

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Biologia reprodutiva de *Crinum americanum* L. – Amaryllidaceae

Rafael Becker

Porto Alegre

2017

Biologia reprodutiva de *Crinum americanum* L. – Amaryllidaceae

Rafael Becker

Trabalho de Conclusão de curso submetido à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Chiara Moço

Porto Alegre-RS

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de colocar que a realização deste trabalho de conclusão de curso, assim como toda a graduação foi um esforço coletivo de pessoas que me ajudaram e marcaram minha vida. Muito obrigado a todos e todas colegas, professores e professoras da Biologia que me passaram muito conhecimento para minha formação. Obrigado à Daia, ao Chaps, ao Kayan, ao Luhen, à Marjo, à Nati, ao Rene e à Tali que além de me ajudar nas cadeiras durante o curso, me ensinaram a entender seus diferentes pontos de vista sobre o mundo e criaram um laço de amizade muito especial que levarei para fora da universidade. Obrigado à Fran, ao professor Guido e principalmente à professora Maria Cecília, que me orientaram em diversos projetos durante o curso e que me iniciaram na carreira científica.

Eu sempre penso que a formação profissional não começa quando entramos na faculdade, e sim quando começamos a aprender nossos primeiros ensinamentos. Assim, agradeço às pessoas mais marcantes da minha vida, que tiveram e ainda tem muita influencia no meu caminho. Nada seria possível sem o apoio da minha família e o amor que sempre senti vindo deles. Agradeço às minhas tias Dinha, Dulcemar e Edi, meus tios Nilo, Johny e Neco, minhas primas Carol e Déborah, meu primo Bruno, meus avôs Nita e Beck e minha avó Dulce por todo apoio que sempre recebi durante toda minha vida. Agradeço também aos meus amigos de sempre, Carlos, Gui e Vini, que deixam minha vida mais divertida e que considero como parte da minha família.

Quero deixar um agradecimento especial também para a (futura) professora Sté, que sem sombra de dúvidas teve uma importância enorme durante toda a faculdade. Obrigado por ter dividido momentos bons, ajudado nos momentos ruins e me ensinado muito sobre a realidade de pessoas que nunca tive contato. Obrigado por me ensinar como ser mais responsável e ter me feito amadurecer minhas atitudes. Agradeço também ao Edson, à Leila, à Nadia e ao pequeno Lorenzo, com os quais tive momentos muito felizes e que guardarei para sempre com muito carinho.

Quero agradecer duas mulheres que considero terem sido as mais importantes da minha vida. Obrigado à Susete, minha mãe, que sempre me deu todo cuidado, proteção e apoio. Com certeza tudo seria extremamente difícil sem tua ajuda e obrigado pelas excessivas cobranças, que me fizeram acreditar na minha capacidade. Obrigado à minha avó, Dona Dica, que foi a primeira pessoa a me mostrar o valor das diferentes formas de vida. Minha paixão pela biologia começou pela influencia dela, que sempre me ensinou a cuidar e respeitar animais e plantas. Tenho certeza que, onde quer que ela esteja, ela está muito feliz por mim e por aquilo que ela começou a construir.

Por último e mais importante, queria agradecer ao meu pai, Carlos. Talvez nunca tenha demonstrado minha eterna gratidão ao apoio gigantesco que sempre me deu. Obrigado pelo exemplo de sucesso, por todo esforço que teve desde os 16 anos de idade para sair de uma realidade complicada e hoje proporcionar tudo que acontece na minha vida. Obrigado por sempre acreditar em mim, pela confiança, pela parceria e até mesmo pelas discussões, que mesmo parecendo momentos ruins nos ajudam a entender um ao outro. Muito obrigado por ter construído tudo na minha vida, e ter sido o principal pilar dessa graduação.

Na biologia aprendemos que nenhum organismo tem a capacidade de sobreviver sozinho. Há a necessidade de interagir com outros organismos para que as coisas dêem certo. É por isso que considero que esta conquista não deve ser creditada a mim, e sim por todos que me ajudaram, tanto na universidade, quanto na vida. Cada ensinamento foi fundamental para a construção desta graduação e será fundamental nos próximos passos a serem dados. Fica aqui minha eterna gratidão a todos pela realização deste sonho de infância. Vamo dale!

RESUMO

A família Amaryllidaceae é uma das mais importantes em número de espécies dentro da ordem Asparagales, e inclui espécies com disposição das folhas alternas dísticas ou espiraladas com nervuras paralelinérvias, que despontam do nível do solo, a partir da base do caule ou surgindo diretamente do bulbo. As inflorescências são cimosas, sustentadas por um longo escapo, e geralmente são bastante vistosas, concedendo à família um alto potencial ornamental. As flores são bissexuadas, cálice e corola geralmente unidos. O *Crinum americanum* L., é uma espécie encontrada em áreas alagadas, banhados e margens de corpos d'água. Sua distribuição acontece desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul, mais comumente nas regiões costeiras. No Brasil, a espécie ocorre em todos os domínios fitogeográficos do país. O estudo da biologia reprodutiva pode esclarecer a evolução de caracteres embriológicos relacionados ao rudimento seminal e o modo de dispersão da semente pela água. O presente trabalho tem como objetivo descrever a biologia reprodutiva de *C. americanum* L. levantando dados sobre as seguintes características: identificação do sistema reprodutivo, as etapas da fecundação e o desenvolvimento do fruto e das sementes. A biologia floral em *C. americanum* é compatível com a síndrome de polinização por esfingídeos. Apesar dos insetos polinizadores não terem sido encontrados durante o estudo, os resultados dos experimentos de polinização indicam que a espécie é autocompatível e que o vetor está presente na população. Apresenta saco embrionário tipo *Polygonum*, embrião cilíndrico e uma grande massa de endosperma. A semente é nua e possui as camadas externas impermeáveis, altamente adaptada para dispersão hidrocória. Estas características justificam o fato da espécie ser muito frequente em áreas com oscilações sazonais de alagamento.

Palavras-chave: *Crinum americanum*, Amaryllidaceae, reprodução, macrófita aquática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	2
4. RESULTADOS.....	4
5. DISCUSSÃO.....	11
6. CONCLUSÃO.....	13
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica da população de <i>Crinum americanum</i> L. estudada no município de Tramandaí-RS.	3
Figura 2: Botão floral de <i>Crinum americanum</i> L. ensacado antes da antese para teste de fecundação espontânea.....	4
Figura 3: Etapas do desenvolvimento floral de <i>Crinum americanum</i> L.	6
Figura 4: Fenologia de <i>Crinum americanum</i> L. A: Flor em antese, mostrando o detalhe do estigma envolvido por uma das pétalas (seta amarela). B: Detalhe dos frutos em um estágio de desenvolvimento avançado.	7
Figura 5: Gráfico ilustrando a relação da porcentagem de frutificação em cada um dos tratamentos (T1: controle; T2: xenogamia; T3: autogamia; T4: espontânea).	7
Figura 6: Flor de <i>Crinum americanum</i> L. em antese mostrando o detalhe de uma mariposa não-esfingídea visitando a flor.	8
Figura 7: Aspectos estruturais do rudimento seminal de <i>Crinum americanum</i> L.	9
Figura 8: Desenvolvimento do embrião e endosperma em <i>Crinum americanum</i> L.....	9
Figura 9: Cortes transversais à mão livre das sementes de <i>Crinum americanum</i> L., mostrando os estratos de células da superfície submetidos aos testes histoquímicos.	10

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de frutos maduros e abortados do teste dos tipos de polinização. (T1: controle; T1: xenogamia; T3: autogamia; T4: espontânea).	7
--	---

INTRODUÇÃO

A família Amaryllidaceae é uma das mais importantes em número de espécies dentro da ordem Asparagales, que inclui cerca de 75 gêneros e mais de 1600 espécies (Souza & Lorenzi 2005). O grupo abrange principalmente plantas herbáceas, frequentemente bulbosas, no geral, são plantas terrestres, porém algumas espécies são epífitas e raramente aquáticas. Como principais características podem-se destacar a disposição das folhas alternas dísticas ou espiraladas com nervuras paralelinérvias, que despontam do nível do solo, a partir da base do caule ou surgindo diretamente do bulbo. As inflorescências são cimosas, sustentadas por um longo escapo, e geralmente são bastante vistosas, concedendo à família um alto potencial ornamental. As flores são bissexuadas, cálice e corola geralmente unidos. Possuem seis estames com anteras rimosas, e o gineceu gamocarpelar, tricarpelar, trilocular com lóculos uni ou pluriovulados, rudimentos bitegmentados e placentação axial (Snijman & Linder 1996; Souza & Lorenzi 2005).

A tribo Amaryllideae da subfamília Amaryllidoideae compõe um grupo monofilético que apresenta cerca de 155 espécies (Dahlgren et al. 1985, Chase et al. 2009). Esta tribo é representada apenas por plantas herbáceas bulbosas com folhas alternas ou raramente rosetada, com um longo escapo floral que sustenta a inflorescência umbelada. Apesar da morfologia ser muito uniforme, o grupo apresenta uma grande diversidade de características nas estruturas de frutificação, algumas com funções especializadas para dispersão pelo vento ou água e inclui também todas as espécies com rudimentos seminiais unitegmentados (Snijman & Linder 1996).

Esta tribo se divide em duas subtribos: a subtribo Amaryllidinae, que abrange os gêneros *Amaryllis*, *Nerine*, *Brunsvigia*, *Crossyne*, *Hessee* e *Stumaria*, e a subtribo Crininae, que inclui os gêneros *Boophone*, *Crinum*, *Amnocharis* e *Cybistetes* (Snijman & Linder 1996). O gênero *Crinum* L. é o único gênero pantropical dentro de sua tribo, podendo ser encontrado na África, Madagascar, Ilhas Mascarenhas, ilhas do Oceano Pacífico, além dos trópicos da Ásia, Austrália e toda América (Snijman & Linder 1996). O gênero *Crinum*, é o único da família em que ocorrem espécies com rudimentos ategumentados (Dutt 1957; Snijman & Linder 1996).

O *Crinum americanum* L., é uma espécie encontrada em áreas alagadas, banhados e margens de corpos d'água. Sua distribuição acontece desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul, mais comumente nas regiões costeiras. No Brasil, a espécie ocorre em todos os domínios fitogeográficos do país (Dutilh & Oliveira 2015). Está frequentemente associada com áreas de estresse ecológico, onde as marés causam constantes mudanças do ambiente. É uma planta de crescimento rápido, resistente a salinidade e alagamento (Ribeiro et al. 2011), além de apresentar alto potencial alelopático, que pode ser muito agressivo já que a espécie ocupa largas

áreas (Ribeiro et al. 2009).

De acordo com Meerow e colaboradores (2003) a espécie se reproduz sexuadamente através da polinização, produzindo uma grande quantidade de sementes. No entanto, também pode se multiplicar através dos rizomas, o que impossibilita identificar em campo se a população se trata de vários clones do mesmo indivíduo.

Segundo estes fatos, o estudo da biologia reprodutiva das espécies desta tribo pode esclarecer a evolução de caracteres embriológicos relacionados ao rudimento seminal e o modo de dispersão da semente pela água. Além disso, a compreensão das estratégias reprodutivas é importante para o manejo desta espécie em populações naturais ou cultivadas.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo descrever a biologia reprodutiva de *Crinum americanum* L. levantando dados sobre as seguintes características: identificação do sistema reprodutivo, as etapas da fecundação e o desenvolvimento do fruto e das sementes.

Como objetivos específicos, o trabalho visa identificar o comportamento das partes florais durante o período da antese; a ocorrência de sistema de autocompatibilidade através de polinizações manuais xenogâmicas e autogâmicas; acompanhar as etapas da fecundação; descrever os estágios de desenvolvimento do embrião e endosperma; compreender o mecanismo de dispersão da semente hidrocória.

METODOLOGIA

Área de estudo: o material botânico foi coletado nas margens do Canal do Camarão (Fig. 1A), que liga a Lagoa das Custódias à Lagoa do Armazém, no município de Tramandaí-RS (29° 59' 25.1'' S, 50° 10' 48.8'' W). O local é um banhado que se manteve alagado durante todo o período de coleta (Fig. 1B). A região da Planície Costeira é caracterizada por ser a província geomorfológica mais jovem do Rio Grande do Sul, com baixas altitudes (de 0 a 40 metros) e baixa amplitude térmica diretamente relacionada com a proximidade do oceano. Além disso, há a influência do planalto que condensa massas úmidas provindas do oceano que favorece a precipitação do local. No litoral norte, é muito característico a presença de um sistema de lagoas

e canais que se formou através de sucessivos eventos de transgressão e regressão do nível do mar, durante o período Cenozóico (Tomazelli 1993).



Figura 1: Localização geográfica da população de *Crinum americanum* L. estudada no município de Tramandai-RS. A: Mapa do Brasil e do Estado do Rio Grande do Sul, com destacando em vermelho a localização do município de Tramandai. B: imagem de satélite com destaque para a área de estudo marcada em vermelho (Fonte: Google Maps). C: visão geral da vegetação na área de estudo.

Experimento em campo: para a execução deste trabalho, foram realizadas cinco saídas de campo no período de floração da espécie, entre janeiro e fevereiro de 2016, e mais cinco saídas no mesmo período, em 2017. O experimento para a compreensão do sistema reprodutivo se deu da seguinte forma: as flores de diversos indivíduos foram marcadas aleatoriamente e submetidas à polinização manual em quatro tipos de tratamento. Tratamento 1 – controle, flores marcadas e submetidas à polinização natural; Tratamento 2 – xenogamia – flores emasculadas e submetidas à polinização manual cruzada; Tratamento 3 – autogamia – flores emasculadas e submetidas à autopolinização manual; e Tratamento 4 – espontânea – flores íntegras ensacadas. O número de frutos formados em cada tratamento foi registrado. As flores foram selecionadas aleatoriamente antes da antese e marcadas para seus respectivos tratamentos. A polinização manual foi feita logo que a antese ocorria, para garantir que a flor não tivesse recebido a visita de nenhum agente polinizador. A polinização manual para o tratamento 2 (xenogamia) foi feita utilizando o pólen de um indivíduo de outra população distante, afim de garantir que fossem indivíduos geneticamente diferentes, já que a espécie se multiplica por estolões. Para o tratamento 3 (autogamia) foi usado o pólen da própria flor a ser testada. No tratamento 1 (controle) as flores foram apenas marcadas e acompanhadas para observação da polinização natural, e o tratamento 4 (espontânea) as flores foram ensacadas em fase de botão pré-antese (Fig. 2) para que se fosse testado a possibilidade da espécie realizar partenogênese.



Figura 2: Botão floral de *Crinum americanum* L. ensacado antes da antese para teste de fecundação espontânea.

Experimento em laboratório: Foram coletadas flores de forma aleatória para análise de crescimento de tubo polínico e desenvolvimento embrionário em laboratório, e sementes para análise de testes histoquímicos. As amostras foram fixadas em solução FAA 70 (Johansen 1940), desidratadas em série alcoólico-etílica e incluídas em hidroxietilmetacrilato (historesina da Leica). Os cortes transversais dos ovários foram realizados com navalha de aço no micrótomo de deslize Leitz 1400. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964). Foi utilizado o teste de calcofluor (Jefferies & Belcher 1974) para identificar a calose presente na parede celular e assim poder identificar o embrião em desenvolvimento. Os testes histoquímicos com os cortes das sementes foram feitos com lugol, para identificar presença de amido; Sudan III e IV, para identificar presença de lipídios; e floroglucinol, para identificar a presença de lignina. As análises e fotomicrografias foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG), do Departamento de Botânica/UFRGS e seu desenvolvimento foi comparado aos dados em literatura sobre outras espécies do gênero *Crinum* e da família Amaryllidaceae.

RESULTADOS

Fenologia

O *C. americanum* é uma espécie que apresenta a inflorescência erguida por um longo escapo que ostenta de 3 a 5 flores. O perianto possui seis tépalas brancas e estreitas. O androceu possui seis estames longos, com o filete longo e de cor roxo escuro com as anteras amarelas. O gineceu tem ovário súpero, tricarpelar, com um estilete mais longo que os estames, porém da

mesma cor. A antese da população estudada foi crepuscular, ocorrendo entre às 18:00 e 19:00 em dias ensolarados e em alguns casos mais cedo, devido às eventuais condições meteorológicas e de luminosidade. O perianto se expande e abre rapidamente (Fig. 3A-B). As anteras já se abrem antes da expansão final do perianto. Uma das pétalas envolve o estigma (Fig. 4A), protegendo-o, até que a antese fique completa e então o estilete se ergue acima das anteras. A flor se mantém aberta por 48 horas, murchando primeiro os estames, depois o perianto e por fim o gineceu – este último, em alguns casos, se manteve erguido por mais de 48 horas (Fig. 3C-E).

O desenvolvimento do fruto torna-se visível através da dilatação da região do ovário após cerca de 15 dias (Fig. 3F), e de 30 a 40 dias se torna maduro e desprende do escapo. Sua forma é globular, chegando a cerca de 10 a 15 centímetros de circunferência e apresenta uma coloração verde-escuro no início do desenvolvimento e se tornando mais claro com o amadurecimento (Fig. 4B). Cada fruto gera entre 3 a 4 sementes, raramente produzindo 5 ou 6.

Acompanhou-se o desenvolvimento do fruto dos tratamentos e foram contabilizados quantos chegaram ao amadurecimento final e quantos foram abortados. No total, foram amostradas 563 flores, pertencentes a 250 escapos florais (que foram considerados como indivíduos). Os dados por tratamento seguem dispostos na Tabela 1 e ilustrado na Figura 5.



Figura 3: Etapas do desenvolvimento floral de *Crinum americanum* L. A: botão floral em processo de antese; B: perianto recém aberto; C: 24 horas após a antese, com perianto começando a murchar e anteras com pouco pólen disponível; D: 48 horas após a antese, perianto e androceu completamente murchos, porém o gineceu ainda ereto; E: 72 horas após a antese, a flor completamente murcha; F: fruto em desenvolvimento, cerca de 15 dias após a polinização (Barra de escala: 4 cm em A-F).



Figura 4: Fenologia de *Crinum americanum* L. A: Flor em antese, mostrando o detalhe do estigma envolvido por uma das pétalas (seta amarela). B: Detalhe dos frutos em um estágio de desenvolvimento avançado.

Tabela 1: Relação de frutos maduros e abortados do teste dos tipos de polinização. (T1: controle; T1: xenogamia; T3: autogamia; T4: espontânea).

Tratamento	Amostragem	Frutos maduros	Frutos abortados	% de frutificação
T1	127	96	31	75,5%
T2	147	117	30	79,6%
T3	181	140	41	77,3%
T4	108	0	108	0%

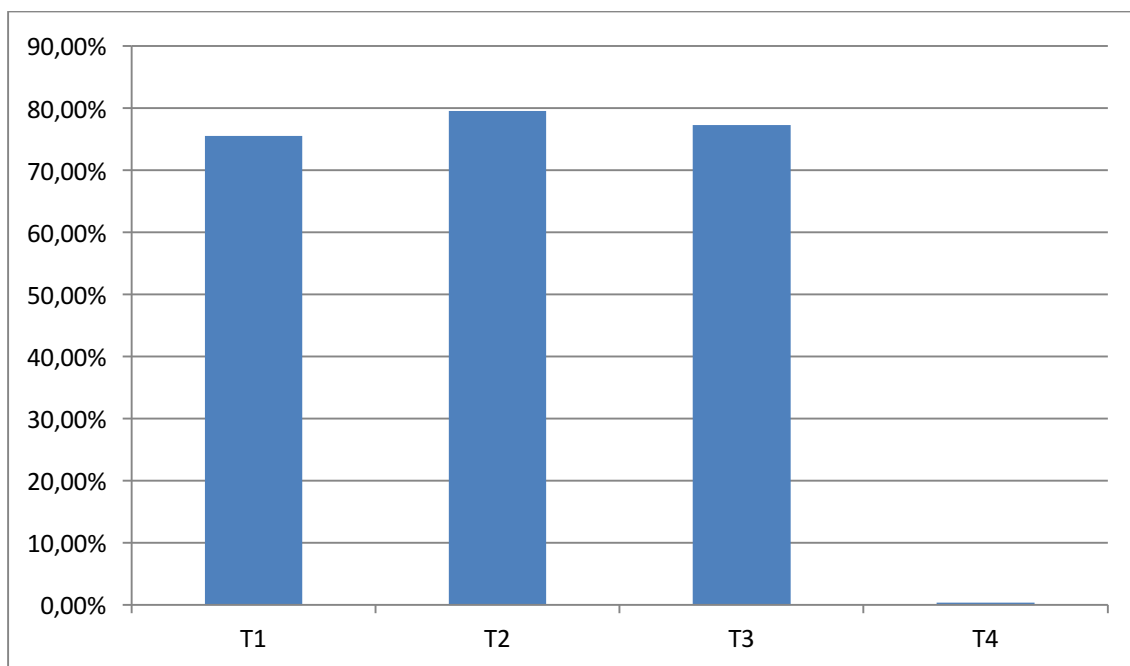


Figura 5: Gráfico ilustrando a relação da porcentagem de frutificação em cada um dos tratamentos (T1: controle; T2: xenogamia; T3: autogamia; T4: espontânea).

Sistema reprodutivo

Foram observadas abelhas, vespas, moscas e mariposas não-esfingídeas visitando as flores durante os períodos claros do dia (Fig. 6).



Figura 6: Flor de *Crinum americanum* L. em antese mostrando o detalhe de uma mariposa não-esfingídea visitando a flor.

Desenvolvimento da semente

Para os cortes anatômicos do ovário foram utilizadas amostras de flores polinizadas manualmente de quatro estágios de desenvolvimento, categorizadas conforme o tempo após a polinização: I – 1 a 2 dias; II – 3 a 4 dias; III – 5 a 7 dias; IV – 14 dias. Os rudimentos seminiais apresentam curvatura anátropa (Fig. 7A) e não possui tegumentos, o que conseqüentemente significa que não apresenta micrópila. O megagametófito aparenta ter o desenvolvimento do saco embrionário do tipo *Polygonum* (Fig. 7B e 7C).

Apesar do rudimento ser ategumentado e conseqüentemente não possuir micrópila, o tubo polínico realiza a fecundação através de uma fina camada de poucas células denominada região micropilar, que pode ser identificada pela presença do aparelho fibrilar (Fig. 7C). Após a fecundação, o endosperma inicia a divisão nuclear formando um cenócito característico de um endosperma do tipo Nuclear (Fig. 7D). Os núcleos espermáticos livres e o citoplasma se concentram na periferia de um grande vacúolo. A cavidade digestora aumenta de tamanho enquanto as divisões celulares ocorrem aumentando o espaço ocupado pelo endosperma dentro do nucelo. Poucas camadas de células do nucelo persistem ao redor (Fig. 7A). Ainda antes da celularização do endosperma, o zigoto começa suas primeiras divisões celulares e o embrião formado apresenta um suspensor curto composto apenas pela célula basal (Fig. 7D). A

celularização completa do endosperma ocorre com o embrião já no estágio globular (Fig. 8A e 8B)).

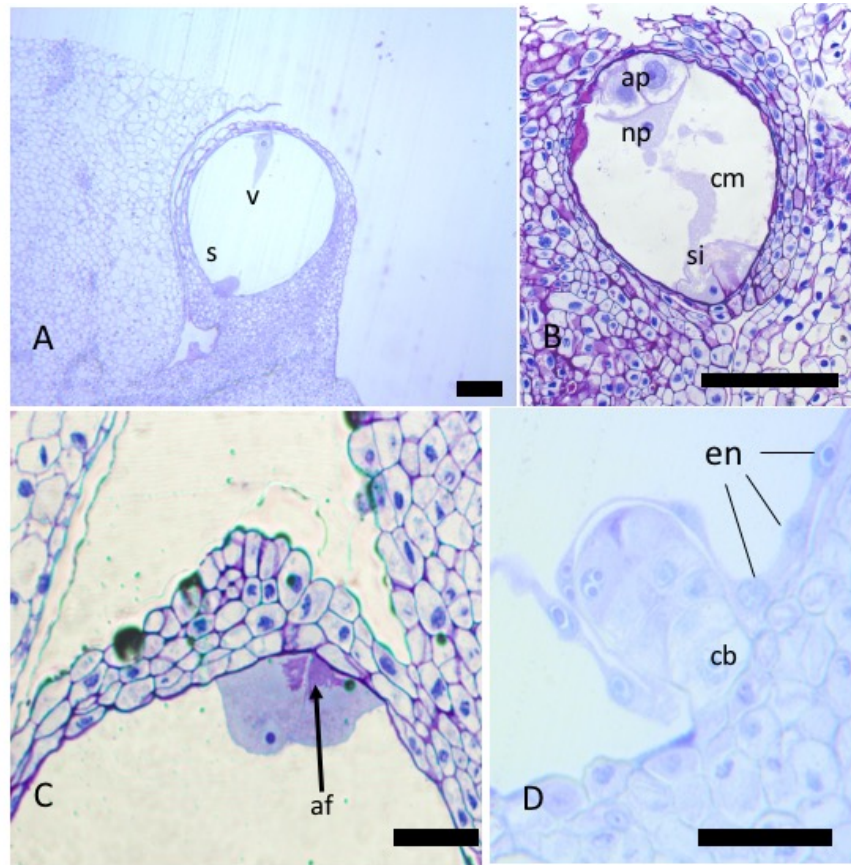


Figura 7: Aspectos estruturais do rudimento seminal de *Crinum americanum* L. Coloração em azul de toluidina em microscopia de luz em todas as figuras. A: rudimento seminal com curvatura anátropa. B: saco embrionário do tipo *Polygonum*; C: detalhe do embrião mostrando o suspensor composto pela célula basal. D: embrião após as primeiras divisões celulares e núcleos do endosperma do tipo Nuclear. Legenda: si = sinérgides; en = núcleo endospérmico; cb = célula basal; v = vacúolo; an = antípodas; cm = célula média; np = núcleo polar; af = aparelho fibrilar. Barra de escala: A= 200µm em B, C e D= 100µm.

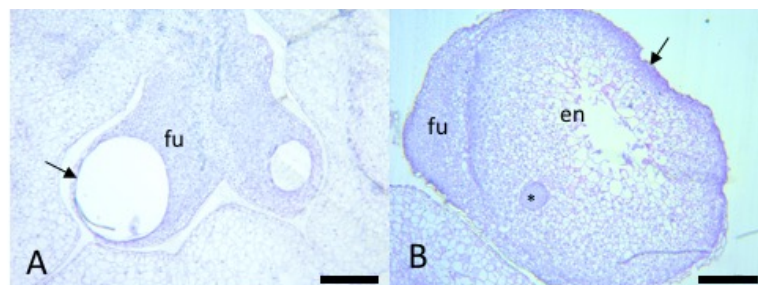


Figura 8: Desenvolvimento do embrião e endosperma em *Crinum americanum* L. Corte transversal do ovário, coloração com azul de toluidina. A: sementes no início do desenvolvimento mostrando o espaço ocupado pelo endosperma cenocítico e as poucas células do nucelo ao redor (seta); B: semente em desenvolvimento mostrando o embrião globular (asterisco) imerso no endosperma celularizado e divisões celulares na periferia do endosperma para a formação das camadas externas protetoras (seta). Legenda: em = endosperma, fu = funículo. Barra de escala: A e B = 400µm.

A falta de tegumento gera uma semente madura composta apenas pelo endosperma e embrião. A parte mais externa da semente é composta por quatro estratos de células com número variável de células e composição de parede distintas (Figura 9A). O extrato I é composto de 7 a 10 camadas de células, que conferem uma coloração acinzentada na semente. O teste com floroglucinol apontou a presença de lignina na parede destas células nesse estrato (Fig. 9C). O estrato II é unisseriado, contínuo, resultado de divisões anticliniais e os testes com Sudan III apontaram a presença de suberina (Fig. 9B). No estrato III, as células são parenquimatosas com cloroplastos, enquanto no estrato IV ocorrem apenas as células ordinárias do endosperma sem grandes espaços intercelulares (Fig. 9A). Com exceção do estrato II, todas as camadas apresentam células desalinhas, resultado de divisões pericliniais, anticliniais e oblíquas. A presença de amido foi detectada nas células ordinárias do endosperma e no eixo embrionário somente em sementes maduras após serem liberadas da proteção do pericarpo.

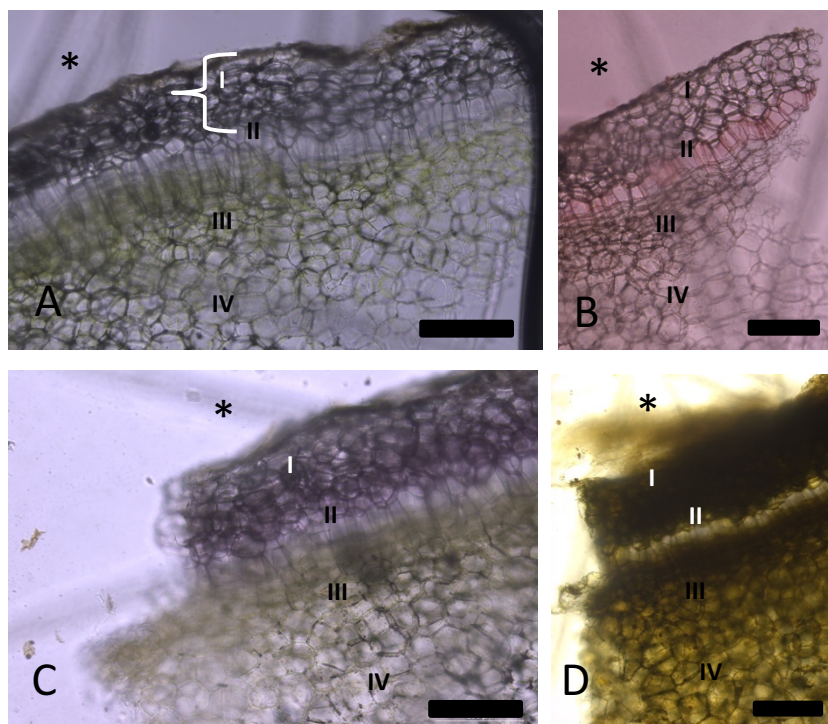


Figura 9: Cortes transversais à mão livre das sementes de *Crinum americanum* L., mostrando os estratos de células da superfície submetidos aos testes histoquímicos; A. Controle – estratos de células sem corante e reagente; B. Teste com Sudan III – positivo no estrato II; C. Teste com floroglucinol – positivo estrato I; D. Teste com lugol – negativo em todos os estratos em sementes maduras ainda protegidas pelo pericarpo. Legenda: * = meio externo. Barra de escala = 200µm.

DISCUSSÃO

A antese crepuscular com duração de 2 a 3 dias registrada em *C. americanum* é semelhante ao descrito em *C. variabile* Herb. (Manning et al. 2002) e *C. flaccidum* Herb. (Howell & Prakash 1990). Estas características da antese somado a morfologia floral - pétalas brancas, tubo floral longo e estreito – tendo como atrativo liberação de odor forte e como recompensa a grande quantidade de néctar, caracterizam a síndrome de polinização por esfingídeos (Sphingidae) ou mariposas noturnas da família Noctuidae (Rech 2014). Este tipo de polinização já foi registrado anteriormente, no Brasil, em *C. erubescens* Aiton, por Silberbauer-Gottsberger e Gottsberger (1975). Knudsen e Tollsten (1993) descreveram que em *C. variabile*, o odor é bastante similar ao de outras espécies esfingófilas, por possuir em sua composição o linalol e nerolidol, que são terpenos muito utilizados na produção de perfumes.

Os experimentos de polinização mostraram que o *C. americanum* é autocompatível. A espécie não mostrou ter distinção nas taxas de frutificação entre xenogamia e autogamia. A autogamia, quando ocorre, é viável, diferentemente do que já foi constatado em *Crinum defixum* Ker Gawl., que é auto-incompatível (Shivanna & Sastri 1981). Os estudos realizados por Howell & Prakash (1990), em *C. flaccidum*, concluíram também que a espécie é auto-incompatível, apesar dos autores relatarem ter tido problemas de experimentação, provavelmente devido a problemas no material usado para ensacar as flores, o qual pode ter alterado a temperatura ou o acesso ao oxigênio pela flor, influenciando no possível desenvolvimento do embrião.

As observações sobre o agente polinizador neste estudo não foram suficientes para identificar a presença de alguma espécie de esfingídeo durante o período pré-antese até as primeiras horas da noite. No entanto, a semelhança na taxa de sucesso entre xenogamia, autogamia e o controle, mostram que a população está tendo uma taxa de polinização estável, demonstrando que os esforços manuais e naturais tiveram o mesmo índice de sucesso. Este resultado indica também que o vetor de polinização está presente na população, apesar de não ter sido observado durante as coletas de campo.

Os experimentos de fertilização espontânea não produziram frutos, o que significa que a espécie não realiza partenogênese, o que também não foi encontrado em estudos feitos com *C. flaccidum* (Howell & Prakash 1990). Presença de sinérides poliembriônicas foi registrada em *C. defixum* (Duth 1962). É importante destacar que o fato de uma das tétalas envolver o estigma até poucos minutos após a antese, provavelmente o protege da autopolinização durante a abertura da flor.

A orientação do rudimento seminal dentro do gênero *Crinum* é bastante variável de espécie para espécie, já sendo descrita como hemítropo, ana-campilótropo ou hemi-anátropo (Howell & Prakash 1990). No entanto, a curvatura anátropa em *C. americanum* também foi registrada em *C. flaccidum* (Howell & Prakash 1990), *C. defixum* (Tomita 1931 *apud* Johri et al. 1992), *C. giganteum* Andrews (Swamy 1946), *C. asiaticum* L. (Dutt 1957) e *C. latifolium* L. (Toilliez-Genoud 1965).

O desenvolvimento do saco embrionário apresentado do tipo *Polygonum* é comum em todas as espécies de *Crinum* já estudadas (Dutt 1957; Howell & Prakash 1990), apesar de *C. latifolium* já ter sido descrito como do tipo *Allium*, por Dahlgren e Clifford (1982), além do tipo *Polygonum*, por Dutt (1959).

O desenvolvimento do endosperma do tipo Nuclear encontrado em *C. americanum* também é uma característica já observada em *C. asiaticum* (Koshimizu 1930) e em *C. flacidum* (Howell & Prakash 1990). O endosperma do tipo Helobial foi registrado em espécies de outros gêneros da família (Johri et al 1992). Koshimizu (1930) detalha ainda que, em *C. asiaticum*, o endosperma se desenvolve de forma semelhante ao encontrado na espécie estudada, apresentando grande desenvolvimento e crescendo para fora do nucelo formando uma grande massa que cerca completamente o embrião.

Crinum é o único gênero de sua tribo que tem espécies que ocorrem fora da África e, provavelmente, as suas sementes dispersas pela água podem ter relação com esta distribuição (Meerow et al 2003). O presente estudo esclarece que a ausência de tegumento em *C. americanum* é constata no rudimento seminal madura antes da fecundação. Esta é uma característica evolutiva importante, pois a distribuição dos estados de caractere presença e ausência de tegumento ainda não está esclarecida. Poucos estudos foram realizados a fim de esclarecer a evolução deste caractere e nenhum recentemente. Tomita (1931 *apud* Johri et al 1992) é o primeiro a afirmar a ausência de tegumentos em *C. latifolium*. Posteriormente, Toilliez-Genoud (1965) faz o registro em *C. giganteum*. Porém, Maheshwari (1950) demonstra a necessidade de mais estudos em fases ontogenéticas iniciais do desenvolvimento do rudimento seminal, pois em *Crinum defixum* o rudimento seminal apresenta um tegumento espesso com várias camadas de células, mas o grande desenvolvimento do endosperma rompe o tegumento formando a semente nua (Dutt 1962). O presente estudo comprova que o rudimento em *C. americanum* não tem tegumento.

As espécies de *Crinum* ocorrem em ambientes lacustres e litorâneos (Uphof 1942). Logo a estrutura da semente tem relação direta com o sucesso da dispersão hidrocórica. A superfície das sementes de *C. americanum* é hidrofóbica e facilita a flutuação da semente na água para a dispersão. Os testes histoquímicos nas camadas das sementes revelaram um tecido lignificado mais externo e uma camada de células mais interna com paredes suberificadas. Dutt (1962)

descreve que ocorre um felogênio no endosperma com células suberificadas.

Abaixo das células lignificadas existe a presença de uma única camada de células com paredes suberificadas em *C. americanum*. Esse padrão é o mesmo observado em *Crinum jasonii* Bjora & Nordal, *Crinum macowanii* Baker e *Crinum rautanenianum* Schinz (Bjora et al. 2006). Em outras espécies, como *Crinum acaule* Baker, *Crinum crassicaule* Baker, *Crinum papillosum* Nordal e *Crinum minimum* Milne-Redh, a camada mais externa não é suberificada (Bjora et al. 2006). Koshimizu (1930) cita a presença de um aerênquima no endosperma em *C. asiaticum*. De acordo com Bjora e colaboradores (2006), este tecido também estaria presente em *C. jasonii* e possibilitaria que os frutos flutuassem por até um mês na água, tendo um grande potencial de dispersão pela água. No entanto, não se encontrou aerênquima ou grandes espaços intercelulares em *C. americanum*.

Tais características morfológicas das camadas celulares das sementes são fundamentais para a diferenciação das espécies dentro do gênero *Crinum*, já que as características morfológicas vegetativas são muito semelhantes. Além disso, essas adaptações ajudam a entender seu papel de proteção, já que há ausência de tegumento (Merry 1937).

CONCLUSÃO

A biologia floral em *Crinum americanum* é compatível com a síndrome de polinização por esfingídeos, apesar de que nenhum destes insetos terem sido encontrados durante o estudo. Os resultados dos experimentos de polinização indicam que o vetor está presente na população estudada. Além disso, o *C. americanum* mostrou autocompatibilidade, sendo esta uma das únicas características observadas que diferencia das observações de outras espécies de *Crinum*.

Os resultados do desenvolvimento embrionário mostraram que a espécie também segue o padrão do gênero com saco embrionário tipo *Polygonum*, embrião cilíndrico e uma grande massa de endosperma. A semente gerada possui as camadas externas impermeáveis e internas suberificada, altamente adaptada para dispersão hidrocória, fazendo sentido com a distribuição desta espécie e de todo gênero, largamente encontrados nas zonas litorâneas entre os trópicos.

Com este entendimento esclarecido da biologia reprodutiva do *C. americanum* é possível ter um melhor manejo das populações naturais e cultivadas. Apesar da espécie ser bastante resiliente às mudanças de ambiente, e por isso não estar incluída em nenhuma categoria de risco, é importante o entendimento da sua reprodução e dispersão quando utilizada de forma cultivada, como ornamental, por exemplo, ou nas populações naturais sendo uma indicadora de presença de outras espécies animais ecologicamente relacionadas ao *C. americanum*.

Por ser uma macrófita aquática muito resistente às mudanças ambientais, como a salinidade e alagamento ou seca, é uma potencial espécie para ser utilizada em áreas de influencia de barragens de usinas hidrelétricas, que recorrentemente alteram o ambiente de forma abrupta, impactando o ecossistema. Assim, o *C. americanum* poderia ser utilizado para manter um ambiente mais estável, além de sua importância para estabilizar o pH da água, evitando estragos no maquinário da estação hidrelétrica. Além disso, a planta possui potencial ornamental, por ter crescimento adensado, folhagem perene e a floração atraente, indicando o uso para formação de maciços e bordaduras de estatura mediana (Stumpf, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BJORÅ, C. S.; KWEMBEYA, E. G.; NORDAL, I. *Crinum jasonii* (Amaryllidaceae): a new endemic pan species of the Luangwa Valley in Zambia with notes on different seed structures in the genus. *Kew Bulletin*, p. 569-577, 2006.
- CHASE, M.W, REVEAL, JL; FAY, MF. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of Linnean Society*, v. 161, p. 132-136, 2009.
- DUTILH, J. H. A.; OLIVEIRA, R.S. 2015 *Amaryllidaceae* IN: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- DUTT, B. S. M. Morphology of the ovule of *Crinum defixum* Ker. *Current Science*, v. 26, n. 1, p. 22-24, 1957.
- DUTT, B. S. M. Ovule and embryo-sac of *Crinum latifolium* L., a reinvestigation. *Current Science*, v. 28, p. 293-4, 1959.
- DUTT, B. S. M. A contribution to the life history of *Crinum defixum* Ker. In: *Plant embryology: a symposium. CSIR New Delhi. Stomata, Amaryllidaceae (PMBD, 185306515)*. 1962.
- HOWELL, G.; PRAKASH, N. Embryology and reproductive ecology of the Darling Lily, *Crinum flaccidum* Herbert. *Australian journal of botany*, v. 38, n. 5, p. 433-444, 1990.
- JEFFERIES, C. J.; BELCHER, A. R. A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo. *Stain Technology*, v. 49, n. 4, p. 199-202, 1974.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., 523 p., 1940.

- JOHRI, B. M.; AMBEGAOKAR, K. B.; SRIVASTAVA, P. S. *Comparative embryology of angiosperms*. Vol. 2. Springer Science & Business Media, 1992.
- KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 113, n. 3, p. 263-284, 1993.
- KOSHIMIZU, T. Carpobiological Studies of *Crinum asiaticum* L, var. *japonicum* Bak. *Botanical Institute, Science Department, Kyoto Imperial University*, 1930.
- MAHESHWARI, P. P. *An introduction to the embryology of angiosperms*. McGraw-Hill Book Company, 1950.
- MANNING, J. C.; SNIJMAN, D.; SCOTT, P. B. Hawkmoth-pollination in *Crinum variabile* (Amaryllidaceae) and the biogeography of sphingophily in southern African Amaryllidaceae. *South Africa nJournal of Botany*, v. 68, n. 2, p. 212-216, 2002.
- MEEROW, A. W.; LEHMILLER, D. J.; CLAYTON, J. R. Phylogeny and biogeography of *Crinum* L.(Amaryllidaceae) inferred from nuclear and limited plastid non-coding DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 141, n. 3, p. 349-363, 2003.
- MERRY, J. Formation of periderm in the endosperm of *Crinum asiaticum*. *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters* v. 22, p. 159-64.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, Mi E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.
- RECH, A. R. et al. Biologia da polinização. *Editora Projeto Cultural, Rio de Janeiro*. 524p, 2014.
- RIBEIRO, J. P. N. et al. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 32, n. 1, p. 183-188, 2009.
- RIBEIRO, J. P. et al. Spatial distribution of *Crinum americanum* L. in tropical blind estuary: Hydrologic, edaphic and biotic drivers. *Environmental and experimental botany*, v. 71, n. 2, p. 287-291, 2011.
- SHIVANNA, K. R.; D. C. SASTRI. Stigma-surface esterase activity and stigma receptivity in some taxa characterized by wet stigmas. *Annals of Botany* v. 47, n.1, p. 53-64, 1981.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Ueber sphingophile angiospermen brasiliens. *Plant Systematics and Evolution*, v. 123, n. 3, p. 157-184, 1975.
- SNIJMAN, D. A.; LINDER, H. P. Phylogenetic relationships, seed characters, and dispersal

- system evolution in Amaryllideae (Amaryllidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, p. 362-386, 1996.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. *Instituto Plantarum*, 2005.
- STUMPF, E. T. Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas. *Embrapa Clima Temperado*, 2009.
- SWAMY, B. G. L. Inverted polarity of the embryo sac of angiosperms and its relation to the archegonium theory. *Annals of Botany*, v. 10, n. 38, p. 171-183, 1946.
- TOILLIEZ-GENOUD, J. L'ovule et La graine de *Crinum gicianteum* (Amaryllidagées). 1965.
- TOMAZELLI, L.J. O regime de ventos e a taxa de migração das dunas eólicas costeiras do Rio Grande do Sul, *Brasil Pesquisas*, v. 20, n. 1, p. 18-26, 1993.
- UPHOF, J. A review of the species of *Crinum*. *Herbertia*, v. 9, p. 63-84, 1942.