

**Biologia reprodutiva e estudo da
fertilidade de *Vriesea gigantea*
(Gaud., 1846), Bromeliaceae**

Gecele Matos Paggi

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Biologia reprodutiva e estudo da
fertilidade de *Vriesea gigantea*
(Gaud., 1846), Bromeliaceae**

Gecele Matos Paggi

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular do Departamento de
Genética como pré-requisito para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Orientação: Prof^a Dr^a Fernanda Bered

Colaboração: Prof^a Dr^a Maria Helena Bodanese Zanettini

Porto Alegre, março de 2006.

*Ao meu amor,
por toda dedicação e compreensão.*

*Ao meu filho lindo,
pelo carinho e amor.*

*À minha mãe, meu pai e meu irmão,
pela amizade de sempre.*

**“Tudo que se sonha só é só um sonho,
mas tudo que se sonha junto é realidade!”**

(Raul Seixas)

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Nelson e ao meu filho, Lucas, por serem pessoas especiais e estarem presentes todos os dias da minha vida me dando amor e alegria.

À minha mãe, Enilsa, por ser essa pessoa maravilhosa e uma super-vovó.

Ao meu pai, Manoel Mello, por ser ter sido o grande inspirador da nossa equipe e sem o qual nada teria acontecido.

Ao meu irmão, Carlos Eduardo, por estar sempre pronto para ajudar em qualquer circunstância.

À Dr^a. Fernanda Bered, pela dedicada orientação, sem medir esforços e tempo, auxiliando, estudando e corrigindo tudo, principalmente no que se refere à estatística. Obrigada pela sua amizade também.

À Maria Helena Bodanese Zanetinni, por estar sempre pronta para ajudar em todos os momentos e por suas fundamentais correções à esta dissertação.

À Eliane Kaltchuk dos Santos por ser acima de tudo, uma ótima amiga e, apesar da CongradBio, sempre arrumar um tempinho e dar valiosas sugestões ao trabalho.

À Clarisse Palma da Silva. Bom, o que falar da minha melhor amiga, parceira e comadre, sem ela, a pesquisa dentro da família Bromeliaceae jamais teria começado no Laboratório de Genética Vegetal. Clá, obrigada por tudo, tu és uma excelente pesquisadora e ótima amiga!

À amiga Camila Martini Zanella por toda ajuda com os infames géis de poliacrilamida, pela ótima convivência e por ser parceira de todas as horas.

Ao Lucas Caetano Tieppo da Silveira, por toda a sua dedicação, pela ajuda na coleta de material e de dados, por ser um grande parceiro e amigo e por me agüentar todo esse tempo.

À amiga Jamilla Sampaio por trabalhar dia e noite, se dedicar ao máximo e por ter aparecido e fortalecido nosso grupo, valeu Jami. Essa garota vai longe!

À amiga Sílvia Nair Cordeiro Richter pela amizade, pelo companheirismo e por todas as fotos de géis, de plantas, etc.

À querida amiga Ana Paula Körbes pela amizade, parceria, conversas, risadas e horas de estudo antes das provas e seminários. E por me ouvir sempre.

À amiga Ana Cristina Arend por ser uma excelente profissional e sempre estar disponível a ouvir todo o tipo de assunto, sempre dando ótimos conselhos, idéias e sugestões.

Ao meu amigo Riggs, não consigo me adaptar com esse apelido... Pela eterna amizade e pelas conversas imprescindíveis.

Aos amigos Luiz Ernesto Costa Shmidt, Ricardo Webber e Priscilla Zamberlan pela ajuda nos trabalhos de campo.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular Vegetal e do Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas do Departamento de Genética da UFRGS em especial ao Ricardo, Adriana Giongo, Anelise, Milena Homirich, Samanta, Liliana, Júlio, Adriana Ambrozini, Rafael, Roberto, Rogéria e Gustavo pela amizade e ótima convivência durante esses dois anos.

Aos colegas de Mestrado, Daniel, Gustavo e Rogéria pela ótima convivência e troca de idéias nas horas difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Genética Ecológica Animal, Ernesto, Adriano, Nicolas e Maurício pelas ótimas discussões e sugestões ao trabalho.

À Dr^a. Helga Winge pelos inúmeros conselhos e relevantes sugestões.

Ao amigo Júlio César de Lima pela revisão do Capítulo II e pela convivência amigável e por sua disposição para o trabalho.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular Elmo J. Antunes Cardoso e à Ellen pelo apoio na solução de inúmeros “probleminhas” e situações.

Às professoras Dr^a. Tatiana Chies e Dr^a. Loreta Brandão de Freitas pela revisão deste manuscrito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela subvenção das bolsas.

À equipe do Parque Estadual de Itapuã, em especial ao Sr. Jairo, pela parceria nas coletas e experimentos de campo sempre com um ótimo humor e para quem nunca falta assunto.

ÍNDICE

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	2
1. 1. Considerações Gerais.....	2
I. 2. <i>Vriesea gigantea</i> (Gaudichaud, 1846).....	4
I. 3. Biologia Reprodutiva: Sistema de cruzamento, Fertilidade, Biologia da Polinização e fertilidade.....	8
I. 3. 1. Sistema de Cruzamento e Fertilidade.....	8
I. 3. 2. Biologia da Polinização e Fenologia.....	12
I. 4. Marcadores Moleculares.....	16
I. 5. Parque Estadual de Itapuã.....	19
I. 6. OBJETIVOS.....	22
I. 6. 1. Objetivo Geral.....	22
I. 6. 2. Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO II - Fertility of <i>Vriesea gigantea</i> Gaud. (Bromeliaceae), in southern Brazil.....	23
Abstract.....	25
Introduction.....	26
Materials and Methods.....	28
Results and Discussion.....	31
References.....	36
Tables and Figures.....	40

CAPÍTULO III - Reproductive system of <i>Vriesea gigantea</i> Gaud. (Bromeliaceae), in southern Brazil.....	50
Abstract.....	52
Introduction.....	53
Materials and Methods.....	55
Results.....	59
Discussion.....	61
References.....	65
Tables and Figures.....	70
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO GERAL.....	77
CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I. 1. Considerações gerais

A família Bromeliaceae está dividida em três subfamílias: Pitcarnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae, cada uma compreendendo vários gêneros e espécies (Smith e Downs, 1974, 1977 e 1979; Leme e Marigo, 1993). Possui aproximadamente 2750 espécies conhecidas (Benzing, 2000) e apresenta seu centro de diversidade genética no leste do Brasil, principalmente na Mata Atlântica (Reitz, 1983), sendo que 15 dos seus 54 gêneros são endêmicos desta região. Dentre as inúmeras espécies de bromélias descritas, aproximadamente 76 delas ocorrem no Rio Grande do Sul, com representantes das três subfamílias.

As bromélias possuem uma distribuição geográfica limitada à faixa intertropical das Américas, com uma única exceção no Oeste Africano – *Pitcairnia feliciana* (Harms. & Mildbr.) (Costa, 2002). As espécies da família Bromeliaceae passaram por uma extensa radiação adaptativa, e hoje, ocupam ambientes extremos e com hábitos que variam de terrestre a epífita (Ranker *et al.*, 1990). Ao longo de toda a sua área de distribuição podem-se citar exemplos de populações que habitam ambientes xéricos como as restingas, os campos de altitude, os campos rupestres, a caatinga e os desertos mexicanos. São também muito freqüentes e abundantes em ambientes mesófilos como a Mata Atlântica e as cadeias montanhosas no noroeste da América do Sul e na América Central (Costa, 2002). Podem ser encontradas desde o nível do mar até altitudes que chegam a 4000 metros, em regiões úmidas e desérticas, em locais com muita ou pouca luminosidade, apresentando adaptabilidade a vários tipos de ambientes.

As espécies da família Bromeliaceae caracterizam-se por apresentar o caule geralmente curto recoberto por folhas dispostas espiraladamente ao seu redor formando uma roseta. As folhas apresentam tricomas peltados na superfície, cuja principal função é a absorção de água e nutrientes (Benzing, 1990). Outra característica peculiar da família é a presença de estigma espiral-conduplicado (Brown e Gilmartin, 1984).

As bromélias são utilizadas como plantas ornamentais em ambientes externos ou internos, sendo extremamente apreciadas no mundo todo, principalmente nos Estados Unidos, Europa e Japão, onde seu cultivo movimenta uma economia considerável (Paula e Silva, 2000). Além disso, podem ser utilizadas na fruticultura, como no caso do abacaxi, e na produção de xaropes, como no caso de *Bromelia antiacantha* (Bert.), a “bananinha-do-mato”. Mais de 90 espécies de bromélias são utilizadas para os mais diversos fins: fibras, forragem, alimentação humana, ornamentação, em rituais místicos, entre outros (Bennett, 2000). Por esses motivos, a coleta predatória e a perda de habitat devido à ação antrópica, contribuem para o aumento da taxa de plantas vulneráveis, ameaçadas de extinção ou mesmo em extinção. Está estimado que, de um total de 270.000 espécies de plantas, atualmente 34.000 estejam ameaçadas de extinção (IUCN, 1998), entre as quais estão diversas espécies de bromélias.

O Brasil é o maior centro de diversidade da família Bromeliaceae, onde ocorre cerca de 50% das espécies. Todavia, o interesse pelo seu cultivo para a comercialização como plantas ornamentais é muito recente, datado principalmente do início dos anos 90. Atualmente, a crescente demanda de mercado vem sendo responsável pelo aumento na produção e comercialização de bromélias. No entanto, a intensificação do extrativismo ilegal, especialmente daquelas espécies com ciclos de vida longos, vem reduzindo drasticamente muitas populações, principalmente aquelas oriundas da Mata Atlântica (Coffani-Nunes, 2002).

I. 2. *Vriesea gigantea* (Gaud., 1846)

A subfamília Tillandsioideae, a qual pertence o gênero *Vriesea* (Lindl.), apresenta nove gêneros e aproximadamente 1100 espécies, sendo que os gêneros *Tillandsia* (L.), *Vriesea* e *Guzmania* (Mez.), são os que apresentam o maior número de espécies, 518, 230 e 175, respectivamente (Costa, 2002).

A espécie *Vriesea gigantea* (Figura 1), como tantas outras espécies do gênero e também do restante da família, tem alto potencial ornamental, e como muitas outras, faz parte da lista de espécies ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul (SEMA: www.sema.rs.gov.br). É uma planta exuberante cujo indivíduo adulto com inflorescência chega a atingir mais de 2 metros de altura (Reitz, 1983). Pode apresentar tanto hábito terrestre como epífita (Smith e Downs, 1977). Está distribuída desde o Espírito Santo até o Rio Grande do Sul, sendo encontrada em uma faixa altitudinal de 5 a 500 m (Smith e Downs, 1977; Reitz, 1983).

Devido à presença de cisternas em *V. gigantea*, alguns trabalhos sugerem uma modulação microclimática funcional que possibilita o estabelecimento de várias espécies associadas (Stuntz, *et al.*, 2002). Desta forma, *V. gigantea* participa de maneira ativa em processos ecológicos das matas, sendo utilizada como fonte de água e abrigo para muitos invertebrados e vertebrados, o que foi relatado por Benzing (2000), também, para outras espécies de bromélias. Schmidt (2003) observou que a composição da fauna de aranhas residentes em *V. gigantea* difere substancialmente daquela encontrada nos substratos arbóreos adjacentes da mesma região no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul.

Com relação aos possíveis polinizadores, Vogel (1969) sugeriu com base nos atributos florais relacionados à síndrome de polinização para quiropterofilia, que diversas

espécies de *Vriesea*, seção *Xiphon*, como por exemplo, *V. atra* (Mez.), *V. bituminosa* (Waw.), *V. gigantea* e *V. longicaulis* (Bak.) Mez, podem ser polinizadas por morcegos. Os espécimes de *V. gigantea* possuem flores branco-amareladas, corola tubular mais larga que as espécies de *Vriesea* polinizadas por beija-flores, e estigma do tipo copulato; as flores abrem ao entardecer e murcham na manhã seguinte, coincidindo com o período de atividade dos morcegos (Benzing, 1980); os morcegos alimentam-se do néctar que fica disponível no momento da abertura das flores (Sazima *et al.*, 1995). Após a frutificação ocorre reprodução vegetativa por brotamento. Entretanto, a espécie não se caracteriza por reprodução clonal, uma vez que não forma touceiras, podendo ser encontrados, no máximo, três clones por indivíduo (Reitz, 1983); a dispersão dos diásporos é anemocórica (Smith e Downs, 1974).

Foram observadas visitas de morcegos glossofagíneos nas flores de *V. atra*, *V. longiscapa* (Ule) e *V. gigantea* (Sazima *et al.*, 1995; Sazima *et al.*, 1999), na Serra do Mar e Serra da Mantiqueira, em São Paulo. Aparentemente, *Anoura caudifer* (Figura 2), é o principal morcego glossofagíneo, senão o único, que visita flores em locais de Mata Atlântica com grandes altitudes (Buzato *et al.*, 1994; Sazima *et al.*, 1994; Sazima *et al.*, 1999).

A distribuição geográfica de espécies de morcegos glossofagíneos no Rio Grande do Sul foi descrita por Fábian *et al.*, (1999), que constataram que os morcegos da espécie *A. caudifer* ocorrem em áreas de Floresta Estacional Decídua. Em geral, os morcegos glossofagíneos visitam as flores seguindo um circuito denominado de “rota-de-captura”, que se caracteriza por visitas a flores distribuídas de forma dispersa, plantas de porte pequeno a médio, com flores tubulares e com bastante quantidade de néctar. Essas visitas são repetidas e regulares às plantas de uma determinada área, favorecendo a polinização cruzada e o fluxo gênico entre populações adjacentes (Webb e Bawa, 1983). O pólen tem

vido encontrado, preferencialmente, na face e no tórax dos morcegos (Sazima *et al.*, 1999). Segundo Sazima *et al.* (1999), nas populações de *V. gigantea* da Serra da Mantiqueira – SP, em média, 6 a 7 flores abrem por noite, as quais têm comprimento médio da corola de 34,1mm. As flores produzem 152,8 µl de néctar por flor, em média, com 17,85% de concentração de açúcar.



Figura 1. Indivíduo adulto de *V. gigantea* do Parque Estadual de Itapuã.

Foto: Clarisse Palma da Silva



Figura 2. Morcego glossofagíneo *Anoura caudifer*.

<http://filin.vn.ua/mammels/phylostomatidae.htm>

I. 3. Biologia Reprodutiva: Sistema de Cruzamento, Fertilidade, Biologia da Polinização e Fenologia

I. 3. 1. Sistema de Cruzamento e Fertilidade

Diferentes espécies de plantas podem apresentar exclusivamente um dos modos de reprodução, assexual ou sexual, e um sistema de cruzamento, autogamia ou alogamia, mas o mais comum é haver um modo de reprodução e sistema de cruzamento predominante, com eventos esporádicos do outro tipo (Bodanese-Zanettini e Cavalli, 2003). Estas características estão diretamente relacionadas à composição genética das populações naturais, e seu entendimento é essencial para os programas de conservação de espécies que estão em risco de extinção (Wong e Sun, 1999; Bodanese-Zanettini e Cavalli, 2003). Outros trabalhos apontam que a reprodução vegetativa (Murawski e Hamrick, 1990) e os mecanismos de polinização também têm um efeito marcante na composição e estrutura genética espacial e temporal de populações (Ritland e Jain, 1981; Ge e Sun, 1999).

Plantas observadas *in situ* e em cultivo, considerando a sua morfologia floral e diversos experimentos de polinização, confirmam a existência de diferentes sistemas de cruzamento entre as bromélias, os quais demonstram correlações com certos aspectos da história natural e ecologia das mesmas (Benzing, 2000).

Algumas características adicionais, as quais influenciam as proporções da progênie que são resultantes de auto-fecundação ou de fecundação cruzada, podem ser observadas. A dicogamia (maturação assincrônica dos órgãos sexuais) e a heterostilia (diferença espacial entre os órgãos sexuais, que limita a autopolinização) promovem a alogamia em muitas espécies auto-compatíveis, e diminuem a obstrução do estigma em espécies autoimcompatíveis (Benzing, 2000). A protoginia – amadurecimento do gineceu antes do androceu – ocorre quase que sem exceção em mais de 150 espécies do gênero *Tillandsia*

analisadas (Gardner, 1982). Martinelli (1994) observou protandria – amadurecimento do androceu antes do gineceu – em 17 espécies de *Vriesea* polinizadas por pássaros e morcegos.

Qualquer que seja a condição fundamental para a família em relação ao sistema de cruzamento, a fecundação cruzada é reforçada pela auto-incompatibilidade amplamente encontrada nas subfamílias Bromelioideae e Tillandsioideae e, embora não confirmado, provavelmente em Pitcairnioideae também (Benzing, 2000). Alguns casos geneticamente confirmados de auto-incompatibilidade em Bromeliaceae são os de *Ananas comosus* (L. Merrill), *A. ananassoides* (Bak.) L.B. Smith e *A. bracteatus* (Lindl.) Schult. & Schult.

Além da auto-incompatibilidade, existem muitos outros mecanismos que obrigam a fecundação cruzada. A dioicia ocorre em todas as subfamílias de Bromeliaceae, mas em poucas espécies, e espécies próximas algumas vezes podem se reproduzir por mecanismos muito diferentes (Benzing, 2000). A grande maioria dos gêneros exibe hermafroditismo e alguns, como o gênero *Catopsis*, inclui espécies dióicas e hermafroditas.

A biologia floral, a estrutura espacial das populações e as interações entre planta e polinizador, são também determinantes do sistema de cruzamento e sucesso reprodutivo (Gaudeul e Till-Bottraud, 2004). Além disso, recursos abióticos, como qualidade do solo e da água, pluviosidade e temperatura, agem sobre a produção de pólen e de sementes. Portanto, a esterilidade dos indivíduos é muito difícil de demonstrar, especialmente *in situ*, onde uma grande variedade de fatores ambientais pode reduzir a frutificação. A limitação de pólen atinge 62% das espécies, ou por causa da baixa produção de pólen, devido a efeitos abióticos, ou à efeitos bióticos como a baixa frequência do polinizador (Byers, 1995).

Freqüentemente, a fertilidade das populações, refletida na produção de sementes viáveis, é afetada pela destruição de habitat e conseqüentemente, pela fragmentação dessas

populações, o que, em espécies auto-compatíveis, pode levar ao endocruzamento e redução da variabilidade genética intrapopulacional. A reprodução e a produção de descendentes são os primeiros processos biológicos afetados. O endocruzamento, a redução de recursos atrativos para polinizadores e a redução da qualidade do habitat são exemplos de fatores negativos que surgem em função da redução do tamanho das populações (Kéry e Matthies, 2004).

A viabilidade das sementes e germinação é um dos aspectos menos estudados na reprodução de bromélias. Com relação à germinação, Downs (1963) analisou a germinação em diferentes condições de luminosidade e temperatura para diversas espécies: as espécies tropicais, como *V. scalaris* (E. Morren), não germinaram a 15°C; a melhor resposta foi observada entre 20°C e 30°C e a porcentagem de germinação foi alta para a maioria das espécies (Tabela 1). A lista de Downs (1963) contém 33 representantes das três subfamílias e indicou que somente *T. stricta* (Bak.) Mez e *V. scalaris* geminaram tanto na luz como no escuro.

No que se refere à viabilidade das sementes, na maioria das bromélias, as sementes perdem a sua viabilidade relativamente rápido quando armazenadas. Entretanto, as sementes de algumas espécies xerofíticas têm permanecido viáveis por mais de um ano, quando mantidas em laboratório sob condições adequadas de temperatura, umidade e luminosidade para o armazenamento (Martinelli, 1994). Alguns exemplos são as sementes de *Billbergia elegans*, que permaneceram viáveis por até 72 semanas e as sementes de *Neoregelia concêntrica* (Vell.) Smith, que germinaram até 76 semanas de armazenamento. Além destas, sementes de algumas espécies podem permanecer viáveis por até 30 meses, como por exemplo, as de espécies do gênero *Puya* (Benzing, 2000).

Apesar da família Bromeliaceae apresentar uma ampla diversidade no que se refere a diferentes sistemas de cruzamento e estratégias de reprodução, aspectos relacionados à

fertilidade de espécies desta família, verificando-se a produção média de flores, formação de frutos, fecundidade das plantas (produção de sementes viáveis) e viabilidade das sementes, bem como a altura da planta e inflorescência, não foram relatados até o momento.

Tabela 1. Efeito da exposição à luz sobre a germinação de sementes de bromélias.

Espécies	Porcentagem de germinação				
	Escuro contínuo	8 h luz	1 h luz	6 h luz	12 h luz
<i>Pitcairnia sp.</i>	0	10	0	-	92
<i>Pitcairnia flamea</i>	0	91	0	0	-
<i>Vriesea hematina</i>	0	96	96	-	96
<i>Vriesea scalaris</i>	6	100	100	100	-
<i>Nidularium fulgens</i>	0	98	98	-	98
<i>Aechmea coelestis</i>	0	83	65	-	91
<i>Puya berteroniana</i>	0	100	0	100	-

(tabela resumida de Downs, 1963).

I. 3. 2. Biologia da Polinização e Fenologia

Apesar de ser uma família com grandes atrativos florais, poucos trabalhos têm sido publicados sobre a biologia da polinização de Bromeliaceae. Alguns trabalhos da metade do século XX em diante relataram que os beija-flores são os principais polinizadores de Bromeliaceae (Ruschi, 1949, 1982; Wolf, 1970; McWillians, 1974). Entretanto, grande parte destes trabalhos, como verificado por McWillians (1974), não identificou precisamente os vetores da polinização. Autores como Johow (1898), Porsch (1932, 1935, 1936), Abendroth, (1965), Vogel (1969), Wolf (1970), Salas (1973), e mais recentemente, Sazima e Sazima (1989), Murawski e Hamrick (1990), Martinelli (1997) e Canela e Sazima (2005), fizeram observações mais precisas sobre os polinizadores e seu comportamento, transferência de pólen e produção de frutos e sementes.

A família Bromeliaceae apresenta uma ampla radiação adaptativa no que se refere à vetores de polinização (Benzing, 2000), mas está entre as poucas famílias de plantas em que a polinização por vertebrados predomina sobre a entomofilia (Sazima e Sazima, 1989; Vogel, 1969; Martinelli, 1997). Uma pequena exceção ocorre na espécie *Bromelia antiacantha*, na qual se observam características tanto para ornitofilia, quanto para melitofilia (Canela e Sazima, 2005). Nesta espécie também foi observada uma estratégia de florescimento do tipo “big-bang” (Canela e Sazima, 2005), caracterizada por um grande número de flores abertas em poucos dias, em diferentes partes da inflorescência, um padrão que difere de outras bromélias (Benzing, 2000).

A biologia da polinização para diferentes espécies de bromélias foi investigada por Martinelli (1994). Todas as espécies com antese noturna e polinizadas por morcegos apresentaram maior média de volume de néctar ($\cong 200 \mu\text{l}$) e menor concentração de açúcar ($\cong 14\%$), enquanto que, em média, espécies polinizadas por beija-flores apresentam menor

volume ($\cong 26 \mu\text{l}$) de néctar e maior concentração de açúcar ($\cong 24\%$) (Martinelli, 1994; Tabela 2).

Em sua grande maioria, as espécies do gênero *Vriesea*, seção *Xiphion*, são polinizadas por vertebrados, principalmente beija-flores e morcegos (Martinelli, 1994; Tabela 2). Utley (1983) encontrou três diferentes grupos de espécies para o gênero *Vriesea*, baseado em observações dos possíveis polinizadores: aquelas com antese diurna e polinizada por beija-flores, espécies com antese crepuscular, as quais o autor sugere serem possivelmente polinizadas por beija-flores e aquelas com antese noturna, que o autor presumiu serem polinizadas por morcegos e insetos noturnos.

Em Bromeliaceae a quiropterofilia tem sido relatada para relativamente poucas espécies por Porsch (1932, 1935, 1936), Vogel (1969), Salas (1973), Sazima e Sazima (1989) e Sazima *et al.* (1999). Estas observações foram feitas apenas para a família Tillandsioideae (espécies do gênero *Vriesea*), entretanto, no trabalho de Sazima e Sazima (1989), foi relatado também que a espécie *Encholirium glaziovii* foi polinizada por morcego, sendo o primeiro caso de quiropterofilia dentro da subfamília Pitcairnioideae.

Espécies polinizadas por morcegos, como o cactus *Stenocereus eruca*, exibem sistemas de polinização altamente especializados, enquanto que espécies que não ocorrem nos trópicos, exibem um sistema moderadamente generalizado, provavelmente devido à incerteza da atividade do morcego, sendo polinizadas tanto por morcegos quanto por visitantes diurnos, (Clark-Tapia e Molina-Freaner, 2004).

Os ciclos de floração e de frutificação de uma espécie podem estar ligados à dinâmica dos herbívoros, à maximização da polinização e à competição por polinizadores

Tabela 2. Sistema de cruzamento e biologia da polinização em espécies do gênero *Vriesea* da região sudeste da Mata Atlântica (Martinelli, 1994). FC = fecundação cruzada; AC = autocompatível, (-) não-analisado.

Espécie	Antese	Principal Polinizador	Volume médio de néctar (μ l)	Concentração média de açúcar no néctar (%)	Sistema de Cruzamento
<i>Vriesea altomacaensis</i>	diurna	beija-flores	-	25,6	-
<i>Vriesea atra</i> var. <i>atra</i>	noturna	morcegos	209	13,3	FC/AC
<i>Vriesea bituminosa</i> var. <i>bituminosa</i>	noturna	morcegos	207	13,4	FC/AC
<i>Vriesea ensiformis</i> var. <i>ensiformis</i>	diurna	beija-flores	32,4	21,9	FC/AC
<i>Vriesea flamea</i>	diurna	beija-flores	-	-	-
<i>Vriesea haematina</i>	diurna	beija-flores	137	21,1	FC/AC
<i>Vriesea heterostachys</i>	diurna	beija-flores	-	27,4	FC/AC
<i>Vriesea hydrophora</i>	noturna	morcegos	90,8	13	FC/AC
<i>Vriesea incurvata</i>	diurna	beija-flores	32,58	22,2	FC/AC
<i>Vriesea longicaulis</i>	noturna	morcegos	-	17	FC/AC
<i>Vriesea longiscapa</i>	noturna	morcegos	-	15,9	FC/AC
<i>Vriesea neglutinosa</i>	diurna	beija-flores	63,3	19,8	FC/AC
<i>Vriesea paraibica</i>	diurna	beija-flores	20,2	22	FC/AC
<i>Vriesea psittacina</i> var. <i>psittacina</i>	diurna	beija-flores	-	-	FC/AC
<i>Vriesea regina</i>	noturna	morcegos	218	12,4	FC/AC
<i>Vriesea sparsiflora</i> var. <i>sparsiflora</i>	diurna	beija-flores	19,6	22,7	FC/AC
<i>Vriesea vagans</i>	diurna	beija-flores	-	25,1	FC/AC

(modificado de Martinelli, 1994)

e dispersores. Assim, entender o padrão fenológico de uma espécie vegetal é relevante para compreender sua dinâmica e a de populações animais relacionados a ela.

Com relação ao desenvolvimento floral em Bromeliaceae, alguns estudos mostraram que o tempo necessário para o desenvolvimento da inflorescência é variável, o que aparentemente está relacionado ao gênero ou subfamília. O período requerido para todas as flores da inflorescência abrirem também é bastante variável, com algumas espécies necessitando de um dia, como *Tillandsia usneoides*, e outras de 71 dias, como *Alcantarea imperialis* (Martinelli, 1994). Em geral, a abertura das flores ocorre da base para o ápice nas inflorescências, com algumas exceções em que a antese ocorre primeiro no centro seguindo para a base e para o ápice (Downs, 1974) ou de forma aleatória, como *Bromelia antiacantha* (Canela e Sazima, 2005). Na Tabela 3 está apresentada a fenologia de algumas espécies do gênero *Vriesea* do estado do Rio de Janeiro.

Tabela 3. Fenologia floral de espécies do gênero *Vriesea*.

Espécies									
	Ag	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr
<i>Vriesea altomacaensis</i>					■	■			
<i>Vriesea atra</i> var. <i>atra</i>					■	■	■		
<i>Vriesea bituminosa</i> var. <i>bituminosa</i>					■	■	■		
<i>Vriesea ensiformis</i> var. <i>ensiformis</i>					■	■	■		
<i>Vriesea flamea</i>					■	■			
<i>Vriesea haematina</i>					■	■	■		
<i>Vriesea heterostachys</i>					■	■	■		
<i>Vriesea hydrophora</i>					■	■	■		
<i>Vriesea longicaulis</i>					■	■	■		
<i>Vriesea neglutinosa</i>					■	■	■		
<i>Vriesea paraibica</i>					■	■	■		
<i>Vriesea psittacina</i> var. <i>psittacina</i>					■	■	■		
<i>Vriesea sparsiflora</i> var. <i>sparsiflora</i>					■	■	■	■	
<i>Vriesea vagans</i>					■	■	■		

(modificado de Martinelli, 1994).

I. 4. Marcadores Moleculares

Na última década, um grande número de novas ferramentas genéticas moleculares tornou-se disponível para detalhar os estudos de processos genéticos das populações. Estudos de polinização e biologia reprodutiva, utilizando marcadores moleculares, podem fornecer informações precisas e detalhadas sobre o sistema de cruzamento de uma espécie (Dawson *et al.*, 1997; Ge e Sun, 1999; He *et al.*, 2004; Sgorbati *et al.*, 2004). A grande maioria destas técnicas pode ser utilizada também, para resolver questões de ecologia populacional, tais como, variações na sobrevivência, fertilidade, fluxo gênico, reprodução e imigração, as quais podem ajudar também a compreender os processos de adaptação a circunstâncias ecológicas particulares (Parker *et al.*, 1998).

Além disso, análises utilizando marcadores moleculares fornecem informações sobre alguns fatores que determinam a estrutura genética populacional, tais como estimativas de padrões de dispersão do pólen, distância de dispersão e fluxo gênico, as quais são particularmente importantes para a otimização de programas de conservação *in situ* (Dawson *et al.*, 1997; Grashof-Bokdam *et al.*, 1998; He e Smouse, 2002; He *et al.*, 2004; Ouborg *et al.*, 1999).

Os marcadores moleculares do tipo SSR (“simple sequence repeat”) ou microssatélites consistem de pequenos motivos (1 a 6 nucleotídeos) repetidos lado a lado em regiões não codificadoras do DNA. São marcadores de natureza codominante que possibilitam, para um determinado *locus*, a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos. A grande vantagem na utilização de marcadores do tipo microssatélites parece estar associada ao fato de, na maioria dos casos, representarem um único *locus*, o qual é frequentemente multialélico (Parker *et al.*, 1998; Pinto, 2001). Desse modo, estes marcadores podem ser utilizados como ferramentas que auxiliam na determinação do

modo de reprodução, questões relacionadas à paternidade, à estrutura genética de populações, a comparação entre espécies e determinação de gêneros (McDonald e Potts, 1997; Parker *et al.*, 1998).

Boneh *et al.* (2003) descreveram *loci* de microssatélites para *Tillandsia fasciculata* (Swartz) e *Guzmania monostachya* (L.) Rusby ex Mez, ambas pertencentes à subfamília Tillandsioideae. Foram desenhados “primers” para 15 *loci*, sendo que sete “primers” resultaram em produtos de amplificação interpretáveis e cinco *loci* foram polimórficos em uma ou ambas as espécies. Destes cinco, quatro “primers” foram desenvolvidos utilizando seqüências de *T. fasciculata*, e um utilizando seqüências de *G. monostachya*. Os “primers” foram utilizados nas duas espécies, confirmando as relações de proximidade entre elas (Terry *et al.*, 1997; Horres *et al.*, 2000). Os *loci* descritos para essas espécies foram usados para estudar a estrutura da população das mesmas, em relação ao seu sistema de reprodução bem como o seu papel de (re)colonização de florestas secundárias. Os “primers” de microssatélites desenvolvidos para *T. fasciculata* e *G. monostachya* podem ser usados para outras espécies dentro do gênero e talvez para outro gênero correlato como *Vriesea*, pertencente à mesma subfamília (Boneh *et al.*, 2003).

Sarthou *et al.* (2003) desenharam sete “primers” que flanqueiam regiões de microssatélites polimórficos úteis para acessar a estrutura genética de *Pitcairnia geyskesii* (L.B. Smith), investigar os níveis de autofecundação, fluxo gênico e diferenças entre e dentro de populações fragmentadas. Em outro trabalho, Sarthou *et al.* (2001) utilizaram isoenzimas para acessar a variabilidade genética de *P. geyskesii* e encontraram um alto nível de polimorfismo, o que revelou que esta espécie utiliza a fecundação cruzada como sistema de cruzamento preferencial.

Um estudo amplo sobre diversidade genética e biologia reprodutiva em Bromeliaceae foi realizado por Sgorbati *et al.* (2004). Esses autores estudaram populações de *Puya raimondii*, espécie nativa dos Andes peruanos que está em risco de extinção. Para as análises de variabilidade genética foram utilizados dois marcadores moleculares, cSSR (“chloroplast simple sequence repeat”) e AFLP (“amplified fragment length polymorphism”); para as análises de biologia reprodutiva foram utilizados cSSR e RAPD (“random amplified polymorphic DNA”), e citometria de fluxo para a análise da quantidade de DNA. Os pesquisadores concluíram que há uma baixíssima diversidade genética entre as populações, apesar de ter sido constatado que a espécie realmente realiza fecundação cruzada. Os autores atribuem a baixa variabilidade genética encontrada a um possível gargalo de garrafa que poderia ter ocorrido repetidas vezes nas populações.

Estudos de correlação envolvendo um grande número de espécies filogeneticamente divergentes, indicam que o sistema de cruzamento, bem como fatores históricos e ambientais afetam a distribuição da diversidade aloenzimática em plantas (Hamrick e Godt, 1989). Em adição, estudos de biologia reprodutiva incluindo a biologia da polinização e análises com marcadores genéticos podem fornecer informações detalhadas do sistema de cruzamento de uma espécie (Ge e Sun, 1999). Essas estimativas são geradas pela análise da variação genética da progênie de plantas de populações naturais, usando o modelo de Ritland e Jain (1981).

I. 5. Parque Estadual de Itapuã

O Parque Estadual de Itapuã - PEI (Figura 3) está localizado ao sul do Distrito de Itapuã, no município de Viamão, a 57 km de Porto Alegre, entre as coordenadas 30° 22' 46" S e 50° 58' 59" W. Tem como limites o Hospital Colônia de Itapuã e o Beco Santa Fé ao norte; ao sul e ao leste a laguna dos Patos e a oeste o lago Guaíba. O Parque destina sua área para três fins principais: pesquisa, educação e recreação. Desde o Decreto nº 25.162, de 23 de dezembro de 1976, que considerou a área do Parque de 1535 ha, houve sucessivas incorporações de áreas adjacentes, fazendo com que a área total atualmente seja de aproximadamente 5566 ha (Ilha, 2000).

De maneira geral, o clima local classifica-se como subtropical úmido, sem estação seca, com temperaturas médias anuais oscilando em torno de 17,5°C e precipitação média anual entre 1100 a 1300 mm. As chuvas são bem distribuídas ao longo do ano e os verões quentes, com temperatura média de 22°C. A predominância dos ventos é no sentido nordeste, sendo que ocorrem ventos sul e sudoeste durante o inverno, condicionando uma alteração bem pronunciada na dinâmica das águas que limitam o Parque.

Apesar da diversidade de ambientes encontrados - morros cobertos por mata, afloramentos graníticos e vegetação rupestre, dunas, restingas, banhados, lagoas, praias e costões rochosos – (Figura 4), o PEI abriga uma amostra significativa, embora empobrecida, da fauna que habitava a região em épocas anteriores ao povoamento. De qualquer maneira, a ocorrência de espécies animais ameaçadas de extinção (e.g. *Lutra longicaudis* - lontra, *Alouatta guariba* - bugio-ruivo, *Caiman latirostris* - jacaré-do-papo-amarelo) serve como indicativo de que a área merece atenção especial como refúgio das populações naturais destas espécies.

Na flora, destaca-se a ocorrência da vegetação característica dos morros graníticos (do chamado Escudo Rio-grandense) e da vegetação nativa da orla do Lago Guaíba, cada vez mais rara devido à expansão urbana. São encontrados figueiras e butiazeiros, além de diversos tipos de orquídeas e bromélias (Rambo, 1942), como *Aechmea recurvata*, *Bromelia antiacantha* e *V. gigantea*, as espécies de bromélias mais abundantes do PEI. É importante notar que a vegetação arbóreo-arbustiva, típica de restinga, sofreu grande impacto antrópico no período compreendido entre as décadas de 1970 a 1990, como exploração de pedreiras, criação de gado e agricultura de subsistência (Da Silva, 1994), o que levou à destruição de parte desse habitat.

No Parque, *V. gigantea* está representada por numerosos indivíduos de grande porte, vivendo no interior de capões de mata. Segundo Schmidt (2003), um dos locais de maior abundância de *V. gigantea* dentro do PEI é o Morro da Grotta. Ainda não se sabe se a menor densidade encontrada em outros locais do PEI é reflexo de perturbações ambientais mais severas no passado, ou se realmente este morro possui características únicas que o diferencia em relação aos outros morros graníticos da região. No entanto, é possível encontrar aglomerados de indivíduos por vários locais do PEI.

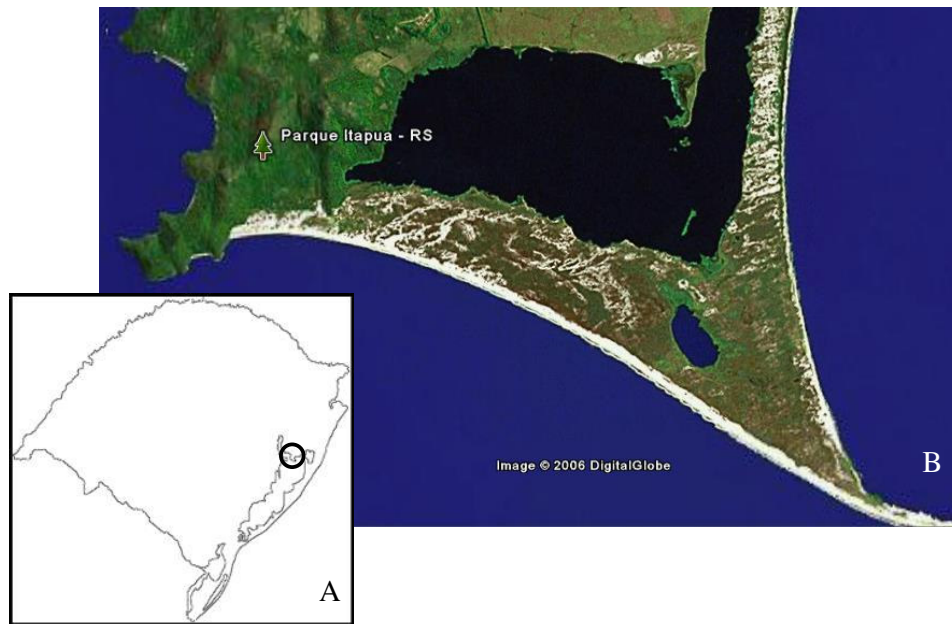


Figura 3. (A) Mapa do Rio Grande do Sul mostrando a localização do Parque Estadual de Itapua; (B) Detalhe do PEI mostrando o limite do Parque, linha vermelha (---).



Figura 4. Vista do Morro da Pedra da Visão: Lagoa Negra (esquerda), Praia de Fora - Lagoa dos Patos (direita) - Parque Estadual de Itapua.

I. 6. OBJETIVOS

I. 6. 1. Objetivo Geral

O presente estudo está inserido em um projeto amplo que visa contribuir para os estudos genéticos e biológicos da família Bromeliaceae, enfocando principalmente espécies nativas do Rio Grande do Sul. Devido à falta de informações sobre a biologia reprodutiva de *Vriesea gigantea*, bem como acerca das consequências da ação antrópica sobre as populações e sua reprodução, este projeto tem como objetivo geral investigar características relacionadas à biologia reprodutiva desta espécie, tais como o sistema de cruzamento, fertilidade e viabilidade das sementes.

I. 6. 2. Objetivos Específicos

- Avaliar a fertilidade de plantas de *V. gigantea* através da viabilidade das sementes e da produção de flores, frutos e sementes.
- Identificar o sistema de cruzamento preferencial de *V. gigantea* através de experimentos controlados de polinização e da análise de progênies utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites.
- Comparar quatro populações do Parque Estadual de Itapuã, considerando todos os parâmetros descritos acima.

**CAPÍTULO II - Fertility of *Vriesea*
gigantea Gaud. (Bromeliaceae), in
southern Brazil**

Trabalho aceito na revista American Journal of Botany

FERTILITY OF *VRIESEA GIGANTEA* GAUD. (BROMELIACEAE), IN SOUTHERN BRAZIL ¹

GECELE M. PAGGI, CLARISSE PALMA-SILVA, LUCAS C. T. SILVEIRA, ELIANE KALTCHUK-SANTOS, MARIA H. BODANESE-ZANETTINI AND FERNANDA BERED²

Laboratório de Genética Molecular Vegetal and Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

¹Manuscript received_____; revision accepted_____

The authors thank the Itapuã State Park for helping in collecting samples. We would like to thank the following colleagues for collecting plant material and / or provision of locality information: Luiz E. C. Schmit, Sr. Jairo Soares, Ricardo Webber, Carlos E. M. Gomes, Jamilla A. T. Sampaio, Sílvia N. C. Richter, and Priscilla Zamberlan. We also thank Nelson Rufino de Albuquerque, Júlio César de Lima and Bernadeth Silva for English revision and suggestions. Research was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and PROPESQ/UFRGS (Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

²*E-mail address:* fbered@portoweb.com.br

Tel: +55-51-33166742/ Fax: +55-51-33167311

ABSTRACT

Vriesea gigantea Gaud. is an epiphytic bromeliad species occurring in the Atlantic Rainforest, in Southern and South-eastern Brazil. In plants, the pollen availability and abiotic resources can limit fruit and seed production. Open pollination has been investigated and pollen supplementation undertaken to estimate the possibility of pollen limitation in natural populations. The flowering pattern in the inflorescence is another intrinsic feature that may limit the fruit and seed production. The investigation of the relative importance of these factors can help elucidate their impact on the overall reproductive success of *V. gigantea*. The fertility of *V. gigantea* was studied in four natural populations of Itapuã State Park, Southern Brazil. Plant fertility was assessed considering: plant and inflorescence size, flower production, fruit and seed set, flower and fruit set pattern and seed viability and germination rate. Supplemental pollination was performed in adult plants in order to determine whether fruit production in *V. gigantea* is limited by reception of pollen. The average number of flowers per plant was 143.93. The fruit set per population ranged from 9.88 to 69.92%, and the number of seeds per fruit ranged from zero to 839. The results showed that *V. gigantea* has a high production of flowers, fruits and seeds. Seeds are highly viable in all populations, presenting average germination rate of 94%. Plants of *V. gigantea* from Itapuã State Park are highly fertile. A high proportion of fruits matured in the manual hand pollination treatment, indicating that species is self-compatible. Pollination treatments showed evidence of pollinator limitation in the Itapuã State Park population.

Key words: Bromeliaceae; Flower production; Fruit set; Itapuã State Park; Pollen-limitation; Seed viability; Self-compatibility

INTRODUCTION

The Bromeliaceae family has nearly 3000 species divided into three subfamilies: Pitcairnioideae, Bromelioideae, and Tillandsioideae (Smith and Downs, 1974). *Vriesea gigantea* Gaud. (Tillandsioideae) is an epiphytic, saxicolous, and terrestrial bromeliad that occurs in the Atlantic Rainforest, Brazil, and is very appreciated as an ornamental plant. The wild populations of *V. gigantea* have been reduced by anthropogenic disturbance of its habitat and by predatory collection practices, being included in the list of endangered species of Rio Grande do Sul State. In spite of this, there are no publications about the fertility of *V. gigantea*.

Several features associated with plant fertility have been used to determine the population viability, such as flower production, fruit and seed set, pattern of fruit production, pollen limitation, seed viability and plant size (Ishii and Kadono, 2002; McIntosh, 2002; Burne et al., 2003; Ortiz et al., 2003; Buide, 2004; Clark-Tapia and Molina-Freaner, 2004; Johnson et al., 2004; Kéry and Matthies, 2004; Hampe, 2005). The fruit and seed production in plants can be limited by the availability of pollen and abiotic resources. The decrease of seed production can be the result of insufficient pollinator visits or reduction in both pollen quantity and pollen quality deposited per visit (Huang and Guo, 2002; Ashman et al., 2004; Buide, 2004). Abiotic resource limitations include inadequate soil nutrients, water, light and climatic factors (Willson and Burley, 1983; McIntosh, 2002; Gaudeul and Till-Bottraud, 2004). Although pollen- and abiotic resource-limitation appears to be an alternative hypothesis for inadequate seed production in plants, some authors have suggested that in equilibrium, seed production in plants should be limited by both factors (Haig and Westoby, 1988; Dogterom et al., 2000). Moreover, the disruption of plant-pollinator mutualisms has the potential of affecting the viability of populations. This

phenomenon may occur when habitat fragmentation directly affects the pollinator populations or when plant population drops below the critical size threshold needed to attract and sustain pollinators (Johnson et al., 2004). Forest fragmentation and the resulting spatial isolation of plant species can modify the activity of pollinators and may have important implications for the reproductive success and reproductive systems in plants they pollinate (Byers, 1995).

The flowering pattern is another intrinsic feature that may limit the fruit and seed production. When fruit set is low, the distribution of fruits and seeds within an individual plant is not uniform and frequently fruit maturation has been to decrease according to the position from the base to the apex of individual inflorescence (Diggle, 1995; Ortiz et al., 2003). This could be a consequence of the opening sequence, since flowers that open first have the opportunity to be pollinated and fertilized earlier (Diggle, 1995).

Seed viability and germination rate are among the less studied aspects of bromeliad fertility and reproductive biology (Benzing, 2000). These aspects vary within Bromeliaceae because most species respond differently to light and temperature. The temperatures prevailing *in situ* allow us to predict their behavior in the laboratory (Downs, 1963; Benzing, 2000).

The investigation of the relative importance of the factors described above will help elucidate their impact on the overall reproductive success of *V. gigantea*. The present study aimed to evaluate the fertility of *V. gigantea* in four populations from southern Brazil. Specifically, our goals were: (1) to record flower, fruit and seed production, pattern of fruiting in the inflorescence, and plant/inflorescence height, (2) to evaluate whether there are fertility differences among populations; (3) to investigate whether fruit and seed set are pollen- or abiotic-resource limited; (4) to determine the seed germination and viability.

MATERIALS AND METHODS

Study species – *Vriesea gigantea* Gaud. is basically an outcrossing (Vogel, 1969) bat pollinated bromeliad species (Sazima et al., 1999) (Fig. 1-A). It ranges from Espírito Santo (ES) to Rio Grande do Sul (RS) in the Atlantic Rainforest - South-eastern and Southern Brazil - respectively. Furthermore, *V. gigantea* plays an important role in ecosystems, because its vegetative structure form tanks that are able to hold many liters of water, providing a resource base for the associated biota (Benzing, 2000). Typical inflorescence has a central axis with several branches on each side and one flower on each side of the lateral axis (Reitz, 1983). The flowers (Fig. 1-B) are tube-shaped with three petals and its colour agreeing with the chiropterophilous syndrome (Vogel, 1969). Flowers in the basal position of the inflorescence open first, whereas flowers in the center and apex position open later (Reitz, 1983; Benzing, 2000).

Study sites – The Itapuã State Park (50° 50' and 51° 05' W, and 30° 20' and 30° 27' S) is located in Viamão, RS, 57 Km from Porto Alegre (Fig. 2). The average temperature for the area is around 17.5 °C and annual rainfall averages 1200 mm/year. The four populations studied are located in the Trilha do Fenômeno, Praia do Araçá, Pedra da Visão and Morro da Grotta, which are 5 to 25 km apart (Table 1). *Vriesea gigantea* is common in the vegetation predominantly formed by *Butia capitata* (Mart.) Becc. and *Ficus organensis* (L.). The Itapuã State Park holds a large number of *V. gigantea* specimens with more than 1,000 adult plants distributed in clustered populations.

Reproductive Success: Flower Production, Fruit and Seed Set – Field studies were carried out during the reproductive period of plants (August/2004). The reproductive

success was evaluated taking into account the parameters related to flower production, fruit and seed set as following: (a) plant and inflorescence height (m); (b) the reproductive potential: total number of flowers per plant; (c) fruit set (i.e. the fraction of flowers developing into a mature fruit): % fruits = total number of fruits per plant/total number of flowers per plant x 100 (according to Burne et al., 2003); (d) number of seeds per fruit (from five fruits randomly collected from 10 plants): estimated by comparing the weight of 20 seeds with the weight of all seeds from each fruit; (e) flower and fruit set position: proportion of flowers and fruit set in the base, center and apex of the inflorescence. The position of each flower and fruit was recorded for each inflorescence and was classified into three categories: apex (when found in the upper third of the inflorescence), center (in the middle third), or base (in the lower third).

Seed viability and germination rate – To analyze seed viability, five plants of *V. gigantea* were randomly sampled in each population (August 2004), totalling of 20 plants. Two fruits (30 seeds/fruit) were used per plant. Seeds were disinfected and placed in Petri dishes with a culture medium, containing ½ MS salts (Murashige and Skoog, 1962), B5 vitamins (Gamborg et al., 1968), 3% sucrose, 0.3% PhytigelTM, pH 6.4. The dishes were incubated in a climate-control chamber (Digmec – YTWC-1) with relative humidity near 100 % and photoperiod of 16 h light at 25°C and 8 h dark at 22°C. Germination was monitored daily for 30 days.

Pollen-supplementation – Field studies were conducted during the plant reproductive cycle, from January to March and August/2005. To determine whether fruit production in *V. gigantea* is limited by reception of pollen, supplemental pollination was performed in the four populations studied. The pollination treatments were accomplished

as follows: a) Open-pollination (OP): flowers, which opened during the day and were available to any visitor, were tagged. b) Manual self-pollination (MSP): when flowers opened around midday and pollen was available, they were hand-pollinated by rubbing anthers with fresh pollen in the stigma from the same flower and then bagged. Two or three flowers from 16 plants distributed throughout the populations were pollinated, whereas three other single flowers on each plant were marked as control (OP treatment). The results (i.e. aborted or developing fruit) of the pollination treatments were recorded six months later and the fruit set was calculated using the formula described above. Mature fruits were collected and the number of seeds per fruit estimated through the weight method. To evaluate whether pollen-supplementation had an effect on seed set, the number of seeds from hand-pollinated and naturally pollinated fruits were compared.

Statistical analyses – All statistical analyses were performed using the SAS software package (Version 8, SAS Institute, Cary, USA). When necessary, data transformation was performed to stabilize variances and achieve approximate normality of residuals. The plant height parameter and pollen-supplementation data were analyzed by the nested Kruskal-Wallis test. The inflorescence height (square root transformed), flower production, fruit set, flower/fruit set position and the number of seeds per fruit were analyzed by the nested ANOVA test followed by the Tukey test to determine if the differences among plants or populations were significant.

RESULTS

Reproductive Success: Flower Production, Fruit and Seed Set – The overall means of plant and inflorescence height were 0.95 m and 1.51 m, respectively, without significant differences among populations (Table 2). The mean of flowers per plant was 143.93, without significant differences among populations (Table 3). The fruit set per plant ranged from 9.88 to 69.92% with an overall mean of 42.71%. Significant differences were detected among populations. Fruit set was higher in Pedra da Visão and lower in Trilha do Fenômeno and Praia do Araçá populations (Table 3). The number of seeds per fruit ranged from zero to 839, with significant differences among plants (Fig. 3). Plants number 6, 8 and 10 had significantly lower production of seeds per fruit when compared with plant number one; no seeds were obtained from plant 9.

The architecture of the inflorescence did not affect the flower production pattern (Fig.4). On the other hand, fruits were not homogeneously distributed within the inflorescence: the upper third (apex) presented significantly lower fruit set than the lower third (base) (Fig. 4).

Seed viability and germination rate – The seed viability and germination rate of *V. gigantea* were very high. An average of 94% of seeds from open-pollinated flowers germinated *in vitro*. After 15 days in culture, most seeds had germinated.

Pollen-supplementation – On average, 47.92 % of open-pollinated flowers developed fruits. The mean fruit set of manual self-pollinated plants was 85.40 % (Table 4). In spite of the higher fruit production in the manual self-pollinated plants, there was no significant difference between treatments. In contrast, there was a significant effect of

pollen-supplementation in seed set per fruit. Manual self-pollinated flowers produced more than twice as many seeds as naturally-pollinated flowers (549.97 vs. 237.51, Table 4).

Data on pollen-supplementation per population are displayed in Table 5. The mean of seeds per fruit in Morro da Grota was significantly higher than the Pedra da Visão population, under manual self-pollination. Nonetheless, there was no significant difference in the fruit set among populations.

In the open treatment (control), although the differences among populations were not significant, Praia do Araçá population yielded only a mean of 102.89 seeds per fruit, around 3.8 times lower than the Morro da Grota population (Table 5).

DISCUSSION

Reproductive Success: Flower Production, Fruit and Seed Set – The adult individuals of *V. gigantea* presented a height general mean of 2.46 m, with inflorescences (Table 2). This is in agreement with Reitz (1983) who reported an average height of 2.00 m for adult individuals of this species. The four analyzed populations of *V. gigantea* produced a high number of flowers, fruits and seeds. Considering mean of flowers per plant (143.93), the mean of seeds per fruit (303) and taking into account that 43% of flowers developed into fruit it is possible to estimate that one plant can produce about 18,753 seeds in each reproductive cycle. Intriguingly, although differences among populations were detected only on fruit set, plants from Praia do Araçá presented lower values in all parameters evaluated (Table 2 and 3). These results suggest lower plant fertility in this population. Several factors may have been responsible for this phenomenon. As the Praia do Araçá population is located near (5m) the Guaíba Lake (Figure 2), the local

growth conditions may be quite different from those of other populations. McIntosh (2002) and Kéry and Matthies (2004) reported that the reduction in plant size, flower size, number of seeds per plant or fruit and flower number in small populations can be a consequence of lower habitat quality, reduced pollination or inbreeding depression. The relative importance of each factor in limiting fruit set in the Praia do Araçá population is difficult to be determined. Nevertheless, we assumed that abiotic resources, such as climatic variation and soil conditions, and other factors as pollen limitation may have contributed to the reduced plant fertility in this population.

It was observed a decrease on fruit set from the base to the apex of the inflorescence in *V. gigantea* (Fig. 4). Similar result was reported by Ortiz et al. (2003) in *Stryphnodendron adstringens*. Factors as the timing, frequency, duration of the flowering period and flowering pattern seem to affect the reproductive success of flowering plants (Rathcke and Lacey, 1985; Diggle, 1995; Ortiz et al., 2003). According to Thomson (1989), in some species the reproductive potential differs from one flower to another, e.g., number of ovules may be few in flowers which open later, having low chance of producing fruits, and usually found in the apex of the inflorescence. It seems that the plant directs little resources to the production of ovules which have less chance to be converted into seeds (Ortiz et al., 2003).

Seed viability and germination rate – Seeds from all analyzed populations were highly viable, presenting a germination rate of 94%. Similar results were reported by Downs (1963) for other bromeliad species. Seed production, seed viability and germination rate, longevity and mortality rate of plants may have an effect on the population dynamics (Kéry and Matthies, 2004). As far as we know, the results here described are the first reported on seed viability and germination rate in *V. gigantea*. Further studies on plant

longevity, mortality rate and recruitment of new individuals will be essential to evaluate the *V. gigantea* populations dynamic.

Pollen-supplementation – The mean fruit set from manual self-pollinated plants was 85.40% indicating that *V. gigantea* is self-compatible as described to other members of this genus (Martinelli, 1994). In natural conditions, 47.92% of open-pollinated flowers developed fruits (Table 4). Similar result was recorded by Canela and Sazima (2005) for *Bromelia antiacantha* (Bert.), whose fruit set under natural conditions, occurred in 50% of the flowers. The differences among populations regarding seed production in the pollen-supplementation experiments may be associated with the lower level of genetic variability found in Pedra da Visão population (Paggi et al., in prep). Reduced genetic variability may result in inbreeding depression, decrease in plant size and fruit/seed set (Huang and Guo, 2002; Buide, 2004; Kéry and Matthies, 2004; Yang et al., 2005).

Under open-pollination, plants from Praia do Araçá yielded 3.8 fold less seeds than those from Morro da Grota (Table 5). It could be hypothesized that the low seed production may be due to pollen-limitation in Praia do Araçá. Similarly, Clark-Tapia and Molina-Freaner (2004) and Ishii and Kadono (2002) concluded that pollen-limitation may be the most important factor contributing to the low seed productivity for *Stenocereus eruca* and Poaceae species, respectively. Furthermore, in *Ferocactus cylindraceus* species, both extrinsic and intrinsic factors were considered important in limiting reproductive output (McIntosh, 2002).

Pollen-limitation is fairly common in plants and can be considered a natural phenomenon (DiFazio et al., 1998; Thomson, 2001; Ishii and Kadomo, 2002). According to Buide (2004), evidences from pollination treatments and spatial variation in fruit set seem to indicate that pollinators limit female fecundity. As *V. gigantea* is a bat-pollinated

species (Sazima et al., 1999), observations on pollinator visits could provide important information to confirm our hypotheses of pollen-limitation. The occurrence of glossophagines bats, such as *Anoura caudifer* and *Glossophaga soricina*, has been recorded throughout the Itapuã State Park (Fábian et al., 1999; Thales Freitas, personal communication). Moreover, the largest bat population was observed in Morro da Grota (Wander Silva, personal communication). The high abundance of bats in this population could explain the high number of seeds and fruit setting under open-pollination (Table 5). However, our observation on pollinator visits are limited and further field studies must be done to best understand the bats and other pollinator activities.

In conclusion, this study demonstrates that the analyzed populations are viable. Plants produce large number of flowers, fruits and highly viable seeds. A high proportion of fruits matured in the manual hand pollination treatment, indicating that species is self-compatible. Reduction in seed set of individuals from Praia do Araçá was probably due to pollinator limitation. The pollen-limitation is most likely a consequence of habitat fragmentation, and, specifically, a disruption of the bat pollination mutualism.

LITERATURE CITED

- ASHMAN, T.-L., T. M. KNIGHT, J. A. STEETS, P. AMARASEKARE, M. BURD, D. R. CAMPBELL, M. R. DUDASH, M. O. JOHNSTON, S. J. MAZER, R. J. MITCHELL, M. T. MORGAN AND W. G. WILSON. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85: 2408-2421.
- BENZING, D. H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, USA.
- BUIDE, M. L. 2004. Intra-inflorescence Variation in Floral Traits and Reproductive Success of the Hermaphrodite *Silene acutifolia*. *Annals of Botany* 94: 441-448.
- BURNE, H. E., C. J. YATES AND P. G. LADD. 2003. Comparative population structure and reproductive biology of the critically endangered shrub *Grevillea althoferorum* and two closely related more common congeners. *Biological Conservation* 114: 53-65.
- BYERS, D. L. 1995. Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 82: 1000-1006.
- CANELA, M. B. F. AND M. SAZIMA. 2005. The Pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil. *Plant Biology* 7: 1-6.
- CLARK-TAPIA, R. AND F. MOLINA-FREANER. 2004. Reproductive ecology of the rare clonal cactus *Stenocereus eruca* in the Sonoran desert. *Plant Systematic and Evolution* 247: 155-164.
- DIFAZIO, S. P., M. V. WILSON AND N. C. VANCE. 1998. Factors Limiting Seed Production of *Taxus brevifolia* (Taxaceae) in Western Oregon. *American Journal of Botany* 85(7): 910-918.
- DIGGLE, P. K. 1995. Architectural effects and the interpretation of patterns of fruit and seed development. *Annual Review of Ecology and Systematic* 26: 531-552.
- DOGTEROM, M. H., M. L. WINSTON AND A. MUKAI. 2000. Effect of pollen load size and source (self, cross) on seed and fruit production in highbush blueberry cv. 'Bluecrop' (*Vaccinium corymbosum*; Ericaceae). *American Journal of Botany* 87(11): 1584-1591.
- DOWNS, R. J. 1963. Photocontrol of germination of seeds of the Bromeliaceae. *Phyton* 21: 1-6.
- FÁBIAN, M. E., A. M. RUI AND K. P. OLIVEIRA. 1999. Distribuição geográfica de morcegos Phyllostomidae (Mammalia: Chiroptera) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia* 87:143-156.
- GAMBORG, O.L., R. A. MILLER AND K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experiment Cell Research* 50: 151-158.
- GAUDEUL, M. AND I. TILL-BOTTRAUD. 2004. Reproductive ecology of the endangered alpine species *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Phenology, gene dispersal and reproductive success. *Annals of Botany* 93: 711-721.
- HAIG, D. AND M. WESTOBY. 1988. On limits to seed production. *American of Naturalist* 131: 757-759

- HAMPE, A. 2005. Fecundity limits in *Frangula alnus* (Rhamnaceae) relict populations at the species' southern range margin. *Oecologia* 143: 31-38.
- HUANG S-Q. AND Y-H. GUO. 2002. Variation of pollination and resource limitation in a low seed-set tree, *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae). *Botanical Journal of Linneum Society* 140: 31-38.
- ISHII, J. AND Y. KADOMNO. 2002. Factors influencing seed production of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* 72: 129-141.
- JOHNSON, S. D., P. R. NEAL, C. I. PETER AND T. J. EDWARDS. 2004. Fruiting failure and limited recruitment in remnant populations of the hawkmoth-pollinated tree *Oxyanthus pyriformis* subsp. *pyriformis* (Rubiaceae). *Biological Conservation* 120: 31-39. Doi:10.1016/j.biocon.2004.01.028
- KÉRY, M. AND D. MATTHIES. 2004. Reduced Fecundity in Small Populations of the Rare Plant *Gentianopsis ciliate* (Gentianaceae). *Plant Biology* 6: 683-688.
- MARTINELLI, G. 1994. Reproductive biology Bromeliaceae in the Atlantic rainforest southeastern Brazil. PhD Thesis, University of St. Andrews, EUA.
- MCINTOSH, M. E. 2002. Plant size, breeding system, and limits to reproductive success in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae). *Plant Ecology* 162: 273-288.
- MURASHIGE, T. AND F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- ORTIZ, P.L., M. ARISTA, P. E. OLIVEIRA AND S. TALAVERA. 2003. Pattern of Flower and Fruit Production in *Stryphnodendron adstringens*, an Andromonoecious Legume Tree of Central Brazil. *Plant Biology* 5: 592-599.
- RATHCKE, B. AND E. P. LACEY. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* 16: 179-214.
- REITZ, R. 1983. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.
- SAZIMA, M., S. BUZATO AND I. SAZIMA. 1999. Bat-pollinated Flower Assemblages and Bat Visitors at Two Atlantic Forest Sites in Brazil. *Annals of Botany* 83: 705-712.
- SMITH, L. B. AND R. J. DOWNS. 1974. Bromeliaceae (Pitcarnioideae). *Flora Neotropica Monograph* 14, vol. 1. Hafner Press, New York, New York, USA.
- THOMSON, J. D. 1989. Deployment of ovules and pollen among flowers within inflorescences. *Evolution Trends Plant.* 3: 65-68.
- THOMSON, J. D. 2001. Using pollination deficits to infer pollinator declines: can theory guide us. *Conservation Ecology* 5(1): 6.
- VOGEL, S. 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteil. III. *Flora* 158: 289-323.
- WILLSON, M. F. AND N. BURLEY. 1983. Mate choice in plants. Princeton University Press, Princeton.
- YANG, C-F., S-G. SUN AND Y-H. GUO. 2005. Resource limitation and pollen source (self and outcross) affecting seed production in two louseworts, *Pedicularis siphonantha* and *P. longiflora* (Orobanchaceae). *Botanical Journal of Linneum Society* 147: 83-89.

TABLES

TABLE 1. Location of the four study sites (populations) within the Itapuã State Park, Brazil.

Population	Location
Morro da Grotta	30° 22' 13,3" S, 51° 01' 42,2" W
Pedra da Visão	30° 22' 40,2" S, 51° 01' 44,7" W
Trilha do Fenômeno	30° 21' 40,3" S, 51° 01' 51,1" W
Praia do Araçá	30° 21' 31,5" S, 51° 02' 41,1" W

TABLE 2. Reproductive success: Means of plant and inflorescence height of the four studied populations.

Population	Analyzed	Mean of plant	Mean of inflorescence
	plants (n)	height (m) ¹	height (m) ²
Morro da Grota	6	1.04 (0.75-1.50)	1.70 (1.40-2.00)
Trilha do Fenômeno	8	1.03 (0.75-1.25)	1.57 (1.30-1.75)
Pedra da Visão	5	0.93 (0.80-1.20)	1.46 (1.35-1.50)
Praia do Araçá	4	0.78 (0.70-1.10)	1.29 (1.20-1.50)
Total	23	0.95 (0.70-1.50)	1.51 (1.20-2.00)

¹ Kruskal-Wallis Test (5%), $P = 0.0941$; ² Anova Test (5%) (square root transformed), $F = 2.63$ and $P = 0.0757$.

TABLE 3. Reproductive success: Means of flower production and rate of fruit setting in four populations of *Vriesea gigantea*.

Population	Plants sampled (n)	Mean of flower production ¹	Fruit set (%) ²
Pedra da Visão	5	120.40 (88-130)	69.92 (41.22-95.45) a
Morro da Grota	8	182.25 (114-267)	48.32 (23.20-65.40) ab
Trilha do Fenômeno	8	159.88 (86-220)	42.72 (10.00-70.05) b
Praia do Araçá	5	113.20 (45-206)	9.88 (6.30-16.66) b
Total	26	143.93 (45-267)	42.71 (6.3-95.45)

a, b – Means with the same letter are not significantly different by the Anova test (5%);

¹ $F = 2.50$ and $P = 0.0864$; ² $F = 6.69$ and $P = 0.0002$.

TABLE 4. Pollen-supplementation: Means of fruit and seed set in the pollination treatments.

(MSP) Manual self-pollination; (OP) Open-pollination.

Treatments	Number of flowers	Number of fruits	Fruit set (%)	Mean of seed set/fruit
MSP	37	32	85.40	549.97 a
OP	47	22	47.92	237.51 b

Kruskal-Wallis Test (5%), $P < 0.0001$.

TABLE 5. The effects of pollen-supplementation on rate of fruit and seed setting in four populations of *Vriesea gigantea*: MSP, Manual self-pollination; OP, Open-pollination.

Population	Treatments			
	MSP		OP	
	<i>fruit set(%)</i>	<i>N° of seeds</i>	<i>fruit set(%)</i>	<i>N° of seeds</i>
Morro da Grotta	90.00	691.50 a	66.67	395.33
Praia do Araçá	100.00	652.83 ab	44.44	102.89
Trilha do Fenômeno	73.33	516.42 ab	33.33	187.71
Pedra da Visão	83.33	276.71 b	44.44	186.56

a, b – Means with the same letter are not significantly different; Kruskal-Wallis Test (5%),

$P = 0.0179$;

FIGURES LEGENDS

Fig. 1 *Vriesea gigantea*: (A) Aspect of plant, bar = 1 cm ; (B) Detail of the flower, bar = 1 cm; (C) Detail of the fruit, bar = 0,5 cm.

Fig. 2 (A) Brazil map; (B) Rio Grande do Sul state; (C) Parque de Itapuã (Itapuã State Park) and the locality of the four study sites, bar = 25 km.

Fig. 3 Number of seed per fruit of *V. gigantea* estimated from five fruits from 10 plants, during 2004. Bars show mean values and minimum and maximum values. Columns that share the same letter are not significantly different by the Tukey test (5%), $F = 4.46$ and $P = 0.0004$.

Fig. 4 Means of flower production and fruit set in different position of the inflorescence. BA= base, CE= center, AP= apex. (n = 26 plants). Columns in the same category that share the same letter are not significantly different by the Tukey test (5%), $F = 3.88$ and $P = 0.025$.

FIGURE 1

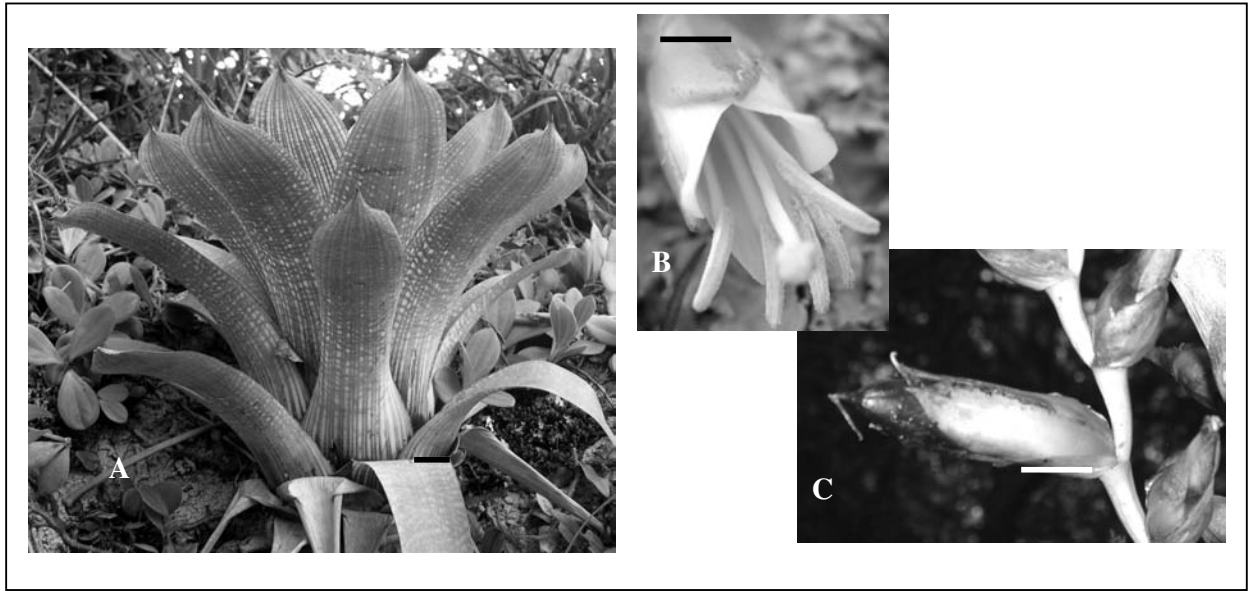


FIGURE 2

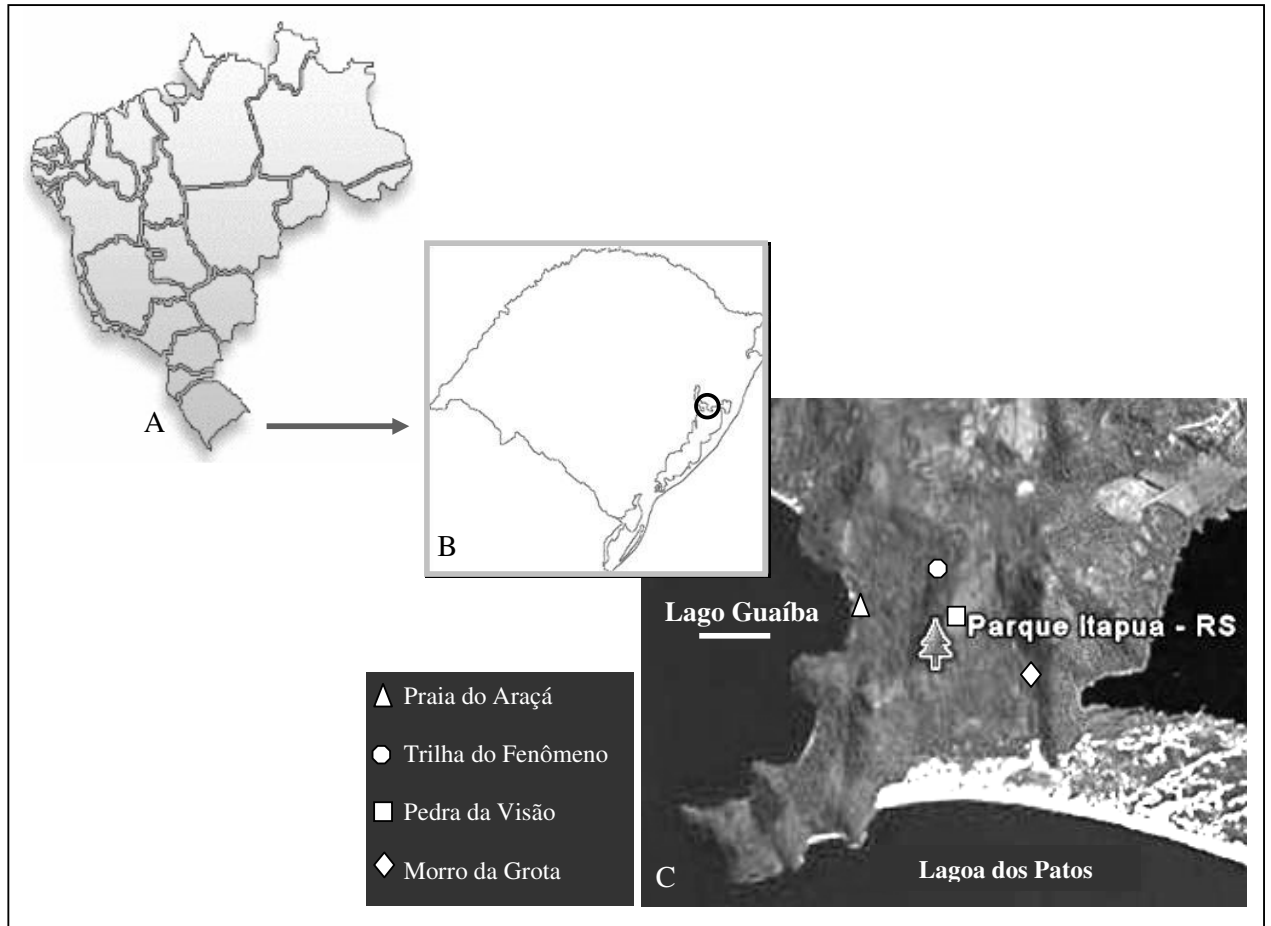


FIGURA 3

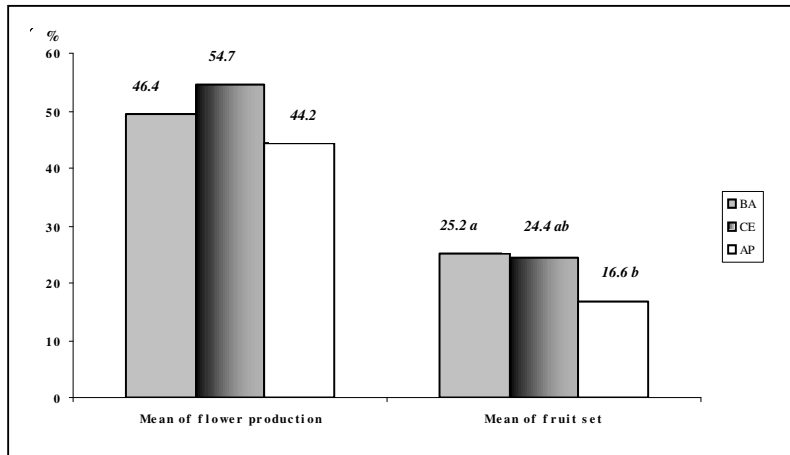
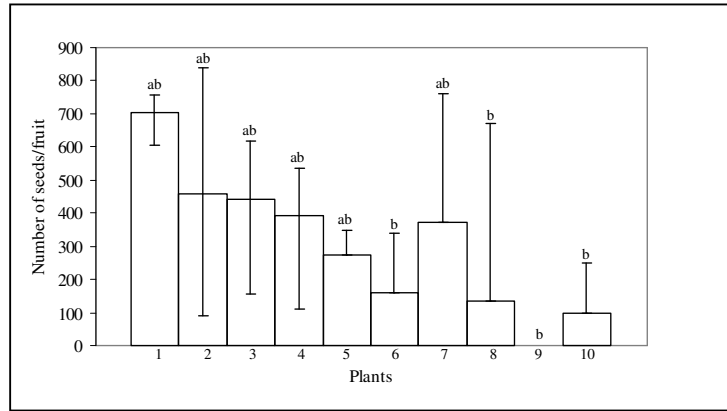


FIGURE 4



**CAPÍTULO III - Reproductive system
of *Vriesea gigantea* Gaud.
(Bromeliaceae), in southern Brazil**

Trabalho a ser submetido à revista Biological Conservation

Reproductive system of *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae), in southern Brazil

Gecele M. Paggi^{*}, Clarisse Palma-Silva, Lucas C. T. Silveira, Jamilla A. T. Sampaio,
Eliane Kaltchuk-Santos, Maria H. Bodanese-Zanettini, and Fernanda Bered

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Caixa Postal 15053, Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract

The reproductive system is directly related to the genetic structure and variability of natural populations. *Vriesea gigantea* is an epiphytic bromeliad that occurs in the Atlantic Rainforest, southern and south-eastern Brazil. However, little is known about the reproductive biology of this species. Information on its reproductive system and outcrossing rate is needed to develop efficient conservation strategies. We investigated four populations of *V. gigantea* from Itapuã State Park, Brazil. We used hand-pollination experiments to determine the reproductive system and progeny analyses to investigate the outcrossing rate of this species. Manual self-pollination resulted in 85.40% of fruit production; under open-pollinization the fruit set was 47.92%. The results showed that *V. gigantea* is self-compatible, the spontaneous selfing is reduced, and the autogamy index (AI) is 0.19, suggesting that the species is nonautogamous and predominantly pollinator-dependent for fruit setting. A quantitative analysis of the reproductive system was performed using progeny arrays assayed for simple sequence repeats (SSR). Despite the outbreeding system of *V. gigantea*, microsatellites data revealed low outcrossing rate ($t_m = 0.146$), and low genetic variation at population level ($A = 1.63$ and $H = 0.25$), in comparison with other animal-pollinated outbreeding plant species.

Keywords: Bromeliad; Reproductive system; Outcrossing rate; Microsatellites; Self-compatible

^{*} Corresponding author. Tel.: +55-51-33166742; fax: +55-51-33167311

E-mail address: gecelepaggi@yahoo.com.br (Gecele M. Paggi)

1. Introduction

The Bromeliaceae family has nearly 3000 species divided into three subfamilies: Pitcairnioideae, Bromelioideae, and Tillandsioideae (Smith and Downs, 1974). *Vriesea gigantea* Gaud. (Tillandsioideae, Fig. 1-A), is an epiphytic bromeliad that occurs in the Atlantic Rainforest, Brazil. It is very appreciated as an ornamental plant, and is included in the list of endangered species of the Rio Grande do Sul State. The wild populations of *V. gigantea* have been destroyed or restricted to small size due to habitat destruction and fragmentation caused by anthropogenic disturbance, and by predatory collections. Notwithstanding the threat of local to global extinction, genetic diversity of bromeliads taxa has scarcely been documented. Comparative population studies using molecular markers are needed to collect information on the levels and patterns of genetic diversity and outcrossing rates of wild bromeliads, which is a first step to facilitate their conservation.

Vriesea gigantea is a bat-pollinated species (Sazima *et al.*, 1999) and ranges from Espírito Santo to Rio Grande do Sul. Its vegetative structures form tanks that are able to hold many liters of water, therefore providing a resource base for associated biota (Benzing, 2000). Typical inflorescences have a central axis with several branches on each side and one flower on each side of the lateral axis (Reitz, 1983). The flowers (Figure 1-B) are tube-shaped with three petals and its colour agreed with the chiropterophilous syndrome that suggests outcrossing as the reproductive system of this species (Vogel, 1969). Flowers in the inflorescence base and center position open first, while flowers in the apex position open later (Reitz, 1983; Benzing, 2000). Nevertheless, the knowledge about the reproductive biology of *V. gigantea* is quite limited and as far as we know, no information is available about its fertility.

Bromeliaceae may be qualified as the most representative and important family in both bat- and bird-pollinated flower assemblages of the Atlantic rainforest in south-eastern Brazil (Sazima *et al.*, 1999). The floral structure of bromeliads is generally specialized in a manner that prevents spontaneous self-fertilization and facilitates animal-mediated outcrossing (Benzing, 2000). However, panmixia is rather rare under natural conditions and nonrandom mating can result from animal-mediated autogamy, geitonogamous selfing, and biparental inbreeding (Wong and Sun, 1999).

The disruption of plant-pollinator mutualisms has the potential to affect the viability of populations. This may occur when habitat fragmentation directly affects pollinator populations or when plant population drop below the critical size threshold needed to attract and sustain pollinators (Kéry and Matthies, 2004). Forest fragmentation and the resulting spatial isolation of bromeliads species can modify the activity of pollinators and may have important implications for the reproductive success and mating systems of the plants that they pollinate. Accordingly, the reproduction of plants in small populations is often reduced, and this has been attributed to inbreeding depression, reduced attractiveness for pollinators, and reduced habitat quality in small populations (Kéry and Matthies, 2004). In fact, at a biogeographical level, the patchy distribution of epiphytes has been suggested to be a force that induces isolation between populations and promotes fast speciation. However, this will depend on how low are the levels of gene flow, and whether the population was founded by few individuals with low effective population size (Gentry and Dodson, 1987; Tremblay and Ackerman, 2001).

In plants, reproductive systems have a profound effect on the genetic composition of natural populations (Hamrick, 1982). Genetic variability is important for genetic viability, since evolutionary responses to environmental change hinge upon such variation

(Fisher, 1958). The disruption of gene flow via pollen transfer and seed dispersal also contributes to the loss of genetic diversity within populations isolated by habitat fragmentation (Hamrick, 1982).

In addition to field studies of pollination and reproductive biology, genetic marker analysis can provide accurate and detailed information on a species' reproductive system. Reproductive system of plants is commonly characterized by outcrossing rates. These estimates can be generated by examining allelic variation over many loci in progeny arrays from plants allowed to pollinate naturally, using maximum-likelihood model to exclude progeny resulting from self-fertilization (Ritland and Jain, 1981). The main objective of our research was to fill important gaps in our knowledge of the reproductive system of bromeliads. Our study aimed: 1) to investigate the reproductive system of *V. gigantea* through hand-pollination experiments; 2) to estimate the outcrossing rates using microsatellites loci (SSR – Simple Sequences Repeats).

2. Materials and methods

2.1. Study sites

We studied four populations from Itapuã State Park (30° 20' and 30° 27' S, and 50° 50' and 51° 05' W) which is located in Viamão, Rio Grande do Sul State (RS), Brazil, about 57 Km from Porto Alegre (Fig. 2). The local mean temperature is about 17.5 °C and annual rainfall averages 1200 mm/year. The vegetation consists of Atlantic Rainforest and the area was hardly altered by human intervention. The Itapuã State Park holds a large number of specimens with more than 1,000 adults plants distributed in agglomerated populations.

The populations (Trilha do Fenômeno, Praia do Araçá, Pedra da Visão and Morro da Grota) are 5 to 25 km apart from each other. Field studies were conducted during the reproductive period of the species from January to March and August/2005.

2.2. Reproductive system

We investigated the reproductive system of *V. gigantea* using controlled hand-pollination experiments with five pollination treatments during 2005 flowering season. The treatments tested for spontaneous (autonomous) selfing, asexual reproduction (agamospermy), self-compatibility, cross-pollinations and flowers under natural conditions of pollination were used as controls. These treatments were achieved using various combinations of pollinator exclusion, emasculation, and hand-pollination (Table 1). Sixteen plants from the four natural populations were used in this study. Three to five flowers were used per plant, per treatment. Plastic mesh bags (maximum mesh size 0.9 mm) were used to exclude insect visitors. Inflorescences were selected for the experiment according to their phenological state and size and were randomly assigned a pollination treatment. Flowers were emasculated before the anthers dehiscence and were pollinated during peak stigmatic receptivity with pollen from the same plant. We gently applied pollen across the stigmatic surface until it was saturated.

In order to determine the main reproductive system of *V. gigantea*, the autogamy index (AI) was calculated as the relationship between seeds from spontaneous selfing and self-pollination, according to Ramirez and Brito (1990). Autogamous and partially autogamous species show indices between 0.30 and 1.00, and nonautogamous show values below 0.30.

2.3. Plant material

For the progeny study, open-pollinated maternal half-sib seeds were collected from three individuals from each population, totaling 12 mother-plants (MP). Fruits were collected during fruiting set season, August/2004. Seeds were sterilized and placed in petri dishes containing ½ MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with B5 vitamins (Gamborg *et al.*, 1968). The petri dishes were incubated in a climate-control chamber (Digmec – YTWC-1) with relative humidity near 100 % and photoperiod of 16 h light at 25 °C and 8 h dark at 22 °C for six months. Fifteen individuals from progeny of 12 MP were used to determine outcrossing and selfing rates.

2.4. Microsatellites marker analyses

Genomic DNA extraction from fresh leaf tissue from seedlings and adult individuals (mother-plants) followed standard CTAB procedure (Doyle and Doyle, 1990). After quantification in agarose gels 0.8% using λ marker (150µg/µl), working sample solutions of 10ng/µl DNA were prepared. The microsatellites markers used in this study were developed for another bromeliad species (*Tillandsia fasciculata*) by Boneh *et al.* (2003). The PCR cocktail (20µl) contained 20ng of genomic DNA, 0.2mM dNTPs (Invitrogen), 3.0µM MgCl₂ (Invitrogen), 1 X PCR buffer (Invitrogen), (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1:5mM MgCl₂ bbpH8.3), 0.5µM of each primer (Invitrogen), and 1U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Amplifications were performed with a Applied Biosystem Gene Amp PCR System 2400 thermal controller, using the follow protocol: 94 °C for 3 min, 40 cycles of 94 °C for 20 s, the primer-specific annealing temperature for 40 s, 72 °C for 20 s, and ending with 72 °C for 5 min. The PCR products were separated on 6% polyacrilamide gels buffered with 0.5 X TBE, and detected by staining with silver nitrate.

2.5. Data analyses

Data of the fruit set and the mean number of seeds obtained from pollination treatments were analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance. Media comparisons were undertaken using the SAS (Version 8, SAS Institute, Cary, USA) software package. Number of alleles per locus (A), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were calculated for each population using the “Tools for Population Genetic Analysis” – TFPGA software. The multilocus outcrossing rate (t_m) was estimated under the mixed mating model described by Ritland and Jain (1981), with the software MLTR 2.3 (Ritland, 1990). The procedure estimates the multilocus outcrossing rate (t_m), the means single-locus outcrossing rate (t_s), the difference between estimates ($t_m - t_s$) that represents the outcrossing rate between related individuals, and the inbreeding coefficient of maternal parents (F). Standard errors were estimated based on 1,000 bootstraps between individuals within progeny array. We tested the significance level of t_m and t_s by a one-tailed Student's t -test based on the null hypothesis that t_m or $t_s = 1$. To verify the importance of the biparental inbreeding in autogamy, we also compared $t_m - t_s$ to zero using a Student's test. Variability of t_m among the analyzed populations and the significance level of F were tested using a χ^2 test. The test was carried out by subtracting each population estimate from the global mean, dividing these differences by the standard error associate with each population outcrossing rate, squaring these quantities, and summing over populations. This statistics was tested as χ^2 -value, with degree of freedom being one less than the number of populations (Godt and Hamrick, 1991).

3. Results

3.1. Reproductive system

The results from the controlled pollinations are summarized in Table 2 and Figure 3. The average rate of natural fruit set was 47.92% in control treatment. Fruit set was significantly lower when we tested for agamospermy (Figure 3-A). The results obtained in the other treatments were not different from the control. Pollination treatment had a highly significant effect on number of seeds per fruit (Figure 3-B). The unmanipulated control flowers produced a mean number of seeds of 237.51. A significantly higher number of seeds per fruit was obtained when we tested for self-compatibility (Figure 3-B). However, few fruits and seeds were set by spontaneous selfing treatment; *V. gigantea* is thus classified as nonautogamous, with autogamy index (AI) of 0.19.

Variation in seed set was observed among populations. Considering self-compatibility treatment, seed production in Morro da Grota was higher than Pedra da Visão population, although the fruit set had been similar (90.0 and 83.33%, respectively). In the agamospermy treatment, only one plant from Praia do Araçá population produced seeds, probably due to pollen contamination during emasculation (Table 2). Under open pollination (control treatment), the mean number of seeds in the Morro da Grota population was 3.8 times higher than Praia do Araçá (Table 2), although differences were not significant.

3.2. Outcrossing rates

Estimates of the outcrossing rate using the method of Ritland and Jain (1981) are given in Table 3. The selfing rate (s) was high in all populations, ranging from 0.800 to 0.999, with an overall mean of 0.854, indicating that 85.4% of the progenies resulted from selfing events. Obviously, multilocus outcrossing rates (t_m) were low in all populations, ranging from 0.001 (Trilha do Fenômeno) to 0.200 (Morro da Grota), with a mean value of 0.146, which indicates that only 14.6% of the progenies resulted from outcrossing events. The mean single-locus outcrossing estimates (t_s) for all population was 0.138. Significant self-fertilization rate was detected, since the means t_m and t_s were significantly lower than one (Table 3). The difference between t_m and t_s represents the outcrossing rate among related individuals, which contributes to the increase of inbreeding within populations. That differences ranged from -0.030 to 0.013 (Table 3). The mean $t_m - t_s$ was not different from zero (Table 3), indicating the absence of biparental inbreeding. Inbreeding coefficient (F) based on genotypic frequencies of maternal plants were positive and significantly greater than zero (Table 3), suggesting an excess of homozygotes in Itapuã State Park.

3.3. Genetic variation

The p2p19 and e6b microsatellite loci were examined in 12 mother-plants and 180 seedlings of their progenies. The mean number of alleles (A) within the populations was relatively low ranging from 1 to 2.5, with a mean of 1.63 (Table 4). All populations examined showed low levels of expected heterozygosity (H_e) varying from 0.03 to 0.50, with a mean of 0.25. The observed heterozygosity (H_o) varied from zero to 0.26, with a mean of 0.09, and generally lower than the expected heterozygosity. The population with the lowest genetic diversity (H_o) was Pedra da Visão, which showed only one allele of the two loci evaluated (monomorphism). The highest genetic diversity was observed in the

Morro da Grota population with observed average heterozygosity (H_o) of 0.26 and mean number of alleles per locus (A) of 2.5.

4. Discussion

4.1. Reproductive system

Our results in controlled pollination experiments (Table 2 and Figure 3A) showed that under natural conditions (control treatment), 47.92% of flowers developed into fruits. Similar results were recorded for *Bromelia antiacantha* (Bert.), in which 50% of flowers produced fruits (Canela and Sazima, 2005). *V. gigantea* is self-compatible, since a high fruit set (85.4%) was obtained in the self-compatibility treatment (Table 2). Self-compatibility is widespread in all three subfamilies of the Bromeliaceae (Martinelli, 1997; Benzing, 2000), although most of the self-compatible species need pollinator services and have several floral mechanisms such as dichogamy and herkogamy, to hinder autonomous self-pollination (Martinelli, 1997; Benzing, 2000; Wendt *et al.*, 2001, 2002; Canela and Sazima, 2003). Moreover, few fruits and seeds were set by spontaneous selfing treatment (Table 2) with AI index of 0.19, typical of nonautogamous species. Autogamous and nonautogamous reproductive systems determined by AI index, were reported for *Pitcairnia* (L.B. Sm.) species (Bromeliaceae) by Wendt *et al.* (2001).

Considering that our results indicate that *V. gigantea* is an auto-compatible species and with a low autogamy index we expected a high fruit and seed set under natural conditions. Surprisingly, our results showed a relatively low fruit and seed production in open and control treatments (Figure 3). Many factors may be responsible for low fruit and

seed set in the *V. gigantea* populations, as pollinator-limitation and floral predation. As *V. gigantea* is reliant on pollen vectors for seed production, our results suggest pollinator-limitation in all populations. The pollen limitation may be the most important factor contributing to the low seed productivity in plants (Ishii and Kadono, 2002; Clark-Tapia and Molina-Freaner, 2004). Furthermore, a moderate dependence on pollinator for seed production has been recorded for some endangered species from Florida (Evans *et al.*, 2003). In addition, we recorded some bees of *Trigona* genus visiting *V. gigantea* flowers. These species spent a long time in the same flower or inflorescence, rarely moving among plants. Similar behavior was reported by Wendt *et al.* (2001) at *Pitcairnia* species (Bromeliaceae), where these bees acted as pollinators. However, in *V. gigantea* they were observed stealing pollen and later nectar through holes at the corolla base. The bees' behavior may affect pollinator visits through aggressive interactions and reduction of resources, as reported for *B. antiacantha* (Canela and Sazima, 2005).

Comparing the open and control treatment, although the statistical analyses did not detect significant differences, it is remarkable that the fruit set in the control was 70.0% higher than in the open treatment (Figure 3). The high fruit production in the control treatment may be due to pollinator-mediated selfing, since the flowers were not emasculated.

Considering differences among populations in the self-compatibility and control treatment (Table 2), one factor responsible for low seed production in Pedra da Visão population could be inbreeding, since a reduced genetic variability ($H_o = 0$) was estimated in this population (Table 4). Accordingly, the F value calculated was the highest (0.776, Table 3). The reduced seed production due to inbreeding has been reported for a great number of species (Severns, 2003; Leimu, 2004; Kéry and Matthies, 2004).

4.2. Outcrossing rates

The low multilocus outcrossing rate (14.60%) and the high selfing rate (85.40%) observed in the *V. gigantea* populations agree with a self-compatible reproductive system. Spontaneous autogamy, pollinator-mediated selfing and geitonogamy could all contribute to a high selfing rate in self-compatible species, as *V. gigantea*. Differently of our results, it would be expected that outcrossing species with a mixed mating system would have a low level of selfing rate and high genetic variability (Soltis *et al.*, 1987). Different factors may, individually or together, explain the poor outcrossing rate in the studied populations. According Patterson *et al.* (2004), a reduction in the density of flowering plants decrease outcrossing rates in native populations; in 2003/2004 reproductive season we estimate that only 5% of the *V. gigantea* plants flowered at Itapuã State Park. A second and related explanation is that there may have been a reduced number of effective pollinators in that year, contributing to decrease of outcrossing rate. The outcrossing and selfing rates confirm that *V. gigantea* has mixed reproductive system as we described previously in the pollination experiments.

The statistic analyses did not detected significant difference between multilocus (t_m) and single locus (t_s) estimates of outcrossing rates, indicating an absence of consanguineous mating. However, the inbreeding coefficient was high ($F = 0.653$, Table 3), which can be explained because of very low genetic variability found at Itapuã State Park ($A = 1.63$ and $H_o = 0.09$, Table 4). Moreover, as each plant produces many flowers concurrently at anthesis and some pollinators often visit several flowers consecutively on the same plant, geitonogamous selfing is probably substantial. These results are quite similar to those reported for *Vincetoxicum hirundinaria*, which selfing seems occur mainly

geitonogamously, but autogamous self-pollination is also possible and the flowers can be pollinated without pollen vectors (Leimu, 2004).

4.3. Genetic variability

Microsatellites data indicate higher level of genetic variability in *V. gigantea* populations from Itapuã State Park ($H_o = 0.09$, Table 4) than previously reported on allozymes, AFLP, cSSR, and RAPD markers for *Aechmea magdalenae*, *Tillandsia recurvata* ((L.) L. and *Puya raimondii* (Harms) (Soltis *et al.*, 1987; Murawski and Hamrick, 1990; Sgorbati *et al.*, 2004), and similar to four other Bromeliaceae species, *T. ionantha* (Planch.), *A. tuitensis*, and *Pitcairnia geyskesii* (Soltis *et al.*, 1987; Izquierdo and Piñero, 2000; Sarthou *et al.*, 2001). Actually, the level of genetic variability in *V. gigantea* populations were very low, similar to values reported for species with the same characteristics, i.e. monocots, and herbaceous and perennials plants. Several factors may influence the genetic variability of plant populations. Among these, the more important are the reproductive systems (Lande and Schemske, 1985) and seed dispersal mechanisms (Hamrick and Godt, 1996). Instead, knowledge of several aspects of population biology are necessary to predict risks to population viability of species in small and fragmented populations.

Acknowledgements

We thank the Itapuã State Park for logistical support. We would like to thank Nelson Rufino de Albuquerque and Júlio César de Lima for English revision and suggestions. Tanks also to the many people who assisted in the collection of plant material and / or provision of locality information: Sílvia N. C. Richter and Sr. Jairo. CNPq and PROPESQ/UFRGS supported this study.

References

- Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 689 pp.
- Boneh, L., Kuperus, P., Van Tienderen, P.H., 2003. Microsatellites in bromeliads *Tillandsia faciculata* and *Guzmania monostachya*. Molecular Ecology Notes 3, 302-03.
- Canela, M.B.F., Sazima, M., 2003. *Aechmea pectinata*: a humminbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in southeastern Brazil. Annals of Botany 92, 731-737.
- Canela, M.B.F., Sazima, M., 2005. The Pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil. Plan Biology 7, 1-6.
- Clark-Tapia, R., Molina-Freaner, F., 2004. Reprotuctive ecology of the rare clonal cactus *Stenocereus eruca* in the Sonoran desert. Plant Systematic and Evolution 247, 155-164.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12,13-15.

- Evans, M.E.K., Menges, E.S., Gordon D.R., 2003. Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* 111, 235-246.
- Fisher, R.A., 1958. *The Genetical Theory of Natural Selection*, second revised ed. Dover Publications, New York, NY.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158.
- Gentry, A.H., Dodson, C.H., 1987. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74 (2), 205-233.
- Godt, M.J., Hamrick, J.L., 1991. Estimates of outcrossing rates in *Lathyrus latifolius* populations. *Genome* 34, 988-992.
- Hamrick, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69, 1685-1693.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J., 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 351, 1291-1298.
- Ishii, J., Kadomno, Y., 2002. Factors influencing seed production of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* 72, 129-141.
- Izquierdo, L.Y., Piñero, D., 2000. High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Australian Journal of Botany* 48, 645-650.
- Kéry, M., Matthies, D., 2004. Reduced Fecundity in Small Populations of the Rare Plant *Gentia nopsis ciliate* (Gentianaceae). *Plant Biology* 6, 683-688.
- Lande, R., 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology* 9, 782-791.

- Lande, R., Schemske, D.W., 1985. The Evolution Of Self-Fertilization And Inbreeding Depression In Plants .1. Genetic Models Evolution 39 (1), 24-40.
- Leimu, R., 2004. Variation in the Mating System of *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae) in Peripheral Island Populations. Annals of Botany 93, 107-113.
- Martinelli, G., 1997. Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: Lima, H.C. and Guedes-Bruni, R.R. (Eds.), Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica. Rio de Janeiro: IP/JBRJ, pp. 213-250.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phy Plant 15, 473-497.
- Murawski, D.A., Hamrick J.L., 1990. Local genetic clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. American Journal of Botany 77(9), 1201-1208.
- Patterson, B., Gore, P., Potts, B.M., Vaillancourt, R.E., 2004. Advances in pollination techniques for large-scale seed production in *Eucalyptus globulus*. Australian Journal of Botany 52, 781-788.
- Ramirez, N., Brito, Y., 1990. Reproductive biology of tropical palm swamp community in the venezuelan Llanos. American Journal of Botany 77, 1260-1271.
- Reitz, R., 1983. Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 808 pp.
- Ritland, K., 1990. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating system. Journal of Heredity 81, 235-237.

- Ritland, K., Jain, S., 1981. A model for the estimation of putcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47, 35-52.
- Sarthou, C., Samadi S., Boisselier-Dubayle, M-C., 2001. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88(5), 861-868.
- Sazima, M., Buzato, S., Sazima, I., 1999. Bat-pollinated Flower Assemblages and Bat Visitors at Two Atlantic Forest Sites in Brazil. *Annals of Botany* 83, 705-712.
- Severns, P., 2003. Inbreeding and small populations size reduce seed set in a threatened and fragmented plant species, *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii* (Fabaceae). *Biological Conservation* 110, 221-229.
- Sgorbati, S., Labra, M., Grugni, E., Barcaccia, G., Galasso, G., Boni, U., Mucciarelli, M., Citterio, S., Iramátegui, A.B., Gonzales, L.V., Scannerini, S., 2004. A survey of genetic diversity reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered Queen of the Andes. *Plant Biology* 6, 1-9.
- Smith, L.B., Downs, R.J., 1974. Bromeliaceae (Pitcarnioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14, 1-662.
- Soltis, D.E., Gilmatin, A.J., Rieseberg, L., Gardner, S., 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionatha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 74(4), 531-537.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., 2001. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72 (1), 47-62.

- Vogel, S., 1969. Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteil. III. Flora 158, 289-323.
- 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). American Journal of Botany 88: 1760-1767.
- 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 Systematic and Evolution 232, 201-212.
- Wong, K.C., Sun, M., 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). American Journal of Botany 86(10), 1406-1413.

Tables and Figures

Table 1

Experimental pollination manipulations and number of flowers used for assessing the reproductive system of *Vriesea gigantea*

Manipulation	Pollination treatment				
	Self-compatibly	Agamospermy	Spontaneous selfing	Open	Control
Bagging	✓	✓	✓		
Emasculation		✓		✓	
Hand-pollination	✓				
N° in treatment	37	36	48	35	47

Bagging excludes insect or vertebrate visitors and emasculation removes all anthers. In the self pollination treatment it was used pollen from the same plant.

Table 2

Rate of fruit setting and mean number of seeds in four populations of *Vriesea gigantea*. SC, self-compatibility; AG, agamospermy; SS, spontaneous selfing; O, open; C, control

Population	Treatments									
	SC		AG		SS		O		C	
	fruit set (%)	N ^o seed ¹	fruit set (%)	N ^o seed ²	fruit set (%)	N ^o seed	fruit set (%)	N ^o seed	fruit set (%)	N ^o seed
Morro da Grota	90.00	691.50 _a	0	0b	27,67	105,13	0	0	66.67	395.33
Praia do Araçá	100.00	652.83 _{ab}	33,33	41,11a	44,44	154,11	33,33	16,22	44.44	102.89
Trilha do Fenômeno	73.33	516.42 _{ab}	0	0b	27,67	102,87	16,67	64,87	33.33	187.71
Pedra da Visão	83.33	276.71 _b	0	0b	11,11	56,67	33,33	34,33	44.44	186.56
Total	85.40	549.97	5.60	10.28	27.10	104.52	14.30	40.80	47.92	237.51

¹ Kruskal-Wallis Test (5%), $P < 0.0001$.

² Kruskal-Wallis Test (5%), $P < 0.0001$.

Table 3

Estimates of the reproductive system parameters for the four populations of *Vriesea gigantea* from Itapuã State Park; t_m is the multilocus outcrossing rate; t_s is the mean single locus outcrossing rate among not related individuals; t_m-t_s is the outcrossing rate among related individuals; s is the selfing rate; and F is the inbreeding coefficient of maternal parents.

Population	t_m	t_s	t_m-t_s	s	F
Morro da Grota	0.200	0.204	-0.030	0.800	0.703
Trilha do Fenômeno	0.001	0.001	0	0.999	-0.200
Pedra da Visão	0.113	0.102	0.011	0.887	0.776
Praia do Araçá	0.180	0.156	0.013	0.820	0.493
Total	0.146 ¹	0.138 ²	0.008 ³	0.854	0.653 ⁴

¹ $t = -19.534$, $P = 0.0003$; ² $t = -20.302$, $P = 0.0003$; ³ $t = -0.151$, $P = 0.8894$; ⁴ $\chi^2 = 8.2004$, $P < 0.05$

Table 4

Genetic variability parameters within populations of *Vriesea gigantea* based on microsatellites data. Number of individuals sampled (N), average number of alleles per locus (A), expected heterozygosity (He) and observed heterozygosity (Ho).

Population	N	A	He	Ho
Morro da Grota	37	2.5	0.35	0.26
Trilha do Fenômeno	39	1.5	0.13	0.07
Pedra da Visão	30	1	0.50	0
Praia do Araçá	31	1.5	0.03	0.03
Total/Mean	137	1.63	0.25	0.09



Fig. 1. *Vriesea gigantea*: (A) Aspect of plant, bar = 1 cm; (B) Detail of the flower. bar = 1 cm

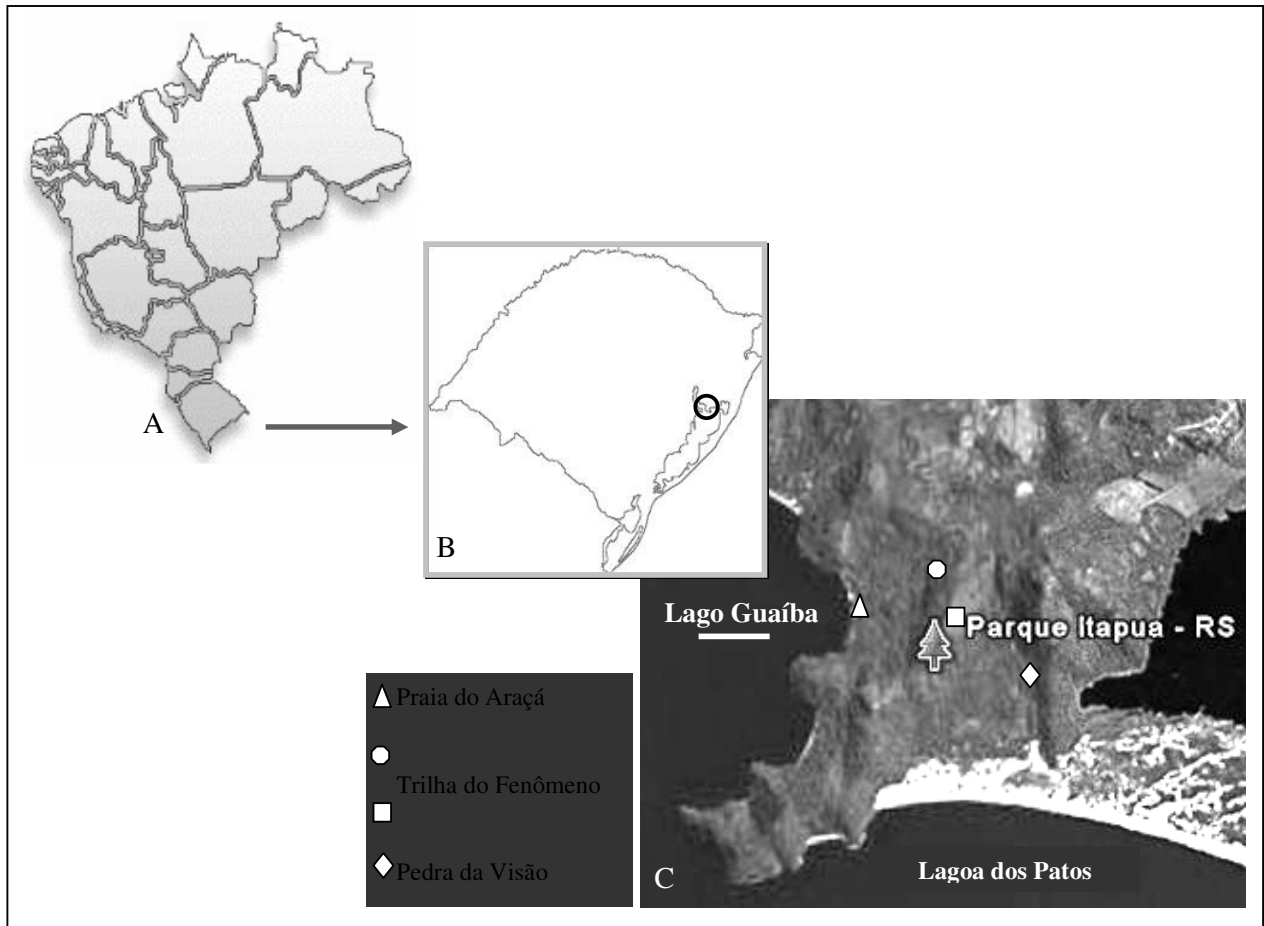


Fig. 2. Locality of the four study sites within the Itapua State Park: Praia do Araçá (PA), Trilha do Araçá (TA), Pedra da Visão (PV) and Morro da Grota (MG), RS, Brazil.

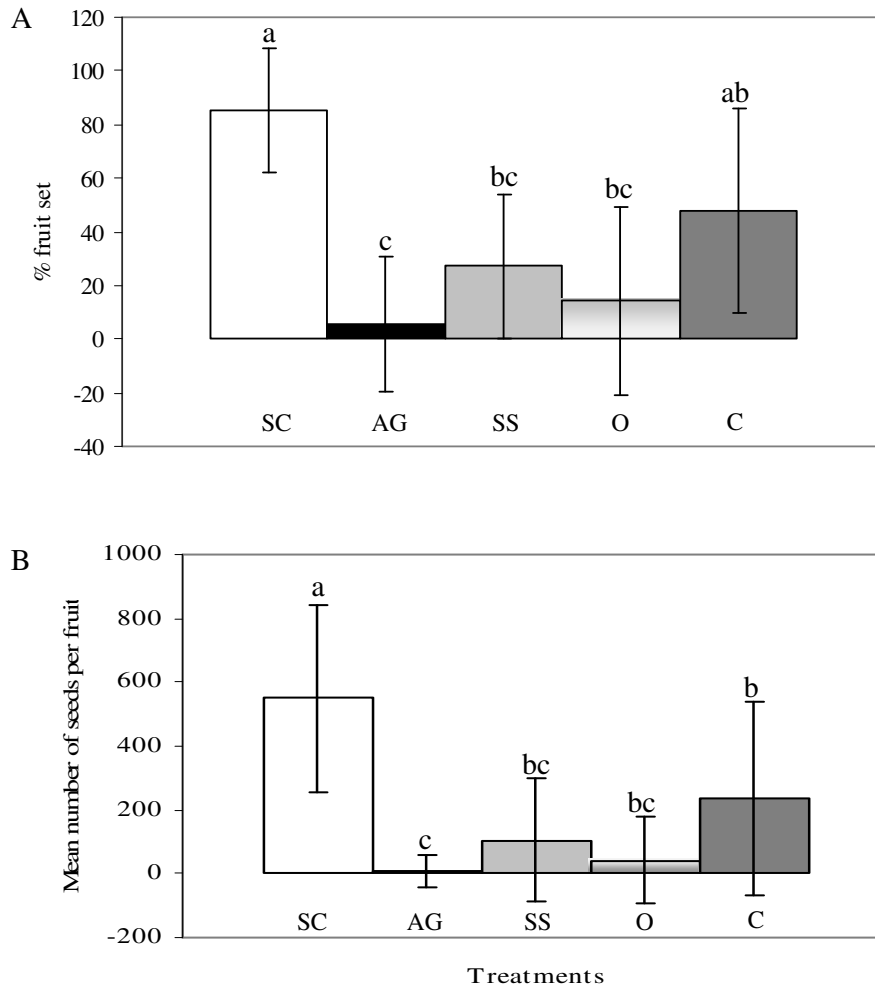


Fig. 3. The effects of pollination treatments on rate of fruit setting (A) and mean number of seeds per fruit (B). SC, self-compatibility; AG, agamospermy; SS, selfing spontaneous; O, open; C, control. Errors bars indicate ± 1 standard error. Columns that share the same letter are not significantly different by the Kruskal-Wallis Test (5%), $P < 0.0001$.

CAPÍTULO IV – Discussão Geral

IV. DISCUSSÃO GERAL

Diversas espécies de bromélias têm se tornado populares, sendo encontradas com facilidade no comércio. Contudo, muitas destas plantas são obtidas por coleta ilegal e indiscriminada das matas. Há, portanto, um forte apelo econômico e ecológico para que esses recursos sejam utilizados de forma sustentável. Nesse sentido, um dos objetivos principais dos trabalhos realizados por nossa equipe é investigar aspectos relacionados à biologia reprodutiva, fertilidade e variabilidade genética de espécies da família Bromeliaceae, visando desenvolver programas de conservação destes recursos genéticos e projetos de utilização sustentável. A espécie *Vriesea gigantea*, como tantas outras espécies do gênero e também do restante da família, tem alto potencial ornamental e, como muitas outras, faz parte da lista de espécies ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul (SEMA: www.sema.rs.gov.br). Até onde sabemos os resultados obtidos neste estudo, sobre biologia reprodutiva e fertilidade de *V. gigantea*, são inéditos e irão contribuir de forma efetiva para o desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo desta espécie.

O estudo de fertilidade das plantas de *Vriesea gigantea* (Capítulo II) levou em consideração o vigor reprodutivo das plantas (altura da planta e da inflorescência, arquitetura da inflorescência e número de flores) e o sucesso reprodutivo (proporção de frutos, número de sementes por fruto, viabilidade e taxa de germinação das sementes). Os indivíduos adultos do Parque Estadual de Itapuã (PEI) apresentaram uma altura média de 2,46m, com inflorescência, um pouco maior do que aquela descrita por Reitz (1983), também para indivíduos adultos (2,00m). Nossos resultados revelaram que as plantas de *V. gigantea* têm uma alta produção de flores, frutos e sementes. Considerando a média de

flores por planta (143,93), a média de sementes por fruto (303) e levando-se em conta que 43% das flores se desenvolveram em frutos, foi possível estimar que uma planta pode produzir cerca de 18.753 sementes em cada ciclo reprodutivo.

A arquitetura da inflorescência não afetou o padrão de produção de flores. Por outro lado, os frutos não foram homoganeamente distribuídos dentro da inflorescência: o ápice apresentou menor produção de frutos que a base, conforme descrito por Diggle, (1995) e Ortiz *et al.*, (2003) como tendência geral de frutificação em diferentes espécies. Fatores como frequência, duração e padrão de florescimento podem afetar o sucesso reprodutivo das plantas (Rathcke e Lacey, 1985; Ortiz *et al.*, 2003). Em algumas espécies o potencial reprodutivo difere de uma flor para outra, por exemplo, no número de óvulos, que pode ser menor nas flores que abrem por último, tendo uma menor chance de produzir frutos e, usualmente, sendo encontradas no ápice da inflorescência (Thomson, 1989). Parece que a planta direciona menos recursos para a produção de óvulos, os quais têm menos chance de serem fecundados (Ortiz *et al.*, 2003).

A viabilidade e taxa de germinação das sementes de *V. gigantea* foram muito altas. Resultados similares foram obtidos por Downs (1963) para outras espécies de bromélias. Tais características, associadas à produção de sementes, à longevidade e à taxa de mortalidade das plantas podem ter um grande efeito na dinâmica das populações (Kéry e Matthies, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho são os primeiros relatos sobre a viabilidade e taxa de germinação de sementes de *V. gigantea*, sendo que estudos sobre a longevidade, taxa de mortalidade e recrutamento de novos indivíduos são necessários para avaliar a dinâmica de populações naturais.

Os resultados referentes ao sistema reprodutivo revelaram que *V. gigantea* é autocompatível e que, aproximadamente, 48% das flores formaram frutos em condições naturais (Capítulo III, Figura 3-A). Resultados similares foram obtidos por Canela e

Sazima (2005) para *Bromelia antiacantha*, a qual apresentou 50% de frutificação. A autocompatibilidade é amplamente distribuída na família Bromeliaceae (Martinelli, 1997; Benzing, 2000), sendo que a maioria das espécies autocompatíveis precisa de vetores de pólen para a fertilização e, além disso, possuem diversos mecanismos que previnem a autogamia, como a dicogamia e a hercogamia (Martinelli, 1997; Benzing, 2000; Wendt *et al.*, 2001, 2002; Canela e Sazima, 2003). Os nossos resultados também revelaram que *V. gigantea* é uma espécie não-autogâmica, já que poucos frutos e sementes foram formados no tratamento de autofecundação espontânea (Capítulo III, Tabela 2) e o índice de autogamia foi baixo (AI = 0.19).

Apesar das características acima descritas sobre o sistema de reprodução de *V. gigantea*, houve uma produção de frutos e sementes relativamente baixa nos tratamentos controle (“control”) e de fecundação cruzada obrigatória (“open”) (Capítulo III, Figura 3). Muitos fatores podem ser responsáveis por estes resultados, como a limitação de polinizadores e a predação floral. Como *V. gigantea* é dependente de vetores de pólen para fertilização, nós sugerimos que houve limitação de polinizadores nas populações estudadas. Este fenômeno tem sido descrito como um dos principais fatores que contribuem para a baixa produção de sementes em populações naturais de muitas espécies (Ishii e Kadono, 2002; Evans *et al.*, 2003; Clark-Tapia e Molina-Freaner, 2004). Além disso, insetos do gênero *Trigona* foram observados visitando flores de *V. gigantea*. Estas espécies passam muito tempo na mesma flor ou inflorescência, e raramente se movem entre plantas. Comportamento similar foi observado por Wendt *et al.* (2001) em espécies de *Pitcairnia*, nas quais estas abelhas agem como polinizadores. Em *V. gigantea*, estes insetos foram observados somente roubando pólen e néctar através de buracos na base da corola. Estas espécies podem afetar a visita de polinizadores através do seu comportamento

agressivo e devido à redução de recursos, como ocorre em *B. antiacantha*. (Canela e Sazima, 2005).

Foi observado também, que as flores de *V. gigantea* do PEI, apresentaram antese diurna, diferentemente do que foi observado por Sazima *et al.* (1999), em populações da Serra do Mar, São Paulo. Populações de plantas que ocorrem em regiões geográficas diferentes podem ser expostas à distintas seleções adaptativas, podendo gerar isolamento reprodutivo em função de diferentes polinizadores (Rundle e Nosil, 2005). Mesmo apresentando antese diurna, foram observadas características florais relacionadas à síndrome de polinização para quiropterofilia nas populações de *V. gigantea* do PEI, tais como a posição das anteras, o tamanho e coloração da corola e poucas flores abrindo por dia, sugeridas por Vogel (1969) e confirmadas por Sazima *et al.*, (1999). Existem algumas evidências da ocorrência de morcegos da família Glossofaginae, como *Anoura caudifer* e *Glossophaga soricina*, nas proximidades do PEI, principalmente no Morro da Grota (Fábian *et al.*, 1999; Thales Freitas, comunicação pessoal). Entretanto, observações de visitantes florais ainda não foram realizadas nesta área.

A análise de progênies utilizando microssatélites (Capítulo III) revelou uma baixa taxa de fecundação cruzada (t_m) e conseqüentemente uma alta taxa de autofecundação (s) nas populações estudadas, o que está de acordo com o sistema de autocompatibilidade de *V. gigantea*. Entretanto, o esperado para espécies com sistema de cruzamento misto como *V. gigantea*, seria uma baixa taxa de autofecundação e alta variabilidade genética, diferente dos nossos resultados. A autogamia espontânea, a autofecundação mediada por polinizadores e a geitonogamia podem ter contribuído para obtenção destes resultados. Além disso, outros fatores podem explicar a baixa taxa de fecundação cruzada encontrada nas populações estudadas. De acordo com Patterson *et al.* (2004), uma redução na densidade de florescimento das plantas diminui as taxas de fecundação cruzada em

populações nativas; na estação reprodutiva de 2003/2004, nós estimamos que apenas 5% das plantas adultas de *V. gigantea* do PEI floresceram. Uma segunda explicação, é que pode ter havido uma redução no número efetivo de polinizadores naquele ano, contribuindo para a diminuição da taxa de fecundação cruzada.

As análises estatísticas indicaram ausência de endocruzamento. Entretanto, o coeficiente de endocruzamento foi alto, o que pode ser explicado pela baixíssima variabilidade genética encontrada no PEI (Capítulo III, Tabela 3). Além disso, como as plantas produzem muitas flores que abrem ao mesmo tempo e alguns polinizadores visitam diversas flores consecutivamente na mesma planta, é provável que ocorra autofecundação por geitonogamia. Estes resultados são muito semelhantes àqueles encontrados para *Vincetoxicum hirundinaria*, na qual a autofecundação parece ocorrer principalmente por geitonogamia (Leimu, 2004).

Os dados de microssatélites indicaram maiores níveis de variabilidade genética nas populações de *V. gigantea* do PEI do que aqueles encontrados para *Aechmea magdalenae*, *Tillandsia recurvata* e *Puya raimondii* (Bromeliaceae), utilizando alozimas, AFLP, cSSR, e RAPD como marcadores moleculares (Soltis *et al.*, 1987; Murawski e Hamrick, 1990; Sgorbati *et al.*, 2004). Por outro lado, os resultados foram similares aos de quatro outras espécies de Bromeliaceae, *T. ionantha*, *A. tuitensis*, e *Pitcairnia geyskesii* (Soltis *et al.*, 1987; Izquierdo e Piñero, 2000; Sarthou *et al.*, 2001). Na verdade, os níveis de variabilidade genética nas populações de *V. gigantea* foram muito baixos (Capítulo III, Tabela 4), similares aos registrados para espécies com as mesmas características (i.e. plantas monocotiledôneas, herbáceas e perenes). Diversos fatores podem influenciar a variabilidade genética de populações de plantas. Entre estes fatores, os mais importantes são o sistema reprodutivo (Lande e Schemske, 1985) e os mecanismos de dispersão de sementes (Hamrick e Godt, 1996). O conhecimento de diversos aspectos da biologia das

populações é necessário para prever os riscos em relação à viabilidade das espécies em populações fragmentadas.

Considerando todos os parâmetros analisados, as comparações entre populações revelaram algumas diferenças significativas. Os indivíduos da Praia do Araçá apresentaram os menores valores em todos os parâmetros de fertilidade avaliados (Capítulo II, Tabelas 2 e 3). Entretanto, somente a proporção de frutos foi significativamente diferente entre as populações, sendo que diversos fatores podem ser responsáveis por este fenômeno. Como a população da Praia do Araçá localiza-se a menos de 5m do Lago Guaíba (Capítulo II, Figura 2), as condições de crescimento podem ser diferentes das outras populações, tais como a ocorrência de ventos e composição do solo. Alguns autores (McIntosh, 2002; Kéry e Matthies, 2004) observaram que a redução no tamanho da planta, tamanho das flores, número de sementes por planta ou frutos e o número de flores em pequenas populações, podem ser consequência da baixa qualidade do habitat, redução na polinização ou depressão por endocruzamento. A importância relativa de cada fator na produção de frutos na Praia do Araçá é difícil de ser determinada, mas deverá ser ainda examinada por nossa equipe. Somado a isso, estudos sobre estabilidade meiótica e a viabilidade do pólen vem sendo desenvolvidos no Laboratório de Citogenética pela aluna de Doutorado Clarisse Palma da Silva e, até o momento, foram identificadas diferentes anomalias nos grãos-de-pólen das plantas da Praia do Araçá, apesar da meiose regular.

Considerando os tratamentos de polinização “controle” e “autocompatibilidade”, na Praia do Araçá foi observada também uma produção de sementes por fruto 3,8 vezes menor do que no Morro da Grota (Capítulo II, Tabela 5). Este resultado indica limitação de polinizador nesta população.

O número de sementes por frutos no tratamento de autocompatibilidade foi 2,5 vezes maior no Morro da Grota do que na Pedra da Visão (Capítulo II, Tabela 5), apesar da

proporção de frutos ter sido muito semelhante 90,0 e 83,33%, respectivamente. Um fator que pode ser responsável pela baixa produção de sementes na Pedra da Visão é o endocruzamento, uma vez que a variabilidade genética estimada nesta população foi reduzida (Capítulo III, Tabela 4) e o coeficiente de endocruzamento foi alto (Capítulo III, Tabela 3). A redução na produção de sementes em função da depressão por endocruzamento tem sido reportada para um grande número de espécies (Huang e Guo, 2002; Servens, 2003; Buide, 2004; Kéry e Matthies, 2004; Leimu, 2004; Yang *et al.* 2005).

Os resultados obtidos para *V. gigantea*, como a identificação de processos genéticos e ecológicos relacionados à estrutura de populações e biologia reprodutiva, abrem muitas perspectivas de estudos relacionados ao sistema reprodutivo preferencial, ainda desconhecido em muitas outras espécies de bromélias do sul do Brasil. Outros aspectos importantes ainda serão investigados por nossa equipe, tais como: (a) quantificação e qualificação da produção de néctar ao longo do período de antese e relação com os possíveis polinizadores; (b) determinação das diferenças na germinação do pólen no estigma quanto à sua origem (polinização cruzada e autopolinização); (c) identificação e caracterização da guilda de polinizadores e do polinizador efetivo de populações do RS e sua relação com as taxas de fecundação cruzada e de autofecundação; (d) análise das taxas de fecundação cruzada e de autofecundação em diferentes ciclos reprodutivos (anualmente) através do estudo de progênies utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites; (e) realização de correlações das informações obtidas para populações do RS com populações do sudeste – SP e RJ – o que será fundamental para o desenvolvimento de projetos de utilização sustentável e programas de conservação destes recursos genéticos.

CAPÍTULO V – Referências

Bibliográficas dos Capítulos I e IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abendroth A (1965) Bromeliads and birds in our garden. Bromeliad Society.
- Bennett BC (2000) Ethnobotany of Bromeliaceae. In: Benzing DH Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, pp 587-608.
- Benzing DH (1980) the biology of the bromeliads. Mad River Press, Califórnia.
- Benzing DH (1990) Vascular Epiphytes. New York: Cambridge University Press.
- Benzing DH (2000) Bromeliaceae: Profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge, 689 pp.
- Bodanese-Zanettini MH e Cavalli SS (2003) Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: Freitas LB e Bered F (eds) Genética e Evolução Vegetal. 1ª ed. Editora UFRGS. Porto Alegre, pp 177-188.
- Boneh L, Kuperus P, e Van Tienderen PH. (2003) Microsatellites in bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*. Molecular Ecology Notes 3: 302-03.
- Brown GK, Gilmartin AJ, (1984) Stigma structure and variation in Bromeliaceae – neglected taxonomic charaters. Britonia 36: 364-374.
- Buide ML (2004) Intra-inflorescence Variation in Floral Traits and Reproductinve Success of the Hermafrodite *Silene acutifolia*. Annals of Botany 94: 441-448.
- Buzato S, Sazima M e Sazima I (1994) Pollination of three species of *Abutilon* (Malvaceae) intermediate between bat and hummingbird flower syndromes. Flora 189: 327-334.

- Byers DL (1995) Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 82: 1000-1006.
- Canela MBF e Sazima M (2003) *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in southeastern Brazil. *Annals of Botany* 92: 731-737.
- Canela MBF e Sazima M (2005) The Pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in Southeastern Brazil. *Plant Biology* 7, 1-6.
- Clark-Tapia R e Molina-Freaner F (2004) Reproductive ecology of the rare clonal cactus *Stenocereus eruca* in the Sonoran desert. *Plant Systematic and Evolution* 247: 155-164.
- Coffani-Nunes JV (2002) Bromélias. In: Simões LL e Lino CF (2002) *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. Editora SENAC, São Paulo. pp 119-132.
- Costa AF (2002) Revisão taxonômica do complexo *Vriesea paraibica* Wawra (Bromeliaceae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 196 pp.
- Da Silva JC (1994) Bromélias do Rio Grande do Sul – I: O Parque Estadual de Itapuã. *Bromélia* 1(2): 19-23.
- Dawson IK, Waugh R, Simons J e Powell W (1997) Simple sequence repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molecular Ecology* 6: 179-183.
- Diggle PK (1995) Architectural effects and the interpretation of patterns of fruit and seed development. *Annual Review of Ecology and Systematic* 26: 531-552.

- Downs RJ (1963) Photocontrol of germination of seeds of the Bromeliaceae. *Phyton* 21: 1-6.
- Downs RJ (1974) Anatomy and physiology. In: Smith LB e Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcarnioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 2-28.
- Evans MEK, Menges ES, Gordon DR (2003) Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. *Biological Conservation* 111, 235-246.
- Fábian ME, Rui AM e Oliveira KP (1999) Distribuição geográfica de morcegos Phyllostomidae (Mammalia: Chiroptera) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia* 87: 143-156.
- Gardner CS (1982) A systematic study of *Tillandsia* subgenus *Tillandsia*. PhD thesis. College Station, TX: Texas A & M University.
- Gaudeul M e Till-Bottraud I (2004) Reproductive ecology of the endangered alpine species *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Phenology, gene dispersal and reproductive success. *Annals of Botany* 93: 711-721.
- Ge XJ e Sun M (1999) Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology* 8: 2061-2069.
- Grashof-Bokdam CJ, Jansen J e Smulders MJM (1998) Dispersal patterns of *Lonicera periclymenum* determined by genetic analysis. *Molecular Ecology* 7: 165-174.
- Hamrick JL e Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Borwn AHD, Clegg MT, Kahler AL e Weir BS (1989) *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, pp. 43-63. Sinauer, Sunderland.

- Hamrick JL, Godt MJ (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- He T e Smouse PE (2002) Paternity analysis in *Ophiopogon xylorrhizus* Wang et Tai (Liliaceae s.l.): selfing assures reproductive success. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 487-494.
- He T, Krauss SL, Lamont BB, Miller BP e Enright NJ (2004) Long-distance dispersal in a metapopulation of *Bankasia hookeriana* inferred from a population allocation analysis of amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* 13: 1099-1109.
- Horres R, Zizka G, Kahl G, Weising K (2000) Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from *trnL* (UAA) intron sequences of the Chloroplast Genome. *Plant Biology* 2: 306-315.
- Huang S-Q e Guo Y-H (2002) Variation of pollination and resource limitation in a low seed-set tree, *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 140: 31-38.
- Ilha F (2000) Um tesouro que renasce das cinzas. *Revista Ecos 19 - Ambiente* 2. www.portoalegre.rs.gov.br/ecos/revistas/ecos19/ambnte2.htm
- Ishii J e Kadomno Y (2002) Factors influencing seed production of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* 72: 129-141.
- IUCN (1998) IUCN Red List of threatened plants. Cambridge: IUCN Publication Services Unit.
- Izquierdo LY, Piñero D (2000) High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Australian Journal of Botany* 48, 645-650.

- Johow F (1898) Ueber Ornithophilie in der chilenischen Flora. Sitzungsber Akademie und Berlin 28: 338-341.
- Kéry M e Matthies D (2004) Reduced Fecundity in Small Populations of the Rare Plant *Gentianopsis ciliate* (Gentianaceae). Plant Biology 6: 683-688.
- Lande R, Schemske, D.W., 1985. The Evolution Of Self-Fertilization And Inbreeding Depression In Plants .1. Genetic Models Evolution 39 (1): 24-40.
- Lande R, Schemske DW (1985) The Evolution Of Self-Fertilization And Inbreeding Depression In Plants .1. Genetic Models Evolution 39 (1): 24-40.
- Leimu R, (2004) Variation in the Mating System of *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae) in Peripheral Island Populations. Annals of Botany 93, 107-113.
- Leme EM e Marigo LC (1993) Bromélias na natureza. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação visual Ltda.
- Martinelli G (1994) Reproductive biology Bromeliaceae in the Atlantic rainforest southeastern Brazil. Tese de Doutorado, University of St. Andrews, EUA.
- Martinelli G (1997) Biologia reprodutiva de Bromeliaceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In: Lima HC e Guedes-Bruni RR (Eds.), Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica. Rio de Janeiro: IP/JBRJ, pp. 213-250.
- McDonald' DB e Potts WK (1997) DNA Microsatellites as Genetic Markers at Several Scales. Avian molecular evolution and systematics. D.P. Mindell ed. Academic Press, San Diego. pp. 29-50.
- McIntosh ME (2002) Plant size, breeding system, and limits to reproductive success in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae). Plant Ecology 162: 273-288.

- McWilliams EL (1974) Evolutionary ecology. In: Smith LB e Downs RJ (editores), Bromeliaceae (Pitcarnioideae). Flora Neotropica Monografia 14: 1-662.
- Murawski DA e Hamrick JL (1990) Local genetic clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. American Journal of Botany 77(9): 1201-1208.
- Ortiz PL, Arista M, Oliveira PE e Talavera S (2003) Pattern of Flower and Fruit Production in *Stryphnodendron adstringens*, an Andromonoecious Legume Tree of Central Brazil. Plant Biology 5: 592-599.
- Ouborg NJ, Piquot Y e Van Groenendael JM (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. Journal of Ecology 87:551-568.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC e Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. Ecology 79(2): 361-382.
- Patterson B, Gore P, Potts BM, Vaillancourt RE (2004) Advances in pollination techniques for large-scale seed production in *Eucalyptus globulus*. Australian Journal of Botany 52: 781-788.
- Paula CC e Silva HMP (2000) Cultivo Prático de Bromélias. 1ª ed. Editora UFV, Viçosa, 70 pp.
- Pinto LR (2001) Análise da Estrutura Genética das Populações de milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microsatélites. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Porsch O (1932) Das problem Fledermausblume. Sitzungsanzeitg. Akademien Wissenschaft der Wien, Math. Nat. Kl. 3: 1-2.

- Porsch O (1935) Säugetiere als Blumenbeute und die Frage der Säugetierblume 2. *Biologia Generalis* 11: 171-188.
- Porsch O (1936) Säugetiere als Blumenbeute 3. *Biologia Generalis* 12: 1-21.
- Rambo, SJB (1942) A Fisionomia do Rio Grande do Sul. 3ª ed. Editora UNISINOS, Porto Alegre, 472 pp.
- Ranker TA, Soltis DE, Soltis PS e Gilmartin AJ (1990) Subfamilial phylogenetic relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variations. *Systematic Botany* 15: 425-434.
- Rathcke B e EP Lacey (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 179-214.
- Reitz R (1983) Bromeliáceas e a malária - bromélia endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 808 pp.
- Ritland K e Jain S (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47: 35-52.
- Rundle DH e Nosil P (2005) Ecological speciation. Review. *Ecological Letters* 8: 336-352.
- Ruschi A (1949) A polinização realizada pelos Trochilídeos, a sua área de alimentação e repovoamento. *Boletim do Museu de Biologia Professor Mello Leitão*. *Biologia* 2: 1-51.
- Ruschi A (1982) *Beija-flores do Estado do Espírito Santo*. Editora Rios Ltda.
- Salas D (1973) Una Bromeliaceae costarricense polinizada por murciélagos. *Brenesia* 2: 5-10.

- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J e Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskii* L. B. Smith (Bromaliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes* 3: 221-223.
- Sarthou C, Samadi S e Boisselier-Dubayle M-C (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88(5): 861-868.
- Sazima I e Sazima M (1989) Mamangavas e irapuás (Apoidea): visitas, interações e conseqüências para a polinização do maracujá (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 33: 109-118.
- Sazima M, Sazima I e Buzato S (1994) Nectar by day and night: *Siphocampylus sulfureus* (Lobeliaceae) pollinated by hummingbird and bats. *Plant Systematic and Evolution* 191: 237-246.
- Sazima M, Buzato S e Sazima I (1995) Polinização de *Vriesea* por morcegos no Sudeste brasileiro. *Bromélia* 2: 29-37.
- Sazima M, Buzato S e Sazima I (1999) Bat-pollinated Flower Assemblages and Bat Visitors at Two Atlantic Forest Sites in Brazil. *Annals of Botany* 83: 705-712.
- Schmidt LEC (2003) A araneofauna de *Vriesea gigantea* Gaud. (Bromeliaceae) no Parque Estadual de Itapuã (Viamão, RS). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 107 pp.
- Severns P (2003) Inbreeding and small populations size reduce seed set in a threatened and fragmented plant species, *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii* (Fabaceae). *Biological Conservation* 110: 221-229.

- Sgorbati S, Labra M, Grugni E, Barcaccia G, Galasso G, Boni U, Mucciarelli M, Citterio S, Iramátegui AB, Gonzales LV and Scannerini S (2004) A survey of genetic diversity reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered Queen of the Andes. *Plant Biology* 6: 1-9.
- Smith LB, Downs RJ (1974) Bromeliaceae (Pitcarnioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 1-662.
- Smith LB e Downs RJ (1977) Bromeliaceae (Tillandsioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 663-1492.
- Smith LB e Downs RJ (1979) Bromeliaceae (Bromelioideae). *Flora Neotropica Monografia* 14: 1493-2142.
- Soltis DE, Gilmatin AJ, Rieseberg L e Gardner S (1987) Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionatha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 74(4): 531-537.
- Stuntz S, Simon U e Zotz G (2002) Rainforest air-conditioning: the moderating influence of epiphytes on the microclimate in tropical tree crowns. *International Journal of Biometeorology* 46: 53-59.
- Terry RG, Brown GK e Olmstead RG (1997) Phylogenetic relationships in subfamilial Tillandsioideae (Bromeliaceae) using *ndhF* sequences. *Systematic Botany* 22: 333-345.
- Thomson JD (1989) Deployment of ovules and pollen among flowers within inflorescences. *Evolution Trends Plant* 3: 65-68.
- Utley JF (1983) A revision of the Middle American Thecophylloid *Vriesea* (Bromeliaceae). *Tulane Studies in Zoology and Botany* 24(1): 1-81.

- Vogel S (1969) Chiropterophilie in der neotropischen Flora. Neue Mitteil. III. Flora 158: 289-323.
- Webb CJ e Bawa KS (1983) Pollen dispersal by hummingbirds and butterflies: a comparative study of two lowland tropical plants. *Evolution* 37: 1258-1270.
- Wendt T, Canela MBF, Faria APG e Rios RI (2001) Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* 88: 1760-1767.
- Wendt T, Canela MBF, Klein DE e Rios RI (2002) Selfing facilitates reproductive isolation among three sympatric species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae). *Plant Systematic and Evolution* 232: 201-212.
- Wolf LL (1970) The impact of seasonal flowering on the biology of some tropical hummingbirds. *The condor* 72(1): 1-14.
- Wong KC, Sun M (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86(10): 1406-1413.
- Yang C-F, Sun S-G e Guo Y-H (2005) Resource limitation and pollen source (self and outcross) affecting seed production in two louseworts, *Pedicularis siphonantha* and *P. longiflora* (Orobanchaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 147: 83-89.