

## Sobrevivência de plantas da bromélia *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto. cultivadas *in vitro* em alta temperatura constante e déficit hídrico.

**William Toshitaka Hagiwara**<sup>(1)</sup>, Fernanda de Oliveira Menezes<sup>(1)</sup> & Catarina Carvalho Nievola

<sup>(1)</sup> Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, Instituto de Botânica de São Paulo. E-mail para contato: [williamthagiwara@gmail.com](mailto:williamthagiwara@gmail.com)

**Resumo:** Eventos relacionados ao aquecimento global, previsto para um futuro próximo, estão associados à falta de água podendo expor os vegetais às condições de déficit hídrico. A avaliação fisiológica das plantas sujeitas a esse ambiente contribui para a identificação de espécies tolerantes. Este trabalho teve como objetivo investigar a condição de déficit hídrico induzido que reduza a sobrevivência de plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch, & Otto cultivadas *in vitro* com PEG 6000 mantidas a 35° C. As plantas foram mantidas em meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962), com concentrações de macronutrientes reduzidas a 1/5 (MS/5). De modo a simular a falta de água, foi acrescentado Polietilenoglicol (PEG-6000) em diferentes quantidades (T1= 5%, T2= 10%, T3= 15% e T4= 20%) para estabelecer diversas condições de potenciais hídricos. Esses resultados foram comparados entre si e também às plantas mantidas em outros dois tratamentos: T5 = somente água e T6= MS/5 sem PEG. Cada tratamento consistiu em cinco frascos com cinco plantas cada. Os resultados revelaram 100% de sobrevivência nas plantas mantidas em todos os tratamentos por um período próximo de 30 dias, apesar de terem apresentado redução nos parâmetros foliar e caulinar não foram apresentados sinais que comprometessem a sua sobrevivência. Conclui-se que *Acanthostachys strobilacea* é tolerante a todos os tratamentos submetidos até um período próximo de 30 dias, onde apresentou 100% de sobrevivência indicando a resiliência dessa bromélia a alta temperatura constante durante os períodos de claro e escuro, conjuntamente ao déficit hídrico imposto.

**Palavras-Chave:** falta de água, bromélia, aquecimento global, polietilenoglicol.

### INTRODUÇÃO

Efeitos do aquecimento global, citados por Salati *et al.* (2004) incluem um cenário de clima mais extremo com secas, inundações e ondas de calor mais frequentes. Segundo esses autores, a elevação na temperatura aumenta a capacidade do ar em reter vapor d'água e, conseqüentemente, há maior demanda hídrica. Assim, o efeito do aumento de temperatura pode estar relacionado à condição de falta de água. Por modelos matemáticos baseados em dados registrados dos oceanos, biosfera atmosfera, está previsto um aumento entre 1,4°C e 5,8°C na temperatura média global até o final do século XXI (IPCC, 2014).

O fornecimento de água adequado é um dos principais responsáveis pelo crescimento vegetal (Janská *et al.* 2010), portanto, a avaliação desse parâmetro pode indicar adaptações às condições de seca. As espécies de Bromeliaceae podem ser candidatas a esse tipo de investigação, pois vários representantes da família ocupam uma diversidade de ambientes, desde mesófilicos até xéricos, apresentando diversas adaptações em relação ao aproveitamento da disponibilidade hídrica do ambiente (Freschi *et al.* 2010). *Acanthostachys strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto, por exemplo, é uma espécie de ampla distribuição pertencente à subfamília Bromelioideae, pode ser encontrada como saxícola ou epífita (Reitz 1983), nos domínios do Cerrado e Mata Atlântica (Stehmann *et al.* 2009). Considerando-se que plantas epífitas exibem adaptações aos episódios de falta de água (Benzing, 1995), comum nos ambientes os quais ocupam a investigação da tolerância dessas espécies à escassez hídrica associada à alta temperatura pode indicar quais seriam consideradas resistentes aos eventos de aquecimento ambiental futuro.

A partir de estudos realizados no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais, foi estabelecido

um protocolo para cultivo in vitro de *A. strobilacea* (Santos *et al.* 2010). Essa técnica permite o desenvolvimento de estudos fisiológicos estabelecendo controle de parâmetros como luminosidade, quantidade de nutrientes e temperatura, tornando também possível criar condições de menor disponibilidade hídrica com adição de polietilenoglicol (PEG 6000). *A. strobilacea* é uma espécie de bromélia tolerante ao aumento de temperatura associado ao déficit hídrico mantendo pigmentos fotossintetizantes e água (Menezes *et al.* 2014). Contudo o conhecimento do limite térmico pode contribuir para identificar a condição que determina a sobrevivência dessa espécie. O estresse causado pelo calor traz distúrbio na fotossíntese devido a alterações no estado físico-químico das biomembranas e na conformação das moléculas de proteína (Larcher 2004). O objetivo deste trabalho foi investigar a condição de déficit hídrico induzido que reduza a sobrevivência de plantas de *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch, & Otto cultivadas in vitro com PEG 6000 e mantidas a 35° C.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção das plantas a partir da germinação in vitro.**

Para a obtenção das plantas, foram utilizadas sementes de *A. strobilacea* proveniente da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, estas foram submetidas a um protocolo de desinfestação (Santos *et al.* 2010) e depositadas em frascos contendo 40 ml de meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962) cuja concentração dos macronutrientes foram reduzidas a 1/5 da formulação original (MS/5), adicionado de 2% de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi geleificado com ágar (6 g L<sup>-1</sup>) e submetido à esterilização em autoclave por 15 minutos a 121° C. Os frascos (5 por tratamento) contendo cinco sementes cada foram mantidos em câmara (tipo BOD) com a temperatura ajustada para 25° C ± 2° C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, até que as plantas atingissem em torno de 2 cm de altura, conforme descrito em Figueiredo (2003).

### **Cultivo in vitro em diferentes potenciais hídricos em alta temperatura.**

Plantas provenientes da germinação de sementes (descrita anteriormente) com 2 cm de altura, foram transferidas para novo meio de

cultura líquido (sem ágar) (MS/5) ao qual foram adicionadas diferentes quantidades de PEG 6000, compondo os seguintes tratamentos: T1= 5% de PEG (-0,44 Mpa), T2= 10% de PEG (-0,61 Mpa), T3= 15% de PEG (-1,03 Mpa), T4=20% de PEG (-1,58 Mpa). Foram estabelecidos outros dois tratamentos: T5 (-0,09 Mpa) somente água e T6 (-0,36) onde o meio era composto por MS/5 sem PEG. Para cada frasco foram adicionados 20 ml de meio de cultura. Em todos os tratamentos o pH foi ajustado para 5,8 e todos foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121° C. Foram utilizadas 30 repetições (frascos) por tratamento contendo cinco plantas em cada, os frascos foram mantidos em câmaras do tipo BOD com a temperatura ajustada para 35° C ± 2° C constante e fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Foram realizadas coletas quinzenais de 25 plantas por tratamento após os seguintes períodos de cultivo: 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após o início do cultivo ao longo dos 90 dias de experimento.

### **Parâmetros avaliados e Análise estatística**

As plantas provenientes destes tratamentos foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência, número e comprimento das folhas e raízes, comprimento caulinar, massa fresca e seca das partes aérea e radicular.

A extração dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas a, b e carotenoides), foi realizada de acordo com protocolo de Munné-Bosch & Lalueza (2006). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 662, 645, 470 nm (clorofilas a e b, carotenoides, respectivamente). Os cálculos do conteúdo de pigmentos foram realizados de acordo com as equações descritas em Lichtenthaler & Buschmann (2001). Os valores foram expressos em mg de pigmento por grama de massa seca.

As médias dos dados biométricos e dos resultados da avaliação dos pigmentos das plantas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com nível de significância a 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas mantidas em 35° C em diferentes quantidades de PEG ao longo de 90 dias apresentaram 100% de sobrevivência por até 30 dias em todos os tratamentos (Tabela 1). A não sobrevivência dessa espécie nas condições de cultivo a 35° C começou a ocorrer após 45 dias. Aos 90 dias de cultivo, apenas as plantas mantidas no tratamento T3 sobreviveram, as mesmas apresentaram 100 % de sobrevivência neste período.

Foi possível observar que as plantas de *A. strobilacea* mantidas durante 30 dias, em todos os

tratamentos que foram submetidos, não apresentaram sinais que comprometeram a sua sobrevivência (Figura 1), no entanto as plantas dos tratamentos T3 e T4 apresentaram redução do comprimento foliar conforme descrito nos trabalhos de Bohnert (1995). Observou-se que essas plantas apresentaram crescimento caulinar reduzido quando comparadas aos outros tratamentos, o que pode estar relacionado a mecanismos adaptativos em casos de déficit hídrico (Pimentel 2004).

O teor hídrico diminuiu nas plantas dos tratamentos T2 e T4 (Tabela 2). Esses valores podem estar associados às respostas de tolerância dessa espécie na condição imposta. As plantas do tratamento T2 apresentaram maior quantidade de clorofila a nos primeiros 15 dias (Tabela 3), quando comparadas as plantas dos tratamentos T3 e T4. Neste mesmo período as plantas dos tratamentos T2 e T4 apresentaram maior quantidade de carotenoides quando comparadas as plantas do tratamento T3 o que pode indicar que as plantas provenientes desses tratamentos estavam em condição de estresse hídrico. Aos 90 dias de cultivos somente as plantas mantidas no tratamento T3 sobreviveram mantendo baixos níveis de pigmentos fotossintetizantes.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que *Acanthostachys strobilacea* é tolerante a todos os tratamentos submetidos até um período próximo de 30 dias, onde apresentou 100% de sobrevivência indicando a resiliência dessa bromélia a alta temperatura constante durante os períodos de claro e escuro, conjuntamente ao déficit hídrico imposto.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benzing, D.H.** 1995. The physical mosaic and plant variety in forest canopies. *Selbyana* 16: 159-168.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. & Jensen, R.G.** 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Dias, L.B.** 2008. Água na planta. Monografia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Field, C. B., Barros, V. R., Dokken, D. J., Mach, K. J., Mastrandrea, M. D., Bilir, T. E, & White, L. L.** 2014. IPCC, 2014: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Freschi L, Takahashi CA, Cambui CA,** 2010c. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* 167, 526-33.
- Janská, A., Marsík, P., Zelenková, S. & Ovesná, J.** 2010. Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment. *Plant Biology* 12: 395-405.
- Larcher, W.** 2004. *Ecofisiologia vegetal*. Editora Rima. 369 p.
- Lichtenthaler ,H .K .& Buschmann, C.** 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001) F4.3.1-F4.3.8
- Menezes, F .O., Carvalho , C.P.& Nievola,C.C.** 2014. Efeitos do déficit hídrico em plantas de *Acanthostachys strobilacea*. 21ª Reunião Anual do Instituto de Botânica 24 a 28 de novembro de 2014
- Munné-Bosch, S. & Laureza, P.** 2006. Age -related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, *Cistus clusii* grown under. Mediterranean Wild conditions. *Planta* (2007) 225:1039–1049
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Oliveira,V.F., Garcia,P.M.A., Aoyama,E.M.,Tamaki,V., Nie vola,C.C.** 2009. Variações no conteúdo de carboidratos em *Alcantarea imoerialis* (carriera)Harms submetidas a diferentes potenciais hídricos .Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia, 10 a 13 de Setembro de 2009, São Lourenço – MG
- Reitz, R.** 1983. Bromeliaceae e a malária-bromélia endêmica. Itajaí. *Flora Ilustrada Catarinense*. Série 983.
- Salati, E.** 2004. Impactos das mudanças climáticas globais em algumas regiões do Brasil através do estudo da variação do balanço hídrico. In: “Cenários Climáticos do Semi-árido em Implicações para o Desenvolvimento do Nordeste”. Workshop realizado em Fortaleza, em 24.11.2004
- Santos, D. S., Tamaki, V. & Nievola, C. C.** 2010. In vitro propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 46: 524–529.
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1974. Pitcairnioideae. *Flora Neotropica* 14: 1–658.
- Stehmann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y.** (ed.) *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 516 p

**Tabela 1.** Porcentagem de sobrevivência de plantas de *A.strobilacea* (Schultz f.) Klotzsch & Otto mantidas *in vitro* a 35°C durante o período de 90 dias, em diferentes concentrações de PEG-6000. T1 (5% de PEG), T2 (10% de PEG), T3 (15% de PEG), T4 (20% de PEG), T5 (H<sub>2</sub>O) e T6 MS/5.

| Periodo(dias) | T1   | T2   | T3   | T4   | T5   | T6   |
|---------------|------|------|------|------|------|------|
| 15            | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 30            | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 45            | 100% | 80%  | 100% | 52%  | 95%  | 100% |
| 60            | 0%   | 64%  | 44%  | 0%   | 0%   | 0%   |
| 75            | 0%   | 0%   | 80%  | 0%   | 0%   | 0%   |
| 90            | 0%   | 0%   | 100% | 0%   | 0%   | 0%   |

**Tabela 2.** Teor hídrico de plantas de *A.strobilacea* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de PEG 6000. Médias acompanhadas por letras distintas minúsculas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey em nível de significância de 5%. T1 (5% de PEG), T2 (10% de PEG), T3 (15% de PEG), T4 (20% de PEG), T5 (H<sub>2</sub>O) e T6 MS/5.

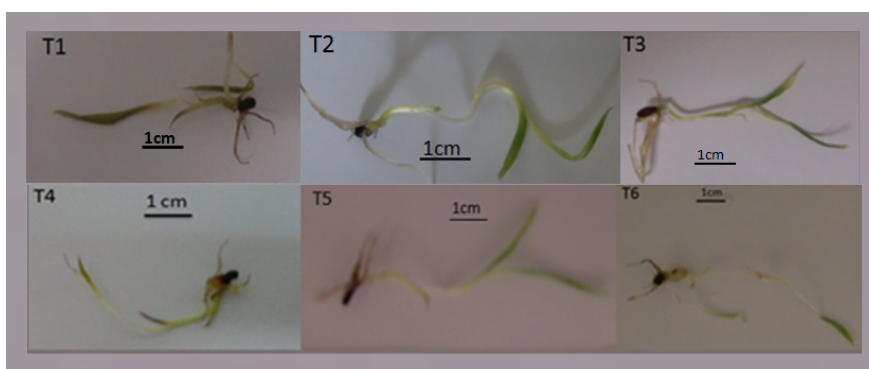
| Tratamento | Periodo (dias) |       |       |      |
|------------|----------------|-------|-------|------|
|            | 15             | 30    | 45    | 90   |
| T1         | 90,6c          | 86,5c | 92b   | *    |
| T2         | 86,5e          | 86,b  | 91,1c | *    |
| T3         | 90,1d          | 85d   | 88,8d | 80,3 |
| T4         | 82,05f         | 81,9e | 87,4e | *    |
| T5         | 92,6b          | 93,7a | 92,2a | *    |
| T6         | 92,7a          | 86,5c | 87,3f | *    |

Nota: \* indica que não houve sobrevivência das plantas

**Tabela 3:** Resultados de clorofila para plantas mantidas *in vitro* em meio MS/5, em diferentes concentrações de Polietilenglicol. T2 (10% de PEG), T3 (15% de PEG), T4 (20% de PEG). Os resultados estão expressos em µg/g massa seca

| Periodo | tratamento  | T2     | T3     | T4     |
|---------|-------------|--------|--------|--------|
| 15 dias | clorofila a | 3,33 a | 1,79 b | 0,71 c |
|         | clorofila b | 2,01 a | 0,5 c  | 1,32 b |
|         | crotenoide  | 0,23 b | 0,64 a | 0,23 b |
| 30 dias | clorofila a | 1,07 a | 0,91 b | 0,63 c |
|         | clorofila b | 0,41 b | 0,2 c  | 0,44 a |
|         | crotenoide  | 0,45   | 0,49   | 0,32   |
| 90 dias | clorofila a | *      | 0,22   | *      |
|         | clorofila b | *      | 0,10   | *      |
|         | crotenoide  | *      | 0,14   | *      |

Nota: (\*) indica que não houve sobrevivência das plantas



**Figura 1:** plantas após 30 dias de cultivo. T1 (5% de PEG), T2 (10% de PEG), T3 (15% de PEG), T4 (20% de PEG), T5 (H<sub>2</sub>O) e T6 MS/5.