



VARIAÇÕES NO CONTEËDO DE CARBOIDRATOS EM *ALCANTAREA IMPERIALIS* (CARRIÈRE) HARMS SUBMETIDAS A DIFERENTES POTENCIAIS HÍDRICOS

V.F. Oliveira^{1,4}

P.M.A. Garcia^{1,4}; E.M. Aoyama^{2,4}; V. Tamaki³; C.C. Nievola³

¹Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, ²Seção de Anatomia, ³Seção de Ornamentais, ⁴Discente do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do IBt, Instituto de Botânica, C. Postal 3005, 01061 - 970 - São Paulo, SP, Brasil-ccnievola@uol.com.br

INTRODUÇÃO

Bromeliaceae é uma família de distribuição neotropical com 40% das espécies existentes no território brasileiro. Cerca de 80% ocorrem na Mata Atlântica, desde o nível do mar até altitudes bastante elevadas, em regiões com grandes amplitudes térmicas, como o caso da Serra dos Órgãos (RJ), área com ecossistemas de Floresta Tropical e Campos de Altitude (Leme & Marigo, 1993) e de onde é nativa *Alcantarea imperialis*. A bromélia imperial, como é popularmente conhecida pelo seu valor ornamental, pode ser encontrada crescendo naturalmente sobre rochas ou solos rasos e pedregosos, sendo considerada uma espécie rupícola. As bromélias dessa espécie apresentam crescimento lento, podendo atingir a fase reprodutiva em 15 anos. Essa espécie é muito utilizada no paisagismo devido ao seu porte (pode atingir cerca de 1 metro de diâmetro da roseta) e à disposição das folhas no eixo caulinar. Estas apresentam uma sobreposição parcial entre elas, formando o denominado tanque, cisterna, ou fitotelmo, que varia em forma e proporção. Essa região da planta, presente em muitas espécies de bromélias, foi considerada como sendo um substituto do solo, pois a água acumulada entre as bainhas foliares, além da matéria orgânica em decomposição, pode ser absorvida diretamente pelas folhas. Muitos membros de Bromeliaceae representam importante função ecológica, servindo de habitat, local de reprodução e alimentação para pequenos animais que vivem associados aos seus tanques e que aproveitam a água contida entre suas folhas (Benzing, 2000).

Indivíduos da bromélia imperial não acumulam água entre suas folhas quando jovens, não sendo encontrados relatos sobre os mecanismos fisiológicos responsáveis pela adaptação dessa espécie que permitam o estabelecimento das plantas sobre as rochas. Bader e colaboradores (2009), estudando a bromélia epífita *Tillandsia flexuosa*, sugerem que a resistência a seca deve estar presente desde o estágio inicial da vida da planta e que mecanismos de tolerância são desen-

volvidos de modo a permitir a sobrevivência a esse estresse.

A técnica do cultivo *in vitro* tem sido considerada muito útil para estudos de fisiologia das plantas devido à possibilidade de manutenção das condições nutricionais, temperatura e fotoperíodo (Pierik, 1987). Por meio do cultivo *in vitro* tem sido possível a aquisição de conhecimentos sobre as características fisiológicas das bromélias (Mercier & Nievola, 2003; Nievola *et al.*, 005; Takahashi, *et al.*, 007), podendo ser uma alternativa em estudos sob o efeito do déficit hídrico em plantas dessa família, à semelhança do realizado por Souza e colaboradores (1999a). Esses autores avaliaram o crescimento de plântulas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn., cultivadas *in vitro* durante 20 dias, em meio de Murashigue & Skoog (1962) adicionado de diferentes concentrações de sorbitol que resultaram em potenciais osmóticos iguais a - 0,5; - 0,75; - 1,5 e - 3,0 MPa, causando um déficit hídrico sobre as plantas em cultura e reduzindo, com isso, seu crescimento. Em outro trabalho, os mesmos autores observaram alterações na anatomia de plantas submetidas a esse estresse (Souza *et al.*, 999b).

Além de efeitos sobre o crescimento, existem vários tipos de respostas ao déficit hídrico que concorrem para a manutenção do status hídrico da planta. Algumas dessas respostas incluem o acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular, também chamado de solutos compatíveis, no processo conhecido como ajuste osmótico (Bajji *et al.*, 001). As plantas podem acumular prolina (Yamada *et al.*, 005) e outros aminoácidos livres (Kusaka *et al.*, 005), poliálcois (Ramanjulu & Bartels, 2002) e carboidratos (Chaves *et al.*, 002), de forma a se aclimatar e/ou se adaptar a déficits hídricos de diferentes níveis de intensidade. Além disso, em altas concentrações, exercem pouco ou nenhum efeito sobre a interação de macromoléculas solventes. Não existem relatos sobre o acúmulo de substâncias osmoprotetoras em plantas jovens de *Alcantarea imperialis* relacionada à sua resistência ao déficit hídrico.

OBJETIVOS

Considerando que plantas rupícolas devem apresentar adaptações para sobreviverem a este ambiente, caracterizado por uma baixa disponibilidade hídrica, este trabalho tem por objetivo verificar o conteúdo de carboidratos existentes em plântulas de *Alcantarea imperialis* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes potenciais hídricos, visando avaliar a capacidade de plantas jovens de tolerarem o déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Estabelecimento do cultivo *in vitro* das plantas sob diferentes potenciais hídricos

Sementes de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms foram obtidas de indivíduos da Coleção de Bromélias da Seção de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo, no segundo semestre de 2006. Os apêndices plumosos foram removidos e as sementes foram desinfestadas por imersão em etanol 70% durante 5 min, seguida de imersão em solução de Benomyl a 1% por 20 min e posteriormente em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5%, contendo 5 gotas de Twin 20 por uma hora, sempre em agitação contínua.

Após a desinfestação, as sementes foram lavadas em câmara de fluxo laminar com água destilada e transferidas para placas de Petri contendo 10 mL de meio de cultura de Murashige & Skoog (1962). O meio, contendo a concentração de micronutrientes original e de macronutrientes reduzida à metade, com adição de 100 mg L⁻¹ de mio - inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de Agar, foi previamente esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado para 5,8. O material foi mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 26 ± 2°C.

Após 12 meses de cultivo *in vitro*, as plantas foram transferidas para novo meio de cultura, com a mesma composição e sem Agar (meio líquido), pH ajustado para 5,8, contendo diferentes concentrações de polietilenoglicol 6000 (PEG), compondo os seguintes tratamentos: T1 = controle (sem PEG) (yw = - 0,5 MPa); T2 = 15% de PEG (w = - 0,95); T3 = 30% de PEG (w = - 4,7 MPa); T4 = 45% de PEG (w = - 8,5 MPa); T5 = 60% de PEG (w = - 17 MPa). Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições (frascos) contendo 5 plantas em cada.

Após 24 dias, as plantas foram coletadas, lavadas em água destilada e submetidas às análises biométricas. Para a análise de carboidrato, amostras de folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a - 80°C até realização das análises.

2. Análises Biométricas

Após a coleta, as plantas foram separadas em partes aérea e raiz para determinação da biomassa fresca. Foram avaliados o número de folhas verdes, o número de folhas mortas, o comprimento da parte aérea, o número e o comprimento das raízes. A biomassa seca foi determinada após secagem em estufa a 60 °C até a que atingissem massa constante.

3. Extração de carboidratos

Amostras de folhas, previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram liofilizadas até a secura e submetidas à fervura por 5 min em etanol 80%. Em seguida, foram maceradas em almofariz, mantidos em banho - maria a 80 °C por 15 min e centrifugados por 15 min a 1082 g, em temperatura ambiente. Os precipitados foram re - extraídos duas vezes com etanol 80%, a 80 °C. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório a 40 °C, sendo ressuspensos em água destilada. O conteúdo de carboidratos totais e açúcares redutores foram determinados pelo método de fenol - sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e Somogyi - Nelson (Somogyi, 1945), respectivamente, utilizando - se glucose como padrão.

RESULTADOS

A avaliação dos parâmetros biométricos mostrou que mesmo sob estresse severo, as plantas da bromélia imperial não pereceram, apenas apresentaram algumas folhas mortas, cerca de três folhas, quando submetidas a - 17 MPa. Essa quantidade não deferiu do observado em plantas mantidas a - 0,95, que apresentou o mesmo valor de mortalidade foliar.

A diminuição do potencial osmótico no meio de cultura promoveu aumento de biomassa aérea e de raízes da bromélia imperial. Tanguilig e colaboradores (1987) sugerem que o aumento da biomassa em condições de déficit hídrico seja um mecanismo adaptativo das plantas sob essas condições. Esse resultado pode indicar a adaptação dessa bromélia ao déficit hídrico provocado em cultura, o que provavelmente indica sua capacidade para sobreviver na condição natural de ambiente rupícola, para o qual as plantas necessitam de um eficiente sistema radicular para a fixação à rocha.

O teor de umidade das partes aérea e subterrânea apresentou diminuição com o acréscimo de PEG ao meio de cultura, sendo mais acentuado na concentração de 60%. Segundo Souza e colaboradores (1999a), a redução constante do teor de água nas plantas é naturalmente explicada pela retirada de água dos tecidos, em função da redução do potencial osmótico do meio de cultura, isto é, ocorre uma inversão da direção do fluxo de água.

Os carboidratos totais e, em especial, os açúcares redutores, apresentaram tendência ao aumento conforme se diminuiu o potencial osmótico do meio de cultura. Esse aumento, provavelmente, foi uma das estratégias presentes nas plantas jovens para conservar a turgescência dos tecidos, em especial nas concentrações de PEG entre 15% a 45%, quando não houve diminuição significativa do teor de água dos tecidos. O aumento de substâncias osmorreguladoras, como os carboidratos, ocasiona o acúmulo de substâncias orgânicas de baixo peso molecular nos compartimentos celulares e no citosol, diminuindo o potencial hídrico das células, o que permite a manutenção da turgescência dos tecidos (Pimentel, 2004), como verificado, especialmente, nas plantas mantidas a concentrações de 15% a 45% de PEG.

Segundo Bader e colaboradores (2009), a tolerância à falta de água de uma espécie adulta se desenvolve já nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta. Nossos resultados indicam que o mesmo ocorre em plantas jovens de *A. imperialis*, que, embora não apresentem tanque, desenvolvem

estratégias de acúmulo de biomassa e carboidratos para tolerar o déficit hídrico.

CONCLUSÃO

Essa espécie tem apresentado grande plasticidade fisiológica frente a estresses ambientais, como por exemplo, baixas temperaturas (Mollo, 2009), variando o conteúdo de carboidratos, bem como a alocação de biomassa. Isto permite utilizar *Alcantarea imperialis* como um modelo para estudos que enfoquem a fisiologia do estresse em plantas.

REFERÊNCIAS

- Bader, M.Y., Menke, G., Zozt, G.** Pronounced drought tolerance characterizes the early life stages of the epiphytic bromeliad *Tillandsia flexuosa*. *Funct. Ecol.*, 23: 472 - 479, 2009.
- Baijji, M., Lutts, S., Kinet, J.M.** Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.*, 160: 669-681, 2001.
- Benzing, D.H.** *Bromeliaceae - Profile of an adaptive radiation*. London, Cambridge University Press, 2000, 690p.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S.** Understanding plant responses to drought-from genes to whole plant. *Funct. Plant Biol.*, 30: 239 - 264. 2003.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356, 1956.
- Kusaka, M., Ohta, M., Fujimura, T.** Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. *Physiol. Plantarum*, 125: 474-489, 2005.
- Leme, E.M.C., Marigo, L.C.** *Bromélias na natureza*. Rio de Janeiro, Marigo Comunicação Visual Ltda, 1993, 183p.
- Mercier, H., Nievola, C.C.** Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. *Vidália*, 1: 57 - 62, 2003.
- Mollo, L.** Efeito da temperatura no crescimento, no conteúdo e na composição de carboidratos não - estruturais de plantas de *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms (Bromeliaceae) cultivadas *in vitro*. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009, 90p.
- Murashige, T., Skoog, F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473 - 497, 1962.
- Nievola, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L.; Souza, B.M., Mercier, H.** Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in peniapple plantlets grown *in vitro*. *In vitro Cell Dev - Pl.*, 41: 832 - 837, 2005.
- Pierik, R.L.M.** *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987, 343 p.
- Pimentel, C.** *A relação da planta com a água*. Soropédica, Edur, 2004, 191p.
- Ramanjulu, S., Bartels D.** Drought - and desiccation - induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.*, 25: 141 - 151, 2002.
- Somogyi, M.** A new reagent for the determination of sugars. *J Biol. Chem.*, 160: 61 - 63, 1945.
- Souza, G.M., Gonçalves, A.N., Neto, N.B.M.** Crescimento *in vitro* de progênies de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. sob condições de deficiência hídrica. *Sci Agricola*, 56: 557 - 562, 1999a.
- Souza, G.M., Gonçalves, A.N., Almeida, M.** Water deficit in relation to leaf and stem anatomy of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. shoots cultivated *in vitro*. *Sci Agricola*, 56: 723 - 731, 1999b.
- Takahashi, C.A., Ceccantini, G.C.T., Mercier, H.** Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions on a tank epiphytic bromeliad. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19:119 - 126, 2007.
- Tanguilig, V.C., Yambao, E.B., O'Toole, J.C., De Datta, S.K.** Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. *Plant soil*, 103: 155 - 168, 1987.
- Yamada, N., Morishita, H., Urano, K. Shiozaki, N., Yamaguchi - Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshiba, K.** Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J Exp Bot.*, 56: 1975 - 1981, 2005.