

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO DA NATUREZA**

**Aline Mystica Silva de Oliveira**

**Biologia Reprodutiva e Interações Planta-Polinizador em Espécies de Bromeliaceae no  
Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil**

**Juiz de Fora**

**2021**

**Aline Mystica Silva de Oliveira**

**Biologia Reprodutiva e Interações Planta-Polinizador em Espécies de Bromeliaceae no  
Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação da Natureza.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Paula Gelli de Faria

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Aline Mystica Silva de.

Biologia reprodutiva e interações planta-polinizador em espécies de Bromeliaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. / Aline Mystica Silva de Oliveira. -- 2021.

103 p. : il.

Orientadora: Ana Paula Gelli Faria

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2021.

1. Complexo nidularioide. 2. Conservação. 3. Polinização. 4. Herbivoria. 5. Serra da Mantiqueira. I. Faria, Ana Paula Gelli, orient. II. Título.

**Aline Mystica Silva de Oliveira**

**Biologia Reprodutiva e Interações Planta-Polinizador em Espécies de Bromeliaceae no  
Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação da Natureza.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Ana Paula Gelli de Faria**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF (Orientadora)**

---

**Prof. Dr. André Rodrigo Rech**  
**Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Monteiro Coelho Ferreira**  
**Universidade Federal de Viçosa – UFV**

---

**Prof. Dr. Luiz Menini Neto**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF**

---

**Prof. Dr. Paulo Henrique Pereira Peixoto**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF**

*À Deus, minha Luz!*

*À minha família!*

*E à todos os estudantes de origem humilde que Acreditam que a Educação pode mudar*

*suas vidas!*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora e à Deus, por sempre iluminarem o meu caminho, guiarem os meus passos a cada dia e por terem permitido que esse sonho se tornasse real!

À minha Família, minha Fortaleza, que me ensinou os valores maiores dessa vida, amo vocês infinitamente! À minha Mãe Glória, meu Amor Maior, por ser a melhor Mãe do mundo e minha grande amiga, obrigada por ter me ensinado a amar as plantas desde sempre e por sempre acreditar nos meus sonhos e me incentivar a lutar por eles! Ao meu Pai João, meu Amor Maior, que conhece muito mais passarinhos que eu, pelos valores que me ensinou a cultivar desde pequena e por ser o melhor Pai do mundo! Ao meu Irmãozinho, Leandro, por ser o meu grande amigo e o melhor Irmão que eu poderia ter na vida, por ter me ensinado a importância dos estudos desde cedo e ter me mostrado o quanto vale a pena lutar pelo que se acredita! Ao Humberto, meu companheiro, por sempre estar junto comigo em todos os momentos, me ajudando e apoiando, tornando a caminhada muito mais leve e feliz ao seu lado! À Aline, minha cunhada, pela torcida e pelas risadas que sempre nos proporciona! À Dona Aparecida e ao Sr. Jorge pelo carinho e torcida sempre!

À minha orientadora, Ana Paula Gelli, por ter me apresentado à Biologia reprodutiva, uma área incrível, pela qual me encantei desde a disciplina que cursei no Mestrado! Obrigada pela confiança desde o início deste projeto e por todos os ensinamentos ao longo destes anos! Ao Paulo Henrique Peixoto, pela parceria e amizade, por todo apoio para a realização dos experimentos de cultura de tecidos e por ter permitido que o Laboratório de Fisiologia Vegetal estivesse sempre de portas abertas para mim, ao qual sou muito grata! Ao professor, Fernando Teixeira Gomes, por quem tenho grande admiração, agradeço muito pelos ensinamentos e por todo apoio e incentivo desde o início deste sonho de adentrar ao universo da Pós-graduação! Ao professor Luiz Menini, pelo qual desde a graduação tenho grande apreço e pelas valiosas contribuições e sugestões ao projeto nas bancas de pré - Qualificação e Qualificação! Ao Bruno Barbosa, meu amigo desde a faculdade e que tive o prazer de reencontrar no Doutorado, obrigada por estar sempre tão disposto a colaborar! Ao Thiago Novato pela amizade, parceria e pela disponibilidade em identificar os insetos! Ao professor André Guaraldo, pela identificação do beija-flor. Ao Elyabe Monteiro, pela colaboração e por ter disponibilizado o Laboratório de Genética para realização dos experimentos de germinação. Ao professor André Rech pelas valiosas sugestões na Qualificação e pela cordialidade!

À Andreza Magro, pela amizade, por dividir as alegrias e as incertezas, principalmente durante o Doutorado! À Ana Paula Mazza pela amizade, pelo apoio e por partilhar a mesma casa durante tanto tempo! Ao Vinicius pela amizade, mesmo às vezes distante, a amizade é a mesma! E a todos os demais colegas da pós-graduação.

À todos os companheiros de trilha ao longo desses anos: Silas Muniz, Roberto Júnio, Ana Paula Gelli, Hagda Caetano, Matheus Rezende, muito obrigada pela companhia! E em especial à minha Mãe Glória, ao Leandro e ao Humberto que estiveram comigo em tantas trilhas e foram os companheiros mais incríveis que eu poderia escolher para partilhar o trabalho de campo, mesmo na chuva ou no Sol, vocês tornaram as subidas muito mais leves, as paisagens e as flores ainda mais belas, obrigada por tudo e por tanto!!!

Aos membros e aos suplentes da banca pela gentileza e disponibilidade em contribuir e participar: Dr. André Rech, Dr<sup>a</sup>. Flávia Monteiro, Dr. Luiz Menini, Dr. Paulo Henrique Peixoto, Dr<sup>a</sup> Andréa Luizi-Ponzo, Dr. Bruno Barbosa, Dr<sup>a</sup>. Helena Maura Silingad, Dr<sup>a</sup>. Tânia Wendt.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da UFJF que contribuíram para a minha formação!

Às secretárias do PPG Biodiversidade, Priscila e Rose por toda ajuda e atenção ao longo destes anos, muito obrigada!

À diretoria e aos funcionários do Parque Estadual do Ibitipoca pela gentileza e apoio ao longo destes anos de trabalho!

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) pelo processamento das licenças de coleta.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado concedida.

*Viva a Ciência! Viva a Educação!*

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.  
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”  
Cora Coralina*



## RESUMO

Bromeliaceae é caracterizada como um grupo altamente diversificado de plantas monocotiledôneas com distribuição essencialmente neotropical. A Floresta Atlântica, considerada um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, representa um dos principais centros de diversidade da família, além de elevada riqueza de espécies e endemismo. No domínio Atlântico, muitas espécies de bromélias apresentam distribuição restrita e exibem alta especificidade de *habitats*, como é o caso das espécies foco do presente estudo. *Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme é uma bromélia rara e endêmica, com populações restritas às florestas nebulares da Serra da Mantiqueira; *Nidularium ferdinandocoburgii* Wawra ocorre principalmente no interior de florestas entre 1.000 e 1.600 m de altitude, foi registrada na Serra do Ibitipoca, Serra de Araras e Serra Negra; *Nidularium marigoii* Leme ocorre principalmente entre 1.300 a 2.700 m de altitude, é típica da Serra da Mantiqueira nos estados do sudeste do Brasil, a espécie é classificada como “Quase Ameaçada” no Livro Vermelho da Flora Brasileira e *Vriesea penduliflora* L.B.Sm., é endêmica da Serra da Mantiqueira nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, avaliada como “Em Perigo” pelo Livro Vermelho da Flora Brasileira. Este estudo foi realizado no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), o qual integra o Complexo da Serra da Mantiqueira, região considerada de extrema importância para a conservação da biodiversidade. Para caracterizar a biologia reprodutiva de *N. ibitipocensis*, *N. ferdinandocoburgii*, *N. marigoii* e *V. penduliflora*, e partindo do pressuposto de que a compreensão da biologia reprodutiva é essencial para preservar e conservar as espécies vegetais, esta tese é apresentada em dois capítulos. No primeiro capítulo são apresentados os resultados referentes à biologia reprodutiva de populações simpátricas de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii*. São fornecidos dados sobre a fenologia da floração e frutificação, biologia floral, ecologia da polinização, sistemas de reprodução, hibridização natural e sucesso reprodutivo dessas espécies. *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* apresentam flores inodoras, com corolas tubulares e duração de dois dias. O pico de floração de *N. ferdinandocoburgii* ocorreu em dezembro, o néctar apresentou em média 11,52 mg de açúcares e *Colibri serrirostris* (Vieillot, 1816) foi observado como polinizador da espécie. A frutificação natural foi de 86,3%; a espécie é autoincompatível e apresenta breve hercogamia. Apenas uma população de *N. marigoii*, composta por oito indivíduos, foi localizada na área de estudo, destes apenas um floresceu. O néctar apresentou em média 6,97 mg de açúcares, a espécie é autoincompatível e apresenta hercogamia pronunciada. Os cruzamentos heteroespecíficos resultaram na produção de frutos férteis somente quando *N. marigoii* atuou como receptora de pólen, originando plantas vigorosas. O segundo capítulo teve como

objetivo caracterizar o sistema reprodutivo, a fenologia e a ecologia da polinização de *V. penduliflora*, uma espécie ameaçada de extinção. Para tanto, foi avaliada a fertilidade e a viabilidade de seus indivíduos por meio dos seguintes parâmetros: produção de flores, frutos e formação de sementes. *Vriesea penduliflora* floresce na estação chuvosa, com pico de floração em janeiro; suas flores apresentam antese diurna e permanecem abertas por cerca de 11 horas. O néctar foi produzido continuamente ao longo da antese e apresentou, em média, 27,79 mg de açúcares. O beija-flor *C. serrirostris* foi considerado seu principal polinizador, mas *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) também foi observada polinizando suas flores. *Vriesea penduliflora* é autocompatível, entretanto, não produz frutos sob autopolinização espontânea, sendo, portanto, dependente do serviço do polinizador. A florivoria causada por formigas do gênero *Camponotus* pode estar associada ao baixo sucesso reprodutivo apresentado pela espécie em condições naturais. Esta tese também resultou em um artigo já publicado, que teve como objetivo avaliar aspectos do sucesso reprodutivo de *N. ibitipocensis* e investigar a magnitude dos danos causados pela intensa herbivoria de frutos e sementes causada por larvas de Tipulidae (Diptera) em seu *habitat* natural. A herbivoria afetou 100% das infrutescências analisadas no primeiro ano do estudo. O sistema reprodutivo da espécie foi caracterizado, bem como a fertilidade e a viabilidade de suas populações naturais. *Neoregelia ibitipocensis* é parcialmente autoincompatível, com potencial para autofecundação e cruzamentos. Foi observada a produção de frutos partenocárpicos nos experimentos de polinização controlada e sob condições naturais. A partenocarpia parece representar uma estratégia para aumentar o sucesso reprodutivo de *N. ibitipocensis*, mitigando os efeitos causados pela predação em seu *habitat* natural. Além disso, desenvolvemos um protocolo eficiente para introdução e multiplicação *in vitro* de *N. ibitipocensis*, cujos resultados fornecem recomendações para o desenvolvimento de estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ* desta espécie. Os resultados gerados nesta tese ampliam o conhecimento sobre os mecanismos reprodutivos em Bromeliaceae e contribuem para o desenvolvimento de estratégias de conservação para populações de espécies endêmicas e ameaçadas da Floresta Atlântica.

**Palavras-chave:** Complexo nidularioide. Conservação. Herbivoria. Polinização. Serra da Mantiqueira. Sistemas reprodutivos.

## ABSTRACT

Bromeliaceae is characterized as a highly diversified group of monocotyledon plants with an essentially neotropical distribution. The Atlantic Forest, considered one of the world's biodiversity hotspots, represents one of the family's main centers of diversity, in addition to high species richness and endemism. In the Atlantic domain, many species of bromeliads also have a restricted distribution and exhibit high *habitat* specificity, as is the case of the species that are the focus of this study. *Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme is a rare and endemic bromeliad, with populations restricted to the forests of Serra da Mantiqueira; *Nidularium ferdinandocoburgii* Wawra occurs mainly in the interior of forests between 1,000 and 1,600 m of altitude, it was recorded in Serra do Ibitipoca, Serra de Araras and Serra Negra; *N. marigoii* Leme occurs mainly between 1,300 to 2,700 m altitude, is typical of Serra da Mantiqueira in the southeastern states of Brazil, the species is classified as “Near Threatened” in the Red Book of Brazilian Flora and *Vriesea penduliflora* LBSm., is endemic to the Serra da Mantiqueira in the states of Minas Gerais and Rio de Janeiro, evaluated as “In Danger” by the Red Book of Brazilian Flora. This study was carried out in the Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), which integrates the Serra da Mantiqueira Complex, a region considered of extreme importance for the conservation of biodiversity. To characterize the reproductive biology of *N. ibitipocensis*, *N. ferdinandocoburgii*, *N. marigoii* and *V. penduliflora*, and assuming that the understanding of reproductive biology is essential to preserve and conserve plant species, this thesis is presented in two chapters. In the first chapter is presented with the results referring to reproductive biology of sympatric populations of *N. ferdinandocoburgii* and *N. marigoii*. Data are provided on flowering and fruiting phenology, floral biology, pollination ecology, breeding systems, natural hybridization and reproductive success of these species. *Nidularium ferdinandocoburgii* and *N. marigoii* have odorless flowers, with tubular corollas and duration of two days. The flowering peak of *N. ferdinandocoburgii* occurred in December, the nectar presented an average of 11.52 mg of sugars and *Colibri serrirostris* was observed as a pollinator of the species. The natural fruiting was 86.3%, the species is self-incompatible and presents a brief herkogamy. Only one population of *N. marigoii* composed of eight individuals was located in the study area, of which only one flowered. The nectar had an average of 6.97 mg of sugars, the species is self-incompatible and has pronounced herkogamy. The heterospecific crosses resulted in the production of fertile fruits only when *N. marigoii* acted as a pollen recipient species, originating vigorous plants. The second chapter aimed to characterize the reproductive system, phenology and pollination ecology of *V.*

*penduliflora*, an endangered species. Therefore, the fertility and viability of its individuals evaluated through the following parameters: production of flowers, fruits and seed formation. *Vriesea penduliflora* blooms in the rainy season, with flowering peak in January, its flowers present diurnal anthesis and remain open for about 11 hours. The nectar was produced continuously throughout the anthesis and presented an average of 27.79 mg of sugars. The hummingbird *C. serrirostris* was considered its main pollinator, but *Apis mellifera* was also observed pollinating its flowers. *Vriesea penduliflora* is self-compatible, however, it does not produce fruits under spontaneous self-pollination, being, therefore, dependent on the service of the pollinator. The florivory caused by ants of the *Camponotus* genus may be associated with the low reproductive success presented by the species under natural conditions. This thesis also resulted in a published article, which aimed to evaluate aspects of the reproductive success of *N. ibitipocensis* and investigate the magnitude of the damage caused by the intense herbivory of fruits and seeds caused by Tipulidae larvae (Diptera) in their natural *habitat*, the herbivory affected 100% of infructescence analyzed in the first year of the study. The reproductive system of the species was characterized, as well as the fertility and viability of its natural populations. *Neoregelia ibitipocensis* is partially self-incompatible, with potential for self-fertilization and crossbreeding. Parthenocarpic fruit production was observed in controlled pollination experiments and under natural conditions. Parthenocarpy seems to represent a strategy to increase the reproductive success of *N. ibitipocensis*, mitigating the effects caused by predation in its natural *habitat*. In addition, we developed an efficient protocol for the introduction and *in vitro* multiplication of *N. ibitipocensis*, whose results provide recommendations for the development of strategies for the *in situ* and *ex situ* conservation of this species. The results generated in this thesis expand the knowledge about reproductive mechanisms in Bromeliaceae and contribute to the development of conservation strategies for populations of endemic and threatened species in the Atlantic Forest.

**Keywords:** Conservation. Herbivory. Nidularioid complex. Pollination. Reproductive systems. Serra da Mantiqueira.

## RESUMO (DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA)

As bromélias representam um grupo de plantas que se destacam pela exuberância e relevância na Floresta Atlântica. Caracterizam-se como verdadeiras ampliadoras da biodiversidade local, são fontes de pólen, néctar, frutos, água, abrigo ou criadouro para uma variedade de animais, que podem ser parcial ou totalmente dependentes das bromélias para sua sobrevivência. A Floresta Atlântica é o bioma brasileiro com maior número e diversidade de Bromeliaceae, muitas espécies são endêmicas, ou seja, ocorrem somente neste local, apresentam distribuição restrita a ambientes específicos e estão ameaçadas de extinção. Este bioma é considerado prioritário em termos de conservação devido à constante destruição que historicamente está sujeito e se destaca como uma das florestas tropicais mais importantes do mundo. No entanto, restam apenas 12,4% de suas florestas originais. O conhecimento sobre a biologia reprodutiva é essencial para a preservação e conservação de espécies vegetais. Neste sentido, o principal objetivo deste estudo foi analisar a biologia da reprodução das seguintes bromélias: *Neoregelia ibitipocensis*, *Nidularium ferdinandocoburgii*, *N. marigoii* e *Vriesea penduliflora* no Parque Estadual do Ibitipoca, localizado no sudeste do Brasil. Esta Unidade de Conservação integra a Serra da Mantiqueira, região considerada de extrema importância para a conservação da biodiversidade mundial. No primeiro capítulo desta tese, estudamos a biologia reprodutiva de *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii*, além de investigar a compatibilidade reprodutiva entre essas espécies, a fim de determinar se elas são capazes de se reproduzir entre si e gerar novas plantas. *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* apresentam flores tubulares e inodoras com duração de dois dias. O beija-flor *Colibri serrirostris* foi observado como polinizador de *N. ferdinandocoburgii*. Ambas as espécies são autoincompatíveis, isto é, não formam sementes a partir de cruzamentos que utilizam o pólen proveniente da própria flor ou de flores da mesma planta, ou seja, elas dependem da presença de polinizadores para a sua reprodução, pois estes são capazes de promover a transferência de pólen entre plantas distintas. Os cruzamentos entre *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* resultaram na produção de sementes somente quando *N. marigoii* recebeu pólen de *N. ferdinandocoburgii*, originando plantas vigorosas. No segundo capítulo, investigamos a biologia reprodutiva e os polinizadores de *V. penduliflora*, uma espécie ameaçada de extinção. *Vriesea penduliflora* floresce na estação chuvosa, com pico de floração em janeiro, suas flores permanecem abertas por cerca de 11 horas, período em que o néctar é produzido continuamente. O beija-flor *C. serrirostris* foi considerado seu principal polinizador, mas a abelha *Apis mellifera* também foi observada polinizando suas flores. *Vriesea penduliflora* é

autocompatível, mas não se reproduz espontaneamente, sendo, portanto, dependente dos serviços dos polinizadores. Observamos a presença de formigas que consumiam as pétalas e os botões florais de *V. penduliflora*, este fato pode estar relacionado ao baixo sucesso reprodutivo apresentado pela espécie em condições naturais. Nossos estudos também resultaram na publicação de um artigo, onde investigamos aspectos do sucesso reprodutivo de *N. ibitipocensis*. Observamos a ocorrência de intensa predação de frutos e sementes por larvas de mosquitos, a predação afetou 100% das infrutescências analisadas no primeiro ano do estudo, reduzindo a fertilidade e a viabilidade da espécie em seu ambiente natural. Diante disso, desenvolvemos um protocolo de estabelecimento *in vitro* para a espécie, o qual possibilitou sua multiplicação e conservação *in vitro*. Registramos a produção de frutos partenocárpicos por *N. ibitipocensis*, ou seja, frutos desprovidos de sementes, os quais parecem representar uma forma da espécie aumentar seu sucesso reprodutivo, pois enquanto os predadores consomem os frutos partenocárpicos deixam de consumir aqueles que possuem sementes, amenizando os efeitos causados pela intensa predação. Os resultados gerados neste estudo fornecem dados de grande relevância para o desenvolvimento de iniciativas de conservação para espécies de Bromeliaceae endêmicas e ameaçadas de extinção da Floresta Atlântica. Sugerimos que os esforços de conservação sejam concentrados principalmente na preservação das florestas e conseqüentemente dos polinizadores. No Brasil, sobretudo nos últimos anos, diante do atual governo onde recordes de desmatamento são celebrados em um cenário proposital de total descaso para com a preservação do meio ambiente e da vida, se faz urgente a sensibilização e a conscientização da sociedade geral para que esta se aproprie dos seus direitos, enquanto cidadãos e exijam de seus governantes nas diferentes esferas do poder que a preservação do meio ambiente seja pauta de políticas de governos que resultem efetivamente na implementação de políticas públicas que promovam de fato, a conservação da natureza, pois, somente quando a sociedade compreender que a humanidade e a natureza estão intimamente conectadas, seremos capazes de transformar a atual realidade. Haja vista que, a Constituição Federal de 1988, em seu artigo 225 assegura que: “Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.”, sendo este um direito fundamental garantido aos cidadãos, basta, portanto, que dele nos apropriemos e o exerçamos em sua plenitude.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** A – Inflorescência de *Nidularium ferdinandocoburgii*. B – Detalhe da flor e ocorrência de breve hercogamia em *N. ferdinandocoburgii*. C – *Colibri serrirostris*, polinizador de *N. ferdinandocoburgii*. D – Inflorescência de *Nidularium marigoii*. E – Detalhe da flor de *N. marigoii* e ocorrência de hercogamia pronunciada. F – Única população de *N. marigoii* localizada na área de estudo.....46

**Figura 2.** A – Plântulas provenientes da germinação das sementes formadas a partir dos cruzamentos heteroespecíficos entre *Nidularium ferdinandocoburgii* e *Nidularium marigoii*. B – Plântulas sob cultivo após 60 dias de germinação. C – Plantas sob cultivo após 120 dias de germinação. D - Plantas após 5 meses de cultivo.....49

### CAPÍTULO 2

**Figura 1.** (a) Inflorescência de *Vriesea penduliflora*. (b) *Colibri serrirostris* polinizando as flores de *V. penduliflora*. (c, d) *C. serrirostris* empoleirado em arbustos próximo a plantas de *V. penduliflora*. (e) *Apis mellifera* polinizando flores de *V. penduliflora*. (f, g) *Camponotus rufipes* consumindo corolas de *V. penduliflora*.....82

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Características reprodutivas e parâmetros de fertilidade analisados em *Nidularium ferdinandocoburgii*: Número (N), média (X), erro padrão ( $\pm$  SE).....45

**Tabela 2.** Frutificação e número médio de sementes viáveis por fruto (média  $\pm$  1 DP) após tratamentos de polinização em *Nidularium ferdinandocoburgii* e *Nidularium marigoii*. O número de plantas indica quantas inflorescências diferentes estavam disponíveis para cada tratamento. O número de frutos formados e o número de flores testadas são apresentados entre parênteses (frutos / flores).....49

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Características reprodutivas e parâmetros de fertilidade analisados em *Vriesea penduliflora*: Número (N), média (X), erro padrão ( $\pm$  SE).....81

**Tabela 2.** Frutificação e número médio de sementes viáveis por fruto (média  $\pm$  1 DP) após tratamentos de polinização em *Vriesea penduliflora*. O número de plantas indica quantas inflorescências diferentes estavam disponíveis para cada tratamento. Os índices de autofertilidade e autocompatibilidade são baseados na frutificação ou média de sementes por fruto em autopolinização espontânea, autopolinização e polinização cruzada.....84



## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
3.	<b>CAPÍTULO 1 - Biologia reprodutiva e hibridização entre duas espécies simpátricas de <i>Nidularium</i> Lem. (Bromeliaceae Juss.) da Floresta Atlântica</b> .....	33
	INTRODUÇÃO.....	36
	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
	RESULTADOS.....	43
	DISCUSSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	59
4.	<b>CAPÍTULO 2 - Biologia reprodutiva de <i>Vriesea penduliflora</i> L. B. Sm. (Bromeliaceae): uma bromélia da Floresta Atlântica ameaçada de extinção</b> .....	72
	INTRODUÇÃO.....	75
	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
	RESULTADOS.....	79
	DISCUSSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	91
5.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	101
6.	<b>APÊNDICE – Artigo: Sucesso reprodutivo, herbivoria e conservação <i>ex situ</i> de <i>Neoregelia ibitipocensis</i> (Bromeliaceae): uma espécie endêmica e ameaçada de extinção da Floresta Atlântica</b> .....	103

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é um dos mais importantes e vulneráveis *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000). O bioma é considerado prioritário em termos de conservação devido à grande fragmentação a que está sujeito, a qual ameaça sua megadiversidade, destaca-se que esta é uma das florestas tropicais mais importantes do mundo (MARTINELLI *et al.*, 2008). No entanto, as áreas remanescentes correspondem a apenas 12,4% de sua cobertura vegetal original (SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2019). O grau de ameaça à conservação desse bioma é alarmante, sobretudo, pelos elevados níveis de diversidade e endemismo em seus domínios (MYERS, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2011).

A família Bromeliaceae Juss. apresenta elevada riqueza, diversidade e endemismo nos domínios da Floresta Atlântica onde possui o mais alto número de espécies ameaçadas, fato que a coloca como prioridade em programas de conservação da biodiversidade (MARTINELLI *et al.*, 2008; PILATTI *et al.*, 2011). A família é predominantemente neotropical, seus representantes apresentam hábitos variados e exibem muitas formas de vida, desde ervas terrícolas, rupícolas, epífitas ou reófitas. Suas espécies são adaptadas aos mais variados ambientes e ocorrem desde o nível do mar até os elevados altiplanos da Cordilheira dos Andes (BENZING, 2000; FORZZA *et al.*, 2013). Essas características conferem à família um elevado potencial para radiação adaptativa (LUTHER, 2012). Ao longo de sua evolução, Bromeliaceae desenvolveu uma notável capacidade adaptativa, no entanto, grande parte das espécies apresentam distribuição restrita, com populações reduzidas e uma alta especificidade de *habitats* (FORZZA *et al.*, 2013).

As bromélias correm sério risco de desaparecer devido à superexploração e a contínua destruição da Floresta Atlântica, somadas ao crescente interesse comercial por espécies com potencial ornamental, portanto, é necessário o desenvolvimento de políticas que promovam a conservação dessas espécies (ZANELLA *et al.*, 2012). A principal ameaça para a maior parte das espécies nativas em regiões tropicais é a fragmentação do *habitat* devido à exploração madeireira e ao desenvolvimento urbano (PAGGI *et al.*, 2012). A coleta predatória e a perda de *habitats* devido à ação antrópica, também contribuem para o aumento do número de plantas vulneráveis, ameaçadas de extinção ou mesmo em extinção (BERED *et al.*, 2008).

No Brasil, a família Bromeliaceae apresenta o maior número de espécies consideradas “Criticamente em perigo” (CR), sendo esta a categoria de maior risco de extinção, além disso, Bromeliaceae é a segunda família com maior número absoluto de espécies ameaçadas de extinção no país (MARTINELLI & MORAES, 2013). O Brasil é o país com maior riqueza

específica para a família Bromeliaceae, totalizando 1379 espécies e 56 gêneros, sendo a Floresta Atlântica e o Cerrado, principalmente nos campos rupestres, os domínios fitogeográficos brasileiros com maior número de táxons (FLORA DO BRASIL, 2020).

Por serem amplamente distribuídas e frequentes em *habitats* neotropicais, as bromélias atuam como um importante elemento ecológico em muitas comunidades, contribuindo para a complexidade estrutural do meio ambiente, que se reflete diretamente na riqueza e diversidade da fauna e flora associadas (BENZING, 2000). As bromélias atuam como espécies-chave para a manutenção da biodiversidade e da complexidade estrutural de diversos ambientes, especialmente as chamadas “bromélias-tanque” (BENZING, 2000). Os tanques são preenchidos com água da chuva e são microhabitats efêmeros cuja duração é determinada por alterações na morfologia das plantas e em seu tempo de vida (WAMBOLD, 2011). Além disso, as bromélias caracterizam-se como verdadeiras ampliadoras da biodiversidade local e atraem uma variedade de polinizadores no período de floração (ROCHA *et al.*, 2004).

Bromeliaceae destaca-se pela ocorrência de diversas síndromes de polinização (MARTINELLI, 1994; SAZIMA *et al.*, 1995; WENDT *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2018; LENZI & PAGGI, 2020), mas caracteriza-se como uma das poucas famílias em que a polinização por vertebrados predomina sobre a entomofilia (SAZIMA *et al.*, 1989; MARTINELLI, 1994; SAZIMA *et al.*, 2000). A ornitofilia é o principal sistema de polinização em Bromeliaceae e os beija-flores são os seus principais polinizadores (BENZING, 2000; NARA & WEBBER, 2002; CANELA & SAZIMA, 2003; VOSGUERITCHIAN & BUZATO, 2006; ROCCA & SAZIMA, 2013; SCROK & VARASSIN, 2011; GIVNISH *et al.*, 2014, MAGALHÃES *et al.*, 2018). As bromélias representam cerca de 30 a 45% dos recursos alimentares, principalmente néctar, usados por beija-flores em áreas da Mata Atlântica (SAZIMA, BUZATO, & SAZIMA, 1996; BUZATO, SAZIMA & SAZIMA, 2000; VIZENTIN-BUGONI, MARUYAMA, & SAZIMA, 2014).

Os representantes da família Trochilidae são considerados os polinizadores mais importantes para a família Bromeliaceae, sugere-se que a diversificação desses dois grupos teria se processado paralelamente (SICK *et al.*, 1984). Segundo Stiles (1981), a atração primária das flores ornitófilas seria a cor, pois os beija-flores têm tipicamente, maior sensibilidade e discriminação de cores que apresentam comprimentos de ondas mais longos, sobretudo no espectro do vermelho. As bromélias ornitófilas geralmente se caracterizam por apresentar brácteas florais com tonalidade vermelha, flores amarelas, alta produção de néctar com concentração de açúcares mediana e antese diurna (SAZIMA *et al.*, 1996; SAZIMA *et al.*, 2000). Como já destacado anteriormente, a ornitofilia é predominante em Bromeliaceae,

mas a melitofilia (WENDT *et al.*, 2001; 2002; ARAÚJO *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2020; LENZI & PAGGI, 2020), a psicofilia (VARASSIN & SAZIMA, 2000; LENZI *et al.*, 2006) e a quiropterofilia (SAZIMA *et al.*, 1995; MARQUES *et al.*, 2015) também ocorrem na família. Além disso, a ocorrência de sistemas de polinização mista está bem documentada em Bromeliaceae (CANELA & SAZIMA, 2005; KAMKE *et al.*, 2011; SCHMID *et al.*, 2011; ZANELLA *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2018; GODOY *et al.*, 2018; LENZI & PAGGI, 2020).

Como as plantas são sésseis, a transferência do pólen depende de vetores externos imprevisíveis tais como insetos, pássaros, mamíferos ou vento (MATALLANA *et al.*, 2016). As bromélias contribuem significativamente para a manutenção da diversidade biológica, sendo o equilíbrio interativo entre as espécies um dos componentes mais marcantes das florestas tropicais (BENZING, 2000). A interação entre plantas e polinizadores é considerada uma relação mutualística, ou seja, uma relação de exploração recíproca que resulta em benefícios para ambas as espécies (RECH & BRITO, 2012). As interações entre as flores e seus polinizadores são tidas como processos coevolutivos onde as características florais influenciam as estratégias de forrageamento dos animais e estes podem direcionar as estratégias reprodutivas das plantas (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1979).

A família Bromeliaceae exibe grande variedade de sistemas reprodutivos, características florais e sistemas de polinização (BENZING, 2000; GIVNISH *et al.*, 2011), tanto autogamia quanto autoincompatibilidade foram registradas para a família (MATALLANA *et al.*, 2010; WOLOWSKI *et al.*, 2013). A autocompatibilidade tem sido relatada amplamente entre os representantes de Bromeliaceae (SIQUEIRA-FILHO & MACHADO, 2001; WENDT *et al.*, 2002; LENZI *et al.*, 2006; PAGGI *et al.*, 2007; ROGALSKI *et al.*, 2009; ROCCA & SAZIMA, 2013; RÍOS & CASCANTE-MARÍN, 2017; CAVALCANTE *et al.*, 2019), assim como a ocorrência de autoincompatibilidade (CANELA & SAZIMA, 2005; VOSGUERITCHIAN & BUZATO, 2006; RAMÍREZ-MORILLO *et al.*, 2009; SCHMID *et al.*, 2010; KAMKE *et al.*, 2011; BÜTTOW, 2012; ZANELLA *et al.*, 2012; PAGGI *et al.*, 2012; WOLOWSKI *et al.*, 2013; GODOY *et al.*, 2018; GOETZE *et al.*, 2018; BÜTTOW *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2020; LENZI & PAGGI, 2020). Os sistemas de reprodução mista também foram registrados para várias espécies de Bromeliaceae (LASSO & ACKERMAN, 2004; LENZI *et al.*, 2006; HMELJEVSKI *et al.*, 2007; ROGALSKI *et al.*, 2009; PAGGI *et al.*, 2015; RÍOS & CASCANTE-MARÍN, 2017; LENZI & PAGGI, 2020; RAMÍREZ-ROSAS *et al.*, 2020).

Segundo Matallana *et al.* (2010), a autopolinização e a autocompatibilidade em Bromeliaceae evoluíram como mecanismos para evitar o fluxo de pólen interespecífico entre espécies congêneres em ecossistemas altamente diversos. Da mesma forma, Petit *et al.* (1997) acreditam que a autocompatibilidade aumentada possa facilitar a coexistência entre as espécies e, possivelmente, reduzir o fluxo gênico heteroespecífico. A autocompatibilidade pode também ser resultado de eventos de dispersão e fragmentação, o que comumente ocorre em plantas raras que exigem *habitats* específicos (WENDT *et al.*, 2002). A autofecundação pode ainda ser entendida como um mecanismo que propicia a garantia reprodutiva e que atua reduzindo o fluxo de pólen interespecífico entre plantas taxonomicamente não relacionadas (RÍOS & CASCANTE-MARÍN, 2017).

As espécies autoincompatíveis são dependentes de polinizadores (ENDRESS, 1994). A autoincompatibilidade tem sido descrita como um importante mecanismo de reprodução para prevenir a depressão por endogamia e promover a heterozigosidade ou diversidade genética, permitindo a sobrevivência ou adaptação de uma espécie ao longo do tempo (CHARLESWORTH, 2006). Embora as espécies autoincompatíveis em Bromeliaceae tenham uma rejeição mais forte ao autopólen antes da fertilização, a maioria dessas espécies também tem uma maior capacidade de hibridização em comparação com bromélias autocompatíveis (MATALLANA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017). A polinização cruzada é importante para a manutenção das espécies, pois promove o fluxo gênico entre os indivíduos, aumentando a variabilidade genética (VOSGUERITCHIAN & BUZATO, 2006).

Em Bromeliaceae ocorre comumente a combinação entre dois modos de reprodução: a produção de sementes que envolve a fusão de gametas e a propagação clonal (BENZING, 2000). A curto e longo prazo, a combinação de sistemas de reprodução sexuada e assexuada é considerada vantajosa, principalmente em relação ao estabelecimento e sobrevivência em ambientes hostis (KARASAWA, 2009; ZANELLA *et al.*, 2011). Segundo Rogalsky *et al.* (2009) a propagação clonal mantém a diversidade genética existente, uma vez que reduz os riscos de mortalidade dos genets, diluindo o risco entre os rametos, o que pode minimizar os efeitos da autocompatibilidade e da deriva genética ao longo das gerações.

As bromélias têm sido extensivamente estudadas em relação a muitos aspectos de sua biologia reprodutiva, tais como: sistemas de reprodução, biologia floral, fenologia da floração, ecologia da polinização e sucesso reprodutivo (WENDT *et al.*, 2002; MACHADO & SEMIR, 2006; MATALLANA *et al.*, 2010; PAGGI *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2018; BÜTTOW *et al.*, 2020; LENZI & PAGGI, 2020; VELÁSQUEZ-NORIEGA *et al.*, 2020). No entanto, ainda há uma grande lacuna de conhecimento a ser

preenchida, sobretudo, considerando-se o grande número e a diversidade de representantes da família, a qual desenvolveu uma grande diversidade de histórias de vida, estruturas vegetativas e florais, bem como estratégias reprodutivas (POOL-CHALÉ *et al.*, 2018).

Os estudos sobre a biologia reprodutiva são importantes como suporte para o desenvolvimento de planos de manejo e conservação de espécies ameaçadas (CESÁRIO & GAGLIANONE, 2008). O entendimento da fenologia tem sido cada vez mais significativo na última década, devido ao seu papel relevante no manejo e conservação de plantas nativas (ELMENDORF *et al.*, 2016). Da mesma forma, a micropropagação tem sido considerada uma estratégia eficiente para se propagar material genético de espécies raras e ameaçadas com a finalidade de assegurar, em longo prazo, a sobrevivência desse material em seu ambiente natural (MERCIER & NIEVOLA, 2003). A instalação *in vitro* de bancos de germoplasma de Bromeliaceae é especialmente importante, uma vez que várias espécies estão ameaçadas de extinção (IUCN, 2020; MARTINELLI & MORAES, 2013) devido a práticas extrativistas e à destruição ou degradação de *habitats* naturais, o que é ainda mais agravante para espécies endêmicas (MARTINELLI *et al.*, 2008), como é o caso das espécies foco do presente estudo, a saber:

*Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme é uma bromélia rara e endêmica da Floresta Atlântica, suas populações têm distribuição restrita às florestas nebulares da Serra da Mantiqueira no Sudeste do Brasil (LEME, 2000). No Parque Estadual do Ibitipoca, a espécie ocorre no interior das matas nebulares em altitudes superiores a 1.500 m (MONTEIRO & FORZZA, 2008). Freitas *et al.* (2020) sugeriram que a espécie deveria ser classificada como Vulnerável, seguindo os critérios da IUCN, apoiando sua inclusão na Lista Vermelha da Flora Brasileira. O gênero *Neoregelia* LBSm. (Bromelioideae) inclui 122 espécies e destaca-se por apresentar a maior representatividade dentro do chamado “Complexo Nidularioide” formado pelos gêneros: *Canistrum* E. Morren, *Canistropsis* (Mez) Leme, *Edmundoa* Leme, *Nidularium* Lem. e *Wittrockia* Lindm., os quais se caracterizam por apresentar inflorescências congestas nidulares, que normalmente se desenvolvem dentro das rosetas foliares que acumulam água (LEME, 1997; SANTOS-SILVA *et al.*, 2017).

*Nidularium ferdinandocoburgii* Wawra ocorre principalmente no interior de florestas, entre 1.000 e 1.600 m de altitude (LEME, 2000). *Nidularium marigoii* Leme, ocorre em áreas de Floresta Atlântica de altitude, matas nebulares, na transição com Campos de Altitude e Campos Rupestres (CNC FLORA, 2012), principalmente entre 1.300 a 2.700 m de altitude (LEME, 2000). Essa espécie é classificada como “Quase Ameaçada” no Livro Vermelho da Flora Brasileira (FORZZA *et al.*, 2013). As espécies compartilham muitas afinidades

morfológicas, mas podem ser diferenciadas pela presença de brácteas estéreis na inflorescência de *N. ferdinandocoburgii*, além disso, os estames são alvos e epipétalos e suas flores têm pétalas alvas com ápice roxo. Enquanto em *N. marigoii*, as brácteas estéreis estão ausentes na inflorescência, suas pétalas são alvas com ápice rosa, a espécie apresenta três estames completamente adnados às pétalas e três adnados apenas à base das pétalas (MONTEIRO & FORZZA, 2008). O gênero *Nidularium* apresenta grande plasticidade fenotípica, o que resulta em uma delicada delimitação específica com caracteres diagnósticos muitas vezes frágeis (MONTEIRO & MOREIRA, 2019). *Nidularium* Lem. (Bromelioideae) inclui 47 espécies (Gouda *et al.* cont. atualizado), é um gênero endêmico do Brasil e praticamente exclusivo da Floresta Atlântica, pois apenas algumas espécies ocorrem no Cerrado e em matas de galeria presentes nos Campos Rupestres (MONTEIRO & MOREIRA, 2019).

*Vriesea penduliflora* L.B.Sm., é endêmica do Brasil com distribuição restrita à Serra da Mantiqueira, a espécie foi avaliada como “Em Perigo” pelo Livro Vermelho da Flora Brasileira (CNC FLORA, 2012). A espécie está sujeita a um declínio contínuo na qualidade do *habitat*, principalmente devido à ocorrência de incêndios nas regiões mais altas dos Parques do Ibitipoca e do Itatiaia (MARTINELLI & MORAES, 2013), o que pode agravar ainda mais a situação da espécie em seu já limitado *habitat* natural. A fragmentação e a destruição do *habitat* estão entre as principais ameaças à diversidade biológica (KUUSSAARI *et al.*, 2009). O gênero *Vriesea* Lindl. (Tillandsioideae) apresenta cerca de 230 espécies (GOUDA *et al.* cont. atualizado) e a Mata Atlântica brasileira representa o seu centro de diversidade, neste bioma foi registrada a maior riqueza específica para o gênero (WANDERLEY & MARTINS, 2007; FORZZA *et al.*, 2015). Considerando o número absoluto de espécies de plantas ameaçadas de extinção, *Vriesea* é o segundo gênero mais ameaçado no Brasil devido à contínua perda e degradação do *habitat* e à distribuição restrita, característica de muitas espécies pertencentes ao gênero (MARTINELLI & MORAES, 2013).

O conhecimento de aspectos do sucesso reprodutivo é fundamental para a compreensão da evolução e manutenção das espécies, assim como para a elaboração de estratégias de conservação bem-sucedidas (BÜTTOW *et al.*, 2020). Considerando que muitas espécies de Bromeliaceae encontram-se ameaçadas de extinção, como as espécies foco deste trabalho, tais estudos tornam-se ainda mais relevantes. Nesse sentido, este trabalho investigou a biologia reprodutiva das seguintes espécies: *Neoregelia ibitipocensis*, *Nidularium ferdinandocoburgii*, *N. marigoii* e *Vriesea penduliflora* e avaliou o sucesso reprodutivo de

seus indivíduos, visando determinar a fertilidade e a viabilidade de suas populações naturais no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB).

Esta Unidade de Conservação se encontra localizada no sudeste de Minas Gerais, sendo considerada uma das áreas prioritárias para a conservação, classificada na categoria de importância biológica especial, sendo este o nível mais alto adotado (DRUMMOND *et al.*, 2005). O PEIB está inserido no Domínio Fitogeográfico da Floresta Atlântica e integra o conjunto de cadeias montanhosas do Complexo da Mantiqueira, região considerada de extrema importância para a conservação da biodiversidade. Nossos resultados visam ampliar o conhecimento dos mecanismos reprodutivos para a família Bromeliaceae e fornecer recomendações para o desenvolvimento de estratégias de conservação para populações de espécies endêmicas e ameaçadas da Floresta Atlântica.

## 2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a biologia reprodutiva de *Neoregelia ibitipocensis*, *Nidularium ferdinandocoburgii*, *N. marigoii* e *Vriesea penduliflora*, espécies ocorrentes no Parque Estadual do Ibitipoca e avaliar o sucesso reprodutivo de seus indivíduos, visando determinar a fertilidade e a viabilidade de suas populações naturais, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias para a conservação e manejo de populações de espécies de Bromeliaceae endêmicas e ameaçadas da Floresta Atlântica.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a biologia reprodutiva de populações simpátricas de *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* assim como a compatibilidade reprodutiva entre estas espécies.
- Investigar o sistema reprodutivo, a fenologia e a ecologia da polinização de *Vriesea penduliflora*.
- Avaliar aspectos do sucesso reprodutivo de *Neoregelia ibitipocensis* e a magnitude dos danos causados pela herbivoria de frutos e sementes a que suas populações naturais se encontram submetidas no PEIB.



- Desenvolver um protocolo eficiente para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *N. ibitipocensis*, fornecendo recomendações para o desenvolvimento de estratégias para a conservação *in situ* e *ex situ* desta espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BERED, F.; KALTCHUK-SANTOS, E.; PALMA-SILVA, C. E.; PAGGI, G. M. Bromélias- A beleza exótica do Novo Mundo. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 235-251.

BÜTTOW, M. V.; GOETZE, M.; PINHEIRO, F. G.; PAGGI, G. M.; ZANELLA, C. M.; BERED, F. Reproductive success of *Aechmea winkleri*, a clonal and self-incompatible bromeliad from the Atlantic rainforest. **Flora**, v. 262, 151521, 2020.

BÜTTOW, M. V. **Estudo do sucesso reprodutivo, dos padrões de cruzamento e do fluxo de pólen em *Aechmea winkleri*, uma espécie endêmica do Sul do Brasil**. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites 1. **Biotropica**, v. 32, n.4b, p. 824-841, 2000.

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

CANELA, M. B. F.; SAZIMA, M. The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in southeastern Brazil: ornithophilous versus melittophilous features. **Plant biology**, v. 7, n. 4, p. 411-416, 2005.

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

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

CHARLESWORTH, D. Evolution of plant breeding systems. **Current Biology**, v. 16, n. 17, p. R726-R735, 2006.

CNCFLORA. *Nidularium marigoii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Nidularium marigoii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Nidularium%20marigoii)>. Acesso em: 9 fevereiro 2021.

CNCFLORA. *Vriesea penduliflora* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea penduliflora](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea%20penduliflora)>. Acesso em: 18 março 2021.

DRUMMOND, G. M.; MARTINS, C. S.; MACHADO, A. B. M.; SEBAIO, F. A.; ANTONINI, Y. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005.

ELMENDORF, S. C.; JONES, K. D.; COOK, B. I.; DIEZ, J. M.; ENQUIST, C. A.; HUFFT, R. A.; SCHWARTZ, M. D. The plant phenology monitoring design for the National Ecological Observatory Network. **Ecosphere**, v. 7, n. 4, p. e01303, 2016.

ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University Press. 1994

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **Principles of Pollination Ecology**. Oxford: Pergamon Press. 1979.

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

FORZZA, R. C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R. F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D. P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R. B.; VERSIEUX, L. **Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2015 Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6414>>.

FORZZA, R.C.; COSTA, A.F.; MACIEL, J.R.; KESSOUS, I.M.; MONTEIRO, R.F.; FARIA, A.P.G.; TARDIVO, R.C.; BÜNEKER, H.M.; SARAIVA, D.P.; MOREIRA, B.A.; JACQUES, S.S.A.; ALMEIDA, M.M.; SANTOS-SILVA, F.; LOUZADA, R.B.; MOURA, R.L.; COUTO, D.R.; NEVES, B.; OLIVEIRA, F.M.C.; ARAÚJO, C.C.; GONÇALVES-OLIVEIRA, R.C.; VERSIEUX, L.M.; ROMANINI, R.P.; MACHADO, T.M.; SILVA, R.S.A.D.; PAIXÃO SOUZA, B.; GOMES-DA-SILVA, J.; URIBBE, F.P.; GUARÇONI, E.A.E.; SOUSA, L.O.F.; PONTES, R.A.S.; NOGUEIRA, M.G.C.; SOUSA, G.M.; KOCH, A.K.; PICANÇO, W.L.; CARDOSO, P.H.; MARTINS, S.E.; BARBOSA-SILVA, R.G.; WANDERLEY, M.G.L. 2020. **Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 06 abr. 2021.

FREITAS, L.; RIBEIRO, P.C.; CANCIO, A.S.; MACHADO, M.A.; SAMPAIO, M.C.; FORZZA, R.C.; VICCINI, L.F. Population demography, genetic variation and reproductive

biology of two rare and endangered *Neoregelia* species (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 787-802, 2020.

FUMERO-CABÁN, J.J.; MELÉNDEZ-ACKERMAN, E. J. Relative pollination effectiveness of floral visitors of *Pitcairnia angustifolia* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 94, n.3, p. 419-424, 2007.

GIVNISH T.F.; 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.; WINTER, K. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 55-78, 2014.

GIVNISH, T.F.; BARFUSS, M.H.J.; VAN, E.E. B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S.; CRAYN, D.M.; SMITH J.A.; WINTER, K. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n.5, p. 872-895, 2011.

GODOY, F.M.R.; LENZI, M.; FERREIRA, B.H.S.; SILVA, L.V.; ZANELLA, C.M.; PAGGI, G.M. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 187, n.4, p. 672-688, 2018.

GOETZE, M.; CAPRA, F.; BÜTTOW, M. V.; ZANELLA, C. M.; BERED, F. High genetic diversity and demographic stability in *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), a species of sandy coastal plains (restinga *habitat*) in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, n.3, p. 374-388, 2018.

GOUDA, E.J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C.S. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. (University Botanic Gardens, Utrecht). 2012. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> Acesso em: Janeiro 2021.

HMELJEVSKI, K.V.; REIS, A.; REIS, M.S.; ROGALSKI, J.M.; DALTRINI-NETO, C.; LENZI, M. Resultados Preliminares da Biologia Reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae): uma espécie rara e endêmica de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 267-269, 2007.

IUCN. **The IUCN red list of threatened species. 2020**. Version 2020-3. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org> Acesso em: Dezembro 2020.

KAMKE, R.; SCHMID, S.; ZILLIKENS, A.; LOPES, B. C.; STEINER, J. The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 8, p. 749-756, 2011.

KARASAWA, M. M. G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas: Uma Perspectiva Evolutiva e Bases Genéticas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2009.

KUUSSAARI, M.; BOMMARCO, R.; HEIKKINEN, R. K.; HELM, A.; KRAUSS, J.; LINDBORG, R.; ÖCKINGER, E.; PÄRTEL M.; PINO, J.; RODÀ, F.; STEFANESCU, C.; TEDER, T.; ZOBEL, M.; STEFFAN-DEWENTER, I. Extinction debt: a challenge for biodiversity conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 24, n. 10, p. 564-571, 2009.

LASSO, E.; ACKERMAN, J. D. The flexible breeding system of *Werauhia sintenisii*, a cloud forest bromeliad from Puerto Rico. **Biotropica**, v. 36, n.3, p. 414-417, 2004.

- LEME, E.M.C. **Bromélias da Mata Atlântica - *Canistrum***. 1997. Rio de Janeiro: Salamandra.
- LEME, E.M.C. ***Nidularium*: Bromélias da Mata Atlântica**. 2000. Rio de Janeiro: Sextante.
- LENZI, M.; MATOS, J.Z.; ORTH, A.I. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n.2, p. 487-500, 2006.
- LENZI, M.; PAGGI, G. M. Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophytic species of outcrops of iron stones in central-western Brazil. **Plant Species Biology**, v. 35, n.1, p. 97-108, 2020.
- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**. 13th edn. 2012. Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society International.
- MACHADO, C. G.; SEMIR, J. Flowering phenology and floral biology of some ornitophilous Bromeliaceae of an Atlantic forest area in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n.1, p. 163-174. 2006.
- MAGALHÃES, A. F. P.; MARUYAMA, P. K.; TAVARES, L. A. F.; MARTINS, R. L. The relative importance of hummingbirds as pollinators in two bromeliads with contrasting floral specializations and breeding systems. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 188, n.3, p. 316-326, 2018.
- MARQUES, J. S.; TAGLIATI, M. C.; FARIA, A. P. G. Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* Regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n.2, p. 835-842, 2015.
- MARTINELLI G. **Reproductive biology of Bromeliaceae in Atlantic Rainforest of southeastern Brazil**. Unpublished PhD Thesis, University of St. Andrews, 1994.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.
- 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**, v. 59, n.1, p. 209-258, 2008.
- MATALLANA, G.; GODINHO, M.A.; GUILHERME, F.A.G.; BELISARIO, M.; COSER, T.S.; WENDT, T. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, n.1, p. 57-65, 2010.
- MATALLANA, G.; OLIVEIRA, P. E.; SILVA, P. R. R.; WENDT, T. Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 3, p. 521-531, 2016.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, v. 1, n.1, p. 57-62, 2003.
- MONTEIRO, R.F.; MOREIRA, B.A. ***Nidularium* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2019. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6249>>. Acesso em: Dezembro 2020.

MONTEIRO, R. F.; FORZZA, R.C. A família Bromeliaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 7-33, 2008.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; YERS, N.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n.6772, p. 853-858, 2000.

NARA, A.K.; WEBBER, A.C. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixio na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 4, p. 571-588, 2002.

PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; LEXER, C.; BERED, F. Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. **Flora**, v. 211, p. 1-10, 2015.

PAGGI, G. M.; PALMA-SILVA, C.; SILVEIRA, L. C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; BERED, F. Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud.(Bromeliaceae) in southern Brazil. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 4, p. 683-689, 2007.

PAGGI, G. M.; SILVEIRA, L. C. T.; ZANELLA, C. M.; BRUXEL, M.; BERED, F.; KALTCHUK-SANTOS, E.; PALMA-SILVA, C. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. **Plant Species Biology**, v. 28, n.3, p. 169-176, 2012.

PETIT, C. LESBROS P., GE X., THOMPSON J.D. Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). **Heredity**, v. 79, n.1, p. 31-40, 1997.

PILATTI, F.K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E.E.; VIANA, A.M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 47, n. 1, p. 82-98, 2011.

POOL-CHALÉ, M.; RAMÍREZ-MORILLO, I.; CARNEVALI FERNÁNDEZ-CONCHA, G.; HORNUNG-LEONI, C. T. Reproductive biology of *Aechmea bracteata* (Sw.) Griseb.(Bromelioideae: Bromeliaceae). **Plant Biology**, v. 20, n. 1, p.113-120, 2018.

RAMÍREZ MORILLO, I. M.; CHI MAY, F.; CARNEVALI, G.; MAY PAT, F. It takes two to tango: self incompatibility in the bromeliad *Tillandsia streptophylla* (Bromeliaceae) in Mexico. **Revista de Biología Tropical**, v. 57, n.3, p. 761-770, 2009.

RAMÍREZ-ROSAS, K.; AGUIRRE-JAIMES, A.; RAMÍREZ-MORILLO, I.M.; GARCÍA-FRANCO, J.G. Floral biology and potential hybridization of three sympatric epiphytic bromeliads in Veracruz, Mexico. **Plant Species Biology**, v. 35, n. 3, p. 197-209, 2020.

RECH, A.R.; BRITO, V.L.G. Mutualismos extremos de polinização: história natural e tendências evolutivas. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 02, p. 297-310, 2012.

RIBEIRO, M.C.; MARTENSEN, A.C.; METZGER, J.P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M.J. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: ZACHOS, F.E.; HABEL, J.C. **Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas**. Heidelberg: Springer, 2011. p. 405-434.

- RÍOS, L.D.; CASCANTE-MARÍN, A. High selfing capability and low pollinator visitation in the hummingbird-pollinated epiphyte *Pitcairnia heterophylla* (Bromeliaceae) at a Costa Rican mountain forest. **Revista de Biología Tropical**, v. 65, n. 2, p. 735-743, 2017.
- ROCCA, M. A.; SAZIMA, M. Quantity versus quality: identifying the most effective pollinators of the hummingbird-pollinated *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 1, p. 97-105, 2013.
- ROCHA, C. F. D.; COGLIATTI-CARVALHO, L.; NUNES-FREITAS, A. F.; ROCHA PESSÔA, T. C.; DIAS, A. S.; ARIANI, C.V.; MORGADO, L.N. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. **Vidalia**, v. 2, n. 1, p. 52-68, 2004.
- ROGALSKI, J. M.; REIS, A.; REIS, M. S. D.; HMELJEVSKI, K.V. Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 4, p. 691-702, 2009.
- SANTOS-SILVA, F.; VENDA, A.K.L.; HALLBRITTER, H.M.; LEME, E.M.; MANTOVANI, A.; FORZZA, R.C. Nested in chaos: Insights on the relations of the 'Nidularioid Complex' and the evolutionary history of *Neoregelia* (Bromelioideae-Bromeliaceae). **Brittonia**, v. 69, n. 2, p. 133-147, 2017.
- SAZIMA, I.; VOGEL, S.; SAZIMA, M. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. **Plant Systematics and Evolution**, v. 168, n. 3, p. 167-179, 1989.
- SAZIMA, I.; BUZATO, S.; SAZIMA, M. The saw-billed hermit *Ramphodon naevius* and its flowers in southeastern Brazil. **Journal für Ornithologie**, v. 136, n. 2, p. 195-206, 1995.
- SAZIMA, I.; BUZATO, S.; SAZIMA, M. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. **Botanica Acta**, v. 109, n. 2, p. 149-160, 1996.
- SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Polinização por beija-flores em *Nidularium* e gêneros relacionados. In: Leme E.M.C. **Nidularium: Bromélias da Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Sextante Artes, p. 190-195, 2000.
- SCHMID, S.; SCHMID, V.S.; KAMKE, R.; STEINER, J.; ZILLIKENS, A. Association of three species of *Strymon* Hübner (Lycaenidae: Theclinae: Eumaeini) with bromeliads in southern Brazil. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 42, n. 2003, p. 50-55, 2010.
- SCHMID, S.; KAMKE, R.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J. Flower visitors of *Aechmea nudicaulis* (Bromeliaceae): species richness, visitation frequency, and interactions in different habitats of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 46, n. 2, p. 101-120, 2011.
- SCROK, G. J.; VARASSIN, I. G. Reproductive biology and pollination of *Aechmea distichantha* Lem.(Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n.3, p. 571-576, 2011.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira: uma introdução**. Brasília: Editora UnB Brasília, 1984.
- SIQUEIRA-FILHO, J. A. D.; MACHADO, I. C. S. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 3, p. 427-443, 2001.

- SOS MATA ATLÂNTICA & INPE (2019). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**. Relatório Técnico. Período 2017-2018. <https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2019/10/Atlas-mata-atlanticaDIGITAL.pdf>
- SOUZA, E. H.; VERSIEUX, L. M.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; CARVALHO COSTA, M. A. P.; MARTINELLI, A. P. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. **Scientia Horticulturae**, v. 223, p. 53-61, 2017.
- STILES, F. G. Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 323-351, 1981.
- VARASSIN, I. G.; SAZIMA, M. Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 11, n. 12, p. 57-70, 2000.
- VELÁSQUEZ-NORIEGA, P.; MAYTA, C.; CUBA, E.; GARCÍA, E.E.; MONTAÑO-CENTELLAS F.; KRÖMER, T. Floral ecology and floral visitors of *Puya atra* (Bromeliaceae), a Bolivian endemic plant. **Ecología en Bolivia**, v. 55, n. 1, p. 36-45, 2020.
- VIZENTIN-BUGONI, J.; MARUYAMA, P.K.; SAZIMA, M. Processes entangling interactions in communities: forbidden links are more important than abundance in a hummingbird-plant network. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1780, p. 2397-2397, 2014.
- VOSGUERITCHIAN, S. B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 3, p. 433-442, 2006.
- WAMBOLD, L. J.; CHAN, D. O.; THERRIAULT, T. W.; KOLASA, J. Abiotic factors controlling species richness, diversity, and abundance in the bromeliad *Hohenbergia polycephala* (Bromeliaceae). **Ecotropica**, v. 17, p. 91-101, 2011.
- WANDERLEY, M. & MARTINS, S. 2007. Bromeliaceae. In: Wanderley, M.; Shepherd, G. & Giulietti, A. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 5, 494p. 2007.
- 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**, v. 232, n. 3, p. 201-212, 2002.
- WENDT, T.; CANELA, M. B. F.; FARIA, A. P. G.; RIOS, R. I. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 10, p. 1760-1767, 2001.
- WOLOWSKI, M.; ASHMAN, T.L.; FREITAS, L. Community-wide assessment of pollen limitation in hummingbird-pollinated plants of a tropical montane rain forest. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 903-910, 2013.
- ZANELLA, C. M.; BRUXEL, M.; PAGGI, G. M.; GOETZE, M.; BUTTOW, M. V.; CIDADE, F. W.; BERED, F. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, n. 9, p. 1511-1519, 2011.

ZANELLA, C. M.; JANKE A.; PALMA-SILVA, C.; KALTCHUK-SANTOS, E.; PINHEIRO, F.G.; PAGGI, G. M.; SOARES, L. E. S.; GOETZE, M.; BÜTTOW, M. V.; BERED, F. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1020-1026, 2012.



# CAPÍTULO 1

### **3. Biologia reprodutiva e hibridização entre duas espécies simpátricas de *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae Juss.) da Floresta Atlântica**

Aline Mystica Silva de Oliveira<sup>a\*</sup>, Ana Paula Gelli de Faria<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Bairro São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento Botânica, Campus Universitário, R. José Lourenço Kelmer s/n, Bairro São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil

**Manuscrito formatado de acordo com as normas da Revista Flora.**

**Resumo:** Bromeliaceae apresenta grande diversidade de atributos florais e sistemas reprodutivos, no entanto, estudos sobre aspectos reprodutivos para o gênero *Nidularium* são escassos. Neste trabalho analisamos a biologia reprodutiva de *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii*, além de investigar a possibilidade de hibridização entre essas espécies simpátricas, ocorrentes em uma porção de floresta nebulosa da Serra da Mantiqueira. A estratégia de florescimento de ambas as espécies é do tipo "steady state", as flores são inodoras e se desenvolvem imersas na água acumulada nas rosetas, possuem corolas tubulares e permanecem com o ápice das pétalas fechado, não expondo anteras e estigmas. Em *N. ferdinandocoburgii* o volume médio de néctar produzido por flor foi  $34,18 \mu\text{L} \pm 19,79$  com um teor médio de açúcares de 11,52 mg. Em *N. marigoii* o volume médio de néctar produzido foi  $22,31 \mu\text{L} \pm 8,74$  com teor médio de açúcares de 6,97 mg. A antese é diurna e as flores permanecem abertas por dois dias em ambas as espécies. Em *N. ferdinandocoburgii*, a taxa de frutificação sob condições naturais foi  $86,31\% \pm 18,49$  e foram produzidas em média  $231,27 \pm 93,49$  sementes por fruto. O beija-flor *Colibri serrirostris* foi o único polinizador observado para *N. ferdinandocoburgii*. Ambas as espécies são autoincompatíveis, sendo, portanto, dependentes dos serviços dos polinizadores para a reprodução. As duas espécies apresentam hercogamia, o que parece ser determinante para seus sistemas reprodutivos. Os cruzamentos heteroespecíficos resultaram na produção de frutos férteis somente quando *N. marigoii* atuou como receptora de pólen. A taxa de frutificação foi de 100%, e os frutos produziram elevado número de sementes viáveis  $83,5 (\pm 63,11)$ , que originaram plantas vigorosas. Nossos resultados ampliam o conhecimento sobre a biologia reprodutiva da família Bromeliaceae, especialmente para o gênero *Nidularium* e fornecem dados importantes para iniciativas de conservação de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção.

**Palavras-chave:** autoincompatibilidade, endemismo, Floresta Atlântica, hibridização, sucesso reprodutivo.

## 1. Introdução

Bromeliaceae constitui uma das maiores e mais diversas famílias de plantas monocotiledôneas neotropicais (3646 espécies e 78 gêneros; Gouda et al., cont. atualizado), seus representantes exibem uma ampla variação nos mecanismos reprodutivos (Benzing, 2000). Tanto a autogamia quanto a autoincompatibilidade foram registradas para bromélias (Matallana et al., 2010), sendo a autoincompatibilidade bem difundida entre os representantes da família (Canela & Sazima, 2005; Vosgueritchian & Buzato, 2006; Ramírez-Morillo et al., 2009; Schmid et al., 2010; Kamke et al., 2011; Büttow, 2012; Zanella et al., 2012; Paggi et al., 2012, 2013; Wolowski et al., 2013; Givnish et al., 2014; Souza et al., 2017; Godoy et al., 2018; Goetze et al., 2018; Lenzi & Paggi, 2020).

A ornitofilia predomina como síndrome de polinização em Bromeliaceae (Martinelli, 1997), sendo os beija-flores seus principais polinizadores (Benzing, 2000; Canela & Sazima, 2003; Givnish et al., 2014). Em áreas de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil, um dos principais centros de diversidade da família, as bromélias podem representar até 30% dos recursos alimentares utilizados pelos beija-flores, destacando a importância da relação ecológica estabelecida entre essas plantas e os vertebrados (Martinelli et al., 2008; Sazima et al., 1996).

Em Bromeliaceae é comum a ocorrência de espécies que exibem semelhança floral, períodos de floração sobrepostos e compartilhamento de polinizadores (Wendt et al., 2008; Matallana et al., 2010, 2016; Cavalcante et al., 2019). Isso possibilita o fluxo de pólen heteroespecífico (Matallana et al., 2016) conseqüentemente, o isolamento reprodutivo pode ser comprometido e descendentes híbridos viáveis podem eventualmente ser produzidos (Ramírez-Rosas et al., 2020). A possibilidade de hibridização natural é maior em sistemas reprodutivos autoincompatíveis do que em sistemas autocompatíveis (Wendt et al., 2002; Matallana et al., 2010; Souza et al., 2017), ocorrendo com mais frequência entre espécies

intimamente relacionadas, especialmente em áreas simpátricas, o que pode refletir o tempo de divergência recente e os vários graus de isolamento reprodutivo entre as plantas (Mallet et al., 2007; Zanella et al., 2016). Sabe-se que as espécies de bromélias podem hibridizar facilmente por meio de experimentos de polinização manual (McWilliams, 1974). No entanto, ainda são escassos os estudos sobre a hibridização natural na família. Poucos registros de híbridos naturais foram observados para gêneros como *Pitcairnia* (Luther, 1984; Wendt et al., 2000, 2001), *Tillandsia* (Gardner, 1984; Luther, 1985) e *Vriesea* (Read, 1984).

*Nidularium* Lem. (aproximadamente 47 espécies, Gouda et al. cont. atualizado) é um gênero endêmico dos domínios da Floresta Atlântica brasileira. Juntamente com os gêneros *Canistrum* E. Morren, *Canistropsis* (Mez) Leme, *Edmundoa* Leme, *Neoregelia* LBSm. e *Wittrockia* Lindm., formam o “complexo nidularioide”, que se caracteriza por apresentar inflorescências congestas, nidulares, que normalmente se desenvolvem imersas na água acumulada nas rosetas foliares (Leme, 1997; Santos-Silva et al., 2017). Muitas espécies apresentam distribuição restrita, com pequenas populações e alta especificidade de *habitats*, (Martinelli & Moraes, 2013), são microendêmicas ou regionais, formando núcleos de endemismo (Zanella et al., 2012).

*Nidularium ferdinandocoburgii* Wawra e *N. marigoii* Leme, espécies foco deste estudo, são restritas à Região Sudeste do Brasil (Martinelli et al., 2008). Ambas as espécies compartilham muitas afinidades morfológicas, sendo *N. ferdinandocoburgii* diferenciado pela presença de brácteas estéreis na inflorescência, estames inclusos, alvos e epipétalos, flores com pétalas alvas e ápice roxo. Em *N. marigoii*, as brácteas estéreis estão ausentes na inflorescência, suas pétalas são alvas com ápice rosa, os estames são inclusos, sendo três adnados à base das pétalas e três completamente adnados às pétalas (Monteiro & Forzza, 2008). *Nidularium ferdinandocoburgii* ocorre principalmente no interior de florestas, entre 1.000 e 1.600 m de altitude. *Nidularium marigoii* ocorre principalmente entre 1.300 a 2.700 m

de altitude (Leme, 2000), e a espécie é classificada como “Quase Ameaçada” no Livro Vermelho da Flora Brasileira (Forzza et al., 2013).

No presente trabalho, investigamos a biologia reprodutiva de populações simpátricas de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* em uma porção de floresta nebulosa localizada na Serra da Mantiqueira, região considerada a 8ª área protegida mais insubstituível do planeta, e um dos dez locais mais importantes para a conservação da biodiversidade (Le Saout et al., 2013). Partindo do pressuposto de que a compreensão da biologia reprodutiva é essencial para preservar e conservar as espécies vegetais (Martinelli et al., 2008; Martinelli & Moraes, 2013), fornecemos dados sobre a fenologia da floração e da frutificação, biologia floral, ecologia da polinização, sistemas de cruzamento, hibridização e sucesso reprodutivo dessas espécies.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Área de estudo*

O estudo foi realizado no Parque Estadual do Ibitipoca, Unidade de Conservação localizada na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, no sudeste do Brasil (21°40' a 21°44'S e 43°52' a 43°55'W). O clima é Cwb (Köppen, 1948), caracterizado por verões chuvosos e invernos secos, com temperatura média anual de 14,8° C e precipitação média de 1544 mm (CETEC, 1983). Na área ocorrem altitudes acima de 1000 m, podendo atingir até 1784 m em seu ponto mais elevado (Rodela, 2000; Menini Neto et al., 2007). Como resultado dos gradientes altitudinais, fatores edáficos e umidade, um mosaico de fisionomias vegetais ocorre no parque (Oliveira-Filho et al., 2013). Dentre as fisionomias florestais, as nanoflorestas nebulares são as mais comuns, caracterizadas pela presença de pequenas árvores e arbustos, com um dossel que varia de 3 a 5 m de altura (Oliveira-Filho et al., 2013).

Ambas as espécies ocorrem simpatricamente no parque. *Nidularium ferdinandocoburgii* está amplamente distribuída, formando numerosas populações e *N.*

*marigoi* apresenta distribuição mais restrita. Foram estudadas duas populações de *N. ferdinandocoburgii* em nanoflorestas nebulares associadas a grutas em elevações de c. 1640–1670 m a.s.l.: Gruta do Pião (21°42'08" S - 43°52'42" W) e Gruta do Cruzeiro (21°41'46" S - 43°53'50" W), distantes entre si por aproximadamente 2600 m. Uma pequena população de *N. marigoi* foi estudada na Gruta do Pião (21°42'08" S - 43°52'42" O). O *voucher* de *N. ferdinandocoburgii* foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger - CESJ [A.P.G. de Faria, 233].

## 2.2. Fenologia reprodutiva

As observações fenológicas foram realizadas mensalmente, entre outubro de 2018 e fevereiro de 2020, abrangendo três períodos consecutivos de floração e frutificação para *N. ferdinandocoburgii*. Apenas um indivíduo de *N. marigoi* foi encontrado em flor no ano de 2019. Foi registrada a presença ou ausência das seguintes fenofases: escapo da inflorescência; inflorescência jovem; botões florais; flores abertas, flores senescentes; frutos imaturos e frutos maduros. Trinta indivíduos de *N. ferdinandocoburgii* foram monitorados em campo e dez foram coletados para monitoramento em casa de vegetação. Os padrões fenológicos foram classificados de acordo com Newstrom et al. (1994). Foi considerado como pico de floração o período no qual mais de 50% dos indivíduos amostrados estavam floridos (Machado & Semir, 2006).

## 2.3. Biologia floral

Os dados sobre a biologia floral foram coletados em dez indivíduos de *N. ferdinandocoburgii* (n = 30 flores). Registramos o volume de néctar produzido ( $\mu$ l), a concentração de açúcares no néctar, a cor das brácteas e corola, a presença ou ausência de odor, o número de flores abertas por dia, o comprimento do tubo da corola (cm) e a duração da antese. Para *N. marigoi*, um indivíduo (n = 28 flores) estava disponível para a coleta de

dados, uma vez que durante os três anos de experimentos, apenas uma planta floresceu na pequena população localizada no campo.

A determinação do volume de néctar foi realizada utilizando-se microsseringas de 50  $\mu\text{L}$  (Hamilton, NV, EUA) e a concentração de açúcares no néctar foi determinada com o uso de um refratômetro portátil com escala BRIX de 0 a 33% (Atago, Tóquio, Japão). As medições foram realizadas em diferentes horários ao longo do dia, em flores de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* previamente isoladas.

A receptividade do estigma foi testada quimicamente com solução de peróxido de hidrogênio a 3% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em diferentes horários do dia, a liberação de bolhas de oxigênio foi utilizada como indicador da receptividade do estigma (Kearns & Inouye, 1993). A disponibilidade de pólen foi analisada tocando as anteras e observando-se a consequente liberação de pólen.

#### 2.4. Visitantes florais

A presença de polinizadores e visitantes florais foi registrada por meio de observações naturalísticas ao longo da antese. Foram considerados como polinizadores, os visitantes florais que contactavam as estruturas reprodutivas das flores (anteras e estigma), realizando, desse modo, visitas legítimas. Os beija-flores foram identificados no campo e a nomenclatura taxonômica seguiu as recomendações do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Piacentini et al., 2015). A identificação dos insetos foi realizada por especialistas por meio de fotos ou registros de vídeo.

#### 2.5. Sucesso reprodutivo

Além dos cruzamentos experimentais, a avaliação da polinização natural foi realizada em 30 indivíduos de *N. ferdinandocoburgii* no campo. O sucesso reprodutivo foi avaliado estimando-se os seguintes parâmetros: 1) potencial reprodutivo (número total de flores produzidas/indivíduo); 2) média do número de frutos/inflorescência e taxa de frutificação



(fração de flores desenvolvidas em frutos maduros sob condições naturais de polinização); 3) média do número de sementes/fruto. A média do número de frutos/inflorescência foi baseada na contagem dos frutos maduros intactos que produziram sementes. A taxa de frutificação foi baseada na contagem dos frutos maduros que produziram sementes. A média do número de sementes/fruto foi determinada em uma subamostra de 20 frutos.

#### 2.6. Viabilidade das sementes e taxa de germinação

O experimento de germinação foi realizado utilizando-se sementes provenientes de frutos de *N. ferdinandocoburgii* coletados no campo (n = 16 frutos) e de sementes formadas através dos cruzamentos heteroespecíficos realizados entre *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoi* (n = 4 frutos). Os frutos foram lavados em água corrente e detergente neutro e transferidos para béqueres contendo hipoclorito de sódio a 0,3% (v / v) por 20 minutos. Após este procedimento, as bagas foram lavadas três vezes em água destilada. O material foi dissecado para a obtenção das sementes, as quais foram distribuídas sob duas camadas de papel filtro e irrigadas com 1 mL de água destilada, em quatro placas de Petri (5 cm de diâmetro), contendo 60 sementes cada. A mucilagem que circunda caracteristicamente as sementes de Bromelioideae foi removida para evitar a proliferação de microrganismos contaminantes. As placas de Petri foram mantidas em bancadas à temperatura ambiente e foram observadas diariamente para verificar o aparecimento de contaminações microbiológicas. A avaliação da germinação foi realizada em censos semanais durante dois meses. A emergência da raiz primária ou da parte aérea foi o critério utilizado para a germinação.

Após quatro meses de cultivo, as plântulas enraizadas e com parte aérea desenvolvida foram transferidas para bandejas de poliestireno, preenchidas com substrato comercial úmido Plantmax Hortaliças HT® (Eucatex) e recobertas com folha de plástico transparente, sendo

mantidas à sombra e irrigadas periodicamente, até a aclimatação completa, após 30 dias as plantas foram expostas às condições ambientais.

### 2.7. Testes de polinização

Os experimentos de polinização manual foram conduzidos em casa de vegetação, utilizando-se plantas transplantadas do campo. Realizamos os cruzamentos experimentais em diferentes flores, por vezes da mesma inflorescência. Cada flor recebeu um dos seguintes tratamentos: (1) autopolinização manual - as inflorescências com botões florais foram ensacadas e, no dia seguinte quando as flores estavam abertas, foram polinizadas manualmente usando pólen fresco obtido da mesma flor; (2) autopolinização espontânea - as inflorescências foram ensacadas e as flores não foram mais manipuladas; (3) polinização cruzada manual - os botões florais foram emasculados e a inflorescência ensacada, e no dia seguinte, quando as flores estavam abertas foram polinizadas manualmente usando pólen fresco obtido de outra planta da mesma espécie (garantimos que essas duas plantas eram de diferentes populações para evitar o uso de rametes dos mesmos genetes); (4) agamospermia - os botões florais foram emasculados e a inflorescência foi ensacada; (5) polinização heteroespecífica - os botões florais foram emasculados e a inflorescência ensacada. No dia seguinte, quando as flores estavam abertas, foram polinizadas manualmente usando pólen fresco obtido de flores da outra espécie. Cada inflorescência foi etiquetada e as pétalas das flores foram codificadas com tinta acrílica de cores diferentes de acordo com o tratamento de polinização. As inflorescências foram monitoradas até que a frutificação pudesse ser avaliada.

Para *N. marigoi*, enfatizamos que, como apenas um indivíduo fértil foi observado no campo, não foi possível realizar todos os testes de polinização. Para esta espécie foram realizados os seguintes tratamentos: autopolinização manual, autopolinização espontânea e cruzamentos heteroespecíficos.

Os índices de autofertilidade (AFI) e autocompatibilidade (SCI) foram calculados (Lloyd & Schoen, 1992). O índice de autofertilidade foi calculado como a porcentagem de frutificação ( $AFI_f$ ) ou média de sementes por fruto ( $AFI_s$ ) produzida sob autopolinização espontânea dividida pela porcentagem de frutificação ou média de sementes por fruto produzida via polinização cruzada manual. O índice de autocompatibilidade foi calculado dividindo-se a porcentagem de frutificação ( $SCI_f$ ) ou média de sementes por fruto ( $SCI_s$ ) produzida via autopolinização manual pela porcentagem de frutificação ou média de sementes por fruto produzida sob polinização cruzada manual. O valor 1 é interpretado como autocompatibilidade completa; um valor inferior a 0,75 é interpretado como sendo devido, pelo menos, a uma autoincompatibilidade parcial (Lloyd & Schoen, 1992). Segundo Ramírez & Brito (1990), as espécies autocompatíveis ou parcialmente autocompatíveis apresentam valores entre 0,30 e 1,00. Abaixo de 0,30 as espécies são consideradas autoincompatíveis.

O desenvolvimento dos frutos foi monitorado periodicamente até a maturação. O número de sementes foi avaliado cerca de três meses após a realização dos cruzamentos experimentais. As médias do número de sementes por fruto nos diferentes tratamentos de polinização foram comparadas por ANOVA. Após a ANOVA unilateral, as médias obtidas para cada tratamento avaliado foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD, N desigual) a 5% de probabilidade usando o software R (R Development Core Team 2019).

## **Resultados**

### **Fenologia reprodutiva, biologia floral e fertilidade natural de *Nidularium ferdinandocoburgii* e *Nidularium marigoii*:**

A floração de *N. ferdinandocoburgii* ocorreu no período chuvoso, a partir de outubro (onde foram observadas as seguintes fenofases: escape da inflorescência/inflorescência jovem; botão floral e flores abertas), estendendo-se até janeiro. O pico de floração da espécie ocorreu no mês de dezembro, no qual mais de 50% dos indivíduos amostrados estavam

floridos. Dos oito indivíduos da única população de *Nidularium marigoii* localizada na área, apenas um floresceu no período deste estudo, fenômeno observado no período chuvoso (mês de fevereiro).

As rosetas de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* são monocárpicas, produzindo brotos em sua base, tornando o genete policárpico. A estratégia de floração de ambas as espécies é do tipo disponibilidade regular ou "steady state" (sensu Gentry, 1974). Em nível individual, as espécies apresentam floração de curta duração, inferior a um mês, de acordo com os padrões propostos por Newstrom et al. (1994). Para *N. ferdinandocoburgii* em escala populacional, o padrão foi caracterizado como intermediário, podendo variar de um a cinco meses de floração. Como apenas um indivíduo de *N. marigoii* floresceu durante o período deste estudo, não foi possível determinar o padrão em escala populacional para a espécie.

A altura média das plantas de *N. ferdinandocoburgii* incluindo a inflorescência foi de 31,83 cm  $\pm$  6,45 e o tamanho médio da inflorescência foi de 11,83 cm  $\pm$  2,60. Foram produzidas em média 23,75  $\pm$  3,63 flores por inflorescência (Tabela 1). As flores de *N. ferdinandocoburgii* possuem corolas tubulares, com comprimento médio de 4,22 cm  $\pm$  0,45 e largura média de 0,58 cm  $\pm$  0,04. Apresentam coloração azul arroxeadada intensa com duração de dois dias, permanecendo com o ápice das pétalas fechado, não expondo as anteras e estigma, os quais são de cor branca, sendo o estilete de coloração lilás. A espécie apresenta breve hercogamia, e o estigma se posiciona logo acima das anteras, de modo que o ápice das anteras quase toca a base do estigma (Figura 1 A, B).

**Tabela 1.** Características reprodutivas e parâmetros de fertilidade analisados em *Nidularium ferdinandocoburgii*: Número (N), média (X), desvio padrão ( $\pm$  DP).

<b>Características reprodutivas</b>	<b>N</b>	<b>X <math>\pm</math> DP</b>
Altura da planta com inflorescência	16	31.83 $\pm$ 6.45
Altura da inflorescência	16	11.83 $\pm$ 2.60
Flores por inflorescência	30	23.75 $\pm$ 3.63
Número de flores abertas / dia	40	1-5
Comprimento da corola	6	4.22 $\pm$ 0.45
Diâmetro da corola	6	0.58 $\pm$ 0.04
Frutos por inflorescência	30	20.5 $\pm$ 5.53
Comprimento dos frutos	10	3.30 $\pm$ 0.16
Sementes por fruto	16	231.27 $\pm$ 93.49
Tamanho das sementes	30	0.3
Volume de nectar ( $\mu$ L)	40	34.18 $\pm$ 19.79
Conteúdo de açúcares no néctar (mg)	40	11.52
Concentração de açúcares no néctar (%)	40	30.45 $\pm$ 5.90
Horário da antese	-	6:00 às 12:00
Disponibilidade das flores aos visitantes	-	Dois dias
Horas de observação	-	30

As flores de *N. marigoi* possuem corolas tubulares com coloração lilás e ápice rosa, as anteras são brancas, o estigma e o estilete são lilases. A espécie apresenta hercogamia pronunciada (Figura 1 D, E) o estigma está posicionado bem acima das anteras, sendo este um

mecanismo para evitar a autofecundação e promover a polinização cruzada. A hercogamia pode ser observada na espécie desde a fenofase de botão floral, e o estigma, por vezes, chega a tocar internamente o ápice das pétalas. Conforme observado para *N. ferdinandocoburgii*, as flores de *N. marigoii* permanecem com o ápice das pétalas fechado e duram dois dias. O número de flores abertas por dia em cada indivíduo variou de uma a, no máximo, cinco flores para ambas as espécies.

As brácteas primárias de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* são vermelhas, o que torna suas inflorescências muito vistosas e conspícuas. As espécies apresentam inflorescências nidulares e ramificadas, as flores são inodoras e se desenvolvem imersas na água que se acumula no interior da roseta. A ordem do desenvolvimento das flores ocorre de forma centrífuga para ambas as espécies. *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* são muito semelhantes em relação à morfologia vegetativa de suas rosetas e podem ser identificados incorretamente no campo quando não estão no período reprodutivo.

*Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* apresentam antese diurna com início por volta das 6h00 estendendo-se até 12h00. Foi considerado como período de disponibilidade da flor aos visitantes o período de produção do néctar no início da manhã, por volta das 6h00, quando as anteras já estavam abertas e os grãos de pólen podiam ser facilmente removidos. O volume médio de néctar produzido por flor em *N. ferdinandocoburgii* foi de  $34,18 \mu\text{L} \pm 19,79$  com conteúdo médio de açúcares de 11,52 mg e concentração média de açúcares de  $30,45 \% \pm 5,90$ . O maior volume de néctar produzido foi de  $97 \mu\text{L}$  registrado às 8h00. Em *N. marigoii* o volume médio de néctar produzido por flor foi de  $22,31 \mu\text{L} \pm 8,74$  com um conteúdo médio de açúcares de 6,97 mg e concentração média de açúcares de  $28,5 \%$ . O maior volume de néctar produzido foi de  $35 \mu\text{L}$  registrado às 10h00. Em ambas as espécies, a concentração de açúcares no néctar foi constante durante todo o período de disponibilidade das flores.

**Figura 1.** A - Inflorescência de *Nidularium ferdinandocoburgii*. B - Detalhe da flor e ocorrência de breve hercogamia em *N. ferdinandocoburgii*. C – *Colibri serrirostris*, polinizador de *N. ferdinandocoburgii*. D - Inflorescência de *Nidularium marigoii*. E – Detalhe da flor de *N. marigoii* e ocorrência de hercogamia pronunciada. F – Única população de *N. marigoii* localizada na área de estudo.



O beija-flor *Colibri serrirostris* (Vieillot, 1816), da família Trochilidae, foi o único polinizador observado para *N. ferdinandocoburgii*. As visitas ocorreram geralmente pela manhã, por volta das 10h00, com intervalos de 40 a 60 minutos. O polinizador permaneceu de três a seis segundos em cada flor, realizando visitas legítimas coletando néctar e introduzindo os bicos entre as pétalas em direção à base da corola onde se localiza a câmara de néctar.

A frutificação de *N. ferdinandocoburgii* iniciou-se logo após a floração, com início em dezembro (observou-se a presença das fenofases: frutos imaturos e frutos maduros) estendendo-se até abril. Em média, foram produzidos  $20,5 \pm 5,53$  frutos por inflorescência, com tamanho médio de  $3,3 \text{ cm} \pm 0,16$ . Os frutos produziram em média  $231,27 (\pm 93,49)$  sementes sob condições naturais. As sementes apresentaram alta taxa de germinação (86%). Os frutos de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* são carnosos e indeiscentes com sépalas

persistentes, permaneceram imaturos por cerca de 30 dias. A maturação completa foi observada três meses após a floração. Ao longo de seu desenvolvimento, os frutos de *N. ferdinandocoburgii* adquirem um aspecto intumescido e alteram sua cor, passando de esbranquiçados a vináceos, indicando sua maturação. Os frutos de *N. marigoii* apresentam cor branco-esverdeada e, à medida que amadurecem, adquirem cor branca. As sementes de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* são elípticas, desprovidas de apêndices e circundadas por mucilagem hialina. O tamanho médio das sementes foi de 3 mm em ambas as espécies.

### **Sistema reprodutivo de *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii***

*Nidularium ferdinandocoburgii* é autoincompatível. Apenas os experimentos de polinização aberta e polinização cruzada manual produziram frutos férteis, caracterizando a espécie como obrigatoriamente xenogâmica. Os índices de autofertilidade (AI) e autocompatibilidade (SCI) foram iguais a zero, indicando autoincompatibilidade completa. Os tratamentos de polinização aberta e polinização cruzada manual apresentaram alta frutificação. Houve maior frutificação sob polinização aberta (86,31%), em comparação com a polinização cruzada manual (75%). Com relação ao número médio de sementes produzidas, a ANOVA unilateral seguida pelo teste de Tukey mostrou uma diferença significativa entre a polinização aberta e a polinização cruzada manual (Tabela 2). A polinização aberta produziu o maior número médio de sementes por fruto, 231,27 ( $\pm$  93,49), em comparação à polinização cruzada manual, que produziu em média 123,26 ( $\pm$  67,36) sementes por fruto, evidenciando um alto investimento na reprodução sexuada. Os tratamentos de autopolinização espontânea e manual não produziram frutos. Esses resultados evidenciam que *N. ferdinandocoburgii* necessita de agentes polinizadores para a produção de frutos e sementes, portanto, a xenogamia se apresenta como seu modo de polinização obrigatório. Não houve formação de frutos nos tratamentos de agamospermia e polinização heteroespecífica, quando *N. ferdinandocoburgii* atuou como espécie receptora de pólen e *N. marigoii* como doadora.



**Tabela 2.** Frutificação e número médio de sementes por fruto (média  $\pm$  1 DP) após tratamentos de polinização em *Nidularium ferdinandocoburgii* e *Nidularium marigoii*. O número de plantas indica quantas inflorescências estavam disponíveis para cada tratamento. O número de frutos formados e o número de flores testadas são apresentados entre parênteses (frutos / flores).

Espécies	Polinização cruzada manual	Autopolinização espontânea	Autopolinização manual	Polinização aberta	Polinização heteroespecífica
<i>Nidularium ferdinandocoburgii</i>					
Número de plantas	8	8	8	20	1
Taxa de frutificação	75 % (18/24)	0 (0/87)	0 (0/43)	86,31 % (410/475)	0 (0/4)
Sementes por fruto	123,26 <sup>a</sup>	0	0	231,27 <sup>b</sup>	0
<i>Nidularium marigoii</i>					
Número de plantas	-	1	1	-	1
Taxa de frutificação	-	0 (0/9)	0 (0/9)	-	100 % (4/4)
Sementes por fruto	-	0	0	-	83,5

A ANOVA seguida pelo teste de Tukey HSD foi realizada entre o número médio de sementes por fruto registrado entre os tratamentos de polinização aberta e polinização cruzada ( $F = 19,84$ ). Os valores seguidos por uma letra sobrescrita diferente dentro de uma mesma linha são significativamente diferentes de acordo com o teste t (valor  $P < 0,0001$ ).

Em *Nidularium marigoii*, embora não tenha sido possível realizar todos os tratamentos de polinização controlada e polinização natural, devido ao pequeno número de indivíduos localizados no campo, observamos alta produção de frutos férteis nos experimentos de polinização heteroespecífica quando *N. marigoii* atuou como espécie receptora de pólen. A taxa de frutificação foi de 100%, os frutos produziram alto número de sementes viáveis (83,5

$\pm 63,11$ ) com alta taxa de germinação (76%), que originaram plantas bem desenvolvidas (Figura 2).

**Figura 2.** A - Plântulas provenientes da germinação das sementes formadas a partir dos cruzamentos heteroespecíficos entre *Nidularium ferdinandocoburgii* e *Nidularium marigoii*. B - Plântulas sob cultivo após 60 dias de germinação. C - Plantas sob cultivo após 120 dias de germinação. D - Plantas após cinco meses de cultivo.



Os tratamentos de autopolinização (espontânea e manual) não resultaram na formação de frutos. A partir dos resultados obtidos nestes experimentos podemos inferir que *N. marigoii* é autoincompatível, conseqüentemente, seu índice de autocompatibilidade é zero.

## Discussão

As flores de *N. ferdinandocoburgii* apresentaram corolas tubulares, com comprimento médio de 4,22 cm  $\pm$  0,45 e diâmetro do tubo floral de 0,58 cm  $\pm$  0,04. Esses valores são próximos aos encontrados por Buzato et al. (2000) para quatro espécies congêneres: *N. angustibracteatum* Leme, *N. innocentii* Lem., *N. marigoi* e *N. procerum* Lindm., cujos comprimentos das corolas foram: 4,32; 5,30; 4,37 e 4,87 cm, respectivamente. Em *N. campoalegrensis* Leme, o comprimento médio da corola foi 45,5 mm (Kaehler et al., 2005). As flores de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoi* tiveram duração de dois dias, assim como observado por Machado & Semir (2006) para as espécies *N. rubens* Mez e *N. innocentii*, que permanecem com o ápice das pétalas fechado, não expondo anteras e estigma. Para *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoi*, o número de flores abertas por dia variou de uma a no máximo cinco. Buzato et al. (2000) obtiveram o mesmo resultado para três das quatro espécies congêneres estudadas, o número de flores abertas por planta variou de uma a cinco flores, exceto para *N. procerum*, cujo número de flores abertas por planta variou de uma a quatro flores.

O padrão fenológico "steady state" observado para *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoi*, caracterizado pela abertura de poucas flores por dia, foi relatado para várias outras espécies de bromélias, tais como: *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Siqueira Filho & Machado, 2001); *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker (Lenzi, Matos & Orth, 2006); *Dyckia brevifolia* Baker (Rogalski et al., 2009); *Canistropsis microps* (E. Morren ex Mez) Leme (Nunes-Freitas & Rocha, 2011); *Vriesea rodigasiana* E. Morren. (Rocca & Sazima, 2012); *Encholirium spectabile* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Queiroz et al., 2016) e *A. bracteata* (Sw.) Griseb. (Pool-Chalé et al., 2018). A baixa intensidade de floração estimula o movimento dos polinizadores, pois estes precisam de várias plantas para satisfazer suas necessidades energéticas (Rech et al., 2014). *Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoi* apresentam inflorescências nidulares e ramificadas. As flores são inodoras e se desenvolvem

imersas na água que se acumula no interior da roseta. Essa estratégia possibilita a proteção das flores e especialmente dos ovários que ficam totalmente submersos na água acumulada pelas brácteas (Leme, 2000) além de evitar a pilhagem do néctar.

*Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* apresentam antese diurna, que se inicia por volta das 6:00h estendendo-se até as 12:00h. A concentração de açúcares no néctar foi constante ao longo do dia para ambas as espécies, conforme relatado para *Aechmea lindenii* por Lenzi et al., (2006) e para *A. distichantha* Lem. por Scrok & Varassin (2011). Em *N. ferdinandocoburgii* a concentração média de açúcares no néctar foi de 30.45% ( $\pm$  5.9) e para *N. marigoii* a concentração de açúcares foi de 28,5 % ( $\pm$  6.4).

Em estudo com *N. rubens* e *N. innocentii*, Machado & Semir (2006), observaram que as espécies apresentavam antese diurna e néctar com concentração de açúcar de 29,7% e 30,7% respectivamente, valores próximos aos observados para *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* no presente estudo. Buzato et al. (2000) encontraram valores de concentração de açúcares e volumes de néctar próximos aos observados neste estudo para *N. angustibracteatum* Leme, *N. innocentii*, *N. marigoii* e *N. procerum* (concentrações de 30,2; 34,2; 29,5 e 38,9% e volumes de 16,5; 11,5; 16,0 e 25,1  $\mu$ L, respectivamente). Em *N. scheremetiewii* Regel, a concentração de açúcares no néctar foi de 27% (Martinelli, 1994). Valores semelhantes também foram encontrados para outras espécies da família Bromeliaceae: em *Dyckia brevifolia* a concentração média de açúcares no néctar foi 25,7% (Rogalski et al., 2009); em *Vriesea friburguensis* Mez. a concentração média de açúcares no néctar foi de 25,6% (Paggi et al., 2012); em *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant a concentração média de açúcares foi de 29,7% (Bastos et al., 2017), em *A. bracteata* o valor foi de 24,4% (Pool-Chalé et al., 2018).

Tanto *N. ferdinandocoburgii* quanto *N. marigoii* apresentam atributos compatíveis com a síndrome de ornitofilia, tais como: flores tubulares, inflorescências expostas, antese diurna,

cores vistosas ou contrastantes, néctar como recurso alimentar apresentando concentração entre 20% e 32% e ausência de odor perceptível ao olfato humano (Grant & Grant, 1968; Faegri & Pijl, 1980). O contraste entre a cor das flores (azul-arroxeadado intenso em *N. ferdinandocoburgii* e rosa em *N. marigoi*) com o vermelho vibrante das brácteas primárias em ambas as espécies maximiza sua exibição visual.

O beija-flor, *Colibri serrirostris* (Vieillot, 1816) foi a única espécie observada como polinizador de *N. ferdinandocoburgii*. As visitas ocorreram mais frequentemente pela manhã, por volta das 10:00h, onde os beija-flores realizaram visitas legítimas às plantas. A espécie foi observada introduzindo o bico entre as pétalas em direção à base da corola, onde se encontra a câmara de néctar. Este movimento induz os beija-flores a penetrarem na flor com o bico, enquanto coletam o néctar, realizam a polinização, promovendo o contato das anteras com o estigma receptivo (Bastos et al., 2017). *Colibri serrirostris* pertence à subfamília Trochilinae, cujos membros comumente defendem territórios de forrageamento com interações agonísticas. O beija-flor foi constantemente avistado empoleirado em arbustos próximos às plantas que visitava. Agonismos podem separar territórios de forrageamento, resultando em compartilhamento de recursos e diminuição da competição intra e interespecífica (Machado, 2009).

O comportamento do polinizador pode ser ainda mais importante em espécies autoincompatíveis. Embora beija-flores territoriais geralmente tragam pólen menos compatível de indivíduos dos mesmos territórios, a pequena quantidade que trazem pode ser suficiente (Maruyama et al., 2016), como de fato, parece ter ocorrido com *N. ferdinandocoburgii*, pois observamos uma alta taxa de frutificação ( $86,31\% \pm 18,49$ ) para a espécie em condições naturais. Outras espécies de beija-flores pertencentes à subfamília Trochilinae foram registradas como polinizadores de espécies do gênero *Nidularium*. Segundo Martinelli (1994), o beija-flor *Heliothryx aurita* (Gmelin, 1788) (Trochilinae) foi o principal

visitante de *N. scheremetiewii*, que, à semelhança de *N. ferdinandocoburgii* apresenta corola azul escura que contrasta com suas brácteas primárias vermelhas vibrantes. Esse mesmo autor registrou *Chlorostilbon aureoventris* (d'Orbigny & Lafresnaye, 1838) (Trochilinae) como polinizador de *N. billbergioides* (Schult. f.) L.B. Sm. Por outro lado, *Phaethornis eurynome* (Lesson, 1832) (Phaethornithinae) foi registrado como polinizador de *N. itatiaiae* L.B.Sm., uma espécie autoincompatível (Wolowski et al., 2013).

Estudos anteriores sobre sistemas reprodutivos do gênero *Nidularium* identificaram espécies autocompatíveis e autoincompatíveis (Matallana et al., 2010; Wolowski et al., 2013). *Nidularium ferdinandocoburgii* é autoincompatível, apenas os experimentos de polinização natural e polinização cruzada manual resultaram na produção de frutos férteis, portanto, a espécie é obrigatoriamente xenogâmica. Os tratamentos de polinização aberta e polinização cruzada manual apresentaram alto índice de frutificação, os percentuais foram de 86,31% e 75%, respectivamente. Esses tratamentos produziram alto número de sementes: 231,27 ( $\pm$  93,49) sementes, sob polinização aberta, e 123,26 ( $\pm$  67,36) sementes, sob polinização cruzada manual. As espécies autoincompatíveis são dependentes de polinizadores (Endress, 1994). A autoincompatibilidade tem sido amplamente relatada para a família Bromeliaceae: *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Vosgueritchian & Buzato, 2006); *Bromelia antiacantha* (Canela & Sazima, 2008) e para várias espécies da subfamília Bromelioideae (Matallana et al., 2010); *N. itatiaiae* (Wolowski et al., 2013); *Bromelia hieronymi* Mez (Godoy et al., 2018); *A. kertesziae* Reitz. (Goetze et al., 2018); *Dyckia excelsa* Leme (Lenzi e Paggi, 2020); *V. friburgensis* (Paggi et al., 2012) e *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B.Sm. (Aoki-Gonçalves et al., 2020).

A autoincompatibilidade tem sido descrita como um importante mecanismo reprodutivo para prevenir a depressão por endogamia e promover a heterozigosidade ou diversidade genética, permitindo a sobrevivência ou adaptação das espécies ao longo do

tempo (Charlesworth, 2006). A polinização cruzada é importante para a manutenção das espécies, pois promove o fluxo gênico entre os indivíduos, aumentando a variabilidade genética (Vosgueritchian & Buzato, 2006). Em Bromeliaceae, embora as espécies autoincompatíveis tenham uma rejeição mais forte ao autopólen antes da fertilização, a maioria também tem uma maior capacidade de hibridização em comparação com bromélias autocompatíveis (Matallana et al., 2016; Souza et al., 2017). A autogamia atua como uma barreira reprodutiva, onde a contaminação do gineceu por autopólen impede a deposição de pólen heteroespecífico no estigma (Matallana et al., 2010; Neri et al., 2017).

Segundo Lloyd & Schoen (1992), o grau de hercogamia pode influenciar as taxas de autopolinização, espera-se que quanto maior a distância das anteras em relação ao estigma, menor a capacidade de autopolinização nas flores. Em nosso estudo, observamos que tanto *N. marigoí*, espécie com hercogamia pronunciada, quanto *N. ferdinandocoburgii*, espécie com breve hercogamia, não produziram frutos nos tratamentos de autopolinização. Os mecanismos que previnem ou minimizam a autopolinização em espécies autoincompatíveis parecem ser vantajosos (Lopes & Machado, 1999), como é o caso da hercogamia presente em *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoí*. Esse mecanismo facilita a ocorrência de fecundação cruzada, mas pode aumentar a possibilidade de contato com pólen heteroespecífico (Martinelli, 2004; Neri et al., 2017). De acordo com Neri et al. (2017), em *Vriesea simplex* (Vell.) Beer, a maior distância estigma-antera devido à ocorrência de hercogamia impede a ocorrência de autopolinização, enquanto em *V. scalaris* E.Morren, o posicionamento próximo da antera em relação ao estigma, resulta em uma maior capacidade de autofecundação espontânea. A ocorrência de hercogamia, a abertura de um pequeno número de flores por dia e a autoesterilidade são mecanismos que contribuem para aumentar a polinização cruzada (Wendt et al., 2002; Schmid et al., 2011; Paggi et al., 2012).

Os testes de congruência mostraram que o sucesso reprodutivo foi de 100% nos cruzamentos heteroespecíficos quando *N. marigoi* atuou como espécie receptora de pólen de *N. ferdinandocoburgii* produzindo frutos com média de 83,5 sementes. A rejeição ao pólen em cruzamentos heteroespecíficos depende das espécies envolvidas e de sua proximidade taxonômica, uma vez que espécies intimamente relacionadas tendem a hibridizar mais facilmente do que aquelas distantemente relacionadas (Vervaeke, 2002). Espécies simpátricas e filogeneticamente semelhantes podem apresentar semelhanças na morfologia floral e na síndrome de polinização (Field et al., 2008), o que pode maximizar o potencial de transferência de pólen heteroespecífico entre as espécies envolvidas (Martinelli, 1994; Barbará et al., 2007; Wendt et al., 2008; Versieux & Wanderley, 2015; Matallana et al., 2010).

De acordo com Souza et al. (2017), os cruzamentos entre *Vriesea carinata* Wawra e *V. paraibica* Wawra resultaram em 100% de sucesso nas hibridizações unilaterais. Segundo os mesmos autores, outras combinações entre espécies de *Vriesea* também foram congruentes e produziram elevado número de sementes nas hibridizações. Matallana et al. (2016) relataram que os cruzamentos entre *Aechmea araneosa* L.B.Sm. e *A. capixabae* L.B.Sm. e entre *A. araneosa* e *A. mutica* L.B.Sm. eram congruentes em ambas as direções, enquanto os cruzamentos entre *Quesnelia quesneliana* (Brongn.) L.B.Sm. e *Q. blanda* (Schott ex Beer) Mez eram congruentes apenas quando a primeira atuava como receptora de pólen, mas não como doadora. Neri et al. (2017) relataram que cruzamentos entre as espécies *Vriesea scalaris* e *V. simplex* resultaram na produção de frutos e sementes para ambas as espécies (74% em *V. scalaris* e 93% em *V. simplex*). Palma-Silva et al. (2011) também observaram a ocorrência de hibridização entre *Pitcairnia albiflos* Herb. e *P. staminea* Lodd. em ambas as direções. De acordo com Wendt et al. (2002), *Pitcairnia flammea* Lindl., *P. corcovadensis* Wawra e *P. albiflos* são interespecificamente compatíveis.



Os frutos produzidos por *N. marigoii* a partir dos cruzamentos heteroespecíficos com *N. ferdinandocoburgii* produziram um elevado número de sementes viáveis, que apresentaram alta taxa de germinação (76%) e originaram plantas bem desenvolvidas. Wendt et al. (2002) também relataram uma alta porcentagem de germinação (72,1%) para as sementes resultantes dos cruzamentos entre *Pitcairnia albiflos* e *P. flammea*. Souza et al. (2017) observaram que a taxa de germinação das sementes produzidas a partir de hibridizações em espécies do gênero *Ananas* foi superior a 93%. De acordo com Neri et al. (2017), a taxa de germinação das sementes foi de 44% quando *V. scalaris* atuou como receptora de pólen de *V. simplex*. Nos cruzamentos entre *Tillandsia polystachia* (L.) L. e *T. juncea* (Ruiz & Pav.) Poir. e entre *Tillandsia polystachia* e *T. variabilis* Schltdl. as taxas de germinação das sementes foram (95%) e (93%), respectivamente, mas quando *T. polystachia* foi a receptora de pólen, as taxas de germinação foram menores (23,8%) e (37,5%), respectivamente (Ramírez-Rosas et al., 2020).

A hibridização pode influenciar a criação, a manutenção e a perda de biodiversidade, permitindo o fluxo gênico e a recombinação entre linhagens divergentes, podendo também acelerar a extinção local de espécies raras (Wolf et al., 2001; Mota et al., 2018). Porém, a hibridização natural é um processo importante na evolução das plantas (Neri et al., 2018) e comum em espécies recentemente divergentes, como aquelas que apresentam rápida radiação de espécies (Mallet et al., 2007). Bromeliaceae é bem conhecida por sua radiação adaptativa recente (Benzing, 2000) e Bromelioideae é a subfamília mais recentemente divergida em Bromeliaceae. Problemas de delimitação taxonômica são comuns em muitos de seus gêneros, que podem estar relacionados à rápida especiação e aos altos níveis de plasticidade fenotípica, comumente observada entre seus representantes (Benzing, 2000; Givnish et al., 2011).

Em espécies estreitamente relacionadas, os sistemas de incompatibilidade interespecífica podem falhar em rejeitar ativamente uma carga de pólen estranho, permitindo

a hibridização (Hiscock & Allen, 2008). Em estudo sobre a morfologia polínica e o potencial germinativo de grãos de pólen de *N. ferdinandocoburgii* e *N. marigoï*, Fernandes et al. (2019) observaram grande afinidade na morfologia polínica e alto potencial germinativo (superior a 90%) para os grãos de pólen dessas espécies.

*Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoï* ocorrem em simpatria no Parque Estadual do Ibitipoca, apresentam grande semelhança morfológica, sendo difícil diferenciá-las na ausência de inflorescências. *Nidularium ferdinandocoburgii* ocorre em alta densidade na área de estudo, ao contrário de *N. marigoï*, que possui pequena população no local. Em nosso estudo, *N. marigoï* foi encontrada em flor somente no mês de fevereiro e *N. ferdinandocoburgii* inicia a floração em outubro e termina em janeiro. Segundo Monteiro & Forzza (2008), há registros de floração de *N. marigoï* nos meses de dezembro e março no PEIB. Portanto, os períodos de floração dessas espécies podem coincidir na área de estudo, possibilitando, a ocorrência de hibridização natural entre essas espécies. A sobreposição de floração favorece potencialmente a troca de pólen interespecífico (Neri et al., 2018). As espécies podem ainda, apresentar a mesma síndrome de polinização e eventualmente, compartilhar os mesmos polinizadores, uma vez que suas inflorescências apresentam atributos e arquitetura floral semelhantes. Apesar de terem se formado em cruzamentos manuais, a ocorrência de híbridos naturais no campo não foi observada. Futuros estudos genéticos e moleculares serão importantes para identificar a possível ocorrência de barreiras reprodutivas entre essas espécies e sua relação com a evolução dos sistemas de acasalamento dessas espécies.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) pelo processamento das licenças de coleta (58.482-4 e 050-2017, respectivamente). Agradecemos também à equipe do Parque Estadual do Ibitipoca; aos colaboradores Dr. André Guaraldo pela identificação do beija-flor. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida à primeira autora. Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Código Financeiro 001.

## Referências

Aoki-Gonçalves, F., Dantas, Q. M. V., De Beauclair Guimarães, T., Solís Neffa, V., Palma-Silva, C., 2020. High gene flow maintains wide-range species cohesion in a Neotropical epiphyte (*Tillandsia aeranthos*, Bromeliaceae). Bot. J. Linn. Soc. 194, 239-252. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa040>

Barbará, T., Martinelli, G., Fay, M. F., Mayo, S. J., Lexer, C., 2007. Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude ‘inselbergs’, *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). Mol. Ecol. 16, 1981-1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03272.x>

Bastos, M. J. S. M., Bastos, L. P., Souza, E. H. D., Soares, T. L., Morais, D. V., Souza, F. V. D. D., Costa, M. A. P. D. C., 2017. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. Acta Bot. Bras. 31, 665-676. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0102>

Benzing, D.H., 2000. Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press, New York.

Büttow, M. V., 2012. Estudo do sucesso reprodutivo, dos padrões de cruzamento e do fluxo de pólen em *Aechmea winkleri*, uma espécie endêmica do sul do Brasil. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Büttow, M.V., Goetze, M., Pinheiro, F.G., Paggi, G.M., Zanella, C.M., Bered, F., 2020. Reproductive success of *Aechmea winkleri*, a clonal and self-incompatible bromeliad from the Atlantic rainforest. *Flora* 262, 151521. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151521>

Buzato, S., Sazima, M., Sazima, I., 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites 1. *Biotropica* 32, 824-841. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00621.x>

Canela, M. B. F., Sazima, M., 2003. *Aechmea pectinata*: A Hummingbird-dependent Bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in South-eastern Brazil. *Ann. Bot.* 92, 731-737. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg192>

Canela, M. B. F., Sazima, M., 2005. The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in southeastern Brazil: ornithophilous versus melittophilous features. *Plant biol.* 7, 411-416. <https://doi.org/10.1055/s-2005-865619>

Cavalcante, B. P., Souza, E. H. D., Williams, J. H., Versieux, L. M., 2019. Reproductive systems and post-pollination barriers between two closely related eubromelioids (Bromeliaceae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 192, 828–839. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz101>

Charlesworth, D., 2006. Evolution of plant breeding systems. *Curr. Biol.*, 16, R726-R735. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.068>

CETEC - Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 1983. Diagnóstico ambiental do Estado de Minas Gerais. Editora CETEC, Belo Horizonte.

CNCFlora. *Nidularium marigoii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Nidularium marigoii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Nidularium_marigoii)>. Acesso em 9 fevereiro 2021.

Endress, P. K., 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge: Cambridge University Press.

Faegri, K., L., Van Der Pijl., 1980. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford, England. 244 pp

Fernandes, F.C., Portella, L.R., Oliveira, A.M.S., Faria, A.P.G., A.P. Luizi-Ponzo., 2019. Morfologia polínica e potencial germinativo de espécies de *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae Juss.) ocorrentes no Parque Estadual de Ibitipoca (Minas Gerais, Brasil). XIV Congresso de Ecologia. <http://www.seb-ecologia.org.br/revistas/indexar/xivceb/pdf/124.pdf>

Field, D. L., Ayre, D. J., Whelan, R. J., Young, A. G., 2008. Relative frequency of sympatric species influences rates of interspecific hybridization, seed production and seedling performance in the uncommon *Eucalyptus aggregata*. J. Ecol. 96, 1198–1210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2008.01434.x>

Forzza, R. C., Costa, A. F., Leme, E. M. C., Versieux, L. M., Wanderley, M. G. L., Louzada, R. B., Monteiro, R. F., Judice, D. M., Fernandez, E. P., Borges, R. A. X., Penedo, T. S. A., Monteiro, N. P., Moraes, M.A., 2013. Bromeliaceae. In: Martinelli G, Moraes MA, eds. Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson & Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 315–397

Gardner, C. S., 1984. Natural hybridization in *Tillandsia* subgenus *Tillandsia*. *Selbyana*, 7: 380–393.

Gentry, A. H., 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6, 64–69.

Givnish, T. F., 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., Winter, K., 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* 98: 872–895. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000059>

Givnish, T. F., 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., Winter, K., 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol.* 71, 55–78. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.010>

Godoy, F. M. R., Lenzi, M., Ferreira, B. H. S., Silva, L. V., Zanella, C. M., Paggi, G. M., 2018. High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 187, 672–688. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy037>

Goetze, M., Capra, F., Büttow, M. V., Zanella, C. M., Bered, F., 2018. High genetic diversity and demographic stability in *Aechmea kertesziae* (Bromeliaceae), a species of sandy coastal plains (*restinga habitat*) in southern Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 186, 374–388. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box103>

Gouda, E. J., Butcher, D., Gouda, C. S. (cont.updated). *Encyclopaedia of Bromeliads*, Version 4. University Utrecht Botanic Gardens. <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> (accessed: 18 January 2021).

Grant, K., Grant, V. 1968. Hummingbirds and their flowers. Columbia University Press, New York, New York. 115 pp

Hiscock, S. J., Allen, A. M., 2008. Diverse cell signalling pathways regulate pollen–stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* 179, 286–317. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02457.x>

Kaehler, M., Varassin, I. G., & Goldenberg, R., 2005. Polinização em uma comunidade de bromélias em Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná, Brasil. *Braz. J. Bot.* 28, 219-228. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200003>

Kamke, R., Schmid, S., Zillikens, A., Lopes, B. C., & Steiner, J., 2011. The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. *Flora* 206, 749-756. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.12.004>

Kearns, C. A., Inouye, D. W., 1993. Techniques for pollination biologists. Niwot: University Press of Colorado.

Köppen, W., 1948. Climatology: with a study of the earth's climates. (Economic Culture Fund: Mexico, MEX)

Le Saout, S., Hoffmann, M., Shi Y., Hughes, A., Bernard, C., Brooks, T. M., Bertzky, B., Butchart, S. H. M., Stuart, S. N., Badman, T., Rodrigues, A. S. L., 2013. Protected areas and effective biodiversity conservation. *Science* 342, 803–805. <https://doi.org/10.1126/science.1239268>

Leme, E. M. C., 2000. Bromélias da Mata Atlântica: Nidularium. Ed. Salamandra. Rio de Janeiro.

Lenzi, M., Matos, J. Z., Orth, A. I., 2006. Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). Acta Bot. Bras. 20, 487–500. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000200024>

Lenzi, M., Paggi, G. M., 2020. Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophytic species of outcrops of iron stones in central-western Brazil. Plant Species Biol. 35, 97–108. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12261>

Lloyd, D. G., Schoen, D. J., 1992. Self- and Cross-Fertilization in Plants. I. Functional dimensions. Int. J. Plant. Sci. 153, 358–369. <https://doi.org/10.1086/297040>

Lopes, A. V., Machado, I. C., 1999. Pollination and reproductive biology of *Rauvolfia grandiflora* (Apocynaceae); secondary pollen presentation, herkogamy and self-incompatibility. Plant Biol., New York, 1, 547-553. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1999.tb00782.x>

Luther, H. E., 1984. A hybrid *Pitcairnia* from Western Ecuador. J. Bromeliad Soc. 34, 272–274.

Luther, H. E., 1985. Notes on hybrid *Tillandsia* in Florida. Phytologia, 57, 175– 176

Machado, C. G., Semir, J., 2006. Flowering phenology and floral biology of some ornitophilous Bromeliaceae of an Atlantic forest area in southeastern Brazil. Braz. J. Bot. 29, 163–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100014>

Machado, C. G., 2009. Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Zoologia, 26, 255-265. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000200008>



Mallet, J., Beltrán, M., Neukirchen, W., Linares, M., 2007. Natural hybridization in heliconiine butterflies: the species boundary as a continuum. *BMC Evol. Biol.* 7, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-28>

Martinelli, G., 1994. Reproductive biology of Bromeliaceae in Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. Unpublished PhD Thesis, University of St. Andrews

Martinelli, G., Moraes, M.A., 2013. Livro Vermelho da Flora do Brasil. (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio: Rio de Janeiro, RJ, BRA).

Martinelli, G., Vieira, C. M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A. F., Forzza, R. C., 2008. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59, 209–258. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859114>.

Maruyama, P. K., Justino, D. G., Oliveira, P. E., 2016. Does intraspecific behavioural variation of pollinator species influence pollination? A quantitative study with hummingbirds and a Neotropical shrub. *Plant Biol.* 18, 913-919. <https://doi.org/10.1111/plb.12492>

Matallana, G., Godinho, M. A., Guilherme, F. A. G., Belisario, M., Coser, T. S. Wendt, T., 2010. Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Syst. Evol.* 289, 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0332-z>

Matallana, G., Oliveira, P. E., Silva, P. R. R. Wendt, T., 2016. Post-pollination barriers in an assemblage of Bromeliaceae in south-eastern Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 181: 521–531. <https://doi.org/10.1111/boj.12406>

McWilliams E. L., 1974. Evolutionary ecology. In: Smith L. B., Downs R. J. (eds.) Bromeliaceae (Pitcairnioideae). Flora Neotropica Monograph No. 14. Hafner Press, New York, pp. 40–45.

Menini Neto, L., Alves, R. J. V., Barros, F. D., Forzza, R. C., 2007. Orchidaceae do parque estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. Acta Bot. Bras. 21, 687–696. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000300015>

Monteiro, R. F., Forzza, R. C., 2008. A família Bromeliaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 7-33.

Mota, M. R., Pinheiro, F., Leal, B. S. S., Wendt, T., Palma-Silva, C., 2019. The role of hybridization and introgression in maintaining species integrity and cohesion in naturally isolated inselberg bromeliad populations. Plant Biol. 21, 122-132. <https://doi.org/10.1111/plb.12909>

Neri, J., Wendt, T., Leles, B., Dos Santos, M. F., Palma-Silva, C., 2017. Variation in reproductive systems facilitates species boundaries of sympatric *Vriesea* (Bromeliaceae). Bot. J. Linn. Soc. 184, 272-279. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box026>

Newstrom, L. E., Frankie, G. W., Baker, H. G., 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. Biotropica 26, 141–159. <https://doi.org/10.2307/2388804>

Nunes-Freitas, A. F., Rocha, C. F. D., 2011. Reproductive phenology and flower visitors' guild of *Canistropsis microps* (Bromeliaceae) in an Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. J. Nat. Hist. 45, 1021-1034. <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.552797>

Oliveira-Filho, A. T., Fontes, M. A. L., Viana, P. L., Valente, A. S. M., Salimena, F. R. G., Ferreira, F. M., 2013. O mosaico de fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca. In: 'Flora do Parque Estadual do Ibitipoca e seu entorno'. (Eds RC Forzza, L Menini Neto, FRG Salimena, DC Zappi) pp. 54–93. (Editora UFJF: Juiz de Fora, MG, BRA)

Paggi, G. M., Silveira, L. C. T., Zanella, C. M., Bruxel, M., Bered, F., Kaltchuk-Santos, E., Palma-Silva, C., 2012. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Species Biol.* 28, 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2012.00374.x>

Palma-Silva, C., Wendt, T., Pinheiro, F., Barbará, T., Fay, M. F., Cozzolino, S., Lexer, C., 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol. Ecol.* 20, 3185-3201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05143.x>

Piacentini, V. Q., Aleixo, A., Agne, C. E., Maurício, G. N., Pacheco, J. F., Bravo, G. A., Brito, G. R. R., Naka, L. N., Olmos, F., Posso, S., Silveira, L. F., Betini, G. S., Carrano, E., Franz, I., Lees, A. C., Lima, L. M., Pioli, D., Schunck, F., Amaral, F. R., Bencke, G. A., Cohn-Haft, M., Figueiredo, L. F. A., Straube, F. C., Cesari, E., 2015. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Ver. Bras. Ornitol.* 23, 91–298.

Pool-Chalé, M., Ramírez-Morillo, I., Carnevali Fernández-Concha, G., Hornung-Leoni, C. T., 2018. Reproductive biology of *Aechmea bracteata* (Sw.) Griseb. (Bromelioideae: Bromeliaceae). *Plant Biol.* 20, 113-120. <https://doi.org/10.1111/plb.12645>

Queiroz, J. A., Quirino, Z. G. M., Lopes, A. V., Machado, I. C., 2016. Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: a bromeliad pollinated by bats, opossum

and hummingbirds in a tropical dry forest. *J. Arid Environ.* 125, 21-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.09.015>

Ramírez, N., Brito, Y., 1990. Reproductive biology of tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *Am. J. Bot.* 77, 1260–1271.  
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11378.x>

Ramírez Morillo, I. M., Chi May, F., Carnevali, G., May Pat, F., 2009. It takes two to tango: self incompatibility in the bromeliad *Tillandsia streptophylla* (Bromeliaceae) in Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 57, 761-770.

Ramírez-Rosas, K., Aguirre-Jaimes, A., Ramírez-Morillo, I. M., García-Franco, J. G., 2020. Floral biology and potential hybridization of three sympatric epiphytic bromeliads in Veracruz, Mexico. *Plant Species Biol.* 35, 197–209. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12279>

Read, R. W., 1984. Natural hybridization: the problem. In: S. Gardner [ed.], *Proceedings of the 1982 World Bromeliad Conference*, 98–104. Mission Press, Corpus Christi, Texas, USA.

Rech, A. R., Avila, JR, R. D., Schlindwein, C., 2014. Síndromes de polinização: especialização e generalização. *Biologia da polinização*, 172-180.

Rocca, M. A., Sazima, M., 2013. Quantity versus quality: identifying the most effective pollinators of the hummingbird-pollinated *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae). *Plant Syst. Evol.* 299, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0706-5>.

Rodela, L. G., 2000. Distribuição de campos rupestres e cerrados de altitude na Serra do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Rogalski, J. M., Reis, A., Reis, M. S. D., Hmeljevski, K. V., 2009. Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. Rev. Bras. Bot. 32, 691–702. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042009000400008>.

Santos-Silva, F., Venda, A. K. L., Hallbritter, H. M., Leme, E. M., Mantovani, A. Forzza, R.C., 2017. Nested in chaos: Insights on the relations of the ‘*Nidularioid Complex*’ and the evolutionary history of *Neoregelia* (Bromelioideae-Bromeliaceae). Brittonia 69, 133–147. <https://doi.org/10.1007/s12228-017-9460-x>

Sazima, I., Buzato, S. Sazima, M., 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. Bot. Acta. 109, 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1996.tb00555.x>.

Schmid, S., Schmid, V. S., Kamke, R., Steiner, J., Zillikens, A., 2010. Association of three species of *Strymon Hübner* (Lycaenidae: Theclinae: Eumaeini) with bromeliads in southern Brazil. J. Res. Lepid. 42, 50–55.

Scrok, G. J., Varassin, I. G., 2011. Reproductive biology and pollination of *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae). Acta Bot. Bras. 25, 571-576. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000300009>

Siqueira Filho, J. A. D., Machado, I. C. S., 2001. Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, nordeste do Brasil. Acta Bot. Bras. 15, 427-443. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062001000300011>

Souza, E. H., Versieux, L. M., Souza, F. V. D., Rossi, M. L., Carvalho Costa, M. A. P., Martinelli, A. P., 2017. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and

their relationships to breeding systems. *Sci. Hortic.* 223, 53-61. <https://doi.org/10.1111/boj.12424>

Versieux L. M., Wanderley M. G. L., 2015. Bromélias gigantes do Brasil. Natal: Capim Macio & Offset.

Vervaeke, I., Derosse, R., Proft, M. P., 2003. Interspecific and intergeneric hybridization. *Acta Hortic.* 624, 133–159.

Vosgueritchian, S. B., Buzato, S., 2006. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. *Braz. J. Bot.* 29, 433-442. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000300010>

Wendt, T., Paz, N. P. L., Rios, R. I., 2000. A morphometric analysis of a putative hybrid between *Pitcairnia albiflos* and *Pitcairnia staminea* (Bromeliaceae). *Selbyana* 21, 132– 136.

Wendt, T., Canela, M. B. F., Klein, D. E., Rios, R. I., 2002. Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Syst. Evol.* 232, 201–212. <https://doi.org/10.1007/s006060200043>.

Wendt, T., Canela, M. B. F., Faria, A. P. G., Rios, R. I., 2001. Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Am. J. Bot.* 88, 1760-1767. <https://doi.org/10.2307/3558350>.

Wendt, T., Coser, T. S., Matallana, G., Guilherme, F. A. G., 2008. An apparent lack of prezygotic reproductive isolation among 42 sympatric species of Bromeliaceae in southeastern Brazil. *Plant Syst. Evol.* 275, 31-41.

Wolf, P. G., Campbell, D. R., Waser, N. M., Sipes, S. D., Toler, T. R., Archibald, J. K., 2001. Test of pre- and post-pollination barriers to hybridization between sympatric species of *Ipomopsis* (Polemoniaceae). *Am. J. Bot.* 88, 213–219. <https://doi.org/10.2307/2657012>

Wolowski, M., Ashman, T.L., Freitas, L., 2013. Community-wide assessment of pollen limitation in hummingbird-pollinated plants of a tropical montane rain forest. *Ann. Bot.* 112, 903-910. <https://doi.org/10.1093/aob/mct140>.

Zanella, C. M., Palma-Silva, C., Goetze, M., Bered, F., 2016. Hybridization between two sister species of Bromeliaceae: *Vriesea carinata* and *V. incurvata*. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 491–504. <https://doi.org/10.1111/boj.12424>

Zanella, C. M., Janke, A., Palma-Silva, C., Kaltchuk-Santos, E., Pinheiro, F. G., Paggi, G. M., Soares, L. E. S., Goetze, M., Büttow, M. V., Bered, F., 2012. Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genet. Mol. Biol.* 35, 1020-1026. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600017>

## **CAPÍTULO 2**



#### **4. Biologia reprodutiva de *Vriesea penduliflora* L.B. Sm. (Bromeliaceae): uma bromélia da Floresta Atlântica ameaçada de extinção**

ALINE MYSTICA SILVA DE OLIVEIRA<sup>1\*</sup>, HAGDA CAETANO DE OLIVEIRA, ANA PAULA GELLI DE FARIA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Bairro São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento Botânica, Campus Universitário, R. José Lourenço Kelmer s/n, Bairro São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil

**Manuscrito formatado de acordo com as normas da Revista Plant Species Biology.**

**Resumo:** Bromeliaceae apresenta distribuição essencialmente neotropical, com elevada riqueza de espécies e endemismo na Floresta Atlântica. No presente estudo, investigamos a biologia reprodutiva e a ecologia da polinização de *Vriesea penduliflora*, espécie endêmica da Serra da Mantiqueira e ameaçada de extinção. Em nível populacional, a espécie apresentou padrão fenológico de floração anual e estratégia de florescimento individual caracterizada como “steady state”. A antese é diurna e as flores permanecem abertas por 11 horas. A produção de néctar foi contínua durante a antese, com volume médio produzido de 101,78  $\mu$ L e conteúdo médio de açúcares de 27,69 mg. As flores de *V. penduliflora* apresentam atributos compatíveis à síndrome de ornitofilia. O beija-flor *Colibri serrirostris* foi considerado seu principal polinizador, mas *Apis mellifera* também foi frequentemente observada polinizando suas flores. *Vriesea penduliflora* é autocompatível, com potencial tanto para autofecundação quanto para cruzamento. A espécie, no entanto, não produz frutos sob autopolinização espontânea, sendo dependente do serviço do polinizador. Acreditamos que a ocorrência de florivoria ocasionada por formigas do gênero *Camponotus* possa estar associada ao baixo sucesso reprodutivo apresentado pela espécie em condições naturais. *Vriesea penduliflora* está sujeita ao declínio contínuo da qualidade de *habitat*, principalmente devido à incêndios recorrentes em sua já limitada área de ocorrência. Desse modo, sugerimos que os esforços de conservação para *V. penduliflora* devem se concentrar, principalmente na conservação do *habitat* e de seus polinizadores.

**Palavras-chave:** autocompatibilidade, biologia da polinização, florivoria, Serra da Mantiqueira, sucesso reprodutivo.

## Introdução

Bromeliaceae caracteriza-se como um grupo altamente diversificado de plantas monocotiledôneas essencialmente neotropicais (Benzing, 2000). A família apresenta elevada riqueza, diversidade e endemismo, tanto genérico como específico no Domínio Atlântico, sendo este um de seus principais centros de diversidade (Martinelli et al., 2008; Givnish et al., 2011). A maioria das espécies apresenta distribuição restrita, com pequenas populações e alta especificidade de *habitat* (Martinelli & Moraes, 2013). Muitas espécies de Bromeliaceae são microendêmicas ou regionais e formam núcleos de endemismo (Zanella et al., 2012).

O gênero *Vriesea* Lindl. (Tillandsioideae) apresenta seu centro de diversidade na Mata Atlântica brasileira, e neste bioma foi registrada a maior riqueza específica para o gênero (Wanderley & Martins, 2007; Forzza et al., 2015). Considerando o número absoluto de espécies de plantas ameaçadas de extinção, *Vriesea* é o segundo gênero mais ameaçado do Brasil devido à contínua perda e degradação do *habitat* e à distribuição restrita, característica de muitas espécies pertencentes ao gênero (Martinelli & Moraes, 2013). Este é o caso de *Vriesea penduliflora* L.B.Sm., endêmica do Brasil e com populações restritas à Serra da Mantiqueira. Essa espécie foi avaliada como “Em Perigo” pelo Livro Vermelho da Flora Brasileira (CNC Flora, 2013). A fragmentação e a destruição do *habitat* estão entre as principais ameaças à diversidade biológica (Kuussaari et al., 2009). *Vriesea penduliflora* está sujeita ao declínio contínuo na qualidade do *habitat*, principalmente devido à ocorrência de incêndios em alguns áreas de ocorrência (Martinelli & Moraes, 2013), o que pode agravar ainda mais a situação da espécie em seu já limitado *habitat* natural em curto e longo prazo.

O conhecimento dos aspectos do sucesso reprodutivo é fundamental para a compreensão da evolução e manutenção das espécies, bem como para o desenvolvimento de estratégias de conservação bem-sucedidas (Büttow et al., 2020). As bromélias têm sido amplamente estudadas em relação a muitos aspectos de sua biologia reprodutiva, tais como: sistemas de reprodução, biologia floral, fenologia de floração, ecologia de polinização e sucesso reprodutivo (Wendt, Canela, Klein, & Rios, 2002; Machado & Semir, 2006; Matallana et al., 2010; Paggi et al., 2013; Marques, Tagliati, & Faria, 2015; Magalhães, Maruyama, Tavares, & Martins, 2018; Büttow et al., 2020; Lenzi & Paggi, 2020; Velásquez-Noriega et al., 2020). Apesar do crescente número de estudos sobre aspectos reprodutivos em Bromeliaceae, ainda há uma grande lacuna de conhecimento a ser preenchida, sobretudo, considerando o grande número e diversidade de representantes da família, os quais desenvolveram uma grande diversidade de histórias de vida, estruturas vegetativas e florais, bem como estratégias reprodutivas (Pool-Chalé et al., 2018).

A família exibe grande variação nos sistemas reprodutivos (Benzing, 2000). Tanto a autogamia quanto a autoincompatibilidade foram registradas em Bromeliaceae (Matallana et al., 2010; Wolowski, Ashman, & Freitas, 2013). Diversas espécies do gênero *Vriesea* são autocompatíveis (Martinelli, 1994; Paggi et al., 2007; Matallana et al., 2010; Rocca & Sazima, 2013; Wolowski et al., 2013) e seus principais polinizadores são beija-flores, morcegos e insetos (Martinelli, 1994; Sazima, Buzato, & Sazima, 1996; Varassin & Sazima, 2000; Kaehler, Varassin, & Goldenberg, 2005; Schmid, Schmid, Kamke, Steiner, & Zillikens, 2011; Wolowski et al., 2013 ; Magalhães et al., 2018).

A ornitofilia é o principal sistema de polinização em Bromeliaceae e os beija-flores são seus principais polinizadores (Benzing, 2000; Givnish et al., 2014). As bromélias representam cerca de 30 a 45% dos recursos alimentares, principalmente néctar, usados por beija-flores na Floresta Atlântica (Sazima, Buzato, & Sazima, 1996; Buzato, Sazima & Sazima, 2000; Vizentin-Bugoni, Maruyama, & Sazima, 2014). Bromeliaceae também fornece alimento e abrigo para uma ampla fauna associada e atrai uma variedade de polinizadores durante o período de floração, caracterizando-se como amplificadoras da biodiversidade local (Rocha et al., 2004), especialmente as chamadas “bromélias-tanque”, as quais atuam como espécies-chave para a manutenção da biodiversidade e da complexidade estrutural de diversos ambientes (Benzing, 2000).

Neste trabalho, investigamos o sistema reprodutivo, a fenologia e a ecologia da polinização de *Vriesea penduliflora*, uma espécie endêmica da Serra da Mantiqueira e ameaçada de extinção. As seguintes questões motivaram nosso estudo: (i) Qual é a natureza dos sistemas de cruzamento da espécie? (ii) Quais são as síndromes de polinização de *V. penduliflora*? (iii) Quais são os polinizadores da espécie? (iv) A espécie é dependente de animais para a polinização? (v) Qual é a taxa de sucesso reprodutivo de *V. penduliflora* sob condições naturais? Para tanto, investigamos a fertilidade e a viabilidade de seus indivíduos por meio dos seguintes parâmetros: produção de flores, frutos e formação de sementes. Nossos resultados fornecem recomendações para o desenvolvimento de estratégias de conservação diante das ameaças a que a espécie está submetida em seu já restrito *habitat* natural.

## **Material e métodos**

### **Área de estudo**

O estudo foi realizado no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), localizado na Serra da Mantiqueira, no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. O PEIB localiza-se hidrograficamente na região do Alto Rio Grande e Alto Paraíba (Menini Neto et al., 2007). O clima da região é classificado como Cwb, segundo Köppen (1948) com invernos secos e verões amenos a chuvosos. Com temperaturas médias de 12 a 15 ° C na época mais fria e entre 18 a 22° C na época mais quente, ocorrem no parque altitudes superiores a 950 m, atingindo até 1784 m em seu ponto mais elevado, correspondente ao Pico da Lombada (Rodela & Tarifa, 2002; Menini Neto, Alves, Barros, & Forzza, 2007).

Em decorrência dos gradientes altitudinais, fatores edáficos e disponibilidade de umidade, no parque, ocorre um mosaico de fisionomias vegetais, compreendendo: floresta nebulosa, nanofloresta nebulosa, arbustal nebulosa, savana arbustivo-arbórea nebulosa, savana arbustiva nebulosa, campina lenhosa nebulosa e campina lenhosa (Oliveira-Filho et al. 2013). O Parque Estadual do Ibitipoca está entre as áreas prioritárias para a conservação da flora no Estado de Minas Gerais, citada na categoria de importância biológica especial, sendo este o nível máximo adotado (Drummond, Martins, Machado, Sebaio, & Antonini, 2005). As populações de *V. penduliflora* estudadas localizam-se no parque em elevações de c. 1.640-1.670 m acima do nível do mar (asl) (coordenadas 21°42'03.5 "S - 43°52'27.1" W).

### **Fenologia reprodutiva**

As observações fenológicas foram realizadas no período de outubro a junho, entre os anos de 2017 e 2019. Foi registrada a presença ou a ausência das seguintes fenofases: escape da inflorescência; inflorescência jovem; botão floral; flores abertas, flores senescentes; frutos imaturos e frutos maduros, monitoradas em visitas a campo a cada dois meses para um total de 12 indivíduos. A classificação dos padrões fenológicos de floração seguiu Newstrom, Frankie e Baker (1994). O pico de floração foi considerado o período no qual mais de 50% dos indivíduos amostrados apresentavam flores (Machado & Semir, 2006).

### **Biologia floral**

Os dados sobre a biologia floral foram coletados em 14 indivíduos de *V. penduliflora* no campo e / ou trazidos do campo e cultivados na Estação Experimental de Cultivo e Manutenção de Plantas da UFJF. Um total de 16 flores foram amostradas para registrar o volume de néctar produzido (µl), a porcentagem e o conteúdo de açúcares no néctar, a cor das

pétalas e brácteas, a presença ou ausência de odor, o número de flores abertas por dia, o comprimento do tubo da corola (cm) e o tempo de antese. A determinação do volume do néctar foi realizada com microseringas de 50 µL (Hamilton, NV, EUA) e a concentração de açúcares no néctar foi determinada com o uso de um refratômetro portátil com escala BRIX de 0 a 33% (Atago, Tóquio, Japão). As medições foram realizadas em diferentes horários ao longo do dia, em flores de *V. penduliflora* (n = 16) previamente isoladas.

A receptividade do estigma foi testada quimicamente utilizando solução de peróxido de hidrogênio a 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em diferentes horários do dia. A consequente liberação de bolhas de oxigênio foi utilizada como indicador da receptividade do estigma (Kearns & Inouye, 1993). A disponibilidade de pólen foi analisada tocando as anteras e observando-se a consequente liberação de pólen.

### **Sistema reprodutivo**

Os experimentos de polinização manual controlada foram conduzidos em 2019, utilizando plantas transplantadas do campo para casa de vegetação. Os botões florais foram isolados antes dos experimentos. Cada flor recebeu um dos seguintes tratamentos: (1) autopolinização manual, a flor foi polinizada manualmente com pólen fresco obtido da mesma flor; (2) autopolinização espontânea, as flores não foram manipuladas; (3) polinização cruzada manual, os botões florais foram emasculados e as flores foram polinizadas manualmente usando pólen fresco obtido de outra planta da mesma espécie (garantimos que essas duas plantas eram de populações diferentes para evitar o uso de rametes dos mesmos genetes); ou (4) agamospermia, os botões florais foram emasculados e a inflorescência foi ensacada. Cada inflorescência foi identificada e as pétalas das flores foram codificadas com tinta acrílica de cores diferentes de acordo com o experimento de polinização. As inflorescências foram monitoradas até que a frutificação pudesse ser avaliada. Para cada tratamento, a frutificação foi calculada como a porcentagem do número de frutos formados dividido pelo número de flores testadas.

Os índices de autofertilidade (AFI) e autocompatibilidade (SCI) foram calculados (Lloyd & Schoen, 1992). O índice de autofertilidade foi calculado como a porcentagem de frutificação (AFI<sub>f</sub>) ou média de sementes por fruto (AFI<sub>s</sub>) produzida por autopolinização espontânea dividida pela porcentagem de frutificação ou média de sementes por fruto, via polinização cruzada manual. O índice de autocompatibilidade foi calculado dividindo a porcentagem de frutificação (SCI<sub>f</sub>) ou média de sementes por fruto (SCI<sub>s</sub>) via autopolinização manual pela porcentagem de frutificação ou média de sementes por fruto por polinização

cruzada manual. Segundo Ramírez & Brito (1990), as espécies autocompatíveis ou parcialmente autocompatíveis apresentam valores entre 0,30 e 1,00. Valores abaixo de 0,30 caracterizam espécies autoincompatíveis.

O desenvolvimento dos frutos foi monitorado periodicamente e cerca de quatro meses após a realização dos cruzamentos experimentais, o número de sementes produzidas por fruto em cada tratamento foi contabilizado. Os valores médios de sementes produzidas por fruto nos tratamentos de polinização foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA). Após a ANOVA unilateral, as médias obtidas para cada tratamento avaliado foram comparadas pelo teste de Tukey (HSD, N desigual) a 5% de probabilidade usando o software R (R Development Core Team 2019).

### **Sucesso reprodutivo**

Além dos cruzamentos experimentais, a avaliação da polinização aberta natural foi realizada em 8 indivíduos que permaneceram no campo ao longo dos experimentos. O sucesso reprodutivo foi avaliado nesses indivíduos estimando-se os seguintes parâmetros: 1) altura da planta e inflorescência (cm); 2) potencial reprodutivo (número total de flores produzidas / indivíduo); 3) taxa de frutificação (fração das flores desenvolvidas em frutos maduros sob condições de polinização natural); 4) número de sementes produzidas / fruto. A taxa de frutificação foi baseada na contagem dos frutos maduros que produziram sementes. O número de sementes foi determinado em uma amostra de 16 frutos.

### **Visitantes florais**

Ao longo da antese, a presença de polinizadores e visitantes florais foi realizada por meio de observações naturalísticas e registrada por meio de vídeos e fotografias, no período da manhã (9h) até o início da tarde (15h), em outubro de 2017 e em janeiro e março de 2019, totalizando 40 horas de observação. Os beija-flores foram identificados no campo e a nomenclatura taxonômica seguiu as recomendações do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (Piacentini et al., 2015).

## **Resultados**

### **Fenologia reprodutiva**

O florescimento de *Vriesea penduliflora* ocorreu no período chuvoso, com início em novembro. Foram observadas as seguintes fenofases: escape floral / inflorescência jovem;

botão floral e flores abertas, estendendo-se até o mês de fevereiro. O pico de floração da espécie ocorreu no mês de janeiro. A espécie apresentou apenas um evento de floração / ano. A estratégia de floração de *V. penduliflora* é do tipo de disponibilidade regular ou "steady state" (sensu Gentry, 1974). Em escala populacional, o padrão foi caracterizado como intermediário, podendo variar de um a cinco meses de floração, de acordo com os padrões propostos por Newstrom et al. (1994). A frutificação iniciou em fevereiro, estendendo-se até julho.

### **Sucesso reprodutivo**

A altura média das plantas de *V. penduliflora* incluindo a inflorescência foi de 118,16 cm  $\pm$  6,45 e a altura média da inflorescência foi de 98 cm  $\pm$  2,60 (Tabela 1). O potencial reprodutivo da espécie apresentou um número médio de 130 flores produzidas por indivíduo. Sob condições naturais, *V. penduliflora* apresentou taxa de frutificação de apenas 29,81%. Foram produzidas, em média, 156,06  $\pm$  27,03 sementes por fruto. Os frutos são do tipo cápsula e quando maduros apresentam tamanho médio de 3,4 cm de comprimento. As sementes têm comprimento médio de 0,47 cm  $\pm$  0,04 e são dotadas de apêndices plumosos, que evidenciam a ocorrência da síndrome de dispersão anemocórica. O comprimento médio das sementes com os apêndices plumosos foi de 1,77 cm  $\pm$  0,09.

### **Biologia floral e polinizadores**

*Vriesea penduliflora* apresenta inflorescência paniculada, laxa, excedendo a roseta foliar. As flores de *V. penduliflora* apresentam corolas de formato tubular, com comprimento médio de 3,5 cm e coloração amarela, assim como as sépalas. A espécie apresenta pedúnculo da inflorescência ereto, glabro, de coloração vermelha intensa. As brácteas do pedúnculo e as brácteas florais apresentam cor vermelha com ápice amarelo (Figura 1-a). O contraste entre o amarelo das flores e o vermelho do pedúnculo, torna as inflorescências muito vistosas e atrativas aos beija-flores.

O número médio de flores abertas por dia foi de 3,24  $\pm$  2,31 e variou de uma a, no máximo, sete flores abertas por indivíduo. Não observamos uma ordem de abertura das flores ao longo da inflorescência, as quais se desenvolveram de maneira aleatória. As flores são inodoras e apresentam antese diurna (com início às 6:00 horas). O período de disponibilidade das flores foi de aproximadamente 11 horas. Durante este período a produção de néctar foi constante, as anteras já estavam abertas, os grãos de pólen podiam ser removidos com facilidade e o estigma apresentava-se receptivo. As flores de *V. penduliflora* produziram um



volume médio de néctar de  $101,78 \mu\text{L} \pm 22,20$  e a produção foi contínua ao longo do período de antese da flor. A concentração de açúcares no néctar variou de 20% a 26%, com concentração média de  $24,67\% \pm 1,9$  e conteúdo médio de açúcares de 27,79 mg por flor.

**Tabela 1.** Características reprodutivas e parâmetros de fertilidade analisados em *Vriesea penduliflora*: Número (N), média (X), desvio padrão ( $\pm$  DP).

<b>Características Reprodutivas</b>	<b>N</b>	<b>X <math>\pm</math> DP</b>
Altura da planta com inflorescência	16	118,16
Altura da inflorescência	16	98
Flores por inflorescência	20	130
Número médio de flores abertas/dia	40	$3,24 \pm 2,31$
Comprimento da corola (mm) X $\pm$ s	6	$3,5 \pm 0,45$
Tamanho dos frutos	10	$3,4 \pm 0,16$
Sementes por frutos	16	$156,06 \pm 27,03$
Tamanho das sementes	30	$0,47 \pm 0,04$
Volume de néctar ( $\mu\text{L}$ )	30	$101,78 \mu\text{L} \pm 22,2$
Concentração de açúcares no néctar (%)	30	$24,67\% \pm 1,9$
Conteúdo de açúcares no néctar (mg)	30	27,69
Horário da antese	-	6:00 às 17:00
Disponibilidade da flor aos visitantes	-	11 horas
Horas de observação	-	40

Observamos duas classes de visitantes florais para *V. penduliflora*: o beija-flor, *Colibri serrirostris* e a abelha *Apis mellifera*, caracterizando um sistema de polinização misto (Figura 1- b, e). Ambos foram frequentes ao longo do dia durante todo o período de floração de *V.*

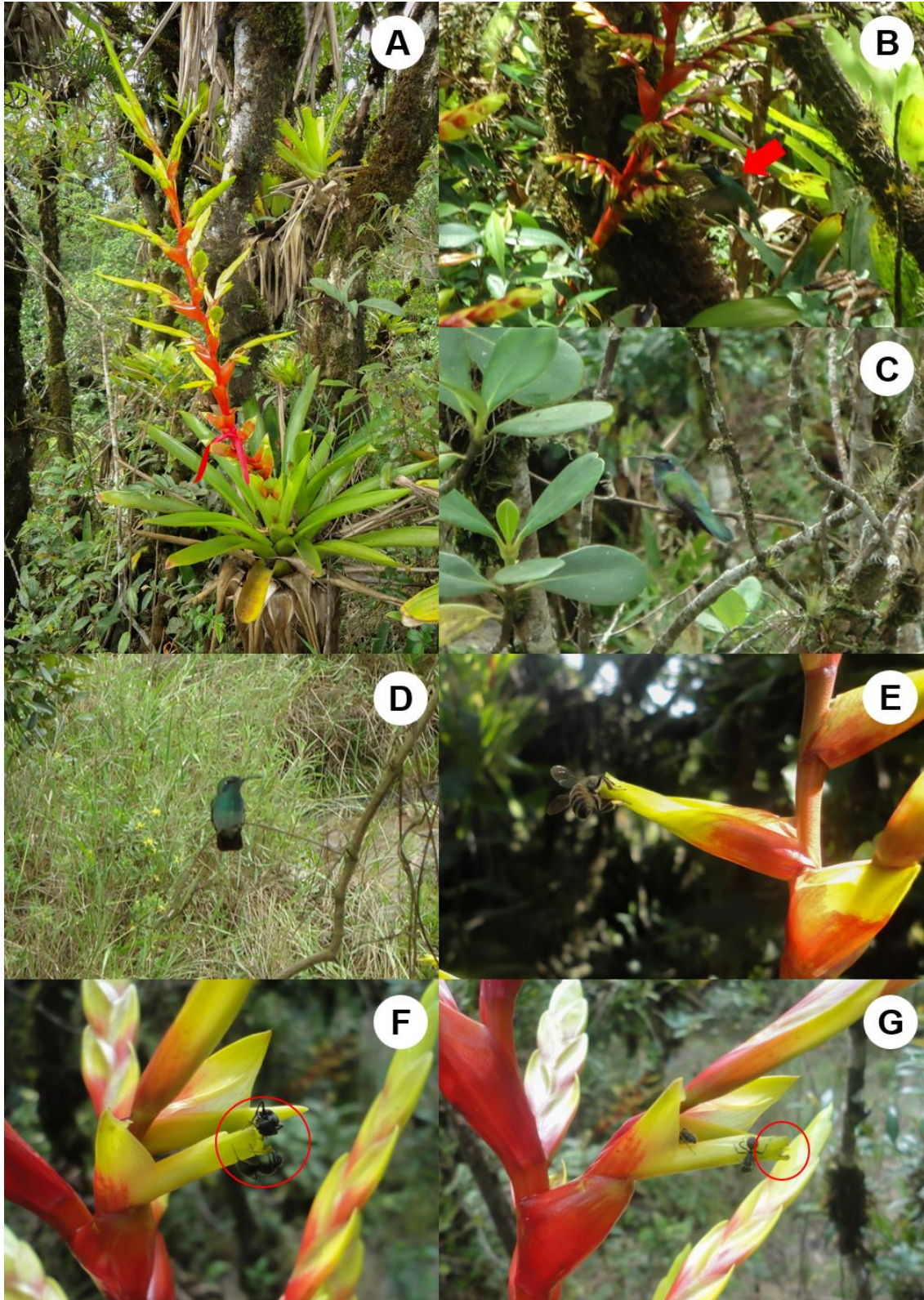
*penduliflora*. *Colibri serrirostris* foi o polinizador mais frequente, durante uma hora de observação, até 16 visitas do mesmo polinizador foram registradas em cada inflorescência. As visitas ocorreram ao longo de todo o dia e foram mais frequentes no período da manhã. A espécie permaneceu de três a seis segundos em cada flor, sendo o bico o principal local de deposição dos grãos de pólen.

Os beija-flores foram observados pairando em frente às flores coletando néctar, introduzindo seus bicos entre as pétalas em direção à base da corola, onde se localiza a câmara de néctar, entrando em contato com as anteras e o estigma, realizando, portanto, visitas legítimas às flores. As visitas dos beija-flores foram rápidas, com um curto intervalo de tempo entre as visitas, aproximadamente 15 minutos, por vezes, eles visitavam flores da mesma inflorescência, assim como, flores de indivíduos distintos. Ocasionalmente, entre os intervalos de visitas às flores, *C. serrirostris* foi observado, empoleirado em árvores próximas a *V. penduliflora*, exibindo comportamento agonístico em relação a outros beija-flores que tentavam se aproximar e emitiam vocalizações características.

A abelha *Apis mellifera* também foi considerada um polinizador legítimo de *V. penduliflora*, com alta frequência de visitas às suas flores. A espécie foi registrada visitando as flores das 9:00 às 15:00 horas, a abelha foi observada com maior frequência forrageando flores da mesma inflorescência, e, ocasionalmente, visitavam flores de inflorescências distintas. As abelhas pousavam na corola e se prendiam a ela usando as pernas e dobrando a parte ventral do corpo, acessando o tubo da corola, contactando as anteras e o estigma com a cabeça e a parte ventral do tórax (Figura 1- e).

O forrageio de flores, botões florais e estruturas vegetativas por formigas pertencentes ao gênero *Camponotus* foi frequentemente registrado no campo. Acreditamos que a ocorrência de florivoria possa estar relacionada à baixa frutificação apresentada pela espécie sob condições naturais. A presença contínua de formigas durante a floração (Figura 1- f, g) e seu registro em dois anos consecutivos na população estudada revelam que há uma relação muito mais comum entre as espécies de *Camponotus* e *V. penduliflora* do que um mero registro acidental. Um dos indivíduos selecionados aleatoriamente para o estudo da fenologia e do sucesso reprodutivo foi totalmente consumido pelas formigas no campo.

**Figura 1** (a) Inflorescência de *Vriesea penduliflora*. (b) *Colibri serrirostris* polinizando as flores de *V. penduliflora*. (c, d) *C. serrirostris* empoleirado em arbustos próximo a plantas de *V. penduliflora*. (e) *Apis melifera* polinizando flores de *V. penduliflora*. (f, g) *Camponotus rufipes* consumindo corolas de *V. penduliflora*.



### Sistema reprodutivo de *Vriesea penduliflora*

*Vriesea penduliflora* é autocompatível, considerando seu  $ISI_f$  de 0,79 e  $ISI_s$  de 1,15. Os tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada manual apresentaram a maior frutificação, os percentuais foram de 69,23% e 55%, respectivamente (Tabela 2). A taxa de frutificação sob condições naturais foi de apenas 29,81%, evidenciando baixa fertilidade natural. Nos tratamentos de autopolinização espontânea e agamospermia, não houve formação de frutos férteis.

**Tabela 2.** Frutificação e número médio de sementes viáveis por fruto (média  $\pm$  1 DP) após tratamentos de polinização em *Vriesea penduliflora*. O número de plantas indica quantas inflorescências diferentes estavam disponíveis para cada tratamento. Os índices de autofertilidade e autocompatibilidade são baseados na frutificação ou média de sementes por fruto em autopolinização espontânea, autopolinização e polinização cruzada.

Tratamento	Número de plantas	Taxa de frutificação	Sementes por fruto
Polinização cruzada manual	3	69.23% (9/13)	154.56 ( $\pm$ 45.20) <sup>a</sup> (n = 9 frutos)
Autopolinização espontânea	3	0 (0/16)	0 <sup>b</sup>
Autopolinização manual	3	55% (11/20)	179.18 ( $\pm$ 32.74) <sup>a</sup> (n = 11 frutos)
Polinização aberta	8	29.81% (311/1043)	156.06 ( $\pm$ 23.03) <sup>a</sup> (n = 16 frutos)

**Índice de Autofertilidade ( $AFI_f$ ) = 0; ( $AFI_s$ ) = 0**

**Índice de autocompatibilidade ( $ISI_f$ ) = 0.79; ( $ISI_s$ ) = 1.15**

O número de frutos formados e o número de flores testadas são apresentados entre parênteses (frutos / flores). O teste de ANOVA seguido do teste Tukey HSD foi realizado entre o número médio de sementes por fruto registrado após os tratamentos de polinização controlada ( $F = 29,54$ ) e entre os tratamentos de polinização aberta e controlada ( $F = 18,79$ ). Os valores seguidos por uma letra sobrescrita diferente dentro de uma coluna são significativamente diferentes de acordo com o teste t (valor  $P < 0,0001$ ).

A ANOVA unilateral seguida pelo teste de Tukey não detectou diferenças significativas entre os tratamentos de autopolinização manual, polinização cruzada e polinização natural com relação ao número médio de sementes produzidas (Tabela 2). O índice de autogamia foi zero, evidenciando que a espécie não é capaz de frutificar espontaneamente na ausência de polinizadores, sendo estes essenciais para a reprodução da espécie. Nossos resultados evidenciam que *V. penduliflora* requer a presença de agentes polinizadores para a produção de frutos férteis, sendo estes necessários para a reprodução tanto por meio de autopólen quanto de cruzamentos.

## Discussão

*Vriesea penduliflora* apresentou padrão de floração anual em nível de população e uma estratégia de florescimento individual caracterizada pelo padrão “steady state” (Gentry, 1974). A espécie floresceu na estação chuvosa com pico de floração no mês de janeiro. *Vriesea penduliflora* apresenta flores com corolas de formato tubular, com comprimento médio de 3,5 cm e coloração amarela. O número de flores abertas por dia variou de uma a no máximo sete flores por indivíduo e o número médio de flores abertas por planta a cada dia foi de  $3,24 \pm 2,31$ . Esses valores são semelhantes aos observados por Nunes, Briet, Galetto, Sazima, & Amorim (2018) para *V. altodaserrae* LBSm., cujo número de flores abertas por indivíduo por dia variou de uma a seis, com média de 3,4 flores abertas por dia. A estratégia de abertura de poucas flores por dia com período de floração relativamente longo, classificada como “steady state” por Gentry (1974), caracteriza uma disponibilidade regular ou constante de recursos alimentares aos visitantes florais.

Essa estratégia favorece o aumento de cruzamentos aleatórios entre indivíduos e o número de fecundações cruzadas na população (Siqueira-Filho & Machado, 2001). Esse padrão foi relatado por Martinelli (1994) para várias outras espécies pertencentes ao gênero *Vriesea*, tais como: *Vriesea flammea* LBSm., *V. haematina* LBSm., *V. paraibica* Wawra e *V. vagans* (LBSm.) LBSm., todas com antese diurna e flores, que se abrem por volta das 6h, assim como observado para *V. penduliflora*. O mesmo padrão também foi documentado para *V. carinata* Wawra, *V. ensiformis* (Vell.) Beer e *V. incurvata* Gaudich. (Araújo, Fischer & Sazima, 1994) e para *V. rodigasiana* E.Morren (Rocca & Sazima, 2013). O padrão fenológico “steady state” está amplamente disseminado entre as espécies da família Bromeliaceae. Para além do gênero *Vriesea*, também foi relatado para: *Canistrum aurantiacum* E.Morren (Siqueira-Filho & Machado, 2001); *Dyckia brevifolia* Baker (Rogalski, Reis, Reis, &

Hmeljevski, 2009); *Canistropsis micros* (E. Morren ex Mez) Leme (Nunes-Freitas & Rocha, 2011); *Encholirium spectabile* Mart. Ex Schult. f. (Queiroz, Quirino, Lopes, & Machado, 2016) e *Aechmea bracteata* (Sw.) Griseb. (Pool-Chalé et al., 2018). Essa estratégia ocorre comumente em plantas especializadas em um determinado tipo de polinizador (Stiles, 1978; Fleming, 1982) e é comum em espécies ornitófilas de Bromeliaceae (Martinelli, 1997).

Em *V. penduliflora* a produção de néctar foi contínua ao longo de toda a antese, o volume de néctar produzido variou de 75 a 129  $\mu\text{L}$  e o volume médio de néctar foi de 101,78  $\mu\text{L}$  com concentração média de açúcares de  $24,67\% \pm 1,9$ . Estes dados são compatíveis com os registrados para outras espécies ornitófilas congêneres. Segundo Martinelli (1994), para *V. altomacaensis* A.F.Costa, a concentração de açúcares no néctar foi de 24% e para *V. heterostachys* (Baker) L.B.Sm. a concentração de açúcares no néctar foi de 27,4%. Em *V. friburguensis* Mez., a concentração média de açúcares no néctar foi de 25,6% e o volume médio de néctar produzido foi de 23,75  $\mu\text{L}$  (Paggi et al., 2012). Para *V. altodaserrae*, uma outra espécie ornitófila, a concentração de açúcares no néctar foi de 26,5  $\mu\text{L}$  (Nunes et al., 2018). No caso das bromélias, o néctar é o recurso floral mais atrativo para os beija-flores (Bastos et al., 2017) sendo estes seus principais polinizadores (Benzing, 2000; Givnish et al., 2014).

A produção contínua de néctar durante o período de antese pode estimular a visitação de polinizadores, aumentando as chances de polinização (Lenzi & Paggi, 2020). *Vriesea penduliflora* possui atributos compatíveis com a síndrome de ornitofilia, tais como: inflorescências expostas, flores tubulares e inodoras, cores brilhantes ou contrastantes, antese diurna, néctar como recurso, apresentando concentração entre 20% e 32% (Grant & Grant, 1968; Faegri & Pijl, 1980). *Vriesea penduliflora* apresenta pedúnculo da inflorescência de cor vermelho intenso e as brácteas do pedúnculo apresentam cor vermelha com ápice amarelo. O contraste entre o amarelo das flores e o vermelho brilhante do pedúnculo, torna suas inflorescências muito vistosas e atrativas aos beija-flores. O beija-flor *Colibri serrirostris* apresentou comportamento de polinizador efetivo de *V. penduliflora* e foi um visitante frequente, as visitas foram mais frequentes pela manhã, por volta das 10h00 e no início da tarde, por volta das 13h00. Os beija-flores realizavam visitas legítimas às flores, a espécie foi observada introduzindo o bico entre as pétalas em direção à base da corola. Esse movimento induz os beija-flores a penetrarem na flor com seus bicos, enquanto coletam o néctar realizam a polinização, permitindo o contato das anteras com estigma receptivo (Bastos et al., 2017).

Nas visitas realizadas por *C. serrirostris* houve deposição de pólen no bico próximo às narinas, o que segundo Siqueira-Filho & Machado (2001) é comum em beija-flores não

ermitões de bico mais curto, como os da subfamília Trochilinae, os quais frequentemente são registrados como polinizadores de Bromeliaceae, inclusive de espécies pertencentes ao gênero *Vriesea*. Os principais visitantes de *V. altomacaensis* e *V. haematina* foram os beija-flores: *Stephanoxis lalandi* (Vieillot, 1818), *Clytolaema rubricauda* (Boddaert, 1783) e *Leucochloris albicollis* (Vieillot, 1818) e o único visitante das flores de *V. flammea* L.B.Sm. foi o beija-flor *Clytolaema rubricauda* (Martinelli, 1994). Rocca & Sazima (2013) registraram os beija-flores, *Amazilia versicolor* (Vieillot, 1818), *Thalurania glaucopis* (Gmelin, 1788) e *Ramphodon naevius* (Dumont, 1818) como polinizadores de *V. rodigasiana*, sendo *T. glaucopis*, de bico curto, seu polinizador mais eficaz. Os Troquilíneos, *Thalurania glaucopis* e *Leucochloris albicollis* foram os principais visitantes e polinizadores das flores de *V. altodaserrae* (Nunes et al., 2018). O beija-flor *Amazilia fimbriata* (Gmelin, 1788) foi registrado como importante polinizador de *V. neoglutinosa* Mez. (Magalhães et al., 2018).

Os beija-flores realizam visitas rápidas em cada indivíduo e podem voar por longas distâncias em curto espaço de tempo (Gill, 1985), visitando mais plantas do que visitantes que passam muito tempo em cada indivíduo. Esse comportamento pode favorecer a ocorrência de polinização cruzada (Canela & Sazima, 2003). *Colibri serrirostris* comumente estabelece territórios em torno das bromélias visitadas (manchas florais ricas em recursos) defendendo os territórios de forrageamento, por vezes apresentando comportamento agonístico e emitindo vocalizações características. Persegona, Corrêa e Roper (2009) observaram a ocorrência de fortes interações entre *C. serrirostris* e *Leucochloris albicollis*. Machado (2014) relatou a ocorrência de eventos agonísticos envolvendo várias espécies, entre as quais *C. serrirostris*. Os não ermitões tipicamente apresentam comportamento de forrageamento característico, possuem território (Stiles, 1975). No presente estudo, as visitas do beija-flor foram registradas em áreas mais abertas, com vegetação esparsa. *Colibri serrirostris* é uma espécie campestre, comum em cerrados e paisagens abertas (Sick, 1997; Silva, Souza, Bieber, & Carlos 2003), sendo incomum em áreas florestais (Machado, 2009).

*Apis mellifera* também foi frequentemente observada polinizando as flores de *V. penduliflora*. As abelhas visitaram as flores individualmente e permaneceram por longos períodos em suas inflorescências. A espécie é considerada um visitante floral dominante em diversas comunidades neotropicais (Souza, Maruyama, & Aoki, 2018) e comumente registrada como polinizadora de Bromeliaceae. *Apis mellifera* foi registrada como polinizadora das seguintes espécies: *Pitcairnia angustifolia* Aiton. (Fumero-Cabán & Meléndez-Ackerman, 2007), *Hechtia schottii* Baker (Ramírez Morillo et al., 2008), *Alcantarea nahoumii* (Leme) J.R.Grant. (Bastos et al., 2017). Foi considerada um visitante

muito frequente e abundante de *Dyckia brevifolia* (Rogalski et al., 2009) e relatada como uma eficiente polinizadora de *V. neoglutinosa* (Magalhães et al., 2018). No entanto, para *D. excelsa*, a espécie foi relatada apenas como um polinizador ocasional (Lenzi e Paggi, 2020). Em nosso estudo, consideramos que *A. mellifera* é um importante polinizador de *V. penduliflora*. Assim como reportado por Magalhães et al. (2018), para *V. neoglutinosa*, mesmo a carga de pólen trazida por polinizadores menos móveis, como abelhas e formigas (potencialmente contendo mais autopólen), é suficiente para produzir frutos e sementes, sobretudo, considerando-se que *V. penduliflora* é uma espécie autocompatível.

Os sistemas de polinização mistos podem ser mais efetivos se comparados àqueles que apresentam apenas um grupo de polinizador (Muchhala, Caiza, Vizúete, & Thomson, 2009). A ocorrência de sistemas mistos de polinização é amplamente documentada para a família Bromeliaceae (Canela & Sazima, 2005; Kamke, Schmid, Zillikens, Lopes, & Steiner, 2011; Schmid et al., 2011; Magalhães et al., 2018; Godoy et al., 2018; Lenzi e Paggi, 2020). Segundo Magalhães et al. (2018), em *V. neoglutinosa* a polinização foi promovida por grupos distintos de visitantes (beija-flores, abelhas e formigas). Em *Alcantarea nahoumii* foram registrados como polinizadores: beija-flores, abelhas, borboletas e o pássaro *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Bastos et al. 2017). Godoy et al. (2018) relataram falcões e beija-flores como polinizadores potenciais de *Bromelia hieronymi* Mez. e as borboletas foram consideradas seus polinizadores ocasionais. As espécies *Bromelia antiacantha* Bertol e *Dyckia brevifolia* Baker foram polinizadas por beija-flores e abelhas (Canela & Sazima, 2005; Rogalski et al., 2009). Para *D. excelsa*, beija-flores, abelhas e borboletas foram registrados como polinizadores (Lenzi & Paggi, 2020).

Observamos a ocorrência de florivoria ocasionada por formigas do gênero *Camponotus* em *V. penduliflora*. Esse processo pode estar associado ao baixo sucesso reprodutivo apresentado pela espécie. Sob condições naturais, a taxa de frutificação de *V. penduliflora* foi de apenas 29,8%, evidenciando baixa fertilidade natural, o que pode, em longo prazo, comprometer localmente a viabilidade da população. A incidência de florivoria e os danos dela decorrentes foram relatados para diversas outras espécies de Bromeliaceae. Cascante-Marín Oostermeijer, Wolf, e Den Nijs (2005) relataram que formigas cortadeiras (*Atta* sp.) cortavam os lobos da corola, os estames e o pistilo de *Werauhia gladioliflora* (H.Wendl.) J.R.Grant, reduzindo o conjunto de frutos produzido. Para essa mesma espécie, foi relatada a ocorrência de florivoria ocasionada por vespas, que provocaram uma redução de 70% em seu sucesso reprodutivo (Cascante-Marín, Wolf & Oostermeijer, 2009).



Grohme, Steiner & Zillikens (2007) observaram que os botões florais de *V. friburgensis* foram parasitados por vespas do gênero *Eurytoma*, que esterilizavam as flores, com isso, os botões não se abriam e secavam, impedindo a formação de frutos. Em *Puya nitida* Mez., os primórdios das inflorescências e flores foram afetados por Dípteros, Himenópteros e Coleópteros (Saldarriaga, 2014). A incidência de florivoria também foi relatada em *Tillandsia carlos-hankii* Matuda, nesse caso, ocasionada por vertebrados e insetos (Palacios-Mosquera, Mondragón & Santos-Moreno, 2019). Em *Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme foi relatada a ocorrência de florivoria ocasionada por formigas cortadeiras (Freitas et al., 2020). A herbivoria nos tecidos reprodutivos das plantas pode provocar severas consequências para o fitness (Carlson & Harms, 2007).

Estudos anteriores sobre sistemas de reprodução demonstraram a predominância da autocompatibilidade no gênero *Vriesea* (Martinelli, 1994; Paggi et al., 2007; Matallana et al., 2010; Rocca & Sazima, 2013; Wolowski et al., 2013). *Vriesea penduliflora* é autocompatível, nossos dados indicam o potencial da espécie tanto para autofecundação quanto para fecundações cruzadas. Nos tratamentos de polinização cruzada e autopolinização manual foram produzidos frutos férteis e elevado número de sementes. A espécie, no entanto, não produz frutos sob autopolinização espontânea, evidenciando sua dependência do serviço do polinizador para manter a viabilidade de suas populações naturais. Segundo Wolowski (2013) dentre as espécies *V. longicaulis* (Baker) Mez., *V. carinata* Wawra, *V. gradata* (Baker) Mez e *V. penduliflora* apenas a última não foi capaz de produzir sementes por meio de autopolinização espontânea, assim como observamos no presente estudo. Matallana et al. (2010) investigaram o sistema reprodutivo de diversas espécies de Bromeliaceae, dentre as quais, doze espécies pertencentes ao gênero *Vriesea*. Destas, somente *V. bituminosa* Wawra não produziu frutos sob autopolinização espontânea e apenas *V. longicaulis* apresentou autoincompatibilidade.

Embora a autocompatibilidade ocorra amplamente nas três subfamílias de Bromeliaceae (Matallana et al., 2010; Wolowski et al., 2013), a maioria das espécies autocompatíveis necessitam de serviços de polinização, pois, muitas vezes, a autopolinização espontânea não culmina na produção de sementes. A autocompatibilidade pode ser resultado de eventos de dispersão e fragmentação, o que comumente ocorre em plantas raras que exigem *habitats* específicos (Wendt et al., 2002) como é o caso de *V. penduliflora*, uma espécie com distribuição altamente restrita às áreas de Matas Nebulares e vegetações campestres de altitude, endêmica da Serra da Mantiqueira nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (CNCFlora 2012).

*Vriesea penduliflora* está sujeita ao declínio contínuo da qualidade de *habitat*, principalmente devido à ocorrência de incêndios nas regiões mais elevadas das Serras de Ibitipoca e do Itatiaia, suas principais áreas de ocorrência (Martinelli & Moraes, 2013). A fragmentação e a destruição de *habitats* estão entre as principais ameaças à diversidade biológica (Kuussaari et al., 2009). A ocorrência de incêndios severos e recorrentes em uma formação florestal pode conduzir à desestruturação da composição florística, com reflexos na diversidade de espécies (Malkinson, Wittenberg, Beerli, & Barzilai, 2011; Peixoto et al., 2012). Em 2020 ocorreu um incêndio de grandes proporções no Parque Estadual de Ibitipoca que atingiu cerca de 330 hectares dentro do Parque e 40 hectares no entorno desta Unidade de Conservação (Clarice Silva, comunicação pessoal), o parque possui área total de 1.488 hectares (IEF, 2007). A ocorrência de incêndios de tamanha proporção, sobretudo, dentro de uma UC, ressalta a fragilidade dos *habitats* e o elevado grau de ameaça a que as espécies se encontram submetidas, reforçando a necessidade do desenvolvimento e implementação de estratégias que promovam a conscientização da sociedade em geral, uma vez que grande parte dos incêndios tem origem antrópica. Desse modo, sugerimos que os esforços de conservação para *V. penduliflora* devem se concentrar, principalmente na conservação do *habitat* e de seus polinizadores. Estudos futuros devem investigar questões relacionadas à eficácia dos diferentes polinizadores e explorar questões relacionadas ao efeito da florivoria sob o sucesso reprodutivo da espécie. Estes estudos poderiam auxiliar na compreensão da estabilidade e viabilidade das populações naturais de *V. penduliflora* e serão importantes para avaliar as consequências das ameaças sofridas pela espécie sob a fertilidade de suas populações e nas relações com seus polinizadores.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ao Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) pelo processamento das licenças de coleta (58.482-4 e 050-2017, respectivamente). Agradecemos também à equipe do Parque Estadual do Ibitipoca; aos colaboradores Dr. André Guaraldo pela identificação do beija-flor e Thiago da Silva Novato pela identificação dos insetos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida à primeira autora. Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Código Financeiro 001.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Aline Mystica Silva de Oliveira: Conceptualização, Investigação, Metodologia, Redação - revisão e edição. Hagda Caetano de Oliveira: Investigação, Metodologia, Redação - revisão e edição. Ana Paula Gelli de Faria: Conceptualização, Investigação, Redação - revisão e edição.

## Referências Bibliográficas

- Araújo, A. C., Fischer, E. A., & Sazima, M. (1994). Floração sequencial e polinização de três espécies de *Vriesea* (Bromeliaceae) na região de Juréia, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, *17*, 113–118.
- Bastos, M. J. S. M., Bastos, L. P., Souza, E. H. D., Soares, T. L., Morais, D. V., Souza, F. V. D. D., & Costa, M. A. P. D. C. (2017). Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. *Acta Botanica Brasilica*, *31*, 665–676. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0102>
- Benzing, D. H. (2000). *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge, MA: University Press.
- Büttow, M. V., Goetze, M., Pinheiro, F. G., Paggi, G. M., Zanella, C. M., & Bered, F. (2020). Reproductive success of *Aechmea winkleri*, a clonal and self-incompatible bromeliad from the Atlantic rainforest. *Flora*, *262*, 151521. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151521>
- Buzato, S., Sazima, M., & Sazima, I. (2000). Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites 1. *Biotropica*, *32*, 824–841. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00621.x>
- Canela, M. B. F., & Sazima, M. (2005). The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in southeastern Brazil: ornithophilous versus melittophilous features. *Plant biology*, *7*, 411–416. <https://doi.org/10.1055/s-2005-865619>
- Carlson, J. E., & Harms, K. E. (2007). The benefits of bathing buds: water calyces protect flowers from a microlepidopteran herbivore. *Biology Letters*, *3*, 405–407. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0095>

- Cascante-Marín A., Oostermeijer J. G. B., Wolf, J. H. D., & den Nijs, J. C. M. (2005). Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a premontane tropical forest. *Plant biology*, 7, 203–209. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837584>
- Cascante-Marín, A., Wolf, J. H., & Oostermeijer, J. G. B. (2009). Wasp florivory decreases reproductive success in an epiphytic bromeliad. *Plant Ecology*, 203, 149–153. <https://doi.org/10.1007/s11258-008-9522-y>
- CNCFlora. *Vriesea penduliflora* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea\\_penduliflora](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea_penduliflora)>. Acesso em 18 março 2021.
- Drummond, G. M., Martins, C. S., Machado, A. B. M., Sebaio, F. A., & Antonini, Y. (2005). *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Faegri, K. L., & Van Der Pijl. (1980). *The principles of pollination ecology*. Oxford: Pergamon Press.
- Fleming, T. H. (1982). Foraging strategies of plant-visiting bats. In T. H. Kunz (Eds.), *Ecology of bats* (pp. 287–325). New York: Plenum Publishing Corporation.
- Forzza, R. C., Costa, A., Siqueira Filho, J. A., Martinelli, G., Monteiro, R. F., Santos-Silva, F., Saraiva, D. P., Paixão-Souza, B., Louzada, R. B., Versieux, L. (2015). *Bromeliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6414>>.
- Freitas, L., Ribeiro, P. C., Cancio, A. S., Machado, M. A., Sampaio, M. C., Forzza, R. C., & Viccini, L. F. (2020). Population demography, genetic variation and reproductive biology of two rare and endangered *Neoregelia* species (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192, 787–802. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz110>
- Fumero-Cabán, J. J., & Meléndez-Ackerman, E. J. (2007). Relative pollination effectiveness of floral visitors of *Pitcairnia angustifolia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, 94, 419–424. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.3.419>
- Gentry, A. H. (1974). Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, 6, 64–69. <https://doi.org/10.2307/2989698>

Gill, Frank B. (1985). Hummingbird flight speeds. *The Auk*, 102, 97–101. <https://doi.org/10.2307/4086825>

Givnish, T. F., 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., & Winter K. (2014). Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 71, 55–78. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.010>

Givnish, T. F., 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., & Winter, K. (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98, 872–895. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000059>

Godoy, F. M. R., Lenzi, M., Ferreira, B. H. S., Silva, L. V., Zanella, C. M., & Paggi, G. M. (2018). High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 187, 672–688. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy037>

Grant, K., V. Grant. 1968. *Hummingbirds and their flowers*. New York: Columbia University Press.

Grohme, S., Steiner, J., & Zillikens, A. (2007). Destruction of floral buds in the bromeliad *Vriesea friburgensis* by the phytophagous larvae of the wasp *Eurytoma* sp in southern Brazil (Hymenoptera: Eurytomidae). *Entomologia Generalis*, 30, 167–172. <https://doi.org/10.1127/entom.gen/30/2007/167>

IEF- Instituto Estadual de Florestas. (2007). *Plano de Manejo do Parque Estadual do Ibitipoca*.

Kaehler, M., Varassin, I. G., & Goldenberg, R. (2005). Polinização em uma comunidade de bromélias em Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Botany*, 28, 219–228. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000200003>

Kamke, R., Schmid, S., Zillikens, A., Lopes, B. C., & Steiner, J. (2011). The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(8), 749-756. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.12.004>

- Kearns C. A., Inouye D. W. (1993). *Techniques for pollination biologists*. Niwot: University Press of Colorado.
- Köppen, W. (1948). *Climatology: with a study of the earth's climates*. Mexico: Economic Culture Fund.
- Kromer, T., Kessler M., Lohaus, G., & Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008). Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology*, 10, 502–511. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00058.x>
- Kuussaari, M., Bommarco, R., Heikkinen, R. K., Helm, A., Krauss, J., Lindborg, R., Öckinger, E., Pärtel M., Pino, J., Rodà, F., Stefanescu, C., Teder, T., Zobel, M. & Steffan-Dewenter, I. (2009). Extinction debt: a challenge for biodiversity conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.04.011>
- Lenzi, M., & Paggi, G. M. (2020). Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophytic species of outcrops of iron stones in central-western Brazil. *Plant Species Biology*, 35, 97–108. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12261>
- Lloyd, D. G., & Schoen, D. J. (1992). Self- and crossfertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal Plant Sciences*, 153, 358–369. <https://doi.org/10.1086/297040>
- Machado, C. G., Semir, J. (2006). Flowering phenology and floral biology of some ornitophilous Bromeliaceae of an Atlantic forest area in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 29, 163–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100014>
- Machado, C. G. (2009). Beija-flores (Aves: Trochilidae) e seus recursos florais em uma área de caatinga da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Zoologia*, 26, 255–265. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000200008>
- Machado, C. G. (2014). The hummingbird community and the plants which they visit at a savannah in the Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. *Bioscience Journal*, 30, 1578–1587.
- Magalhães, A. F. P., Maruyama, P. K., Tavares, L. A. F., & Martins, R. L. (2018). The relative importance of hummingbirds as pollinators in two bromeliads with contrasting floral specializations and breeding systems. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188, 316–326. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy050>

- Malkinson, D., Wittenberg, L., Beerli, O., & Barzilai, R. (2011). Effects of Repeated Fires on the Structure, Composition, and Dynamics of Mediterranean Maquis: Short- and Long-Term Perspectives. *Ecosystems*, *14*, 478–488. <https://doi.org/10.1007/s10021-011-9424-z>
- Marques, J. S., Tagliati, M. C., & Faria, A. P. G. (2015). Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* Regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *87*, 835–842. <http://dx.doi.org/10.590/0001-3765201520140340>
- Martinelli G. (1994). *Reproductive biology of Bromeliaceae in Atlantic Rainforest of southeastern Brazil*. Unpublished PhD Thesis, University of St. Andrews.
- Martinelli, G. (1997). Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: H.C. Lima & R.R. Guedes-Bruni (Eds.), *Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em Mata Atlântica* (pp. 213–250). Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Martinelli, G., & Moraes, M. A. (2013). *Livro Vermelho da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Martinelli, G., Vieira, C. M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A. F., & Forzza, R. C. (2008). Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, *59*, 209–258. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859114>
- Matallana, G., Godinho, M. A., Guilherme, F. A. G., Belisario, M., Coser, T. S., & Wendt, T. (2010). Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant systematics and evolution* *289*, 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0332-z>
- Menini Neto, L., Alves, R. J. V., Barros, F. D., & Forzza, R. C. (2007). Orchidaceae do parque estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* *21*, 687–696. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000300015>
- Muchhala, N., Caiza, A., Vizuete, J. C., & Thomson, J. D. (2009). A generalized pollination system in the tropics: bats, birds and *Aphelandra acanthus*. *Annals of Botany*, *103*, 1481–1487. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn260>

Newstrom, L. E., Frankie, G. W., & Baker, H. G. (1994). A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, 26, 141–159. <https://doi.org/10.2307/2388804>

Nunes, C. E., Briet, J., Galetto, L., Sazima, M., & Amorim, F. W. (2018). Nectar ecology of the endemic epiphytic hummingbird-pollinated bromeliad *Vriesea altodaserrae*: secretion dynamics and pollinator visitation pattern. *Acta Botanica Brasilica*, 32, 479–486. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0241>

Nunes-Freitas, A. F., & Rocha, C. F. D. (2011). Reproductive phenology and flower visitors' guild of *Canistropsis microps* (Bromeliaceae) in an Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 45, 1021–1034. <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.552797>

Oliveira-Filho, A. T., Fontes, M. A. L., Viana, P. L., Valente, A. S. M., Salimena, F. R. G., & Ferreira, F. M. (2013). O mosaico de fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca. In: R.C. Forzza; L. Menini Neto; F.R.G. Salimena & D.C. Zappi (Eds.), *Flora do Parque Estadual do Ibitipoca e seu entorno*. (pp. 54–93). Juiz de Fora: Editora UFJF.

Paggi, G. M., Silveira, L. C. T., Zanella, C. M., Bruxel, M., Bered, F., Kaltchuk-Santos, E., & Palma-Silva, C. (2012). Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Species Biology* 28, 169–176. <https://10.1111/j.1442-1984.2012.00374.x>

Paggi, G. M., Palma-Silva, C., Silveira, L. C., Kaltchuk-Santos, E., Bodanese-Zanettini, M. H., & Bered, F. (2007). Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud.(Bromeliaceae) in southern Brazil. *American Journal of Botany*, 94, 683–689. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.4.683>

Paggi, G. M., Silveira, L. C. T., Zanella, C. M., Bruxel, M., Bered, F., Kaltchuk-Santos E., & Palma-Silva, C. (2013). Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Species Biology*, 28, 169–176. <https://10.1111/j.1442-1984.2012.00374.x>

Palacios-Mosquera, Y., Mondragon, D., & Santos-Moreno, A. (2019). Vertebrate florivory of vascular epiphytes: the case of a bromeliad. *Brazilian Journal of Biology*, 79, 201–207. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.176023>



- Peixoto, K. D. S., Sanchez, M., Pedroni, F., Ribeiro, M. N., Facure, K. G., Gomes-Klein, V. L., & Guilherme, F. A. G. (2012). Dinâmica da comunidade arbórea em uma floresta estacional semidecidual sob queimadas recorrentes. *Acta Botanica Brasilica*, 26, 697–708. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000300020>.
- Persegona, J. E., Corrêa, L. & Roper, J. J. (2009). Interações estacionais entre beija-flores (Trochilidae) em uma região de ecótono no município de Piraquara, Paraná. *Estudos de Biologia*, 31, 49–58. <http://dx.doi.org/10.7213/reb.v31i73/75.22837>
- Piacentini, V. Q., Aleixo, A., Agne, C. E., Maurício, G. N., Pacheco, J. F., Bravo, G. A., Brito, G. R. R., Naka, L. N., Olmos, F., Posso, S., Silveira, L. F., Betini, G. S., Carrano, E., Franz, I., Lees, A. C., Lima, L. M., Pioli, D., Schunck, F., Amaral, F. R., Bencke, G. A., Cohn-Haft, M., Figueiredo, L. F. A., Straube, F. C., & Cesari, E. (2015). Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 23, 91–298.
- Pool-Chalé, M., Ramírez-Morillo, I., Carnevali Fernández-Concha, G., & Hornung-Leoni, C. T. (2018). Reproductive biology of *Aechmea bracteata* (Sw.) Griseb.(Bromelioideae: Bromeliaceae). *Plant Biology*, 20, 113–120. <https://doi.org/10.1111/plb.12645>
- Queiroz, J. A., Quirino, Z. G. M., Lopes, A. V., & Machado, I. C. (2016). Vertebrate mixed pollination system in *Encholirium spectabile*: a bromeliad pollinated by bats, opossum and hummingbirds in a tropical dry forest. *Journal of Arid Environments*, 125, 21-30. <https://doi.org/10.2307/1934961>
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Available from: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Ramírez, N., Brito, Y. (1990). Reproductive biology of tropical palm swamp community in the Venezuelan Llanos. *American Journal of Botany*, 77, 1260–1271. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11378.x>
- Ramírez Morillo, I. M., Chi May, F., Fernández-Concha, G. C., & May Pat, F. (2008). Reproductive biology of *Hechtia schottii*, a dioecious Bromeliaceae, in Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 56, 279-289.

- Rocca, M. A., & Sazima, M. (2013). Quantity versus quality: identifying the most effective pollinators of the hummingbird-pollinated *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 299, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0706-5>
- Rocha, C. F. D., Cogliatti-Carvalho, L., Nunes-Freitas, A. F., Rocha Pessôa, T. C., Dias, A. S., Ariani, C.V., & Morgado, L.N. (2004). Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae. *Vidalia*, 2, 52-68.
- Rodela, L. G., & Tarifa, J. R. (2002). The climate of Serra do Ibitipoca, southeast of Minas Gerais State. *GEOUSP Espaço e Tempo*, 6, 101-113. <https://doi.org/10.11606/issn.2179-0892.geousp.2002.123649>
- Rogalski, J. M., Reis, A., Reis, M. S. D., & Hmeljevski K.V. (2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. *Brazilian Journal of Botany* 32, 691–702. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042009000400008>
- Saldariaga, A. F. (2014). *Estrategias de la reproducción sexual de Puya nitida (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia)* (Master's thesis, Universidade Nacional da Colômbia). Retrieved from <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/53996>
- Sazima, I., Buzato, S., & Sazima, M. (1996). An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Botanica Acta*, v. 109(2), 149-160. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1996.tb00555.x>
- Schmid, S., Schmid, V. S., Kamke, R., Steiner, J., & Zillikens, A. (2010). Association of three species of *Strymon* Hübner (Lycaenidae: Theclinae: Eumaeini) with bromeliads in southern Brazil. *Journal of Research on the Lepidoptera*, 42, 50–55.
- Sick, H. (1984). *Ornitologia Brasileira: uma introdução*. Brasília: Editora UnB Brasília.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira.
- Silva, J. M. C., Souza, M. A., Bieber, A. G. D., & Carlos, C. J. (2003). Aves da Caatinga: status, uso do *habitat* e sensibilidade. In: I.R, Leal; M. Tabarelli; J.M.C. Silva (Eds.), *Ecologia e Conservação da Caatinga* (237–274). Recife: Editora Universitária da Universidade Federal do Pernambuco.

- Siqueira-Filho, J. A. D., & Machado, I. C. S. (2001). Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da Floresta Atlântica, nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 15, 427–443. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062001000300011>
- Souza, C. S., Maruyama, P. K., Aoki, C., Sigrist, M. R., Raizer, J., Gross, C. L., & Araujo, A. C. (2018). Temporal variation in plant-pollinator networks from seasonal tropical environments: higher specialization when resources are scarce. *Journal of Ecology*, 106, 2409–2420. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12978>
- Stiles, F. G. (1975). Ecology, flowering phenology and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology* 56, 285–310. <https://doi.org/10.2307/1934961>
- Varassin, I. G., & Sazima, M. (2000). Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 11/12: 57–70.
- Velásquez-Noriega, P., Mayta, C., Cuba, E., García, E., Emilia, Montañó-Centellas, F., & Krömer, T. (2020). Floral ecology and floral visitors of *Puya atra* (Bromeliaceae), a Bolivian endemic plant. *Ecología en Bolivia*, 55, 36–45.
- Vizentin-Bugoni, J., Maruyama, P.K., Sazima, M. (2014). Processes entangling interactions in communities: forbidden links are more important than abundance in a hummingbird-plant network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 2397–2397. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2397>
- Wanderley, M. Das G. L., Shepherd, G. J., & Giulietti, A. (2007). Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. São Paulo: Instituto de Botânica.
- Wendt, T., Canela, M. B. F., Klein, D. E., & Rios, R. I. (2002). Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 232, 201–212. <https://doi.org/10.1007/s006060200043>
- Wolowski, M., Ashman, T. L., & Freitas, L. (2013). Community-wide assessment of pollen limitation in hummingbird-pollinated plants of a tropical montane rain forest. *Annals of Botany*, 112, 903–910. <https://doi.org/10.1093/aob/mct140>

Zanella, C. M., Janke A., Palma-Silva, C., Kaltchuk-Santos E., Pinheiro F.G., Paggi G. M., Soares L. E.S., Goetze M., Büttow M. V., & Bered, F. (2012). Genetics, evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1020–1026. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600017>

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados gerados nos capítulos que compreendem esta tese ampliam o conhecimento a respeito dos diversos mecanismos reprodutivos que ocorrem na família Bromeliaceae e contribuem para o desenvolvimento de iniciativas de conservação para espécies de Bromeliaceae endêmicas e ameaçadas da Floresta Atlântica.

*Nidularium ferdinandocoburgii* e *N. marigoii* exibem grande similaridade morfológica e seus períodos de floração podem se sobrepor. *Nidularium ferdinandocoburgii* possui numerosas populações no PEIB, enquanto *N. marigoii* apresenta apenas uma pequena população na área de estudo. Os cruzamentos heteroespecíficos resultaram na produção de frutos férteis quando *N. marigoii* atuou como receptora de pólen, originando plantas vigorosas. Constatamos que ambas as espécies são autoincompatíveis. *Colibri serrirostris* foi registrado como polinizador frequente de *N. ferdinandocoburgii*.

*Vriesea penduliflora* é autocompatível, no entanto, não produz frutos sob autopolinização espontânea, sendo, portanto, dependente dos serviços prestados pelos polinizadores. O beija-flor *C. serrirostris* foi considerado o principal polinizador da espécie, embora *Apis mellifera* também tenha sido registrada polinizando suas flores. *Vriesea penduliflora* apresentou baixo sucesso reprodutivo sob condições naturais, provavelmente devido à ocorrência de florivoria ocasionada por formigas do gênero *Camponotus*, as quais foram frequentemente observadas consumindo suas flores.

*Neoregelia ibitipocensis* é parcialmente autoincompatível, apresenta potencial tanto para autofecundação quanto para cruzamentos. As populações da espécie foram afetadas por intensa predação de frutos e sementes ocasionada por larvas de Tipulidae em seu *habitat* natural. A herbivoria reduziu drasticamente o sucesso reprodutivo da espécie, comprometendo a fertilidade e a viabilidade de suas populações naturais. Observamos a produção de frutos partenocárpicos tanto nos experimentos de polinização controlada quanto sob condições naturais. A partenocarpia parece representar uma estratégia para aumentar o sucesso reprodutivo de *N. ibitipocensis*, amenizando os efeitos causados pela predação em seu *habitat* natural. Desenvolvemos um protocolo eficiente para introdução e multiplicação *in vitro* de *N. ibitipocensis*, fornecendo alternativas para o desenvolvimento de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ* para a espécie.

Todas as quatro espécies foco deste estudo, são dependentes dos serviços dos polinizadores para a sua reprodução, desde as espécies altamente autoincompatíveis, como *Nidularium ferdinandocoburgii* e *Nidularium marigoii*, até *Neoregelia ibitipocensis*, uma espécie parcialmente autoincompatível e *Vriesea penduliflora*, uma espécie autocompatível,

porém autoestéril, todas as espécies podem ser consideradas preferencialmente xenogâmicas. Esse fato ressalta a importância dos agentes polinizadores para a manutenção da fertilidade e viabilidade de suas populações naturais. Desse modo, reforçamos aqui a necessidade urgente de se priorizar a conservação das florestas, uma vez que a principal ameaça para a biodiversidade, sobretudo, em regiões tropicais é a fragmentação e a destruição do *habitat*. A Mata Atlântica representa o centro de diversidade da família Bromeliaceae, no entanto, este é um dos biomas mais ameaçados do planeta, com índices de desmatamento crescentes e alarmantes em seus territórios.

Sugerimos que os esforços de conservação sejam concentrados principalmente na preservação do *habitat* e conseqüentemente dos agentes polinizadores. Para tanto, é necessário que a preservação do meio ambiente seja pauta de políticas de governos que resultem efetivamente na implementação de políticas públicas que promovam a conservação da natureza, assegurando o direito de todos a um meio ambiente ecologicamente equilibrado.

6. **APÊNDICE – Artigo: Sucesso reprodutivo, herbivoria e conservação *ex situ* de *Neoregelia ibitipocensis* (Bromeliaceae): uma espécie endêmica e ameaçada de extinção da Floresta Atlântica**

# Reproductive success, herbivory and *ex situ* conservation of *Neoregelia ibitipocensis* (Bromeliaceae): an endemic and endangered species from the Atlantic Forest

Aline Mystica S. Oliveira<sup>A,C</sup>, Paulo Henrique P. Peixoto<sup>B</sup>, Bruno C. Barbosa<sup>A</sup> and Ana Paula G. Faria<sup>B</sup>

<sup>A</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer s/n, Bairro São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

<sup>B</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Campus Universitário, R. José Lourenço Kelmer s/n, Bairro São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

<sup>C</sup>Corresponding author. Email: [alinemystica@gmail.com](mailto:alinemystica@gmail.com)

**Abstract.** Herbivory in plant reproductive tissues can severely reduce the fitness of the species, especially for those threatened with extinction. We investigated aspects of the reproductive ecology of *Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme, an endangered species restricted to a few cloud forests sites in the Brazilian Atlantic Forest. Data on breeding systems, fertility, and viability of its populations are provided, as well as alternatives for development of strategies for *ex situ* conservation. Hand pollination experiments revealed that *N. ibitipocensis* is partially self-incompatible. Fruit and seeds were affected by intense herbivory caused by Tipulidae (Diptera) larvae. The predation reached 100% of the analysed infructescences during the first year of the study. We observed the production of parthenocarpic fruit both through controlled pollination experiments and under natural conditions. The potential for self-pollination and autogamy probably compensate for the reduced ability of the species to attract pollinators due to its small floral display. In the same way, parthenocarpy seems to represent a strategy to enhance the fitness of *N. ibitipocensis*, mitigating the effects of the predation. We developed an efficient protocol of *in vitro* multiplication, which represents a viable alternative for *ex situ* conservation of the species.

**Keywords:** Atlantic Forest, Bromeliaceae, bromeliad, *ex situ* conservation, herbivory, *Neoregelia ibitipocensis*, nidularioid complex, parthenocarpy, reproductive success, tissue culture.

Received 27 January 2021, accepted 14 April 2021, published online 11 June 2021

## Introduction

Bromeliaceae comprises 3657 species (Gouda *et al.* 2021) with a distribution restricted to the Neotropics (Benzing 2000). It is the fourth richest family in the number of species in the Atlantic domain (Stehmann *et al.* 2009). In the Brazilian Atlantic Forest, Bromeliaceae also has the highest number of threatened species, a factor that places it as a priority in biodiversity conservation programs (Pilatti *et al.* 2011).

Bromeliads have established important ecological interactions with diverse vertebrate and invertebrate fauna that are often partially or totally dependent on them for their survival. They are sources of pollen, nectar, fruit, water, shelter or breeding sites (Benzing 2000). Given that many key functional aspects of ecosystems closely depend on biotic interactions (Díaz *et al.* 2013), the potential extinction of

bromeliad species may accelerate the local extinction of other species.

The family Bromeliaceae have been extensively studied with regard to many aspects of their reproduction, such as breeding systems (e.g. Wendt *et al.* 2002; Matallana *et al.* 2010; Palma-Silva *et al.* 2015; Lenzi and Paggi 2020), floral biology (e.g. Nara and Webber 2002), flowering phenology (e.g. Machado and Semir 2006; Santana and Machado 2010; Nunes-Freitas and Rocha 2011), reproductive success (e.g. Paggi *et al.* 2007, 2013; Büttow *et al.* 2020), and pollination ecology (e.g. Kaehler *et al.* 2005; Rocca and Sazima 2013; Marques *et al.* 2015; Aguilar-Rodríguez *et al.* 2019; Velásquez-Noriega *et al.* 2020). By contrast, knowledge about plant–animal relationships that negatively affect reproductive success in Bromeliaceae is still quite scarce



(Nara and Webber 2002; Cavallari 2004; Cascante-Marín *et al.* 2005; Lenzi *et al.* 2006; Schmid *et al.* 2010; Saldarriaga 2014). Studies on herbivory of fruit and seeds are relevant because of the effect of this ecological interaction on the reproductive success of populations, which is the basis for the stability of the species in their natural habitat. Herbivory in plant reproductive tissues can cause severe consequences for the fitness of the species, thus promoting the evolution of defensive floral traits (Carlson and Harms 2007).

One of the strategies employed by plants to mitigate the effects of the herbivory is parthenocarpy (Zangerl *et al.* 1991). In a broad sense, parthenocarpy includes those processes that allow the production of seedless fruit (Verdú and García-Fayos 1998). The ostensible production of seedless fruit brings a cost without benefits to the plant because they do not contribute to the production of offspring; however, they can indirectly contribute to fitness by diverting herbivores from fruit that contain viable offspring, thereby reducing the damage caused by predation (Zangerl *et al.* 1991).

Studies on reproductive biology are important to support the development of management and conservation plans for threatened species (Cesário and Gaglianone 2008). Similarly, the *in vitro* installation of Bromeliaceae germplasm banks is also important because several species are threatened with extinction (Martinelli and Moraes 2013; see <http://www.iucnredlist.org>, accessed 14 December 2020) due to extractive practices and the destruction or degradation of natural habitats, which is especially important for endemic species (Martinelli *et al.* 2008).

*Neoregelia ibitipocensis* (Leme) Leme, the species on which this work focuses, is an endemic and rare bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *Neoregelia* stands out as the genus with the largest species number within the 'nidularioid complex', which is characterised by congested inflorescences with short peduncles that develop within the water tank formed by the rosette of leaves (Santos-Silva *et al.* 2017). The populations of *N. ibitipocensis* have restricted distribution to a few portions of cloud forests in the Mantiqueira Mountain Range, south-east Brazil (Leme 2000). Freitas *et al.* (2020) suggested that this species should be classified as 'Vulnerable', following IUCN criteria, supporting its inclusion in the official Red List of the Brazilian Flora.

We aimed to evaluate aspects of the reproductive success of *N. ibitipocensis* and the magnitude of damage from fruit and seed herbivory observed for this species in a portion of cloud forest located in the Atlantic Forest of south-eastern Brazil. For this endeavour, we investigated its breeding systems as well as the fertility and viability of its populations through the following parameters: flower production, fruit and seed set, seed viability, and germination rate. In addition, we developed an efficient protocol for *in vitro* introduction and multiplication of *N. ibitipocensis*. Our results provide recommendations for the development of strategies for *in situ* and *ex situ* conservation of this species.

## Material and methods

### Study area

The study was conducted in the Ibitipoca State Park, Minas Gerais state, South-east Brazil (21°40'–21°44'S, 43°52'–

43°55'W). The climate is Cwb (Köppen 1948), characterised by rainy summers and dry winters, with a mean annual temperature of 14.8°C and mean rainfall of 1,544 mm (Cetec 1983). The highest point in the area is 1784 m (Menini Neto *et al.* 2007). A mosaic of vegetation physiognomies occurs in the park, comprising rocky grasslands, savannas, and forests (Oliveira-Filho *et al.* 2013). Of the forest physiognomies, dwarf cloud forests are the most common being characterised by shrubs and small trees, with a canopy 3–5 m high (Oliveira-Filho *et al.* 2013). Two populations of *N. ibitipocensis* in dwarf cloud forests associated with grottoes at elevations of ~1.64–1.67 m above sea level were studied in the park: Gruta do Pião (21°42'08"S, 43°52'42"W) and Gruta do Cruzeiro (21°41'46"S, 43°53'50"W), which are ~2600 m from each other. A voucher specimen was deposited at the Leopoldo Krieger Herbarium – CESJ (A.P.G. de Faria number 235).

### Breeding systems

Controlled hand pollination experiments were conducted in a greenhouse during 2018 and 2019 using plants transplanted from the field. Flower buds from six inflorescences were bagged before treatments. Each flower received one of the following treatments: (1) hand self-pollination, in which they were hand-pollinated using fresh pollen obtained from the same flower; (2) spontaneous selfing, in which flowers were left unmanipulated; or (3) hand cross-pollination, in which flower buds were emasculated and flowers hand-pollinated using fresh pollen obtained from another plant of the same species (we made sure that these two plants were from different populations to avoid using ramets of the same genets). Each inflorescence was labelled, and the flower petals were colour-coded by pollination treatment with acrylic paint. Inflorescences were monitored until fruit set could be evaluated. For each treatment, fruit set was calculated as the percentage of the number of fruit formed divided by the number of the flowers tested.

Indices of autofertility (AFI) and self-compatibility (SCI) were calculated (Lloyd and Schoen 1992). Autofertility index was calculated as the percentage of fruit set (AFI<sub>f</sub>) or mean of seeds per fruit (AFI<sub>s</sub>) produced from spontaneous self-pollination divided by the percentage of fruit set or mean of seeds per fruit by hand cross-pollination. This index measures the ability of flowers to self in the absence of pollinators (Wendt *et al.* 2002). The self-compatibility index was calculated by dividing the percentage of fruit set (SCI<sub>f</sub>) or mean of seeds per fruit (SCI<sub>s</sub>) by hand self-pollination by the percentage of fruit set or mean of seeds per fruit by hand cross-pollination. A value of 1.00 is interpreted as complete self-compatibility; a value <0.75 is interpreted as being due to at least partial self-incompatibility (Lloyd and Schoen 1992).

Fruit development was monitored periodically until maturation. Approximately 3 months after carrying out the experimental crosses, the number of seeds produced was counted. The parthenocarpic fruit set was also determined in the flowers under controlled pollination. The mean values of seeds per fruit among pollination treatments were compared using analysis of variance (ANOVA). Significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments were assessed with Tukey's honestly significant difference (HSD, unequal  $n$ ) multiple-

range tests using R software (ver. 1.2.5019, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

#### *Reproductive success and seed predation*

In addition to the experimental crosses, evaluation of natural open pollination was done on 40 individuals left in the field throughout the experiments. Reproductive success was assessed in these individuals by estimating the following parameters: (1) reproductive potential (total number of flowers produced per individual); (2) fruit set; and (3) seed set. The fruit set was based on the count of the intact (non-predated) mature fruit that produced seeds.

Seed set was determined in a subsampling of 20 fruit. Observations of fruit and seed predation of *N. ibitipocensis* were carried out in the field. Samples of damaged fruit and seeds were analysed at the Behavioural Ecology Laboratory of the Federal University of Juiz de Fora. The growth and behaviour of the larvae of fruit herbivores were followed until their final development, for later taxonomic identification of the predator.

#### *Seed viability and in vitro germination*

An *in vitro* germination study was carried out using seeds from fruit collected in the field ( $n = 16$  fruit) in September 2019. The fruit were washed under running tap water and neutral detergent and transferred to beakers containing 0.3% (v/v) sodium hypochlorite, for 20 min in a laminar flow chamber. After this procedure, the berries were washed three times in distilled and autoclaved water. The material was dissected to extract the seeds, which were inoculated in test tubes containing 10 mL of deionised water and agar (7%) culture media. After inoculation, the material was kept in a growth room under controlled conditions of temperature ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), photoperiod (16 h light–8 h dark), and light ( $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The test tubes were observed weekly to check for the development of microbiological contamination. Germination assessment was carried out in a weekly census for 2 months. The seeds that showed protrusion of the radicle or aerial parts were considered germinated.

#### *Establishment of an in vitro multiplication protocol*

The seedlings from the germination experiment of *N. ibitipocensis* were randomly transferred to test tubes containing 10 mL of pure MS growth medium (Murashige and Skoog 1962) or MS medium with different growth regulators: naphthalene acetic acid (NAA), gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ), 6-benzylaminopurine (BAP), or kinetin (KIN), all at a concentration of  $5.0 \mu\text{M}$ . The pH of the culture medium was adjusted to  $5.7 \pm 0.1$  before autoclaving, performed at  $120^{\circ}\text{C}$  for 20 min. We evaluated the experiment after 90 days; the following parameters were analysed: number of shoots; shoots  $>2$  cm; number of roots and root size. Additionally, a qualitative analysis was carried out, where three independent evaluators assigned scores to the explants of each treatment. In order to reduce the risks of bias, the evaluators were unaware of the treatments applied. The scores ranged from 1 to 5, with 1 being the score attributed to the treatments that showed insufficient development, 3

being the score attributed to the treatments that presented intermediate development, and 5 being the score attributed to the treatments that showed full development in relation to the evaluated parameter. Intermediate scores (2 and 4) were also given between the values and criteria presented to separate small differences between treatments. The following parameters were assessed: leaf pigmentation; potential for acclimatisation; and future morphogenic potential (estimated by the number of axillary buds). After one-way ANOVA, the means obtained in each evaluated parameter were compared by the Scott–Knott test at 5% probability. The statistical analyses were performed using the SAEG program (ver. 9.1, System for Statistical Analysis, UFV Brazil).

## Results

### *Breeding systems*

All experimental treatments resulted in fruit set. The  $\text{SCI}_f$  was 0.55 and  $\text{SCI}_s$  was 0.30, which indicates a partial self-incompatibility for *N. ibitipocensis*. Measurements of autofertility based on fruit set ( $\text{AFI}_f = 0.62$ ) and seed set ( $\text{AFI}_s = 0.27$ ) showed that the species is able to spontaneously set fruit and seeds in the absence of pollinators (Table 1).

There was higher fruit set in hand cross-pollination (90.0%), compared with hand self-pollination (50.0%) and spontaneous self-pollination (56.2%). One-way ANOVA followed by the Tukey's test showed a significant difference between open and hand cross-pollinations compared with the self-pollinations (spontaneous and hand self), with regard to the mean number of seeds produced (Table 1).

The parthenocarpic fruit set evaluated for each controlled pollination treatment (Table 1) was higher for spontaneous and hand self-pollination (50.0%), compared with that observed for the hand cross-pollination (11.1%).

### *Reproductive success and seed predation*

*Neoregelia ibitipocensis* is predominantly terrestrial (Fig. 1b). The flowers are white with a tubular-shaped corolla and anthesis that lasts 2 days. Owing to the curved arrangement of the petal apices, the corolla remains partially closed throughout anthesis (Fig. 1a, b). The average number of flowers produced per individual was  $12.8 \pm 2.5$ , and the number of open flowers per day ranged from one to a maximum of three. Under natural conditions (open pollination), fruit set of *N. ibitipocensis* was 21.2% and the average seed number produced by non-predated fruit was  $139.2 \pm 67.1$  (Table 1).

The fruit of *N. ibitipocensis* are fleshy and indehiscent, with a white colour and persistent greenish-white sepals (Fig. 1c, d). The parthenocarpic fruit are similar in shape, size and colour compared to seeded fruit, making it very difficult to differentiate between the two only by external morphology. The seeds are elliptical, without appendages and surrounded by a hyaline mucilage. The average size of the seeds is 3 mm ( $n = 30$ ). In all samples analysed (from parthenocarpic and non-parthenocarpic fruit), no aborted ovules were observed.

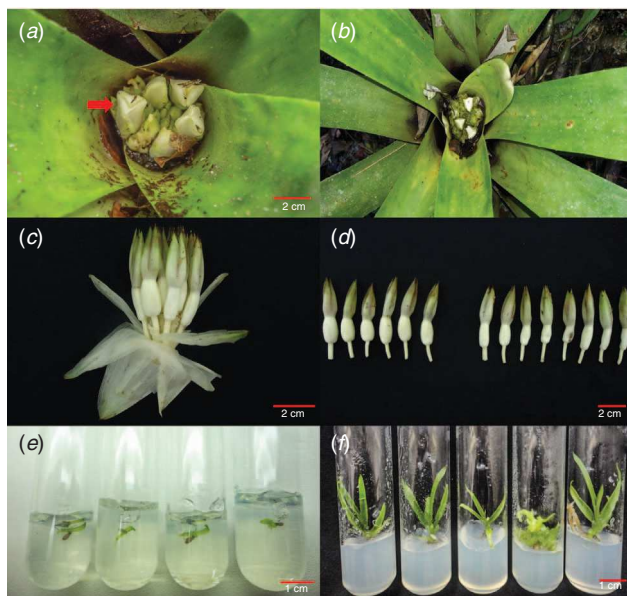
We recorded the presence of larvae and adults of Tipulidae (Insecta, Diptera). These insects caused an intense predation

**Table 1. Breeding systems experiments of *Neoregelia ibitipocensis***

Fruit set and average number of viable seeds per fruit (means  $\pm$  s.d.) after pollination treatments in *Neoregelia ibitipocensis*. The number of plants indicates how many different inflorescences were available for each treatment. Autofertility and self-compatibility indices are based on fruit set or mean of seeds per fruit in spontaneous self-, self- and cross-pollination. Percentage of parthenocarpic fruit was based on flowers that developed seedless fruit. The number of fruit formed and the number of the flowers tested are shown in parenthesis (fruit/flowers). Test of ANOVA followed by Tukey's HSD test were performed between the average number of seeds per fruit recorded after controlled pollination treatments ( $F = 29.54$ ) and between controlled and open pollination treatments ( $F = 18.79$ ). Values followed by a different lower-case, superscript letter within a column are significantly different according to  $t$  test ( $P < 0.0001$ )

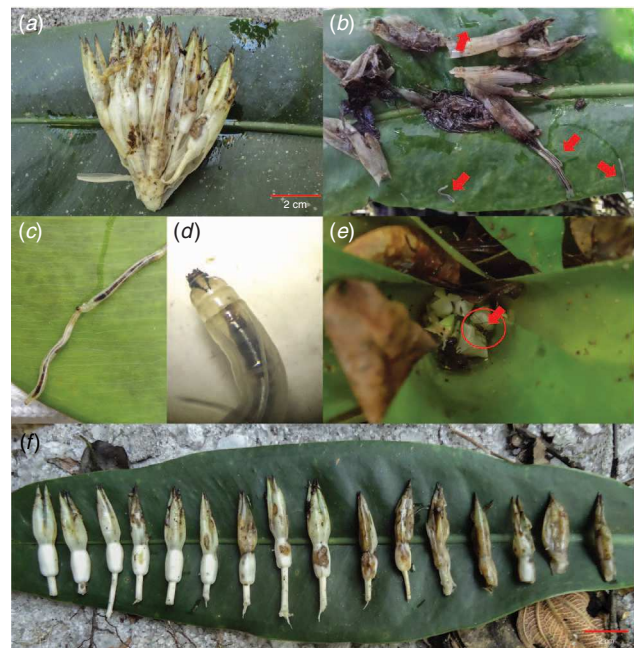
Treatments	Number of plants	Fruit set	Seeds per fruit	Parthenocarpic fruit set
Hand cross-pollination	6	90% (9/10)	112.0 $\pm$ 27.8 <sup>a,b</sup> ( $n = 9$ fruit)	11.1% (1/9)
Spontaneous self-pollination	6	56.2% (9/16)	31.0 $\pm$ 24.3 <sup>b</sup> ( $n = 9$ fruit)	50% (5/10)
Hand self-pollination	6	50% (5/10)	34.0 $\pm$ 16.0 <sup>b</sup> ( $n = 5$ fruit)	50% (5/10)
Open pollination (2018)	20	0% (0/0)	0	–
Open pollination (2019)	20	21.2% (59/278)	139.2 $\pm$ 67.1 <sup>b,c</sup> ( $n = 20$ fruit)	–

Autofertility index ( $AFI_f$ ) = 0.62; ( $AFI_s$ ) = 0.27  
 Self-compatibility index ( $SCI_f$ ) = 0.55; ( $SCI_s$ ) = 0.30



**Fig. 1.** Inflorescences, fruit and seedlings from *Neoregelia ibitipocensis*: (a) Detail of a flower in post-anthesis with completely folded petals (arrow). (b) Flowering plant in the field. (c, d) Inflorescence and fruit from the controlled pollination experiments. (d) From left to right, the first six fruit are the result of hand cross-pollination. The other fruit come from spontaneous and hand self-pollination treatments. (e) *In vitro* germinated seeds in a water-agar culture medium after 30 days of inoculation. (f) From left to right, *in vitro* seedlings in MS medium and in MS medium with the growth regulators NAA, GA<sub>3</sub>, BAP, and KIN at 5  $\mu$ M and 90 days after inoculation.

of *N. ibitipocensis* fruit and seeds (Fig. 2b–e). These larvae are found in bromeliads' phytotelma before they even start the flowering process. Herbivory of fruit and seeds occurred in 100% of the individuals analysed in 2018 and in 95% of them



**Fig. 2.** Inflorescence and fruit of *Neoregelia ibitipocensis* in the early stage of development, already showing damage caused by Tipulidae larvae (a, b). (b) Arrows highlight the larvae emerging from the newly manipulated fruit. (c, d) Diptera larvae of the Tipulidae family. (e) Tipulidae adult perched on the rosette of *N. ibitipocensis*. (f) Fruit collected in the field with different degrees of damage caused by herbivory.

analysed in 2019, of which 56.5% were totally damaged, leaving no preserved fruit. Parthenocarpy was also observed in the field, but the percentage formation of these fruit was not evaluated under natural conditions.

**Table 2.** *In vitro* micropropagation of *Neoregelia ibitipocensis*

Average number of shoots (Sh); shoots >2 cm (Sh2); roots (Ro); root size (Rs, cm); leaf pigmentation (Pig); acclimation potential (Ac) and future morphogenic potential (Mo) in *N. ibitipocensis* cultures obtained *in vitro* in the presence of MS medium growth (control) and MS medium with different growth regulators: naphthalene acetic acid (NAA); gibberellic acid (GA<sub>3</sub>); 6-benzylaminopurine (BAP) and kinetin (KIN), all at a concentration of 5 µM after 90 days of inoculation. Superscript letters compare different growth regulators (within a column) for each characteristic evaluated. Means followed by the same lower-case, superscript letters do not differ statistically according to the Scott–Knott test at 5% probability

Treatment	Sh	Sh2	Ro	Rs	Pig	Ac	Mo
MS	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	8.3 <sup>a</sup>	2.4 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>
NAA	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	6.1 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	3.6 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>
GA3	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	7.6 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>
BAP	7.1 <sup>a</sup>	0.3 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	2.5 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	4.7 <sup>a</sup>
KIN	1.0 <sup>b</sup>	1.0 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>

#### Seed viability and *in vitro* germination rate

Seed germination of *N. ibitipocensis* started 12 days after inoculation *in vitro*. Germination extended until the 24th day after inoculation, with most of the seeds germinating until the 10th day (Fig. 1e). The *in vitro* germination rate was 61.1% ( $n = 120$  seeds).

#### Establishment of an *in vitro* multiplication protocol

The propagation rate of explants is a parameter of great relevance when aiming to develop an efficient *in vitro* establishment and multiplication protocols. The addition of the cytokinin BAP to the growth medium significantly increased the number of shoots in *N. ibitipocensis* cultures (7.1 shoots per seedling inoculated, considerably increasing the spread rate of the species (Fig. 1f). In the treatments with NAA, GA<sub>3</sub>, and KIN, as well as in the control treatment (MS medium without growth regulators), there was only 1.0 shoot per explant. These data reinforce the potential of BAP to promote the *in vitro* multiplication of cultures of bromeliads (Table 2).

There were significantly fewer shoots taller than 2.0 cm in the treatment with BAP (Fig. 1f). Such a physiological response is expected because this growth regulator promotes an increase in the number of shoots but does not stimulate their elongation. In all other treatments, there was only one shoot taller than 2.0 cm (Table 2).

In the control treatment and in the presence of growth regulators NAA, GA<sub>3</sub>, and KIN, plantlets of *N. ibitipocensis* showed root development. The mean number and root size were statistically similar among these treatments. By contrast, in the treatment supplemented with BAP, there was no root development. In the qualitative analysis, the leaf pigmentation parameter showed statistically similar averages among all evaluated treatments (Table 2).

In the evaluation of the potential for acclimatisation, the plantlets grown in the control treatment and in the treatments supplemented with NAA, GA<sub>3</sub>, and KIN proved to be suitable for acclimatisation, showing both a well-developed aerial part and root system. Their respective averages did not differ statistically (Table 2). By contrast, the plants grown in the treatment with BAP were not fully developed to the point of acclimatisation. Although the shoots were more numerous in

this growth medium, they were not properly rooted and elongated.

The future morphogenic potential was better evaluated in treatment with BAP. This result is in line with the evaluation of the parameter number of axillary buds, which was also higher in this culture medium, showing its superiority when prioritising *in vitro* multiplication (Table 2). In the other treatments, the averages were lower and did not differ (Table 2).

#### Discussion

Previous studies on breeding systems of the *Neoregelia* genus have identified both self-compatible and self-incompatible species (Matallana *et al.* 2010; Wolowski *et al.* 2013). Although Freitas *et al.* (2020) described *N. ibitipocensis* as highly self-incompatible, they argued that the moderate genetic diversity detected for its populations would suggest preferential autogamy, and the percentages of polymorphic loci were similar to those found in several other species with mixed mating systems. Our data on self-compatibility index indicate the potential of *N. ibitipocensis* for both selfing and outcrossing and suggest the possible occurrence of a mixed mating system for this species.

Mixed breeding systems has been recorded for several Bromeliaceae species (Lasso and Ackerman 2004; Lenzi *et al.* 2006; Hmeljevski *et al.* 2007; Rogalski *et al.* 2009; Paggi *et al.* 2015; Ríos and Cascante-Marín 2017; Lenzi and Paggi 2020; Ramírez-Rosas *et al.* 2020). This reproductive strategy enables plants to produce offspring in the face of unpredictable pollination (Bush and Beach 1995) or even if the pollinator's visits are infrequent or there are few possible partners available (Eckert *et al.* 2006). In *Wittmackia patentissima* (Mart. ex Schult. & Schult.f.) Mez and *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez, for example, Cavalcante *et al.* (2020) argued that self-compatibility is maintained due to the periodic limitation of pollen for crossbreeding, even though the species appears to have evolved under widely crossed mating systems.

*Neoregelia ibitipocensis* is partially self-incompatible but preferentially xenogamic, as the highest rates of fruit and seed set were obtained through cross-pollination. Our data also bring some evidence of occurrence for inbreeding depression, as we registered a significantly smaller number

of seeds in the fruit of spontaneous and hand self-pollination, compared to the fruit of cross-pollination. Thus, the visit of the pollinator is essential for its fertilisation and sexual reproduction.

Freitas *et al.* (2020) registered the bee *Bombus brasiliense* Lepeletier, 1836 as the only pollinator for *N. ibitipocensis*. They also reported that the rosettes of the most flowered individuals were covered with a litter layer, which hindered the pollinator from accessing the flowers. In our 28 h of observation in the same area and during two consecutive years of flowering period, there were no visitors registered for *N. ibitipocensis*. Given that practically all inflorescences that we encountered were also blocked by litter, cross pollination in this species seems to be reduced more due to inaccessible flowers rather than pollinator inefficacy. In this way, the potential of *N. ibitipocensis* for self-pollination and autogamy probably compensates for the reduced ability to attract pollinators due to its low floral display and highly aggregated spatial distribution, similar to that reported by Bush and Beach (1995) for other epiphytic species.

Aspects of reproductive success are of fundamental importance for understanding species maintenance, as well as formulating successful conservation strategies. Our results showed that *N. ibitipocensis* presents a smaller reproductive potential (evaluated here by the number of flowers per individual), compared with other many-flowered *Neoregelia* spp., such as *N. concentrica* (Vell.) L.B.Sm., *N. cruenta* (Graham) L.B.Sm., *N. myrmecophila* (Ule) L.B.Sm., *N. pascoalina* L.B.Sm., and *N. sarmentosa* (Regel) L.B.Sm., which can produce more than a double the number of flowers than *N. ibitipocensis*. Fruit set was lower under natural conditions (21.2%) than after hand cross-pollination (90.0%).

The pollination success of a species can also be evaluated by the production of parthenocarpic fruit, as this can be an indicator of the lack of pollinators or inefficiency in pollination (Lenzi *et al.* 2006). The occurrence of parthenocarpy has only been reported in four species of Bromeliaceae: *Aechmea lindenii* (E. Morren) Baker (Lenzi *et al.* 2006); *Bromelia hieronymi* Mez (Godoy *et al.* 2018); *W. patensissima* (Cavalcante *et al.* 2020), and *Aechmea mariaae-reginae* H. Wendl. (Cascante-Marín *et al.* 2020). For *A. lindenii* and *B. hieronymi*, the highest rates of parthenocarpy (reaching 100% in *B. hieronymi*) occurred in spontaneous, hand self-pollination and apomixis experiments. For *A. lindenii*, parthenocarpy was associated with the low frequency of pollinator visits in areas with high luminosity. *Neoregelia ibitipocensis* seems to follow the same pattern as some of the above-mentioned species. Half of the flowers tested for spontaneous self-pollination and hand self-pollination developed parthenocarpy (fruit set of 50.0%). In the hand cross-pollination, parthenocarpic fruit set was only 11.1%.

The production of parthenocarpic fruit can also represent a defence strategy against predators. Once located by their enemies, plants invite their predators to consume these structures that would otherwise be useless and, for a low cost, these fruit can indirectly contribute to fitness by allowing fertile seeds to escape predation (Zangerl *et al.* 1991). We observed a high fruit and seed predation of *N. ibitipocensis* caused by larvae

of Tipulidae, also known as crane-flies (Fig. 2a,f). These insects inhabit environments ranging from strictly aquatic to a small water-filled cavity (phytotelm) in a terrestrial plant to feed on plant material (Alexander and Alexander 1970; Rafael *et al.* 2012). The continuous presence of larvae (Fig. 2b–d) and the adult record (Fig. 2e) indicate a strong relationship between Tipulidae species and *N. ibitipocensis*.

The predation rates reached 100% of the fruit from all individuals of *N. ibitipocensis* monitored during 2018. From the total individuals monitored during the 2019 fruiting season, 95% suffered predation, and in 56.5% of them, the infructescences were totally consumed by larvae, causing a drastic reduction in its reproductive success. High fruit losses, which negatively affect the reproductive success, have also been registered in *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb., with losses of 84.5% caused by caterpillars (Schmid *et al.* 2010) and in *Puya nitida* Mez, where herbivory caused by dipteran and beetles larvae caused 100% fruit loss (Saldarriaga 2014).

In *A. lindenii*, parthenocarpy was identified as a strategy to mitigate caterpillar predation of fruit and seeds by the butterfly *Tecla* sp. (Lenzi *et al.* 2006). Zangerl *et al.* (1991) observed that parthenocarpy reduced the damage caused by herbivores in *Pastinaca sativa* (Apiaceae), suggesting that it is an adaptable option. Similarly, Traveset (1993) observed that how much higher the proportion of parthenocarpic fruit in *Pistacia terebinthus* (Anacardiaceae), the smaller was the amount of seeds predated by wasps. We suggest that the occurrence of parthenocarpy in *N. ibitipocensis* may represent an escape route, apparently incorporated by the species to avoid the intense predation to which it is subjected. According to Lenzi *et al.* (2006), the absence of difference in the external morphology of the seeded and parthenocarpic fruit corroborate this idea. We believe that when feeding on parthenocarpic fruit, the larvae can reduce the predation of the fertile ones, and this could be an advantageous strategy for the reproductive success of the species.

In Bromeliaceae, other examples of fruit and seed predation by insects in both adults and larval stages (e.g. Diptera, Coleoptera, leaf-cutter ants, and caterpillars) has been registered in *Aechmea beeriana* L.B. Sm. & M.A. Spencer (Nara and Webber 2002); *Encholirium pedicellatum* (Mez) Rauh (Cavallari 2004); *Werauhia gladioliflora* (H. Wendl.) J.R. Grant (Cascante-Marín *et al.* 2005); *A. lindenii* (Lenzi *et al.* 2006); *Aechmea caudata* Lindm., *A. nudicaulis* and *Vriesea friburgensis* Mez (Schmid *et al.* 2010); *Bromelia antiacantha* Bertol. (Filippon *et al.* 2012), and *P. nitida* (Saldarriaga 2014).

Seed herbivory can cause a significant reduction in the reproductive potential of plants during the pre-dispersion phase (Ribas-Fernández *et al.* 2009). Limitations on seed production and dispersal also can pose great risks to rare species, making it more vulnerable to events that could lead to genetic bottleneck or demographic collapse (e.g. fires, habitat fragmentation). Although Freitas *et al.* (2020) considered the vegetative reproduction by clonal growth as the main component of population structuring in *N. ibitipocensis*, in general, the persistence of clonal plants

in the long-term depends on a balance between the survival of genets through clonal growth and recruitment through sexual reproduction (Mondragón *et al.* 2004; Jacquemyn and Honnay 2008; Manninen and Tolvanen 2017). Recruitment and establishment of seedlings is crucial for the establishment and maintenance of plant populations, and the seedling stage is one of the most vulnerable periods in the life cycle of epiphytic plants because seedling mortality is often high (Harper 1977; Zotz *et al.* 2001; Mondragón *et al.* 2004).

Crucial stages of the sexual reproduction of this species are being negatively affected by environmental conditions (low floral display due to litter coverage) and antagonistic insect–plant interactions. It is extremely rare to observe seedlings of *N. ibitipocensis* in the field, a phenomenon that indicates a low rate of seedling recruitment. Although the high rates of fruit and seed predation have prevented a real evaluation of the fertility of the populations of *N. ibitipocensis* in the study area, it is very likely that the establishment of new individuals and maintenance of genetic diversity is compromised.

To ensure the survival and maintenance of *N. ibitipocensis* populations and thus maintain their evolutionary potential, *in situ* and *ex situ* conservation strategies need to be implemented. There are only 10 herbarium records known for *N. ibitipocensis* (see <http://inct.splink.org.br>; <http://jabot.jbrj.gov.br/>), half of which have been collected inside Conservation Units (Itatiaia National Park, Rio de Janeiro State and Ibitipoca State Park, Minas Gerais State). As *in situ* conservation strategies, we reinforce the importance of more field work, so that new populations can be located. Besides, future ecological studies such as those conducted in this work will be important to investigate the fertility, the viability, and the threat level of the populations that are not protected inside conservation units.

As a strategy for *ex situ* conservation, the importance of tissue culture techniques stands out for the preservation of genetic resources, because they make it possible to obtain high multiplication rates from different explants, and can even reverse the risks of extinction (Mercier and Nievola 2003). *In vitro* multiplication protocols have already been developed for several endemic vulnerable or endangered Bromeliaceae species (Dal Vesco *et al.* 2014; Resende *et al.* 2016; Faria *et al.* 2018; Flores *et al.* 2018; Lima *et al.* 2020; Sasamori *et al.* 2020).

Compared to other nidularioid complex species, *N. ibitipocensis* presented a low seed viability (61.1%). In *Nidularium innocentii* Lem., the percentages were above 75% (Pereira *et al.* 2010); for *Neoregelia mucugensis* Leme, germination rates under controlled conditions varied from 93 to 95% (Bellintani *et al.* 2007). High germination rates (above 90%) were observed in other Bromeliaceae genera, such as *Aechmea* (Nara and Webber 2002; Lenzi *et al.* 2006; Paulo and De Paula 2018; Büttow *et al.* 2020), *Vriesea* (Droste *et al.* 2005; Sasamori *et al.* 2016), *Pitcairnia* (Pereira *et al.* 2011), and *Portea*, *Billbergia*, and *Tillandsia* (Oliveira 2016).

Our results demonstrated that the *in vitro* multiplication of *N. ibitipocensis* cultures can be promoted efficiently using MS medium supplemented with 5  $\mu$ M BAP. This treatment proved

to be the most promising option, as the addition of the BAP to the growth medium significantly increased the number of shoots in *N. ibitipocensis* cultures (7.1 shoots per explant). In the long run, it would allow for greater production of seedlings, this being one of the main advantages of *in vitro* propagation. The use of BAP has also shown to be efficient in multiplication *in vitro* for other species of bromeliads, such as: *Nidularium fulgens* Lem. (Paiva *et al.* 2006); *Vriesea scalaris* E. Morren (Silva *et al.* 2009); *N. cruenta* (Mengarda *et al.* 2009); *Nidularium procerum* Lindm. (Silva *et al.* 2012); *Neoregelia concentrica* (Vell.) L.B.Sm. (Martins *et al.* 2014); *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Resende *et al.* 2016), and *Aechmea ramosa* Mart. ex Schult. & Schult.f. (Faria *et al.* 2018).

However, the number of shoots >2 cm was lower in the presence of BAP. According to Vasconcelos *et al.* (2015), the use of this cytokinin promotes larger metabolic investment in the organisation of new meristematic centres (new shoots) to the detriment of the length of shoots. Manfio *et al.* (2010) also observed a reduction in the lengthening of *Orthophytum grossiorum* Leme & C.C. Paula shoots produced in response to BAP during the *in vitro* multiplication phase, especially at the highest concentrations.

In the treatment supplemented with BAP, there was no root development. Cytokinins generally have an inhibitory effect on *in vitro* rooting, interfering with the activity of auxins and the cell division necessary for the phase of root initiation (Grattapaglia and Machado 1998). However, we observed that the *in vitro* elongation and rooting phases of *N. ibitipocensis* can be performed efficiently in a medium without growth regulators. Similar results have been reported for other species of the nidularioid complex, such as *Nidularium innocentii* and *N. procerum* (Silva *et al.* 2012).

According to Dias *et al.* (2020), the presence of BAP in the culture medium significantly reduced rooting for the species *Aechmea aquilega* (Salisb.) Griseb. and *Bromelia balansae* Mez. These authors also reported that these species exhibited a high rooting capacity in the absence of growth regulators, thus reported in present study. Silva *et al.* (2009) reported similar results in a study with *V. scalaris*. There are species that take root without the need for additional supplementation with auxins, probably because the endogenous level is suitable to promote rooting, as seems to be the case for *N. ibitipocensis*.

The qualitative analysis carried out for the *in vitro* cultures of *N. ibitipocensis* demonstrated that the treatment supplemented with BAP was the most promising, as in this we verified the highest rate of multiplication for the species, and with this the greatest morphogenetic potential, which allows the obtaining a greater number of explants from a single matrix plant.

In general, in the qualitative analysis we found a similar response pattern among the control treatment and treatments supplemented with the growth regulators NAA, GA<sub>3</sub>, or KIN, this result suggests that the use of MS medium in the absence of growth regulators is an alternative viable for the maintenance of *in vitro* *N. ibitipocensis* cultures; it is also less expensive, since it contributes to the reduction of the costs of production of the culture medium and avoids the occurrence of hyperhydricity in the tissues. However, we emphasise that,

when aiming at the *in vitro* multiplication phase, the use of MS medium supplemented with BAP is the most suitable option, because it is possible to obtain a much larger number of plants than in the natural reproductive processes of the species.

We suggest that conservation efforts for this species should focus primarily on habitat conservation and its pollinators. Additionally, we believe that the *in vitro* micropropagation protocol established in this work be of great importance for practical management actions (e.g. future restoration programs to establish populations of *N. ibitipocensis* in other sites and areas), which will surely contribute to the conservation of this species.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Declaration of funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

### Acknowledgements

We thank the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) and the State Forest Institute (IEF-MG) for processing collection permits (58482-4 and 050-2017 respectively). We also thank the Ibitipoca State Park staff; the collaborators of the Plant Physiology Laboratory (LFV-UFJF) and the Behavioural and Bioacoustic Ecology Laboratory (LABEC-UFJF) for the logistical support; Lúcio M. C. Lima for providing photo of the plant.

### References

- Aguilar-Rodríguez PA, Krömer T, Tschapka M, García-Franco JG, Escobedo-Sarti J, Macswiney GMC (2019) Bat pollination in Bromeliaceae. *Plant Ecology & Diversity* **12**, 1–19.
- Alexander CP, Alexander MM (1970) Family Tipulidae. In 'A Catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States'. (Ed. N Papavero) pp. 1–259. (Universidade de São Paulo: São Paulo, SP, Brazil)
- Bellintani MC, Lima CC, Brito AL, Santana JD, Dornelles ALC (2007) Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* bromélias endêmicas da Chapada Diamantina. *Revista Brasileira de Biociências* **5**, 1101–1103.
- Benzing DH (2000) 'Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation.' (Cambridge University Press: New York, NY, USA)
- Bush SP, Beach JH (1995) Breeding systems of epiphytes in a tropical montane wet forest. *Selbyana* **16**, 155–158.
- Büttow MV, Goetze M, Pinheiro FG, Paggi GM, Zanella CM, Bered F (2020) Reproductive success of *Aechmea winkleri*, a clonal and self-incompatible bromeliad from the Atlantic rainforest. *Flora* **262**, 151521. doi:10.1016/j.flora.2019.151521
- Carlson JE, Harms KE (2007) The benefits of bathing buds: water calyces protect flowers from a microlepidopteran herbivore. *Biology Letters* **3**, 405–407. doi:10.1098/rsbl.2007.0095
- Cascante-Marín A, Oostermeijer JGB, Wolf JHD, Den Nijs JCM (2005) Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a premontane tropical forest. *Plant Biology* **7**, 203–209. doi:10.1055/s-2005-837584
- Cascante-Marín A, Trejos C, Madrigal R, Fuchs EJ (2020) Genetic diversity and reproductive biology of the dioecious and epiphytic bromeliad *Aechmea mariae-reginae* (Bromeliaceae) in Costa Rica: implications for its conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**, 773–786. doi:10.1093/botlinnean/boz083
- Cavalcante BP, Souza EHD, Williams JH, Versieux LM (2020) Reproductive systems and post-pollination barriers between two closely related eu-bromelioids (Bromeliaceae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**, 828–839. doi:10.1093/botlinnean/boz101
- Cavallari MM (2004) Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação. MAgon thesis, Universidade de São Paulo, Brazil. Available at <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-24012005-085130/pt-br.php>
- Cesário LF, Gaglianone MC (2008) Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. *Acta Botanica Brasilica* **22**, 828–833. doi:10.1590/S0102-33062008000300018
- Cetec (1983) 'Diagnóstico ambiental do Estado de Minas Gerais.' (Editora Cetec: Belo Horizonte, MG, Brazil)
- Dal Vesco LL, Vieira PM, Corredor JP, Pescador R, Welter LJ, Guerra MP (2014) Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **89**, 542–548. doi:10.1080/14620316.2014.11513118
- Dias SGJ, Silva LF, Carneiro LA, Sousa CM (2020) Multiplicação *in vitro* de bromélias *Aechmea aquilega* e *Bromelia balansae*. *Brazilian Journal of Development* **6**, 17464–17476. doi:10.34117/bjdv6n4-062
- Díaz S, Purvis A, Cornelissen JHC, Mace GM, Donoghue MJ, Ewers RM, Jordano P, Pearse WD (2013) Functional traits, the phylogeny of function, and ecosystem service vulnerability. *Ecology and Evolution* **3**, 2958–2975. doi:10.1002/ece3.601
- Droste A, Silva AMD, Matos AV, Almeida JWD (2005) *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**, 717–722. doi:10.1590/S1516-89132005000600006
- Eckert CG, Samis KE, Dart S (2006) Reproductive assurance and the evolution of uniparental reproduction in flowering plants. In 'Ecology and Evolution of Flowers'. (Eds LD Harder, SCH Barrett) pp. 181–203. (Oxford University Press: Oxford, UK)
- Faria DV, Simão MJ, Cipriano R, Werner ET, Soares TCB, Aoyama EM, Lima-Gontijo ABP (2018) *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae) from leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* **54**, 530–536. doi:10.1007/s11627-018-9907-0
- Filippon S, Fernandes CD, Ferreira DK, Duarte AS, Reis MS (2012) Produção de frutos para uso medicinal em *Bromelia antiancata* (caraguatá): fundamentos para um extrativismo sustentável. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **14**, 506–513. doi:10.1590/S1516-05722012000300013
- Flores R, Kraetzig LC, Flóres PZ, Pereira DN, Büncker HM, Maldaner J, Viero CL, Strahl MA (2018) Propagation of *Dyckia vicentensis*, an endemic bromeliad of the Pampa biome, Brazil. *Rodriguésia* **69**, 2229–2235. doi:10.1590/2175-7860201869447
- Freitas L, Ribeiro PC, Cancio AS, Machado MA, Sampaio MC, Forzza RC, Viccini LF (2020) Population demography, genetic variation and reproductive biology of two rare and endangered *Neoregelia* species (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**, 787–802. doi:10.1093/botlinnean/boz110
- Godoy FMR, Lenzi M, Ferreira BHS, Silva LV, Zanella CM, Paggi GM (2018) High genetic diversity and moderate genetic structure in the self-incompatible, clonal *Bromelia hieronymi* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **187**, 672–688. doi:10.1093/botlinnean/boy037

- Gouda EJ, Butcher D, Gouda CS (2021) Encyclopaedia of Bromeliads Version 4. (University Botanic Gardens: Utrecht, Netherlands) Available at <http://bromeliad.nl/encyclopedia/> [Verified 20 January 2021]
- Grattapaglia DE, Machado MA (1998) Micropropagação. In 'Cultura de tecidos e transformação genética de plantas'. (Eds AC Torres, LS Caldas, JA Buso) pp. 183–260. (Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq: Brasília, DF, Brazil)
- Harper JL (1977) 'Population biology of plants.' (Academic Press: London, UK)
- Hmeljevski KV, Reis A, Reis MS, Rogalski JM, Daltrini-Neto C, Lenzi M (2007) Resultados Preliminares da Biologia Reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae): uma espécie rara e endêmica de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Biociências* **5**, 267–269.
- Jacquemyn H, Honnay O (2008) Mating system evolution under strong clonality: towards self-compatibility or self-incompatibility? *Evolutionary Ecology* **22**, 483–486. doi:10.1007/s10682-007-9207-3
- Kaehler M, Varassin IG, Goldenberg R (2005) Polinização em uma comunidade de bromélias em Floresta Atlântica Alto-montana no Estado do Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Botany* **28**, 219–228. doi:10.1590/S0100-84042005000200003
- Köppen W (1948) 'Climatology: with a Study of the Earth's Climates.' (Economic Culture Fund: Mexico)
- Lasso E, Ackerman JD (2004) The flexible breeding system of *Werauhia sintensisii*, a cloud forest bromeliad from Puerto Rico. *Biotropica* **36**, 414–417. doi:10.1111/j.1744-7429.2004.tb00335.x
- Leme EMC (2000) 'Nidularium: Bromélias da Mata Atlântica.' (Sextante: Rio de Janeiro, RJ, Brazil)
- Lenzi M, Paggi GM (2020) Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophytic species of outcrops of iron stones in central-western Brazil. *Plant Species Biology* **35**, 97–108. doi:10.1111/1442-1984.12261
- Lenzi M, Matos JZ, Orth AI (2006) Variação morfológica e reprodutiva de *Aechmea lindeni* (E. Morren) Baker var. *lindenii* (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasílica* **20**, 487–500. doi:10.1590/S0102-33062006000200024
- Lima APPS, Lima-Brito A, Santana JRF (2020) Micropropagation of Chapada Diamantina ornamental bromeliad. *Ciência Rural* **50**(2), e20180922. doi:10.1590/0103-8478cr20180922
- Lloyd DG, Schoen DJ (1992) Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* **153**, 358–369. doi:10.1086/297040
- Machado CG, Semir J (2006) Flowering phenology and floral biology of some ornithophilous Bromeliaceae of an Atlantic forest area in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany* **29**, 163–174. doi:10.1590/S0100-84042006000100014
- Manfio CE, Motoike YS, Paula CCC, Valente MS, Melo CG (2010) Seleção precoce *in vitro* de clones elite de uma bromélia ornamental. *Ciência Rural* **40**, 1537–1544. doi:10.1590/S0103-84782010000700009
- Manninen OH, Tolvanen A (2017) Sexual reproduction of clonal dwarf shrubs in a forest-tundra ecotone. *Plant Ecology* **218**, 635–645. doi:10.1007/s11258-017-0717-y
- Marques JS, Tagliati MC, Faria APG (2015) Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* Regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **87**, 835–842.
- Martinelli G, Moraes MA (2013) 'Livro Vermelho da Flora do Brasil.' (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio: Rio de Janeiro, RJ, Brazil)
- Martinelli G, Vieira CM, Gonzalez M, Leitman P, Piratininga A, Costa AF, Forzza RC (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* **59**, 209–258. doi:10.1590/2175-7860200859114
- Martins JPR, Schimildt ER, Alexandre RS, Castro EM, Nani TF, Pires MF, Pasqual M (2014) Direct organogenesis and leaf-anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) LB Smith (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany* **46**, 2179–2187.
- Matallana G, Godinho MA, Guilherme FAG, Belisario M, Coser TS, Wendt T (2010) Breeding systems of Bromeliaceae species: evolution of selfing in the context of sympatric occurrence. *Plant Systematics and Evolution* **289**, 57–65. doi:10.1007/s00606-010-0332-z
- Mengarda LHG, Povoas L, Debiasi C, Pescador R (2009) Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. *Scientia Agraria* **10**, 469–474. doi:10.5380/rsa.v10i6.15532
- Menini Neto L, Alves RJV, Barros FD, Forzza RC (2007) Orchidaceae do parque estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* **21**, 687–696. doi:10.1590/S0102-33062007000300015
- Mercier H, Nievola CC (2003) Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidalia* **1**, 57–62.
- Mondragón D, Durán R, Ramírez I, Valverde T (2004) Temporal variation in the demography of the clonal epiphyte *Tillandsia brachycaulos* (Bromeliaceae) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Tropical Ecology* **20**, 189–200. doi:10.1017/S0266467403001287
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nara AK, Webber AC (2002) Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixo na Amazônia Central. *Acta Amazonica* **32**, 571–588. doi:10.1590/1809-43922002324588
- Nunes-Freitas AF, Rocha CFD (2011) Reproductive phenology and flower visitors' guild of *Canistropsis microps* (Bromeliaceae) in an Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. *Journal of Natural History* **45**, 1021–1034. doi:10.1080/00222933.2011.552797
- Oliveira AMS (2016) Cultivo *in vitro* e perfis de enzimas antioxidativas em espécies de bromélias. MEd thesis, Universidade Federal de Juiz de Fora. Available at <http://repositorio.ufjf.br:8080/jspui/handle/ufjf/3059>
- Oliveira-Filho AT, Fontes MAL, Viana PL, Valente ASM, Salimena FRG, Ferreira FM (2013) O mosaico de fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca. In 'Flora do Parque Estadual do Ibitipoca e seu entorno'. (Eds RC Forzza, L Menini Neto, FRG Salimena, DC Zappi) pp. 54–93. (Editora UFJF: Juiz de Fora, MG, Brazil)
- Paggi GM, Palma-Silva C, Silveira LC, Kaltchuk-Santos E, Bodanese-Zanettini MH, Bered F (2007) Fertility of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) in southern Brazil. *American Journal of Botany* **94**, 683–689. doi:10.3732/ajb.94.4.683
- Paggi GM, Silveira LCT, Zanella CM, Bruxel M, Bered F, Kaltchuk-Santos E, Palma-Silva C (2013) Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Species Biology* **28**, 169–176. doi:10.1111/j.1442-1984.2012.00374.x
- Paggi GM, Palma-Silva C, Bodanese-Zanettini MH, Lexer C, Bered F (2015) Limited pollen flow and high selfing rates toward geographic range limit in an Atlantic forest bromeliad. *Flora* **211**, 1–10. doi:10.1016/j.flora.2015.01.001
- Paiva PDO, Naves VC, Paiva R, Pasqual M (2006) Avaliação de diferentes formulações de sais minerais para a micropropagação de *Nidularium fulgens* Lem. *Plant Cell Culture and Micropropagation* **2**, 9–14.
- Palma-Silva C, Cozzolino S, Paggi GM, Lexer C, Wendt T (2015) Mating system variation and assortative mating of sympatric bromeliads (*Pitcairnia* spp.) endemic to neotropical inselbergs. *American Journal of Botany* **102**, 758–764. doi:10.3732/ajb.1400513
- Paulo ML, De Paula CC (2018) Germination and morphology of the post-seedling development of *Aechmea bambusoides* (Bromeliaceae), a threatened species from the Brazilian flora. *Seed Science and Technology* **46**, 225–231. doi:10.15258/sst.2018.46.2.04
- Pereira C, Cuquel FL, Panobianco M (2010) Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocenti* (Lem.). *Revista Brasileira de Sementes* **32**, 36–41. doi:10.1590/S0101-31222010000200004



- Pereira EO, Lima ABP, Nogueira EU, Couto DR, Soares TCB (2011) Germinação *in vitro* de *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae): efeito do meio de cultivo e carvão ativado. *Enciclopédia Biosfera Centro Científico Conhecer* **7**, 634–642.
- Pilatti FK, Aguiar T, Simões T, Benson EE, Viana AM (2011) In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* **47**, 82–98. doi:10.1007/s11627-010-9302-y
- Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CJB (2012) 'Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia.' (Holos Editora: Ribeirão Preto, SP, Brazil)
- Ramírez-Rosas K, Aguirre-Jaimes A, Ramírez-Morillo IM, García-Franco JG (2020) Floral biology and potential hybridization of three sympatric epiphytic bromeliads in Veracruz, Mexico. *Plant Species Biology* **35**, 197–209. doi:10.1111/1442-1984.12279
- Resende CF, Ribeiro C, Mendes GC, Soares CG, Braga V, Da Cruz BP, Peixoto PH (2016) In vitro culture of *Vriesea cacuminis* LB Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia. Série Botânica* **71**, 55–61.
- Ribas-Fernández Y, Quevedo-Robledo L, Pucheta E (2009) Pre- and post-dispersal seed loss and soil seed dynamics of the dominant *Bulnesia retama* (Zygophyllaceae) shrub in a sandy Monte desert of western Argentina. *Journal of Arid Environments* **73**, 14–21. doi:10.1016/j.jaridenv.2007.12.001
- Ríos LD, Cascante-Marin A (2017) High selfing capability and low pollinator visitation in the hummingbird-pollinated epiphyte *Pitcairnia heterophylla* (Bromeliaceae) at a Costa Rican mountain forest. *Revista de Biología Tropical* **65**, 735–743. doi:10.15517/rbt.v65i2.25948
- Rocca MA, Sazima M (2013) Quantity versus quality: identifying the most effective pollinators of the hummingbird-pollinated *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **299**, 97–105. doi:10.1007/s00606-012-0706-5
- Rogalski JM, Reis A, Reis MSD, Hmeljevski KV (2009) Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. *Brazilian Journal of Botany* **32**, 691–702. doi:10.1590/S0100-84042009000400008
- Saldarriaga AF (2014) Estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia). MSc(Biol) thesis, Universidade Nacional da Colômbia. Available at <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/53996>
- Santana CS, Machado CG (2010) Fenologia de floração e polinização de espécies ornitófilas de bromeliáceas em uma área de campo rupestre da Chapada Diamantina, BA. *Brazilian Journal of Botany* **33**, 469–477. doi:10.1590/S0100-84042010000300009
- Santos-Silva F, Venda AKL, Hallbritter HM, Leme EM, Mantovani A, Forzza RC (2017) Nested in chaos: Insights on the relations of the 'Nidularioid Complex' and the evolutionary history of *Neoregelia* (Bromelioideae-Bromeliaceae). *Brittonia* **69**, 133–147. doi:10.1007/s12228-017-9460-x
- Sasamori MH, Endres Júnior D, Droste A (2016) Low macronutrient concentrations benefit *in vitro* propagation of *Vriesea incurvate* (Bromeliaceae), an endemic species of the Atlantic Forest, Brazil. *Rodriguésia* **67**, 1071–1081. doi:10.1590/2175-7860201667417
- Sasamori MH, Endres Júnior D, Droste A (2020) Conservation of *Vriesea flammea* LB Sm., an endemic Brazilian bromeliad: effects of nutrients and carbon source on plant development. *Brazilian Journal of Biology* **80**, 437–448. doi:10.1590/1519-6984.215276
- Schmid S, Schmid VS, Kamke R, Steiner J, Zillikens A (2010) Association of three species of *Strymon* Hübner (Lycaenidae: Theclinae: Eumacini) with bromeliads in southern Brazil. *Journal of Research on the Lepidoptera* **42**, 50–55.
- Silva ALL, Franco ETH, Dornelles EB, Reichert BCL, Quoirin M (2009) *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E, Morrem (Bromeliaceae). *Iheringia. Série Botânica* **64**, 151–156.
- Silva ALL, Costa JDL, Alcantara GB, Carvalho DC, Schuck MR, Biasi LA, Soccol CR (2012) Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany* **44**, 1095–1101.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (2009) 'Plantas da Floresta Atlântica.' (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, RJ, Brazil)
- Traveset A (1993) Deceptive fruits reduce insect seed predation in *Pistacia terebinthus* L. *Evolutionary Ecology* **7**, 357–361. doi:10.1007/BF01237867
- Vasconcelos JM, Leão JRA, Raposo A, Fermino-Junior PCP (2015) Sistemas de cultivo *in vitro* e aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. and Schult. f. (Bromeliaceae). *Scientia Agrária Paranaensis* **14**, 240–246. doi:10.18188/1983-1471/sap.v14n4p240-246
- Velásquez-Noriega P, Mayta C, Cuba E, García E, Emilia Montaña-Centellas F, Krömer T (2020) Floral ecology and floral visitors of *Puya atra* (Bromeliaceae), a Bolivian endemic plant. *Ecología en Bolivia* **55**, 36–45.
- Verdú MM, García-Fayos P (1998) Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Canadian Journal of Botany* **76**, 134–141. doi:10.1139/b97-166
- Wendt T, Canela MBF, Klein DE, Rios RI (2002) Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **232**, 201–212. doi:10.1007/s006060200043
- Wolowski M, Ashman TL, Freitas L (2013) Community-wide assessment of pollen limitation in hummingbird-pollinated plants of a tropical montane rain forest. *Annals of Botany* **112**, 903–910. doi:10.1093/aob/mct140
- Zangerl AR, Berenbaum MR, Nitao JK (1991) Parthenocarpic fruits in wild parsnip: decoy defense against a specialist herbivore. *Evolutionary Ecology* **5**, 136–145. doi:10.1007/BF02270830
- Zotz G, Hietz P, Schmidt G (2001) Small plants, large plants: the importance of plant size for the physiological ecology of vascular epiphytes. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2051–2056. doi:10.1093/jexbot/52.363.2051

Handling editor: Garry Cook