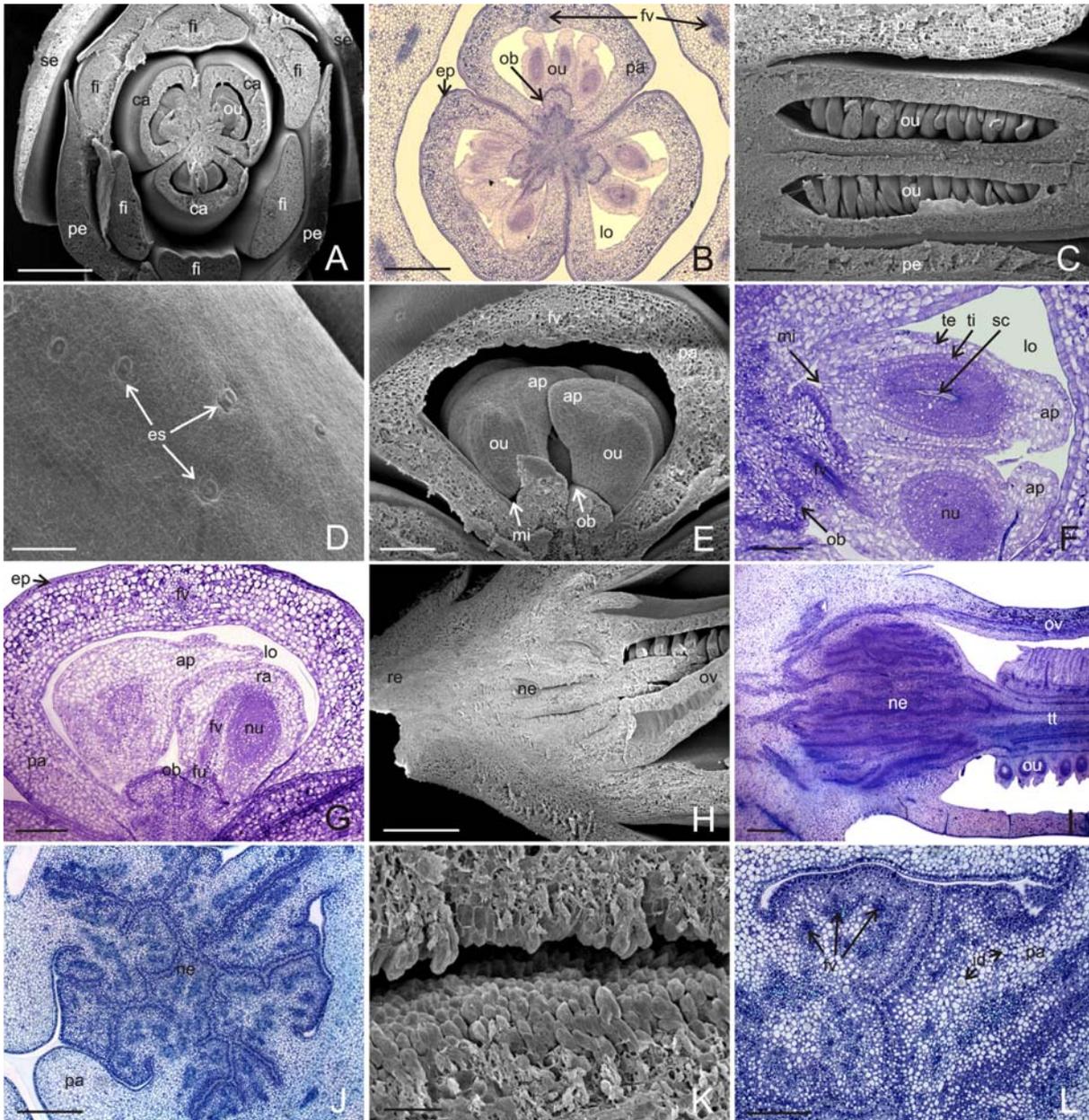
**Figura 4** – Estigma em *Dyckia distachya*. A-B) Estigma do tipo conduplicado-espiral observado através de microscopia eletrônica de varredura. C) Detalhe das papilas estigmáticas. D-E) Secções transversal (D) e longitudinal (E) do estigma observados por microscopia de luz (ML). E) Secção longitudinal do estigma por ML. F) Secção transversal do estilete por ML. (ct) cutícula; (ee) epiderme externa; (ei) epiderme interna; (es) estigma; (et) estilete; (id) idioblasto; (ov) ovário; (pf) parênquima fundamental; (pp) papilas. Barras: A, B = 1 mm; C - F = 100  $\mu$ m

A morfologia do estigma do tipo conduplicado-espiral também foi relatada para *Dyckia tuberosa* (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006) e para *D. brevifolia* (ROGALSKI et al., 2009).

A subfamília Pitcairnoideae mostra homogeneidade em relação ao tipo de estigma. Dentre os táxons da subfamília, analisados por Brown e Gilmartin (1989), todos apresentam a morfologia do estigma do tipo conduplicado-espiral, sendo o tipo mais comum encontrado na família Bromeliaceae. Os autores ressaltam que esse tipo de estigma é encontrado apenas em Bromeliaceae, e suas características apresentam-se logo no início do desenvolvimento floral, já no início do desenvolvimento do carpelo.

O gineceu de *D. distachya* é parcialmente sincárpico, apresentando três carpelos parcialmente unidos. O ovário é súpero, tricarpelar, trilocular, placentação do tipo axilar com número médio de  $125,60 \pm 24,74$  óvulos por flor ( $n=5$ ). O ovário apresenta epiderme externa uniestratificada, com células recobertas por cutícula. Nota-se a presença de estômatos na epiderme do ovário (Figuras 5 A-D). Os óvulos são justapostos, anátropos, adjacentes ao obturador placentário em cada lóculo. Tanto o tegumento externo quanto o interno são envoltos por duas a três camadas de células. Os óvulos apresentam apêndice chalazal e micrópila do tipo endostomal (Figuras 5C, 5E-G).

Inseridos na porção estendida do receptáculo floral, na base do ovário, encontram-se os nectários septais infraloculares em labirinto, com grande concentração de feixes vasculares, com epiderme uniestratificada e citoplasma denso revelando intensa atividade metabólica (Figuras 5 H-L). O volume médio de néctar foi de  $14,3 \mu\text{L} \pm 0,58$  por flor e o valor médio do Brix durante a antese foi de 77,7 % ( $n=3$ ). As flores de *D. distachya* não apresentam apêndices petalares.



**Figura 5** – Gineceu e nectários em *Dyckia distachya*. A) Secção transversal da flor, podendo-se observar sépalas, pétalas, filetes e a região apical dos carpelos. B) Secção transversal do ovário tricarpelar e trilocular. C) Secção longitudinal do ovário, evidenciando dois dos três carpelos e os óvulos. D) Epiderme do ovário e a ocorrência de estômatos. E-G) Secções transversais do carpelo evidenciando os óvulos. H) Secção transversal da base da flor evidenciando o nectário. H-I) Secções longitudinais da base da flor, podendo-se observar o nectário. J-L) Secções longitudinais do nectário. (ap) apêndice; (ca) carpelo; (ct) cutícula; (ep) epiderme, (es) estigma; (et) estilete; (fi) filete; (fu) funículo, (fv) feixe vascular; (id) idioblasto; (lo) lóculo; (mi) micrópila; (ne) nectário; (nu) nucelo; (ob) obturador; (ou) óvulo; (ov) ovário; (pa) parênquima; (pe) pétala; (pp) papilas; (re) receptáculo; (sc) saco embrionário; (se) sépala; (te) tegumento externo; (ti) tegumento interno. A, C, D, E, H, K:

microscopia eletrônica de varredura; B, F, G, I, J, L: microscopia de luz. Barras: A, H = 1mm, B, C, I, J = 500  $\mu\text{m}$ ; D, E, F = 100  $\mu\text{m}$ ; K = 50  $\mu\text{m}$ ; G, L = 200  $\mu\text{m}$

Estudando o desenvolvimento floral em espécies de bromélias, Sajo et al. (2004a) relatam que a posição do ovário nas flores de Bromeliaceae é variável, desde ínfero e súpero em Bromeliodeae e Tillandsioideae, respectivamente até a presença de ambas as posições em Pitcairnoideae. Para *Dyckia hebdingii* as autoras descrevem que o ovário é súpero, parcialmente apocárpico, trilocular e com placentação axilar, porém as autoras ressaltam que as flores são semi-epígenas durante as primeiras fases de desenvolvimento, tornando-se hipóginas posteriormente, na antese.

É comum a presença de número variável de óvulos por lóculo em flores de Bromeliaceae sendo estes anátropos com a micrópila adjacente ao obturador em cada lóculo. Os óvulos de muitas espécies de bromélias possuem apêndice chalazal de origem dérmica e subepidérmica. No entanto, apesar de sua origem ser similar nos diferentes gêneros, sua forma varia entre as inúmeras espécies. Para *D. hebdingii* o tegumento externo do óvulo mostra-se pluriestratificado (SAJO; PRYCHID; RUDALL, 2004b), assim como observado em *D. distachya*, no presente trabalho.

Para *D. tuberosa* o volume diário de néctar foi de 24  $\mu\text{L}$  (VOSGUERITICHIAN; BUZATO, 2006) e em *D. brevifolia* foi de 30,5  $\mu\text{L}$  (ROGALSKI et al., 2009). Devido à abundante produção de néctar com elevada concentração de açúcar encontrada nas flores de *Dyckia*, é sugerido que as plantas são visitadas por beija-flores (VOSGUERITICHIAN; BUZATO, 2006).

O néctar é o meio pelo qual os agentes polinizadores são atraídos. Em Bromeliaceae, esse recurso é produzido por meio dos nectários septais (STAHL et al., 2012). A presença de nectários septais nas flores da família Bromeliaceae é um fato incomum dentro da ordem Poales, onde esse tipo de estrutura é considerada rara ou ausente. Por outro lado, são comuns em outras monocotiledonêas. A presença ou ausência de nectários (septais ou outros tipos) está associada com a síndrome de polinização. A ausência dessas estruturas sugere que a polinização ocorra por meio do vento, ou outras formas que não utilizam o néctar como recurso, o que é comum dentro da ordem Poales (SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004a).

Similarmente ao descrito no presente trabalho, flores de *Dyckia hebdingii*, apresentam nectários infraloculares inseridos na região do receptáculo floral, sendo que os tecidos que os compõem são extensos contendo inúmeros feixes vasculares e tecido secretor interocular na base do ovário (SAJO; RUDALL; PRYCHID, 2004a). Em *D. brevifolia*, foi constatada a presença de nectários extranupciais em cada uma das sépalas (ROGASLKI et al., 2009) bem como em *D. tuberosa* (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006) e *D. floribunda* (VESPRINI et al., 2003). Esses autores relatam que a presença de nectários extraflorais é relativamente simples, não estruturais, não vascularizados e com ausência de tecido especializado na produção de néctar.

Assim como em *Dyckia distachya*, a ausência de apêndice petalar foi também observada em *D. hebdingii* (SAJO et al., 2004a), não sendo porém, característica de toda a subfamília, sendo que Sajo et al. (2004a) relataram a presença de apêndices petalares no gênero *Ptcairnia*. O apêndice petalar pode auxiliar na adequada posição do néctar dentro do tubo floral facilitando o acesso aos polinizadores e evitando sua evaporação (VARADAJAN; BROWN, 1988; BENZING, 2000). Vervaeke et al. (2003), ressaltam que esta estrutura provavelmente está envolvida com o acúmulo, retenção e escoamento do néctar na flor.

A ausência do apêndice petalar em *Dyckia* parece ser compensada por meio da existência de filamentos basais intumescidos especializados no armazenamento do néctar (VARADAJAN; BROWN, 1988).

#### 5.1.1.2.3. Morfologia dos grãos de pólen

Os grãos de pólen são de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, equatorialmente, apresentam contorno plano de um lado e convexo no outro, monocarpado, com o colpo apresentando contorno irregular (Figuras 6A-B). A exina é semitectada, reticulada, heterobrocada, com granulações e malhas menores em direção ao colpo e em direção às extremidades do diâmetro equatorial (Figuras 6B-D).

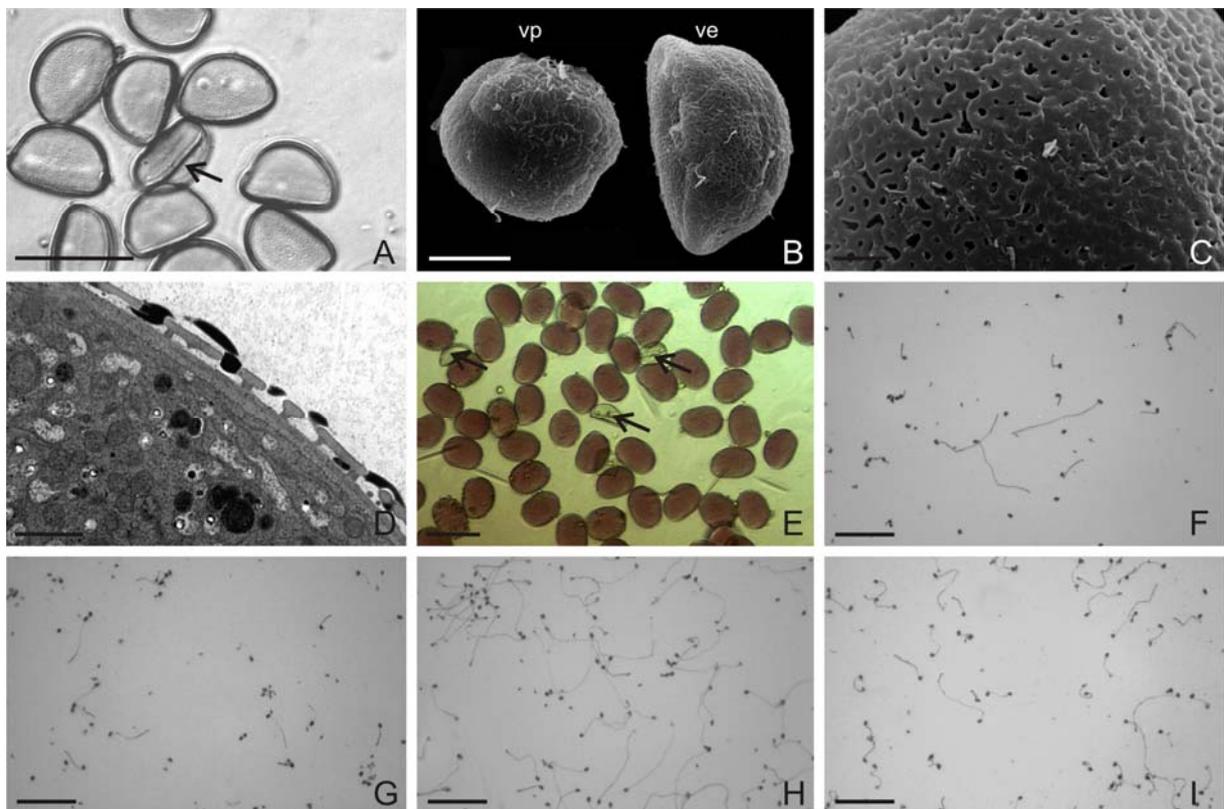
A estimativa de número de grãos de pólen produzidos por flor foi de 317.900 e 52.983 grãos por antera. Os grãos de pólen acetolisados apresentaram medidas de diâmetro equatorial de  $38,11 \pm 2,15 \mu\text{m}$  e diâmetro polar de  $27,98 \pm 2,35 \mu\text{m}$  em

vista equatorial. As características morfométricas das camadas da exina dos grãos de pólen de *D. distachya* são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Morfometria das camadas da exina de grãos de pólen de *Dyckia distachya*

Estruturas	Dimensões* ( $\mu\text{m}$ )
Tecto	$0,27 \pm 0,04$
Columela	$0,29 \pm 0,06$
Exina	$0,93 \pm 0,06$
Nexina	$0,37 \pm 0,07$
Sexina	$0,56 \pm 0,08$

\* Médias de 25 grãos  $\pm$  desvio padrão



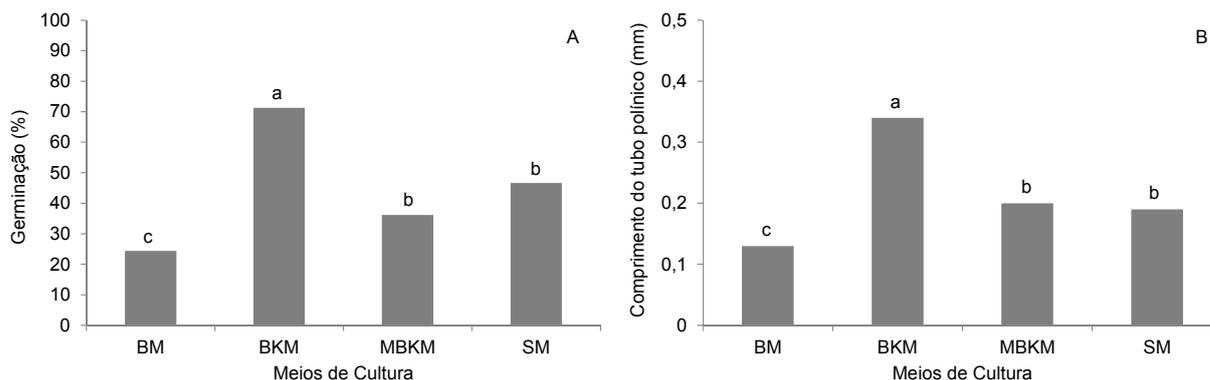
**Figura 6** – Grãos de pólen de *Dyckia distachya*. A) Grãos de pólen após acetólise láctica, evidenciando o colpo (seta). B) Morfologia observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), evidenciando vista polar (vp) e equatorial (ve). C) Detalhes da ornamentação da exina em MEV. D) Grão de pólen observado por microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando a exina. E) Viabilidade dos grãos de pólen avaliada por carmim acético, setas indicando grãos de pólen inviáveis. F-I) Germinação dos grãos de pólen em meio BM (F), MBKM (G), BKM (H), SM (I). (te) teto; (co) columela; (ex) exina. Barras: A, E = 50  $\mu\text{m}$ ; B = 10  $\mu\text{m}$ ; C, D = 2  $\mu\text{m}$ ; F-I = 500  $\mu\text{m}$

As características dos grãos de pólen de *D. distachya* coincidem com aquelas descritas para outras espécies de *Dyckia* (*D. macedoi*, *D. rariflora*, *D. saxatilis*, *D. sordida* e *D. ursina*) (FORZZA; WANDERLEY, 1998). Nestas, as autoras descrevem os grãos de pólen como sendo de âmbito ovalado, heteropolares, monocolpados, possuindo colpos de margens espessas, sendo a exina tectada a semitectada, mais espessa que a nexina, perfurada, microreticulada a reticulada, heterobrocada com malhas menores em direção ao colpo e às extremidades. As paredes dos grãos de pólen são de espessura variável, simples-columelado ou raramente duplicolumelado. As autoras ainda relatam que pequenas diferenças foram observadas em relação à escultura da exina, como a exina perfurada em *D. saxatilis*, enquanto nas outras espécies estudadas, a exina, além de perfuradas, são microreticuladas, apresentando poucas perfurações em *D. macedoi* e *D. rariflora*.

O desenvolvimento de grande número de grãos de pólen é comum dentro do gênero *Dyckia*. Em *D. brevifolia*, o número médio de grãos de pólen encontrados por flor foi de 424.200 e de 70.700 por antera (ROGALSKI et al., 2009), enquanto que para *D. ibiramensis*, o número médio de grãos de pólen por flor foi de 328.050 e de 54.675 por antera (HMELJEVSKI et al., 2007).

#### 5.1.1.2.4 Viabilidade dos grãos de pólen

A germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico variou conforme o meio de cultura, porém, o meio BKM resultou na maior porcentagem de germinação (aproximadamente 70 %) e comprimento do tubo polínico (Figuras 6 F-I e 7). Para o teste histoquímico com carmim acético, foi observada viabilidade de 83%, resultado superior à porcentagem de germinação *in vitro* (Figura 6F).



**Figura 7** - Porcentagem de germinação (A) e comprimento do tubo polínico (B) de grãos de pólen de *Dyckia distachya* em diferentes meios de cultura. BM (PARTON et al., 2002), BKM (BREWBAKER; KWACK, 1963), MBKM (BREWBAKER; KWACK, 1963, modificado), SM (SOARES et al., 2008)

As diferenças encontradas nas taxas de germinação *in vitro* de grãos de pólen, podem ocorrer, segundo Pfahler (1981) pela complexa interação entre a morfologia e fisiologia do grão de pólen com os componentes do meio de cultura. De acordo com Chagas et al. (2009), inúmeros fatores exercem influência sobre a germinação dos grãos de pólen *in vitro*, sendo temperatura e tempo de incubação considerados os mais importantes.

Parton et al. (2002) obtiveram bons resultados de germinação e crescimento dos tubos polínicos de bromeliáceas pertencentes às três subfamílias em meios BM, MBKM e BKM. Os autores observaram que o crescimento do tubo polínico foi significativamente maior em meio de cultura BKM em comparação aos outros dois meios avaliados.

Por vezes, a baixa taxa de germinação e baixo crescimento do tubo polínico ocorrem pela composição inadequada do meio de cultura, ou pela elevada hidratação dos grãos de pólen (SOARES et al., 2011). Pio et al. (2004) mencionam que não só a composição do meio, mas também a temperatura e a alta umidade podem resultar em aumento da pressão osmótica, ocasionando pouca resistência da parede celular, tendo por consequência o rompimento dos grãos de pólen, e ausência de germinação.

Os testes de viabilidade não são completamente satisfatórios, pois os métodos químicos de avaliação utilizam corantes que reagem com os componentes químicos ou estruturas polínicas, e, por consequência, podem não apresentar a capacidade real de germinação do grão de pólen, além do fato de que amostras que

se mostram efetivas na germinação *in vitro*, podem não apresentar suficiente alongação do tubo polínico para a ocorrência da fertilização (STANLEY; LINSKENS, 1974). Soares et al. (2008) enfatizam que a técnica de germinação *in vitro* apresenta resultados mais próximos, aos que provavelmente, ocorrem *in vivo*.

Avaliando a viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de *Ananas* por meio da germinação *in vitro* e uso do carmim acético, Soares et al. (2011) constataram que os resultados obtidos por carmim acético, na sua maioria superestimaram os resultados em relação à germinação *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados em diferentes genótipos de bananeira (SOARES et al., 2008).

## 5.2. Mecanismos reprodutivos

As plantas de *D. distachya* apresentaram produção de sementes a partir de todos os tratamentos realizados, caracterizando uma diversidade de mecanismos reprodutivos para esta espécie. O maior número de sementes foi obtido nos tratamentos de autopolinização, evidenciando sistema de autocompatibilidade, e polinização cruzada manuais, com 100 % de sementes viáveis. Nas flores não polinizadas manualmente observou-se um número intermediário de sementes, também apresentando 100 % de germinação *in vitro*. O fato de as anteras serem posicionadas acima do estigma pode ser uma característica favorável à autopolinização. A agasmopermia foi observada, com produção de sementes menores, e em número reduzido (Tabela 3).

**Tabela 3** - Produção e viabilidade de sementes por fruto nos diferentes tratamentos de polinização com *Dyckia distachya*

Tratamento	Número de sementes*	Viabilidade das sementes (%)**
Polinização natural	80,20 ± 6,38	100
Autopolinização manual	111,67 ± 10,69	100
Polinização cruzada manual	124,00 ± 3,87	100
Agamospermia	18,50 ± 5,28	20

\* Média de sementes em dez frutos ± desvio padrão. \*\* Avaliação através da germinação *in vitro*.

Benzing (1980; 2000) relata que os membros da família Bromeliaceae reproduzem-se de maneiras diversas, sendo a alogamia comum nessas plantas, entretanto, a maioria dos indivíduos dessa família apresenta autocompatibilidade.

Diferentemente das observações deste trabalho com *D. distachya*, há relatos da presença de autoincompatibilidade em *D. ibiramensis* (HMELEJEVSKI et al., 2007) e *D. tuberosa* (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006).

Em *D. brevifolia*, foi observada autocompatibilidade e ocorrência de agamospermia, sendo que a autocompatibilidade possivelmente favorece a autopolinização e a geitonogamia (ROGALSKI et al., 2009).

A ocorrência de autocompatibilidade pode favorecer a formação de frutos e sementes em inúmeras espécies de bromélias (LENZI; MATOS; ORTH, 2006). Esses autores explicam que a autocompatibilidade, é útil na conquista de novos ambientes, onde a presença de polinizadores é escassa. A presença da polinização cruzada possui acentuada importância no aumento da variabilidade genética.

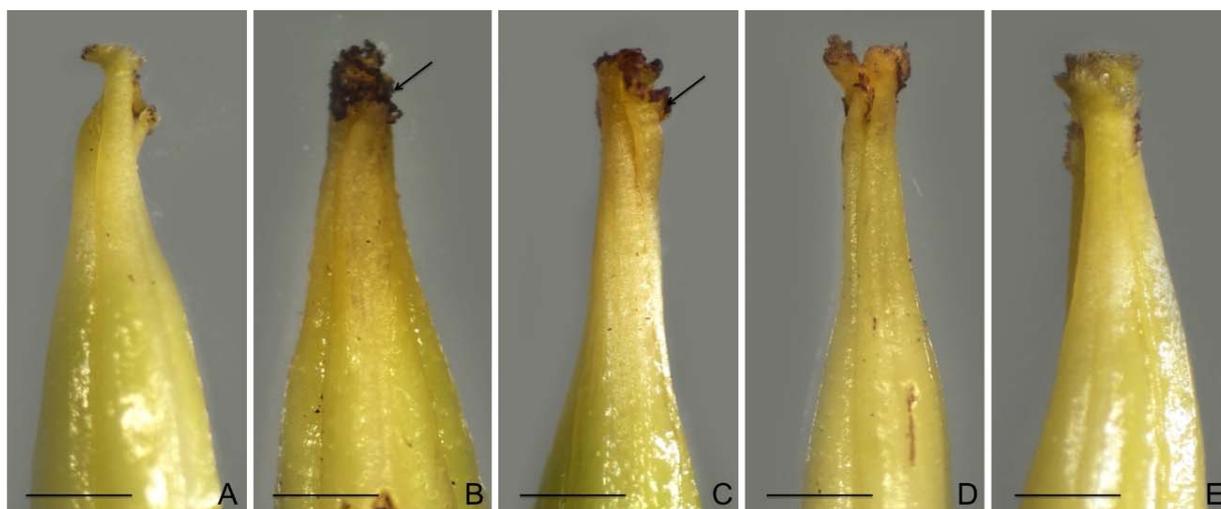
### 5.3. Receptividade do estigma

O estigma mostrou-se receptivo durante as primeiras horas da manhã, observando-se uma diminuição da receptividade ao longo do dia, não sendo verificada receptividade, ou esta, bastante reduzida 24 horas após a antese. Não foi verificada a receptividade na pré-antese (Tabela 4, Figura 8). Esses dados demonstram que o melhor horário para a realização das polinizações é próximo às 8:00 horas.

**Tabela 4** - Receptividade do estigma de *Dyckia distachya* com solução de  $\alpha$ -naftil acetato com tampão fosfato, acetona e fast blue B salt

Períodos avaliados	Receptividade do estigma
Pré-antese 18:00 h	-
Antese 8:00 h	+++
Quatro horas após antese (12 h)	++
10 horas após antese (18 h)	+
24 horas após antese (8:00 h)	-

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



**Figura 8** - Receptividade do estigma de *Dyckia distachya* avaliada após imersão em solução de  $\alpha$ -naftil acetato com tampão fosfato, acetona e Fast Blue B Salt em: A) Pré-antese. B) Antese. C) Quatro horas após antese. D) Dez horas após antese. E) Vinte e quatro horas após antese. Barras: 0,5 mm

Ao contrário do observado em *Dyckia distachya*, os estigmas de *D. brevifolia* mantiveram a receptividade durante todo o período de abertura floral conforme relatado por Rogalski et al. (2009). Lenzi et al. (2006) observaram que o estigma de *Aechmea lindenii* também permanece receptivo durante todo o período de abertura floral. No entanto, Parton et al. (2001) em estudo sobre as barreiras reprodutivas em nove espécies de bromélias de quatro gêneros, observaram que em uma espécie de *Vriesea*, o estigma se mostrou receptivo até dois dias após a antese, porém, a quantidade de óvulos fertilizados decresceram nas polinizações realizadas na pós-antese.

#### 5.4. Germinação de sementes

A germinação das sementes foi elevada, com taxas de pelo menos 77 %, independentemente da temperatura e substrato utilizado (Tabela 5).

As maiores porcentagens de germinação foram observadas nas sementes introduzidas em meio de cultura. Em contrapartida, os menores valores foram encontrados nas sementes alocadas em papel Germitest<sup>®</sup>, independente da temperatura a que foram submetidas.

As sementes germinadas em substrato comercial e meio de cultura às temperaturas de 22 °C e 27 °C, não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de germinação. As sementes alocadas em papel Germitest<sup>®</sup> à 32° C apresentaram diferenças significativas nas taxas de germinação em comparação ao meio e cultura MS. Em contrapartida, as sementes germinadas em papel Germitest<sup>®</sup> a 32 °C, não apresentaram diferenças significativas em relação ao substrato comercial para essa temperatura (Tabela 5).

Não foi observada mortalidade nas sementes estabelecidas em meio de cultura, nas três temperaturas avaliadas. As maiores porcentagens de mortalidade foram observadas nas sementes estabelecidas no substrato comercial a 32 °C com 80,17 % de índice de mortalidade, e nas sementes germinadas em papel Germitest<sup>®</sup> a 22 °C (Tabela 5).

Os maiores índices de velocidade de germinação (IVG) para os três substratos analisados foram obtidos à temperatura de 32 °C, com valor máximo obtido em meio de cultura. Os menores índices observados foram em temperatura de 22 °C (Tabela 5).

O tratamento controle, que constou de sementes germinadas em bandejas mantidas em casa de vegetação (27 °C) apresentou porcentagem de germinação de 88 %, enquanto o IVG (1,55) foi bem inferior ao observado nos demais tratamentos. A mortalidade das plantas foi de 45 % devido contaminação por fungos e bactérias.

A germinação das sementes se deu até o 12° dia após a semeadura em todas as temperaturas e substratos avaliados com pico de germinação ocorrendo no 4° dia. Para o controle, as sementes germinaram até o 18° dia, não sendo observado um pico determinante.

**Tabela 5** - Porcentagem de germinação, mortalidade e índice de velocidade de germinação em *Dyckia distachya* nos diferentes substratos e temperaturas avaliados no período de outubro a novembro de 2011.

	22 ° C	27° C	32° C
Germinação (%)			
Substrato Comercial	91 aA	93 aAB	84 bAB
Papel Germitest ®	78 aB	82 aB	77 aB
Meio de Cultura	97 aA	97 aA	93 bA
CV (%)	11,70		
Mortalidade (%)			
Substrato Comercial	24,17 bB	22,17 bA	80,17 aA
Papel Germitest ®	39,33 aA	28,17 abA	23,33 bB
Meio de Cultura	0,00 aC	0,00 aB	0,00 aC
CV (%)	22,48		
Índice de velocidade de germinação (IVG)			
Substrato Comercial	5,73 bB	6,48 aB	6,91 aB
Papel Germitest ®	5,70 bB	6,46 bB	8,16 aAB
Meio de Cultura	6,72 bA	8,41 aA	9,20 aA
CV (%)	16,62		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna dentro do mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As altas taxas de germinação de sementes obtidas em diferentes condições, no presente trabalho, indicam que as sementes de *D. distachya* germinam em uma ampla faixa de temperatura, assim, como relatado por Duarte et al. (2010) em *D. goehringii*, sob temperaturas de 20 °C, 25 °C e 30 °C. Segundo os autores, essa amplitude pode ser considerada como um parâmetro favorável ao estabelecimento da espécie em condições naturais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira et al. (2007) em *D. tuberosa*, com germinação de sementes entre 15 °C e 40 °C, com o fim do processo de germinação se dando 20 dias após semeadura. Analisando a germinação de sementes de *D. distachya*, em condições aeróbias e de inundação, Wiesbauer et al. (2007) observaram que a maioria das sementes germinaram aos sete dias após a semeadura, numa faixa de temperatura entre 21 °C e 30 °C.

Pinheiro e Borghetti (2003), estudando os fatores abióticos relacionados à germinação de sementes de *Aechmea nudicaulis* e *Streptocalyx floribundus* (Bromeliaceae) germinadas sobre uma camada de papel filtro em placas de Petri, observaram que, para ambas as espécies a velocidade de germinação foi máxima a 25 °C, as autoras ainda relatam que houve variação no tempo médio de germinação

para as duas espécies nas temperaturas de 15 °C e 35 °C indicando que o processo de germinação pode prolongar-se em uma semana ou mais sob temperaturas extremas, acima de 35 °C.

Para sementes de *Pitcairnia albiflos*, a faixa de temperatura ideal para o processo de germinação foi de 20 °C a 30 °C, sendo que em temperaturas extremas, de 10 °C a 15 °C, ou 35 °C a 40 °C, as mesmas não germinam (PEREIRA et al., 2010).

Utilizando substratos como papel filtro umedecido, areia lavada e vermiculita na avaliação da qualidade físico-fisiológica de sementes de *Billbergia portiana* (Bromeliaceae), Duarte et al. (2005), concluíram que o substrato afetou o vigor das sementes e IVG, devido à maior capacidade de retenção de água do substrato. Melo et al. (2005), avaliando o efeito dos substratos areia, vermiculita e papel Germitest® na germinação de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina*), em condições de laboratório, recomendam que as sementes sejam germinadas em areia ou vermiculita. As menores taxas de germinação observadas em papel Germitest® possivelmente foram favorecidas pela baixa termocondutividade apresentada por esse substrato, a qual provoca a diminuição do potencial germinativo.

A obtenção de altas taxas de germinação *in vitro* é comum entre as espécies de bromeliáceas. Silva et al. (2008) utilizando meio de cultura MS sólido alcançaram 100 % de germinação para *Dyckia marítima*.

De acordo com Pompelli (2006), sementes de *D. encholirioides* mostraram porcentagens de germinação de 28,3 %, cinco dias após o estabelecimento *in vitro* em meio MS, e taxas de 77,5 % e 79,7 % no 8° e 14° dias de inoculação, respectivamente.

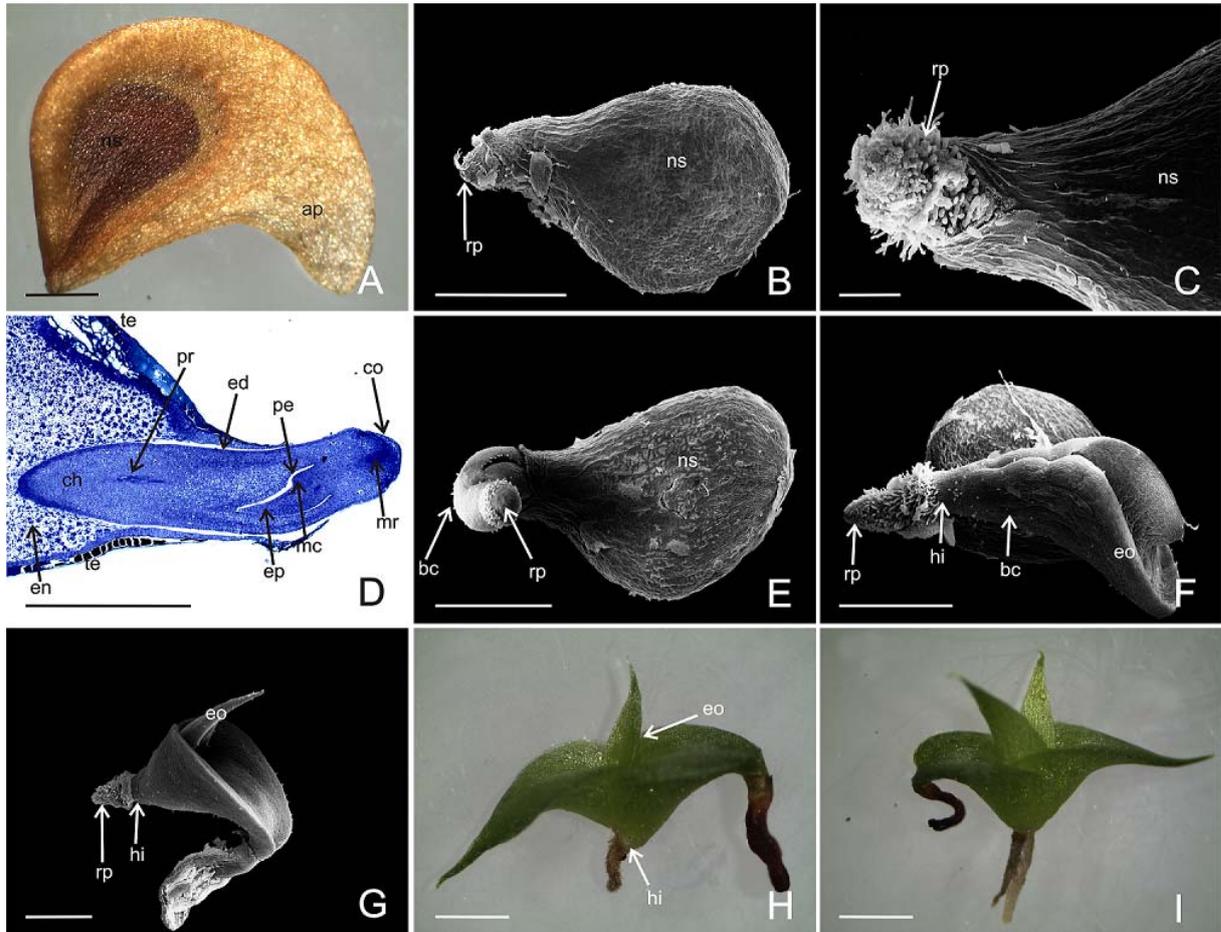
## 5.5. Morfoanatomia do desenvolvimento pós-seminal

As sementes de *D. distachya* são pequenas, ovaladas-achatadas, discoides, inseridas em frutos do tipo cápsulas, septícidas e deiscentes com aproximadamente  $3,21 \pm 0,27$  mm de comprimento e  $2,60 \pm 0,46$  mm de largura, possuem coloração amarronzada, com um tom castanho mais escuro na região que delimita o embrião. Apresentam apêndice alado membranáceo, podendo ser facilmente transportadas pelo vento ou pela água (Figura 9A).

A germinação das sementes teve início no 2° dia após o estabelecimento em meio de cultura, com rompimento inicial do tegumento e consequente extrusão da raiz primária (Figuras 9B-D). Observa-se o cotilédone haustorial em formato cilíndrico no interior do tegumento da semente em contato com o endosperma. Além da observação da formação da raiz primária, protoderme, primórdios do eófilo, coifa e meristemas caulinar e radicular (Figura 9D).

A bainha cotiledonar foliácea cupuliforme exhibe o primeiro eófilo ao 4° dia, sendo o colo sutilmente delimitado por estreitamento (Figura 9E). Ao 5° dia, o primeiro eófilo exhibe a formação de um pequeno tanque (Figura 9F). Nesse período observa-se também o hipocótilo de tamanho reduzido e o surgimento do segundo eófilo (Figura 9G). O terceiro eófilo surgiu no 9° dia após o estabelecimento das sementes (Figura 9H).

Aos 12 dias, a planta jovem apresenta início da formação de raízes adventíceas, raiz primária curta, robusta e pilosa, colo delimitado por estreitamento e hipocótilo reduzido ou ausente. As folhas são cupuliformes imbricadas em rosetas (Figura 9I).



**Figura 9** – Morfologia da semente e desenvolvimento pós-seminal em *Dyckia distachya*. A) Semente madura, observando-se o núcleo seminífero e o apêndice alado. B-I) Fases do desenvolvimento pós-seminal observado por microscopia eletrônica de varredura (B, C, E, F, G) e microscopia de luz (A, D, H, I). B-C) Fase 1 evidenciando a extrusão da raiz primária; em B, o apêndice foi retirado para germinação *in vitro*. D) Secção longitudinal da semente na fase 1. E) Fase 2 evidenciando a emissão da bainha cotiledonar. F) Fase 3 evidenciando o primeiro eófilo em MEV. G) Fase 4 evidenciando a emissão do segundo eófilo em MEV. H) Fase 5 evidenciando a emissão do terceiro eófilo. I) Fase 6 evidenciando planta jovem aos 12 dias com a emissão das raízes adventícias. (ap) apêndice; (bc) bainha cotiledonar; (co) coifa; (ch) cotilédone haustorial; (ed) epiderme; (en) endosperma; (eo) eófilo; (ep) eófilo primário; (hi) hipocótilo; (mc) meristema caulinar; (mr) meristema radicular; (ns) núcleo seminífero; (pr) traços de procâmbio; (rp) raiz primária; (te) tegumento. Barras: A-B, D-I = 1 mm; C = 200  $\mu$ m

O estudo do desenvolvimento pós-seminal de plântulas de *Dyckia distachya* apresentou similaridades com as espécies *D. pseudococcinea* (PEREIRA et al., 2008), *D. duckey* e *D. racemosa* (SILVA; SCATENA, 2011). Esses autores descreveram que essas espécies possuem sementes pequenas, ovaladas, achatadas, discóides, com envoltório rugoso, alas membranáceas, sendo de coloração mais escura a região que delimita o embrião. Os autores relatam ainda que a germinação teve início ao 3º dia com o rompimento dos tegumentos e extrusão da raiz primária. A planta jovem foi observada aos nove dias em *D. duckey* e *D. racemosa* (SILVA; SCATENA, 2011) e 12 dias em *D. pseudococcinea* (PEREIRA et al., 2008) com colo delimitado, raiz primária curta, hipocótilo reduzido ou ausente, folhas em roseta e início do crescimento de raízes adventícias.

## 5.6. Micropropagação

### 5.6.1 Multiplicação *in vitro*

De maneira geral, os brotos subcultivados em meio de cultura líquido mostraram-se mais desenvolvidos quando comparados ao meio de cultura semissólido (Figura 10). As taxas de multiplicação variaram de 2,17 brotos explante<sup>-1</sup> (MS + BAP e ANA, sólido) a 6,93 brotos explante<sup>-1</sup> (MS + CIN e ANA, líquido sob agitação) no primeiro subcultivo. Os brotos advindos do meio de cultura sem adição de reguladores vegetais apresentaram raízes mais desenvolvidas do que aqueles advindos dos meios de cultura com reguladores de crescimento.

A propagação vegetativa em casa de vegetação por meio da emissão de brotos laterais de *D. distachya* mostrou-se muito lenta, em comparação com a multiplicação *in vitro*. A média de brotos emitidos por planta foi de  $3,84 \pm 3$ , (n=25) em dois anos de cultivo em casa de vegetação em vasos com substrato Basaplant®.



**Figura 10** – Culturas de *Dyckia distachya* no quinto subcultivo em meio de cultura suplementado com diferentes combinações de reguladores de crescimento e estado físico do meio de cultura - A) semissólido; B) líquido estático; C) líquido sob agitação

As análises estatísticas revelaram que não houve interação entre a composição do meio de cultura e os estados físicos do meio de cultura. Desta forma foi realizada a análise isoladamente (Tabela 6).

A maior taxa de proliferação foi observada durante o primeiro subcultivo em meio MS suplementado com CIN e ANA ( $5,30 \pm 0,57$  brotos por explante), enquanto, a menor taxa de proliferação foi observada em meio de cultura MS suplementado com BAP e ANA ( $3,04 \pm 0,59$  brotos por explante). A partir do terceiro subcultivo, os meios MS combinados aos reguladores BAP e ANA apresentaram taxas superiores de multiplicação em relação aos meios sem presença de reguladores e aos meios acrescidos de CIN e ANA, permanecendo assim até o último subcultivo (Tabela 6).

Em relação ao estado físico do meio, as melhores respostas foram obtidas em meios de cultura no estado líquido (estático e agitação), notando-se diferença entre eles apenas no segundo e quinto subcultivos, onde o meio sob agitação foi superior ao estático. Em todos os subcultivos o meio de cultura semissólido apresentou menores taxas de multiplicação (Tabela 6).

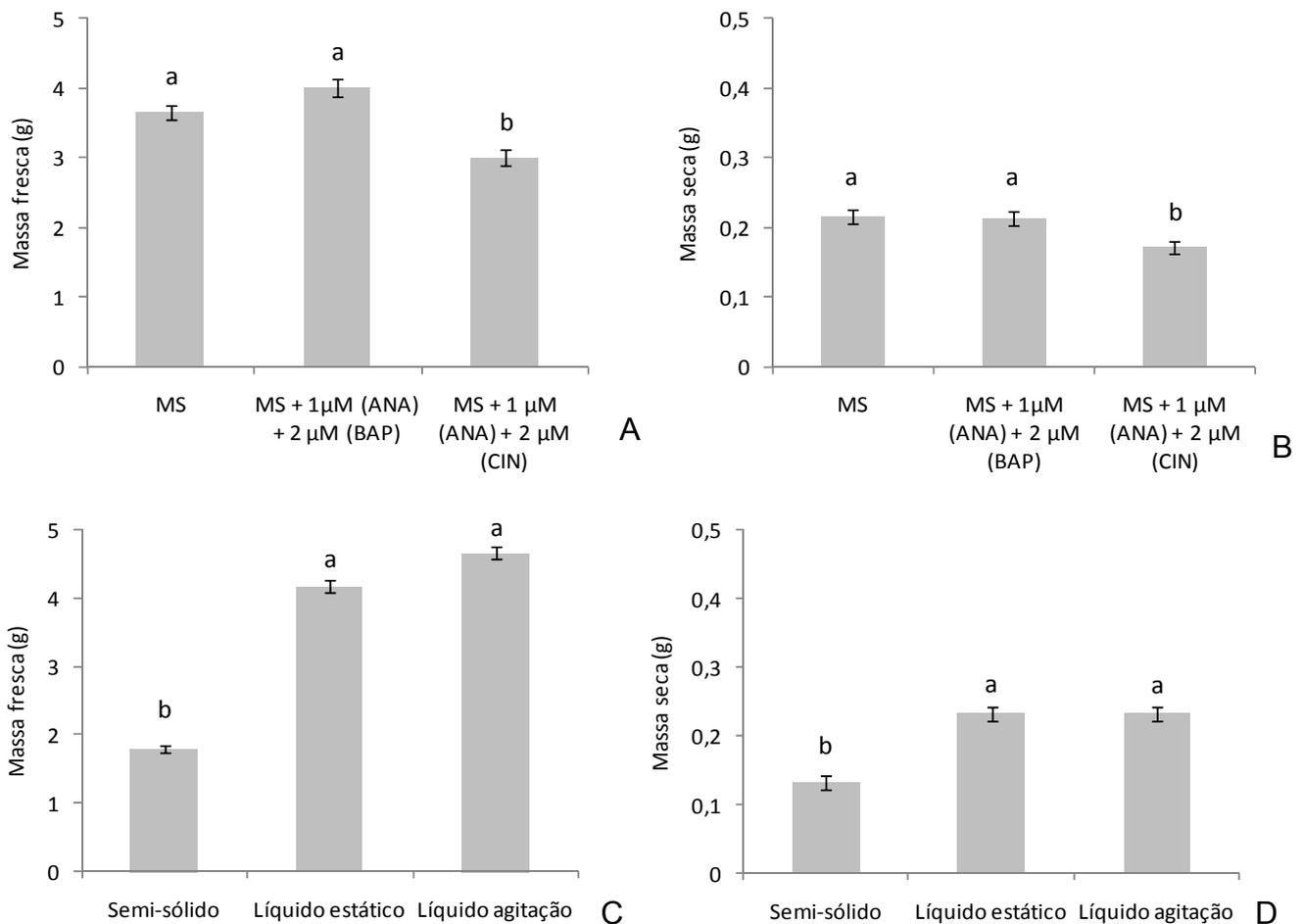
**Tabela 6** - Taxa de multiplicação *in vitro* de *Dyckia distachya* em diferentes meios de cultura e estados físicos do meio nos cinco subcultivos

Subcultivos	I	II	III	IV	V
<b>Meios de cultura</b>	Taxas de multiplicação				
MS	$4,62 \pm 0,30$ b	$3,43 \pm 0,21$ b	$3,81 \pm 0,17$ b	$3,60 \pm 0,16$ b	$3,79 \pm 0,17$ b
MS + $2\mu\text{M}$ (BAP) + $1\mu\text{M}$ (ANA)	$3,04 \pm 0,59$ c	$4,59 \pm 0,35$ a	$4,45 \pm 0,14$ a	$4,55 \pm 0,16$ a	$4,56 \pm 0,17$ a
MS + $2\mu\text{M}$ (CIN) + $1\mu\text{M}$ (ANA)	$5,30 \pm 0,57$ a	$4,64 \pm 0,25$ a	$3,80 \pm 0,15$ b	$3,66 \pm 0,13$ b	$3,69 \pm 0,15$ b
<b>Estado físico do meio de cultura</b>					
Semissólido	$2,64 \pm 0,30$ b	$3,15 \pm 0,22$ c	$2,87 \pm 0,10$ b	$2,97 \pm 0,12$ b	$2,96 \pm 0,11$ c
Líquido estático	$5,16 \pm 0,30$ a	$4,49 \pm 0,26$ b	$4,60 \pm 0,15$ a	$4,43 \pm 0,14$ a	$4,42 \pm 0,15$ b
Líquido agitação	$5,17 \pm 0,57$ a	$5,02 \pm 0,25$ a	$4,54 \pm 0,10$ a	$4,40 \pm 0,12$ a	$4,66 \pm 0,15$ a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna dentro do mesmo fator, não diferem entre si pelo intervalo de confiança 95 % para as médias.

Ao final do quinto subcultivo foram obtidas massa de matéria fresca e seca. Os resultados dessas duas variáveis são similares aos resultados obtidos nas taxas de multiplicação. Pode-se observar que não houve diferença significativa na matéria fresca e seca em meio de cultura MS e MS acrescido de BAP e ANA sendo superior ao meio MS acrescido de CIN e ANA (Figuras 11 A-B).

Para os meios de cultura em diferentes estados físicos, as maiores massas de matéria fresca e seca foram obtidas em meios líquidos (estático e agitação), com os menores valores em meio semissólido (Figuras 11 C-D).



**Figura 11** - Massa fresca e seca (g) de *Dickya distachya* nos diferentes meios de cultura (A, B) e estado físico do meio (C,D) no quinto subcultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

De maneira geral, o processo de micropropagação é dividido em quatro fases (estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação, formação das raízes e aclimatização), sendo a primeira fase, a responsável pela adaptação dos explantes ao ambiente *in vitro*. Essa fase termina quando os explantes produzem um número constante de brotos normais após serem subcultivados. Usualmente, essa fase completa-se em quatro ou seis semanas, porém, em algumas espécies, com as arbóreas, por exemplo, essa fase pode prolongar-se por até 12 meses (DAVEY; ANTHONY, 2010).

De maneira semelhante ao relatado no presente trabalho, Pompelli e Guerra (2005) avaliaram a micropropagação de *D. distachya* em meios de cultura com

diferentes reguladores de crescimento nos estados semissólido e líquido e obtiveram resultados superiores em meio líquido. Esses autores constataram hiperidricidade nos brotos no quarto subcultivo, dificuldade não encontrada no presente trabalho.

Com o objetivo de obter um protocolo de micropropagação eficiente para *D. agudensis*, Silva et al. (2007) estudaram os efeitos das concentrações de citocininas e auxina no número de brotos em meio de cultura semissólido. Esses autores concluíram que a máxima eficiência foi obtida com a mistura de BAP e IBA (ácido indolbutírico) na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, resultando em 4,6 ± 2,5 brotos por explante.

De maneira semelhante aos resultados obtidos nesse trabalho, Almeida et al. (2002) relatam que o estado físico do meio de cultura exerceu influência nas taxas de proliferação de brotos do abacaxizeiro “Pérola”, obtendo uma taxa de multiplicação 4,3 vezes maior em meio de cultura líquido quando comparado ao meio de cultura semissólido. Em contrapartida, Silva et al. (2012) estudando as espécies *Nidularium procerum* e *N. inocentii*, observaram que o estado físico do meio não exerceu influência nas taxas de multiplicação das plântulas.

Mengarda et al. (2009) com o objetivo de avaliar a influência do estado físico do meio de cultura sobre o comportamento *in vitro* de *Neoregelia cruenta*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata* observaram que após 30 dias de cultivo em diferentes meios (semissólido, líquido estático, líquido sob agitação de 90 rpm e líquido estático com ponte de papel filtro), o meio líquido estático apresentou melhores resultados no que diz respeito à taxa média de multiplicação em todas as espécies estudadas. Todos os meios avaliados por esses autores apresentavam em sua constituição a combinação de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

As altas taxas de multiplicação observadas em meio líquido podem ter sido favorecidas pela maior disponibilidade de água e nutrientes encontradas nesse meio, o qual não oferece resistência física à difusão dos nutrientes quando comparado ao meio de cultura semissólido (PEREIRA; FORTES, 2003).

### 5.6.2. Aclimatização de plantas

Na aclimatização, observou-se que as plantas provenientes dos meios de cultura líquido (estático e agitação) apresentaram um desenvolvimento superior (1,5 cm) e mais vigoroso quando comparadas à plantas do meio de cultura semissólido (0,8 a 1,0 cm). As plantas do meio semissólido, mesmo passando por um período de 60 dias em meio de cultura MS líquido antes da aclimatização, se mostraram menores do que aquelas provenientes do meio de cultivo na forma líquida.

Verificou-se, aos 120 dias, que a porcentagem de sobrevivência foi relativamente alta para as plantas provenientes de todos os tratamentos, variando de 92 a 100 % (Tabela 7) e mais uma vez as plantas provenientes do meio de cultura semissólido apresentaram menor crescimento. As plantas aclimatizadas mostraram padrões morfológicos normais.

**Tabela 7** – Porcentagem de sobrevivência das plantas de *Dyckia distachya* cultivadas *in vitro* 120 dias após transferência para casa de vegetação.

Tratamentos	Sobrevivência (%)
MS - semissólido	98
MS + 2 $\mu$ M (BAP) + 1 $\mu$ M (ANA) - semissólido	98
MS + 2 $\mu$ M (CIN) + 1 $\mu$ M (ANA) - semissólido	94
MS - líquido estático	99
MS + 2 $\mu$ M (BAP) + 1 $\mu$ M (ANA) - líquido estático	97
MS + 2 $\mu$ M (CIN) + 1 $\mu$ M (ANA) - líquido estático	99
MS - líquido agitação	92
MS + 2 $\mu$ M (BAP) + 1 $\mu$ M (ANA) - líquido agitação	100
MS + 2 $\mu$ M (CIN) + 1 $\mu$ M (ANA) - líquido agitação	99

A família Bromeliaceae é composta por espécies rústicas, por consequência, na maioria das vezes são observadas altas taxas de sobrevivência durante a etapa de aclimatização (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006).

A etapa de aclimatização é uma fase de grande importância do processo de multiplicação *in vitro*, uma vez que as plantas passam de ambiente heterotrófico para autotrófico. Esse processo, quando realizado de forma ineficaz, pode resultar em perdas consideráveis do material propagado, já que a transferência para casa de vegetação implica em rápida desidratação das plantas devido ao desenvolvimento tardio da cera epicuticular e de estômatos funcionais durante o cultivo *in vitro*, o que

leva a elevadas taxas de transpiração (BANDEIRA et al., 2007; POSPÍSILOVÁ et al., 1999).

De acordo com Pompelli e Guerra (2005), plantas menores que 1,5 cm provenientes do cultivo *in vitro* não são capazes de sobreviver fora desse ambiente. Porém, no presente trabalho, as plantas provenientes do cultivo em meio semissólido apresentaram alta porcentagem de sobrevivência, mesmo apresentando comprimentos, em sua maioria, menores que 1,5 cm. Esses autores ainda ressaltam que os brotos devem ser mantidos nas condições *in vitro* até atingirem um tamanho mínimo para que possam ser transferidos para casa de vegetação.

Resultados semelhantes foram relatados para *D. maritima* por Silva et al. (2008), com 90 % de sobrevivência após 120 dias de cultivo em casa de vegetação para clones da espécie oriundos do cultivo *in vitro*, enquanto que Mercier e Kerbauy (1993) observaram 100 % de sobrevivência para plantas de *D. macedoi* fora do ambiente *in vitro*, também em condições de casa de vegetação.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas de *D. distachya* apresentam flores completas hipóginas com perianto composto de três pétalas, três sépalas e seis estames, filetes conados, estigma do tipo conduplicado-espiral, presença de nectários septais infraloculares, ausência de apêndice petalar, ovário súpero trilobular e óvulos anátropos apresentando apêndice chalazal.

Os grãos de pólen são de tamanho médio, simetria bilateral, âmbito ovalado, equatorialmente, apresentam contorno plano de um lado e convexo no outro, monocarpado, com o colpo apresentando contorno irregular, exina semitectada, reticulada, heterobrocada, com granulações e malhas menores em direção ao colpo e em direção às extremidades do diâmetro equatorial.

Os melhores resultados para germinação e crescimento do tubo polínico foram obtidos em meio de cultura BKM. As plantas de *D. distachya* apresentam todos os mecanismos de reprodução (polinização cruzada, autopolinização e agamospermia), produzindo sementes viáveis em todos os tratamentos. O maior número de sementes foi obtido no tratamento de polinização cruzada e autopolinização manual. O estigma mostrou-se receptivo durante as primeiras horas da manhã.

Sementes de *D. distachya* germinam em uma ampla faixa de temperatura, sendo a temperatura de 27 °C a que mais favoreceu o processo em todos os substratos avaliados. Observou-se que o processo de germinação se deu bem mais lentamente nas sementes mantidas em casa de vegetação.

A descrição morfoanatômica do desenvolvimento pós-seminal permitiu a caracterização de cinco fases para o desenvolvimento pós-seminal: extrusão da raiz primária, emissão do primeiro eófilo, emissão do segundo eófilo, emissão do terceiro eófilo e planta jovem.

Para a micropropagação, os meios de cultura MS no estado líquido (estático e agitação), se mostraram bem mais eficiente na multiplicação das plântulas especialmente em combinação com 2  $\mu$ M BAP + 1  $\mu$ M ANA, apresentando elevadas taxas de produção de brotos, sendo indicado para a produção massal de mudas de *D. distachya*.

As plantas obtidas da micropropagação apresentaram altas porcentagens de sobrevivência durante o período de aclimatização, não sofrendo alterações morfológicas.

O presente trabalho proporcionou maiores conhecimento acerca da espécie *D. distachya*, fornecendo subsídios para a elaboração de estratégias de reintrodução e conservação dessa espécie ameaçada de extinção.

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, J. M. F.; DE LIMA, M. C.; ALBUQUERQUE, F.; DE MORAES, E.; SILVA, V. S. Influência da temperatura e do tipo de substrato na germinação de sementes de cerejeira. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 8, p. 49-55, 1986.
- ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 296-300, 2002.
- ANDRADE, A. C. S.; CUNHA, R.; SOUZA, A. F.; REIS, R. B.; ALMEIDA, K. J. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. **Seed, Science and Technology**, Zurich, v. 31, p. 125-137, 2003.
- ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Bromeliads. In: SILVA, J. A. T. (Org). **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**. Tokyo: Global Science Books, 2006. v. 4, p. 644-655.
- ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MARAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Menta X Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 533-538, 2011.
- BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização ex vitro de plantas propagadas pela enxertia de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, p. 773-781, 2007.
- BARRET, S. C. H. Major evolutionary transitions in flowering plant reproduction: an overview. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 169, p. 1-5, 2008.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London. Serie A**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BARTH, O. M. **O pólen do mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. 152 p.
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *OrthoPHYTUM mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1101-1103, 2007.
- BENCKE, M.; DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich (Bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, São Leopoldo, n. 59, p. 299-306, 2008.
- BENZING, D. H.; BURT, K. M. Foliar permeability among twenty species of the Bromeliaceae. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 97, p. 269-279, 1970.

BENZING, D. H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **American Journal of Botany**, New York, v. 63, p. 1009-1014, 1976.

BENZING, D. H.; RENFROW, A. The nutritional dynamics of *Tillandsia circinnata* in southern Florida and the origin of the "air plant" strategy. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 141, p. 165-172, 1980.

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

BODANESE-ZANETTINI, M. H.; CAVALLI, S. S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Ed.). **Genética e evolução vegetal**. 1. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003. p. 177-188.

BOLAT, I.; PIRLAK, L. An investigation of pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of agriculture and Forestry**, Ankara, Turkey, v. 23, p. 383-388, 1997.

BOLTEN, A. B.; FEINSINGER, P.; BAKER, H. G.; BAKER, I. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. **Oecologia**, Berlin, v. 41, p. 301-304, 1979.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa n° 6, de 23 de setembro de 2008. Lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, v. 145, n. 185, 24 set. 2008. Seção 1, p. 75-83.

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

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

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

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (G. Graham) L. B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p. 79-83, 1999.

CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; DALL'ORTO, F. A. C.; TIZATO, L. H. C.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; SCARPARE FILHO, J. A. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus pérsica* (L.) Batch vulgaris. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, p. 8-14, 2009.

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

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

DAQUINTA, M. M.; ALMEIDA, A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis of immature flower and buds of flower stalk in *Dyckia distachya*. **Journal of the Bromeliad Society**, Orlando, v. 49, p. 72-76, 1999.

DAVEY, M.R.; ANTHONY. **Plant Cell Cultures - Essential Methods**. 1 ed. Chichester, UK, 2010, 341p.

DEMÉTRIO, C. G. B.; HINDE, J. P. Half-normal plots and overdispersion. **GLIM Newsletter**, Oxford, v. 27, p. 19-26, 1997.

DOUSSEAU, S.; DE ALVARENGA, A. A.; DE CASTRO, E. M.; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; DE MELO, L. A. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1694-1700, 2008.

DROSTE, A.; SILVA, A. M.; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

DUARTE, E. F.; GUIMARÃES, N. N. R.; CARNEIRO, I. F. Germinação e vigor de sementes de bromélia (*Billbergia porteana* Beer) em diferentes substratos. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos...** Goiânia: UFG, 2005. 1 CD-ROM.

DUARTE, E. F.; CARNEIRO, I. F.; GUIMARÃES, N. N. R. Características físicas e germinação de sementes de *Dyckia goehringii* Gross e Rauh (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, p. 422-429, 2010.

ESTEVAN, D. A.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; MOTA, T. D.; TAKAHASHI, L. S. A. Germinação de sementes de duas bromélias em diferentes substratos. **Científica**, Jaboticabal, v. 38, p. 7-13, 2010.

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

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 264 p.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T.; SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas, no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 15, p. 231-242, 2001.

FIGLIOLA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I. R.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLA, M. B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília, DF: ABRATES, 1993. p. 137-74.

FORZZA, R. C.; WANDERLEY, M. G. Considerações sobre a morfologia polínica em *Dyckia*, *Encholirium* e *Pitcairnia*. **Bromélia**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1-4, p. 50-53, 1998.

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

GALETTO, L.; BERNADELLO, G. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, p. 269-280, 2004.

GALVANESE, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de Ana, 6-BA e Ágar na propagação in vitro de *Aechmea Blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, Bromélia Nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, p. 63-67, 2007.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Cham, Switzerland: Springer, 2008. v. 1.

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

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

GUARÇONI, E.A.E.; SARTORI, M.A.; DE PAULA, C.C. *Dyckia inflexifolia* (Bromeliaceae), a new species from Brazil. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v. 49, p. 407-411, 2012.

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

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

JONES, J. B.; MURASHIGE, T. Tissue culture propagation of *Aechmea fasciata* Baker and other bromeliads. **International Plant Propagators Society Combined Proceedings**, Carlisle, v. 24, p. 117-127, 1974.

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

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

KOH, Y. C.; DAVIES JÚNIOR, F. T. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 70, p. 301-307, 1997.

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

LEME, E. M. C.; RIBEIRO, O. B. C.; MIRANDA, Z. J. G. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v. 67, p. 9-37, 2012.

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

LESAR, H.; HLEBEC, B.; CERANIC, N.; KASTELEC, D.; LUTHAR, C. Acclimatization of terrestrial orchid *Bretilla striata* Rchb. f. (Orchidaceae) Propagated under *in vitro* conditions. **Acta Agriculturae Slovenica**, Ljubljana, Slovenia, v. 99, p. 69-75, 2012.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 11. ed. Sarasota: Sarasota Bromeliad Society and Marie Selby Botanical Gardens, 2008.

LOUVEAUX, J.; MARURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methodik der Melissopalynologie. **Apidologie**, Paris, v. 1, p. 193-209, 1970.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

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

MATALLANA, G.; GODINHO, M. A. S.; GUILHERME, F. A. G.; BELISARIO, M.; COSER, T. S.; WENDT, T. Breed systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 289, p. 57-65, 2010.

MELO, R. R.; FERREIRA, A. G.; RODOLFO JÚNIOR, F. Efeitos de diferentes substratos na germinação de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan). Em condições de laboratório. **Revista Científica Eletrônica de**

**Engenharia Florestal**, n. 5, 2005. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/florestal05/pages/artigos/artigo09.pdf>

MENGARDA, L. H. G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, p. 469-474, 2009.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* – an endangered endemic Brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, Surrey, v. 1, p. 70-72, 1993.

MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R. M.; SOTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, p. 107-112, 2003.

MEZ, C. Bromeliaceae. **Das Pflanzenreich Regni Vegetabilis Conspectus**, Weinheim, v. 4, n. 32, p. 1-667, 1934.

MORAES, P. L. R.; PAOLI, A. A. S. Morfologia e estabelecimento de plântulas de *Cryptocarya moschata* Ness, *Ocotea catharinensis* Mez e *Endlicheria paniculata* (Spreng.). MacBride-Lauraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, p. 287-295, 1999.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-97, 1962.

NAVARRO, L.; GUITIÁN, J. The role of floral biology and breeding system on the reproductive success of the narrow endemic *Pretocoptis viscosa* rothm. (Caryophyllaceae). **Biological Conservation**, Barking, v. 103, p. 125-132, 2002.

PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; SILVEIRA, L. C. T.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; BERED, F. Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) in Southern Brazil. **American Journal of Botany**, New York, v. 94, p. 83-689, 2007.

PAIVA, P. D. O.; NAVES, V. C.; DUTRA, L. F.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. *In vitro* propagation of *Nidularium fulgens* Lem. **Interciencia**, Caracas, v. 34, p. 593-596, 2009.

PAOLI, A. A. S.; BIANCONI, A. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pseudima frutescens* (Aubl.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 30, p. 146-155, 2008.

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

PARTON, E.; VERVAEKE, R.; DELEN, B. R.; VANDENBUSSCHE, R.; DE PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 55-161, 2002.

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

PENISSI, B. V. **Growing indoor plants with success**. Attapulcus, GA: The University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences, 2007. 28 p. (Bulletin, 1318).

PEREIRA, A. R.; ANDRADE, A. C. S.; FORZZA, R. C.; RODRIGUES, A. S. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). **Seed, Science & Technology**, Zurich, v.38, p. 79-87, 2010.

PEREIRA, A. R.; PEREIRA, T. S.; RODRIGUES, A. S.; DE ANDRADE, A. C. S. Morfologia de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de espécies de Bromeliaceae. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 22, p. 1150-1162, 2008.

PEREIRA, D. A.; BRITO, A. C.; AMARAL, C. L. F. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq) com vistas ao melhoramento genético. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, p. 27-34, 2007.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, p. 1035-1043, 2003.

PFAHLER, P. L. *In vitro* germination characteristics of maize pollen to detected biological activity of environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, Reserch Triangle Park, v. 37, p. 125-132, 1981.

PINHEIRO, F.; BORGHETTI, F. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.)Griesebach and *Estreptocalyx floribundus* (Martius Exchults) (F.) Mez. (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, p. 17-35, 2003.

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

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, p. 293-296, 2004.

POMPELLI, M. F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var. *encholirioides* (Bromeliaceae, Ptilocarpoideae). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 13, p. 1-9, 2006.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, p. 273-279, 2004.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, p. 117-126, 2005.

POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Review. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, p. 481-497, 1999.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, R. O.; NODARI, R. W.; LISCHKA, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 14, p. 1799-1808, 2005.

REITZ, R. **Bromeláceas e a malária-bromélia endêmica**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983. 808 p.

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

ROGALSKI, J. M.; REIS, A.; DOS REIS, M. S.; HMELJEVSKI, K. V. Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), do Rio Itajaí-Açú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, p. 691-702, 2009.

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

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

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. Sacarose e pH na germinação in vitro de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, p. 170-174, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S.; COAN, A. I. Seed morphology and post-seminal development of *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) from the "Campos Gerais", Paraná, Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 945-951, 2006.

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

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Cambridge, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHIVANNA, K. R.; LINSKENS, H. F.; CRESTI, M. Pollen viability and pollen vigor. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 81, p. 38-42, 1991.

SILVA, A. L. L.; DORNELLES, E. B.; BISOGNIN, D. A.; FRANCO, E. T. H.; HORBACH, M. A. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – an extinction threatened bromeliad. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 62, p. 39-43, 2007.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; GEISING, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia marítima* Baker – Bromeliaceae. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 63, p. 135-138, 2008.

SILVA, A. L. L.; COSTA, J. L.; DE ALCANTARA, G. B.; DE CARVALHO, D. C.; SCHUK, M. R.; BIASI, L. A.; SCHEIDT, G. N.; SOCCOL, C. R. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. And *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, Faisalabad, Pakistan, v. 44, p. 1095-1101, 2012.

SILVA, I. V.; SCATENA, V. L. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 62, p. 263-272, 2011.

SIMPSON, M. G. **Plant systematics**. San Diego: Academic Press, 2006. 579 p.

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

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

SMITH; L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). In: NEW YORK BOTANICAL GARDEN. **Flora Neotropica**. New York, Hafner Press, 1974. (Monograph, 14, pt. 1).

SMITH; L.B.; DOWNS, R.J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). In: NEW YORK BOTANICAL GARDEN. **Flora Neotropica**. New York, Hafner Press, 1977. (Monograph, 14, pt. 2).

SMITH; L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). In: NEW YORK BOTANICAL GARDEN. **Flora Neotropica**. New York, Hafner Press, 1979. (Monograph, 14, pt. 3).

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

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

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

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 849 p.

TAKAHASHI, C. A.; MERCIER, H. Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: characterization of a spatial and a functional division. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, p. 1208-1216, 2011.

TAYLORSON, R. B.; HENDRICKS, S. B. Interactions of light and a temperature shift on seed germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 49, p. 127-130, 1972.

TEIXEIRA, C.M.; ARAÚJO, J.B.S.; CARVALHO, G.J. Potencial alelopático de plantas de cobertura no controle de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 691-695, 2004.

TOMLISON, P. B. Comelinales-Zingibelaes. In: METCALFE, C. R. (Ed.). **Anatomy of the monocotyledons**: III. Oxford: Clarendon Press, 1969. p. 193-294.

VARADAJAN, G. S.; BROWN, G. K. Morphological variation of some floral features of subfamily Pitcairnoideae (Bromeliaceae) and their significance in pollinization biology. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 149, p. 82-91, 1988.

VERVAEKE, I.; PARTON, E.; DERROUSE, R.; DE PROFT, M. P. Flower biology of six cultivars of the Bromeliaceae in pollen, pistil and petal appendages. **Selbyana**, Sarasota, FLA, v. 24, p. 78-86, 2003.

VESPRINI, J. L.; GALLETO, L.; BERNADELLO, G. The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, p. 24-27, 2003.

VIEIRA, D. C. M.; SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, p. 183-188, 2007.

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

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, Dordrecht, v. 393, p. 25-38, 1995.

WANG, Z. Y.; YAXIN, G.; SCOTT, M.; SPANGENBERG, G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany**, New York, v. 91, p. 523-530, 2004.

WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; KLEIN, D. E.; RIOS, R. I. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of Pitcairnia (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 232, p. 201-212, 2002.

WIESBAUER, M. B.; SCARIOT, E. C.; SASAKI, L. L.; REIS, A. Influência da luz e inundação de *Dyckia distachya* Hassler, uma bromélia em vias de extinção. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 717-719, 2007.

WINKLER, M.; HULBER, K.; HIETZ, P. Effect of canopy position and seedling survival of epiphytic bromeliads in a Mexican Humid Montane Forest. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, p. 1039-1047, 2005.

WOLF, A. V.; BROWN, M. G.; PRENTISS, P. G. Concentratives properties of aqueous solutions: conversion tables. In: WEAST, R. C.; ASTLE, M. J. (Ed.). **Handbook of chemistry and physics**. 60. ed. Boca Raton: CRC Press, 1979. p. 227-270.